

令和 4 年 9 月 7 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08331

研究課題名(和文) 無菌性炎症からアプローチする新しい早産の臨床 - 新規の診断・治療を模索する -

研究課題名(英文) Sterile Inflammation - A novel approach to preterm birth -

研究代表者

島 義雄 (SHIMA, YOSHIO)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：70714765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：周産期に関する医療水準がきわめて高い我が国において、早産は依然として大きな課題であるが、これまでは臨床・基礎のいずれにおいても感染に基づく事象として解析や研究が重ねられてきた。しかし、実際にはそれを証明できない事例の方が多いため、妊娠や成長によって変容する自己に対して惹起される炎症(無菌性炎症)に焦点した研究を行った。その結果、早産の胎盤組織や出生後の早産児において、内因性の分子構造が免疫担当細胞群を活性化することで炎症が起動し、種々の病態の形成に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の周産期医療の大きな課題である早産の臨床において、これまでのような感染を中心とした解析や研究では、詳細不明としか分類し得なかった多くの事例に対して、無菌性炎症という新たな視点を与えることで、検査や治療的アプローチについてより幅広い選択肢を提供できる可能性を提言することができた。今後、本研究を基礎とした臨床応用が進められることで、早産そのものの予防や、早産児の予後をさらに改善して国民の福祉に貢献できるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Preterm birth remains a major health issue in Japan, despite its high levels of standard care. Infection has been considered as a central role in preterm births and their consequence, however, it is not proven in many cases in practice. The research focused on inflammation evoked by self-component around the perinatal period, with the results that endogenous molecular patterns in placental tissue or clinical specimens from preterm infants activated innate immune system and contributed to pathophysiology.

研究分野：周産期医学

キーワード：sterile inflammation preterm birth

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症の本質は生体の恒常性維持にあり、元来は変容した自己(劣化や損傷、ストレスによる影響など)の原状回復をするために発動しているが、臨床医学の多くの分野では、さらに上位の原因となる病原体や異物の排除に関わる事象に関心の重きが置かれてきた。病的な分娩である早産は、国際的な医療水準がきわめて高いわが国の周産期医療においてもなお、大きな課題となっているが、疫学的に子宮内感染の関与が明らかであるので、大部分の先行研究はやはり外因の作用の結果である感染症の文脈のなかで行われてきた。しかし、実臨床ではむしろ微生物学的にも病理学的にも感染を証明できない早産事例の方が多く、詳細不明と分類せざるを得ないことから、有効な対策の立案が困難であった。そこで本研究では炎症論の原点に立ち戻り、妊娠や胎児の成長という現象がまさに自己の大きな変容に他ならないことに着目し、内因に対して発動する炎症(無菌性炎症)を解析の中心課題に定め、早産に関する様々な病態の解明を試みることにした。

2. 研究の目的

正常な分娩は予定に従って整然と進行する炎症反応そのものであり、なんらかの理由によってそれが時間的プログラムを逸脱する早産も、分娩機転という現象としては差異を見出すことができない。そこで本研究では、感染の関与が証明できない早産を、自己由来の成分(アラミンと総称)に対する無菌性炎症の誤作動あるいは過剰応答であるとの立場を取り、その機序を免疫細胞学的に解明して早産の臨床における新しい診断指針や予防/治療戦略を構築するうえでの基礎的な知見を提供することを目的とした。さらに、出生した早産児に見られる特有の病態である慢性呼吸障害も、明らかに感染症が原因ではない場合には、日常の管理・治療のために行われる酸素投与や呼吸管理などの医療介入行為が惹起した無菌性炎症が遷延した結果であるとの考えを検証するために、早産児から臨床試料を得て同様にアラミン各種の動態に関する解析を試みた。

3. 研究の方法

● ヒト早産脱落膜に存在する免疫細胞の解析

症例は妊娠 24 週～33 週で分娩に至った早産胎盤から壁側脱落膜および基底脱落膜を採取、これら組織を破砕後細胞分離し主にフローサイトメトリーを用いて免疫細胞群を解析した。早産症例は全て病理検索により組織学的 CAM を有さないものを解析し、さらにこれら症例を破水または陣痛を有する群 (no CAM with labor/rupture of membrane: nCAM-w-LR, n = 23) とこれらを伴わ

ない群 (no CAM without labor/rupture of membrane: nCAM-wo-LR n = 10) に分け、CAM がいない症例での破水もしくは陣痛の発来起点に関与する免疫細胞を探索した(表 1)。nCAM-w-LR 群では妊娠週数が早いことも影響しておよそ 80%の帝王切開率、nCAM-wo-LR では陣痛がないので 100%の帝王切開率(適応はおもに NRFS および羊水過少、FGR、母体心疾患など)であった。

