

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08307

研究課題名(和文) 胎児が制御する羊膜・絨毛膜の恒常性維持機構とその破綻

研究課題名(英文) Fetal signal-mediated maintenance of intrauterine environment

研究代表者

石本 人士 (ISHIMOTO, HITOSHI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10212937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胎児膜の恒常性維持に関わる胎児因子として胎児特異的蛋白midkine(MDK)に着目し以下の結果を得た。羊膜上皮細胞培養でMDKはプロゲステロン(P4)の受容体(核型・膜性)や代謝酵素、局所産生酵素のmRNA発現を変化させなかった、羊膜組織培養でMDKはadrenomedullin mRNA発現を抑制した、ヒト胎児肺でMDKは肺胞上皮に局在し、この染色強度と肺MDK mRNAレベルは妊娠32週以降で著明に減少した、A549細胞でデキサメサゾン量は量依存的にMDK mRNA発現を抑制した、NCI-H441細胞で低濃度(妊婦生理的濃度範囲内)P4添加はMDK mRNA発現を増強した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の成果は「MDKは胎児肺で産生され、羊水中に出て羊膜に働きかけ妊娠維持に働く。そして妊娠末期に肺での産生と羊水中濃度が低下して分娩発来の一因となる」、という作業仮説において、肺と羊水中のMDK動態を説明するものであり、MDKが妊娠維持に働く胎児シグナルである可能性が高まったといえる。このような知見の積み上げは、妊娠維持機構の破綻(早産や前期破水など)の予防を模索する上で重要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：In search for fetal factors involved in the maintenance of fetal membranes, we studied on midkine (MDK) that shows fetus-specific expression. Obtained data is as follows: 1) in human amniotic epithelial cells, MDK did not change mRNA expression of progesterone-related factors including PGR, PGRMC1, PGRMC2, SRD5A1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1D1, and HSD17B2; 2) MDK suppressed ADM mRNA expression in human amnion tissue, 3) in human fetal lung, MDK protein was localized in alveolar epithelial cells, and MDK staining intensity and MDK mRNA expression in the lung were remarkably low at over 32 weeks of gestation compared to those at earlier weeks, 4) in A459 lung cells, dexamethasone decreased MDK mRNA expression in a dose-dependent manner; and 5) in NCI-H441 lung cells, addition of progesterone, at lower concentrations within physiological range for pregnant women, augmented MDK mRNA expression.

研究分野：周産期医学

キーワード：羊膜 胎児肺

1. 研究開始当初の背景

胎生動物において在胎期間は種特異的に決まっているが、これは母体が分娩を安全に遂行することができ、かつ児が胎外生活を開始する上での最良のタイミングが決まっているということの意味する。「胎児由来のシグナル」により在胎期間=分娩のタイミングが決定されるとする胎児シグナル説は、胎児の成熟の終了が分娩のタイミングを決めるという点で極めて合理的であり、ヒトのように少ない数の同胞が一回の分娩で生まれる場合には、個々の児の生存にとって有利となる。ヒトではこのような明らかな胎児シグナルはこれまでに発見されていない。また胎児シグナルは、分娩惹起シグナルと妊娠維持シグナルという二つの観点から捉え得る。これまでの国内外の研究では後者の観点からの検討は少ない。

胎児と羊水腔を包む卵膜のうち、羊水中に直接接する羊膜とその外側の絨毛膜は受精卵に由来し、胎児膜(fetal membranes; FM)と呼ばれる。羊水腔側から母体(脱落膜・子宮筋層)側に伝達される物質としてはプロスタグランジン(PGs)がある。PGsは陣痛発来に中心的な役割を有する。妊娠子宮内で最もPG産生が盛んなのは羊膜であり主にPGE₂を産生する。妊娠後半にはPG合成の律速段階に関わるcyclooxygenase-2(COX2; PTGS2)発現が徐々に増加する。しかし絨毛膜にはPG脱水素酵素(PGDH)が高発現しているため、羊膜(一部絨毛膜)で産生されるPGE₂は脱落膜に達せず代謝されてしまう。やがてCOX2とPGDHの発現バランスが変化し、絨毛膜を通過しうるPGE₂が増加することになる。PGE₂では頸管熟化促進、羊膜・絨毛膜の脆弱化促進、妊娠子宮の子宮収縮作用が知られる。我々は、培養羊膜上皮細胞に成長分化因子Midkine(MDK)を羊水中濃度相当添加するとCOX2発現とPGE₂産生が濃度依存的に抑制されること、妊娠中期羊水にはMDKは高濃度で存在するが後期には著明に減少することを報告した(日産婦学会,2012)。最近、米国のRobert Romeroらも羊水中のMDK濃度については同様の成績を報告している(PLoS One, 2016)。羊水中MDKの役割が注目されるが、MDKによる詳細なCOX2発現抑制機序やPGDH発現に与える影響、またin vivoに近い系でのPGE₂産生・COX2発現抑制作用については検討されておらず、またMDKの他の作用についても未解明である。

