

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K16777

研究課題名（和文）早産におけるケモカインシステムの分子病理学的研究

研究課題名（英文）The mechanism of chemokine system in preterm labor

研究代表者

溝口 美佳（MIKA, MIZOGUCHI）

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80647561

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はケモカインネットワークに着目し、早産におけるケモカインシステムの関連を解明しようとしている。まず、LPS腹腔内投与によるマウス早産モデルを確立した。そのモデルを用いて、野生型とCX3CR1欠損マウスで早産率を比較すると有意にCX3CR1欠損マウスで低くなることが分かった。そのメカニズムとして、CX3CR1欠損マウスで子宮へのマクロファージの遊走が抑制され、炎症性サイトカインの産生の抑制につながる事が分かった。また、早産妊婦の血清中でCX3CL1が有意に上昇をしていることから、野生型マウスに抗CX3CL1抗体を投与すると早産が抑制されることも同定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本の周産期死亡率は世界一低く、早産率は約5%である。しかし、早産児・特に早期早産児の死亡率はいまだに高く、先天奇形を除く周産期死亡の最大の原因を早産児が占めている。早産児の長期予後には、脳質周囲白質軟化症、未熟児網膜症、壊死性腸炎等の問題が指摘される。児の予後を改善するためには、早産そのものを減少させることが重要である。現在は安静・子宮収縮抑制剤など対症療法が治療の中心で、それだけでは分娩に至ってしまう症例も多い。早産の詳細なメカニズムを解明することが病態解明・治療に繋がると考え、早産の新たな治療戦略の基盤を構築することが、この研究成果の意義である。

研究成果の概要（英文）：This study focuses on the chemokine network and aims to elucidate the relationship of the chemokine system in preterm labor(PTL). First, we established LPS-induced PTL mice model. Using this model, we found that the PTL rate was significantly lower in CX3CR1-deficient mice than in wild-type(WT) mice. We detected that migration of macrophages to the uterus was suppressed in CX3CR1-deficient mice, which led to the suppression of inflammatory cytokine production. CX3CL1 was significantly elevated in the serum of PTL. The administration of anti-CX3CL1 antibodies to WT-mice suppressed PTL.

研究分野：産科学

キーワード：早産 ケモカイン 産科学 サイトカイン 切迫早産 前期破水 羊水 プロゲステロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国の早産の頻度は約5%であるも、2005年以降低下を認めていない。早期早産児の死亡率はいまだに高く、周産期死亡の大きな原因である。早産児の長期予後には、脳質周囲白質軟化症、未熟児網膜症、壊死性腸炎等さまざまな問題が指摘され、これらの児の予後を改善するためには、早産そのものを減少させることが重要である。

分娩の機序において、子宮収縮に先立って脱落膜、羊膜、子宮頸管などの妊娠組織に好中球やマクロファージを主体とする免疫細胞が流入する。ケモカインは細胞遊走能を誘導するサイトカイン様物質であり、こうした免疫細胞の流入を調節している。ケモカインの中でも、CXCL8及びCCL2は分娩中のヒト子宮筋、脱落膜、羊膜、子宮頸管に強く発現しており広く研究されている。他にも多数のケモカインが早産を含む分娩中の妊娠組織、羊水及び母体血中に発現していることが報告されており、分娩に先立つ妊娠組織への免疫細胞を抑制することが早産の抑制につながると考え、今回ケモカインを研究の対象とした。

2. 研究の目的

現在の早産治療の中心である子宮収縮抑制剤は早産を減少させるという明確なエビデンスは無く、早産のさらなる病態解明、さらには新規治療法の開発を目的とし本研究を行った。

本研究ではケモカインレセプターCX3CR1ノックアウト(KO)マウスを用いて、LPS誘導早産におけるCX3CL1(Fractalkine)-CX3CR1システムの役割について検討した。