羊水中MDKの主な産生源については、羊水中に接する組織のMDK mRNA発現の予備的結果から、我々は胎児肺に着目している。一般にMDKは妊娠中期の胎児組織に高発現するが、齧歯類胎仔肺でもMDK発現プロファイルはこれに合致し、妊娠末期には発現が減弱する。また胎仔肺でのMDK局在は羊水と接する肺胞上皮細胞であることが示されており(Reynolds PR et al: Dev Dyn, 2003)、ヒトにおいて胎児肺が羊水中MDKの産生源である可能性は高い。

胎児肺におけるMDK発現調節機構についてはまだ十分に解明されていない。齧歯類胎仔肺のMDK発現は肺成熟・発達に関わる糖質コルチコイドにより負の発現制御を受ける。胎児血中にも豊富に存在する性ステロイドによるMDKの発現調節については知られていない。

2. 研究の目的

本研究の大きな目的は、ヒトにおいて胎児由来のシグナルにより在胎期間=分娩のタイミングが決定されるとする胎児シグナル説を検証し、妊娠維持・分娩発来機構を制御する胎児シグナルの存在を示し、その制御機構の分子的基盤を明らかにすることである。そこで胎児由来と考えられる成長分化因子midkine(MDK)に着目し、「MDKは胎児肺由来の妊娠維持シグナルである」との仮説を立て、この仮説の検証を行う。具体的には、MDKの羊膜の遺伝子発現に与える影響、羊水中のMDK産生源候補である胎児肺における発現調節の検討である。

3. 研究の方法

ヒト羊膜は臨床研究審査委員会で承認された研究計画に従い、患者の同意を得て実験に供した。また肺胞・気道上皮細胞のモデルとして、A549細胞とNCI-H441細胞を用いた。

(1) MDKの羊膜の遺伝子発現に与える影響

MDKのプロゲステロン関連因子の遺伝子発現への影響：培養ヒト羊膜上皮細胞において、羊水中濃度相当のrecombinant human(rh)MDK添加(100ng/mL)が、重要な妊娠維持ホルモンであるプロゲステロン(P4)の受容体や局所生成・代謝系の遺伝子発現に与える影響についてrealtime RT-PCR法で検討した。

MDKのadrenomedullin(ADM)遺伝子発現への影響：ヒト羊膜組織培養にrhMDK(100ng/mL)を添加し、と同様にMDKによる遺伝子発現調節を検討した。

(2) 胎児肺におけるMDK発現、局在の検討

商業的に入手したヒト胎児肺由来のmRNAと組織切片を用いて、realtime RT-PCR法と免疫組織染色によりMDK発現と局在を検討した。

(3) ヒト肺胞上皮細胞モデルにおけるMDK発現の糖質コルチコイド、プロゲステロンによる調節

ヒト肺胞上皮細胞モデルとして、A549細胞およびNCI-H441細胞を用い、合成糖質コルチコイドであるデキサメタゾン(DEX)やプロゲステロン(P4)を添加し、DEXやP4の量依存的なMDK mRNA

発現変化を realtime RT-PCR 法で検討した。

4. 研究成果

(1) MDK の羊膜の遺伝子発現に与える影響

rhMDK 添加 72 時間後の mRNA 発現を realtime Taqman RT-PCR 法で検討したところ、PGR は基礎レベルでは発現が非常に低く、また rhMDK 添加による変化も認められなかった。PGRMC1 や PGRMC2 の発現レベルは高かったが、同様に rhMDK 添加による影響は認められなかった。また P4 局所代謝系 (SRD5A1, AKR1C1~C3, AKR1D1) や局所生成系 (HSD17B2) の mRNA 発現も rhMDK 添加で変化がなかった。これまでの検討で、ヒト羊膜上皮細胞培養系では rhMDK により COX2 mRNA 発現と PGE2 産生が濃度依存的に抑制されることが判明している。これまでにヒト羊膜上皮細胞培養系では rhMDK により COX2 mRNA 発現と PGE2 産生が濃度依存的に抑制されることが判明している。よって、MDK は P4 とは独立した機序で妊娠維持に関与している可能性があるものと考えられた。

以前の培養羊膜上皮細胞への MDK 添加による発現差異解析 (RNA-seq) の結果から、MDK により発現減少し、かつ高発現レベルである遺伝子として adrenomedullin (ADM) が MDK のメディエーター候補の一つとして挙がっている。そこで、ヒト羊膜組織培養系に rhMDK (100ng/mL) を添加し、MDK による ADM mRNA 発現調節を検討したところ、羊膜全体としても rhMDK は ADM mRNA 発現を減少させ負の制御が認められた。ADM の羊膜での作用は未知だが、一般的には血管増生への関与が知られる。MDK は羊膜上皮細胞で血管増生因子である VEGF-A も発現抑制することが判明していることから、MDK は羊膜の無血管状態を維持する恒常性機構を担っている可能性がある。