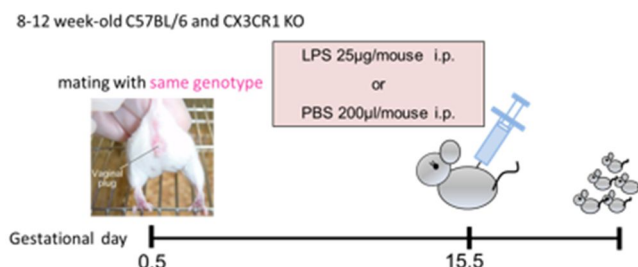
3. 研究の方法

(1) ヒトサンプルでのCX3CL1の発現

倫理委員会の承認を得て、当院で分娩した妊婦血清を早産群 正常産帝王切開群 正常産陣痛発来群 早産群と同妊娠週数で採血し正常分娩となった群の4群に分け、ELISAを用いて血清CX3CL1を測定し比較検討した。また胎盤で免疫組織学染色を行いCX3CL1の発現を同定した。

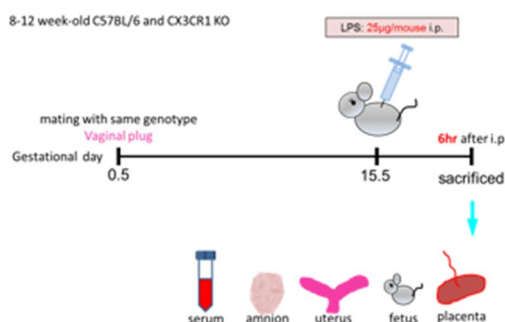
(2) LPS誘導早産マウスモデルの確立と早産率の比較

同遺伝子型マウスで交配し、vaginal plugの同定日をgestational day(gd)0.5と決定する。gd15.5にLPS25 μ gを腹腔内投与し分娩まで観察し早産率を野生型c57BL/6(WT)とKOマウスで比較する。



(3) 子宮における遊走免疫細胞と炎症性サイトカイン及びケモカインの比較

WT及びKOマウスでLPS投与6時間後に羊膜、胎盤、子宮及び血清を採取した。免疫組織学染色で脱落膜における免疫細胞数、RT-PCRにて子宮における炎症性サイトカイン及びケモカイン等を比較した。蛍光二重免疫染色も行い脱落膜マクロファージにおける炎症性サイトカインの分泌を同定した。血清CX3CL1をELISAで測定し検討を行った。



(4) 抗CX3CL1抗体の治療効果の検討

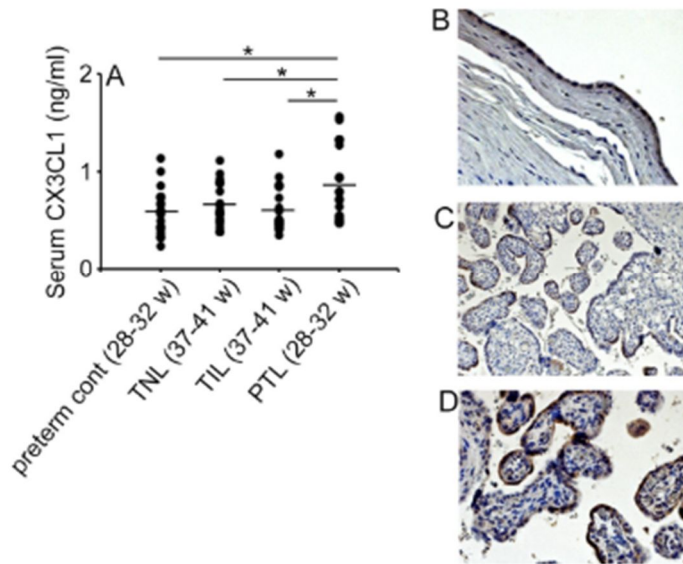
LPS投与3時間後に抗CX3CL1中和抗体200 μ gを腹腔内投与し分娩まで観察した。

4. 研究成果

(1) ヒトサンプルでの CX3CL1 の発現

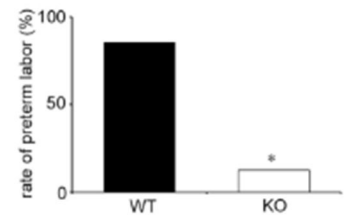
早産妊婦血清では他群と比較して血清 CX3CL1 が有意に上昇していた (Figure A).