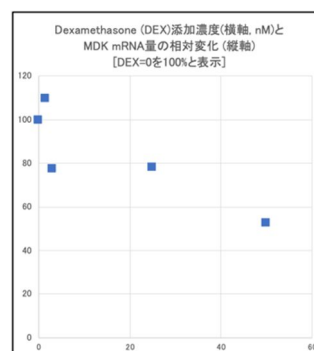
(2) 胎児肺における MDK 発現、局在の検討

羊水中 MDK の由来候補である胎児肺での MDK mRNA 発現量について realtime RT-PCR 法を用いた解析を行い、妊娠 32 週以降の胎児肺では、妊娠中期 (妊娠 32 週未満) に比べて有意に低発現であることが示された。これに呼応するようにヒト胎児肺切片を用いた免疫組織染色では、妊娠中期では肺胞上皮に一致して MDK 陽性であったが、妊娠末期では MDK 発現はほぼ見られなかった。肺胞上皮は肺胞内・気道内液の出入りを通じて羊水に接している。よって胎児肺における MDK の妊娠中の発現変化や局在パターンは、妊娠中期以降著明に減少する羊水中 MDK 濃度の推移と一致し、胎児肺が羊水中 MDK の産生源であることの傍証であると考えられた。

(3) ヒト肺胞上皮細胞モデルにおける MDK 発現の糖質コルチコイド、プロゲステロンによる調節

糖質コルチコイドによる MDK 発現調節

A549 細胞では、MDK mRNA 発現の DEX 量依存的な変化を呈した。すなわち DEX 高濃度添加 (24 時間) で MDK mRNA の発現抑制が見られた (右図)。MDK は我々の予備的検討から胎児副腎皮質細胞においてコルチゾールの産生抑制をおこすと考えられるが、近年齧歯類では、胎児肺においてはこれとは逆に MDK の発現が糖質コルチコイドにより抑制されていることが示されている。今回の A549 細胞での結果はこれと合致する。妊娠末期には、ヒト胎児血中および羊水中コルチゾール濃度が急上昇することが知られるが、これにより羊水に接する肺胞上皮細胞で MDK 産生が減少し、羊水中の MDK 濃度が減少し、羊膜上皮を介した MDK の妊娠維持作用が減弱する可能性が示唆された。一方、A549 細胞とほぼ同条件で培養した NCI-H441 細胞ではこのような変化がなく、A549 細胞で MDK 発現が抑制された濃度においても MDK 発現は抑制されなかった。ただし NCI-H441 細胞では血清添加の有無などの諸条件により、特定の遺伝子で基礎遺伝子発現量が大きく変化することが知られており、今後、チャコール処理血清を用いる、より妊娠中のホルモン環境に近い条件で培養を行う等の検討を要する。



プロゲステロン (P4) による MDK 発現調節

妊娠維持の必須ホルモンであるプロゲステロン (P4) に対しては、NCI-H441 細胞において妊娠中の生理的 P4 血中濃度の低濃度の範囲の添加では、MDK 発現増強が見られた。これは MDK が P4 依存性に調節される可能性を示しており、今後ヒト胎児由来肺胞上皮細胞での検討を要する。

以上のように得られた実験結果から、羊水中の MDK の由来が胎児肺であることを示唆する成果が集積してきている。現在の作業仮説は、「MDK は胎児肺で産生され、羊水中に出て高濃度で存在し、羊膜に働きかけ妊娠維持に働く。そして妊娠末期に羊水中濃度が低下して分娩発来の一因となる」というものであるが、後半の羊水中 MDK の羊膜への作用については、今後 ADM など MDK のメディエーター候補について順に検討し追究して行きたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1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 石本 人士	4. 巻 51増刊
2. 論文標題 陣痛(分娩)発来機序	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 周産期医学	6. 最初と最後の頁 290-295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 石本 人士	4. 巻 52
2. 論文標題 胎盤・胎児ステロイド代謝の総論	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 周産期医学	6. 最初と最後の頁 15-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Kashiwagi Hirofumi, Ishimoto Hitoshi, Izumi Sun-ichiro, Seki Toshiro, Kinami Rihito, Otomo Asako, Takahashi Kazumi, Kametani Fuyuki, Hirayama Noriaki, Sasaki Erika, Shiina Takashi, Sakabe Kou, Mikami Mikio, Kametani Yoshie	4. 巻 10
2. 論文標題 Human PZP and common marmoset A2ML1 as pregnancy related proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61714-8	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石本 人士
2. 発表標題 ヒト胎児副腎 この未知なる大きな臓器
3. 学会等名 第28回日本ステロイドホルモン学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 石本人士、他57名	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 697
3. 書名 標準産科婦人科学 第5版	

〔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
研究分担者	亀谷 美恵 (Kametani Yoshie) (50338787)	東海大学・医学部・准教授 (32644)	
研究分担者	後藤 優美子 (Goto Yumiko) (50624574)	東海大学・医学部・講師 (32644)	
研究分担者	宮澤 昌樹 (Miyazawa Masaki) (30624572)	東海大学・医学部・客員講師 (32644)	
研究分担者	柏木 寛史 (Kashiwagi Hirofumi) (10710460)	東海大学・医学部・助教 (32644)	
研究分担者	宮澤 麻里子 (Miyazawa Mariko) (80637091)	東海大学・医学部・特定研究員 (32644)	

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
---------	---------