胎盤の免疫組織学染色では羊膜上皮細胞と絨毛の syncytiotrophoblast に CX3CL1 の発現を認めた (Figure B-D).



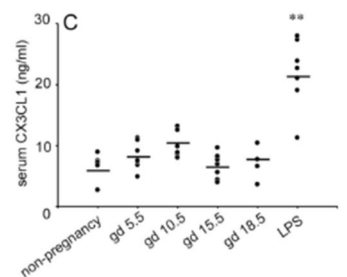
(2) LPS 誘導早産マウスモデルの確立と早産率の比較

gd15.5 に LPS を投与された WT マウスは 24 時間以内に分娩となり, 仔マウスは未熟性のため生存できなかった. 母体マウスの死亡は認めなかった. KO マウスでは有意に早産が抑制された. (WT85.7%, KO12.5% P=0.017).

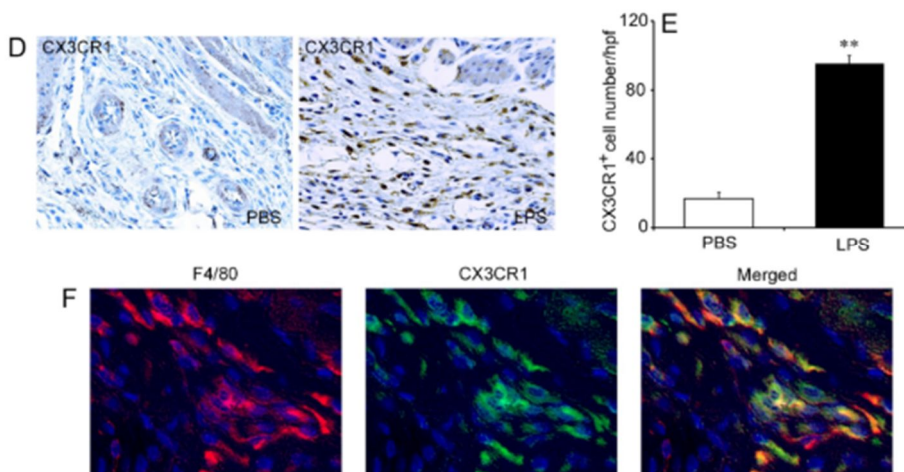


(3) 子宮における免疫細胞と炎症性サイトカイン及びケモカインの比較

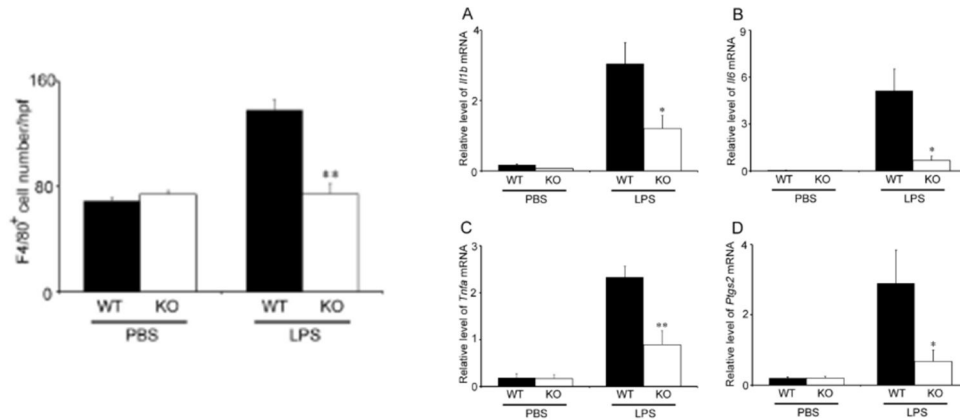
マウス血清中 CX3CL1 は gestational day の推移では大きな変化は示さなかったが, LPS 投与 6 時間後には有意に増加していた (Figure C).



LPS 投与により CX3CR1 陽性細胞の子宮への遊走を認め, 免疫組織学染色からマクロファージであることが同定された (Figure D-F).

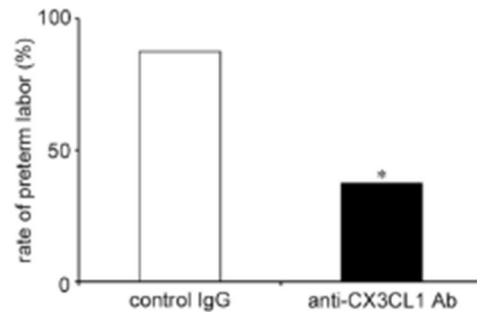


マクロファージの子宮への遊走はKO マウスで有意に抑制され、RT-PCR では *Ii-1* , *Ii-6*, *Tnf* , *Ptgs2* の遺伝子発現が KO マウスで有意に抑制されていた。蛍光二重免疫染色では子宮へ遊走したマクロファージより上記サイトカインが分泌されていることが同定された。



(4) 抗 CX3CL1 中和抗体の治療効果の検討

抗 CX3CL1 中和抗体は早産率を約 50% 減少させた(無治療群 87.5% , 治療群 37.5% P=0.039) .



(5) 総括

母体の CX3CR1 欠損及び抗 CX3CL1 抗体により早産が抑制されることが示された。早産において, CX3CL1-CX3CR1 システムが子宮へのマクロファージの遊走に関与し, そのマクロファージが炎症性サイトカインを分泌し早産を惹起していることが示唆された。CX3CL1-CX3CR1 システムの標的治療が新規早産治療のひとつとなる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 溝口 美佳、平山 純也、中田 久実子、南條 佐輝子、小林 彩、太田 菜美、八木 重孝、南 佐和子、井籠 一彦	4. 巻 71
2. 論文標題 症例 夫婦ともにEhlers-Danlos症候群を有し常位胎盤早期剥離に至った1例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 産婦人科の実際	6. 最初と最後の頁 673～677
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18888/sp.0000002185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizoguchi M, Ishida Y, Nosaka M, Kimura A, Kuninaka Y, Yahata T, Nanjo S, Toujima S, Minami S, Ino K, Mukaida N, Kondo T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Prevention of lipopolysaccharide-induced preterm labor by the lack of CX3CL1-CX3CR1 interaction in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0207085. eCollection 2018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 溝口美佳
2. 発表標題 夫婦ともにEhlers-Danlos症候群を有し常位胎盤早期剥離に至った1例
3. 学会等名 日本周産期・新生児学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 溝口美佳
2. 発表標題 夫婦ともにEhlers-Danlos症候群を有し妊娠・出産に至った1例
3. 学会等名 日本遺伝カウンセリング学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mika Mizoguchi, Kumiko Nakata, Yoshihiro Takiguchi, Tamaki Yahata, Sakiko Nanjo, Noriyuki Sasaki, Nami Ota, Yasushi Mabuchi, Shigetaka Yagi, Sawako Minami, Kazuhiko Ino
2. 発表標題 Advanced hepatoid carcinoma of the ovary with lung and liver metastases
3. 学会等名 第71回 日本産婦人科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mika Mizoguchi, Tamaki Yahata, Sakiko Nanjo, Madoka Yamamoto, Sawako Minami, Kazuhiko Ino
2. 発表標題 Prevention of LPS-induced preterm labor by the lack of CX3CL1-CX3CR1 interaction in mice
3. 学会等名 第70回 日本産婦人科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 溝口美佳、八幡環、太田菜美、八木重孝、熊谷健、南佐和子、井籠一彦
2. 発表標題 過去10年間当院で管理した18トリソミー症例の検討
3. 学会等名 第54回 日本周産期・新生児学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mika Mizoguchi, Kumiko Nakata, Naoyuki Iwahashi, Yoshihiro Takiguchi, Tamaki Yahata, Yasushi Mabuchi, Shigetaka Yagi, Sawako Minami, Kazuhiko Ino
2. 発表標題 A case report of advanced hepatoid carcinoma of the ovary with lung and liver metastases
3. 学会等名 The 17th BIENNIAL MEETING OF THE INTERNATIONAL GYNECOLOGIC CANCER SOCIETY (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------