● 早産児における HMGB1 と慢性呼吸障害との相関

出生した早産児に見られる特有の病態である呼吸障害 (bronchopulmonary dysplasia :BPD)では、明らかに感染症が原因ではない症例を多く遭遇する。BPD は周産期を通じて慢性的な炎症反応によって、肺の発達の管状期または嚢状期における肺胞血管の成長が停止または変化した結果であると認識されている。最初の反応は、FGR、P-PROM、CAM などの出生前の要因に由来し、出

表 1. ヒト早産胎盤解析・患者背景

	破水/陣痛あり (n = 23)	破水/陣痛なし (n = 10)	p value
Maternal age (years)	33.30 (31.00-38.00)	32.20 (28.00-36.00)	0.52
Gestational age at delivery	31.00 (29.75-32.00)	31.50 (29.75-32.25)	0.56
Birthweight (g)	1424 ± 600	1525 ± 436.5	0.61
Nulliparity (n)	43.4% (10)	80.0% (8)	0.07
Delivery mode			0.11
Vaginal delivery	21.7% (5)	0% (0)	
Cesarean delivery	78.3% (18)	100% (10)	
Antenatal betamethasone administration	56.5% (13)	80.0% (8)	0.26

破水/陣痛なし群での帝王切開の適応(症例数): NRFSのみ(1)、NRFS+羊水過少(2)、NRFS+FGR(3)、NRFS+羊水過少+FGR(2)、NRFS+羊水過多(十二指腸閉鎖症、1)、母体心疾患(重度大動脈狭窄症、1)

Kato, Negishi, and Shima et al. 2020. *Am. J. Reprod. Immunol.*より改変

生後に蘇生、酸素補給、人工呼吸などの救命介入から生じる反応のその要因となる。すなわちいづれも明らかな病原性感染を必要としない。そのような背景の中、早産児の呼吸障害とアラミンである HNGB1 に何らかの相関を有するという仮説を立て、出生後の早産児血清 HMGB1 の動態を解析した。妊娠 33 週以前に生まれた未熟児 25 名(感染症例を除く)を対象に血清 HMGB1 濃度を ELISA 法にて測定、サンプルは出生時、2 週間後、4 週間後に採取され、BPD の有無で比較した。

表2. 早産児における慢性呼吸障害と血清HMGB1・患児背景

case	With BPD	Without BPD	p Value
Gestational age (weeks)	27.3±1.4	30.5±1.7	<.05
Birthweight (g)	875±227	1388±313	<.05
FGR	5 (42%)	5 (38%)	ns
P-PROM	1 (8%)	1 (8%)	ns
CAM	4 (33%)	4 (31%)	ns
Antenatal corticosteroids	8 (67%)	7 (54%)	ns
Surfactant replacement (repeat dose)	12 (100%) (5)	10 (77%) (0)	ns
Significant PDA	11 (92%)	2 (15%)	<.05
Return to birthweight (days)	16.8±2.9	13.8±2.4	<.05

FGR: fetal growth restriction; P-PROM: preterm-premature rupture of the membrane; CAM: chorioamnionitis; PDA: patent ductus arteriosus.

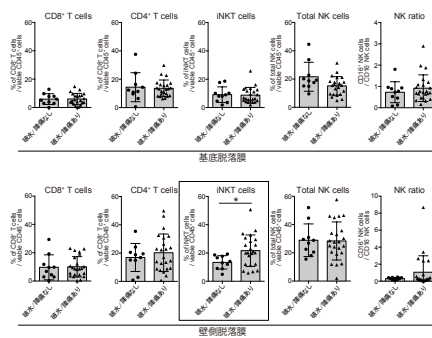
Shima et al. 2021, J. Maternal Fetal Neonatal Med. より抜粋

4. 研究成果

● ヒト早産胎盤膜中存在する免疫細胞の解析

✓ 結果 1. 破水・陣痛を伴う CAM(-)胎盤胎盤膜には、iNKT 細胞が集積している

まずこれら胎盤膜中の CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、natural killer (NK)細胞、invariant natural killer T (iNKT)細胞の数の割合を検索したところ、nCAM-wo-LR にくらべ nCAM-w-LR において壁側胎盤膜中の iNKT 細胞の割合が有意に高かった。その他の細胞群については有意な差を認めなかった(図 1)。

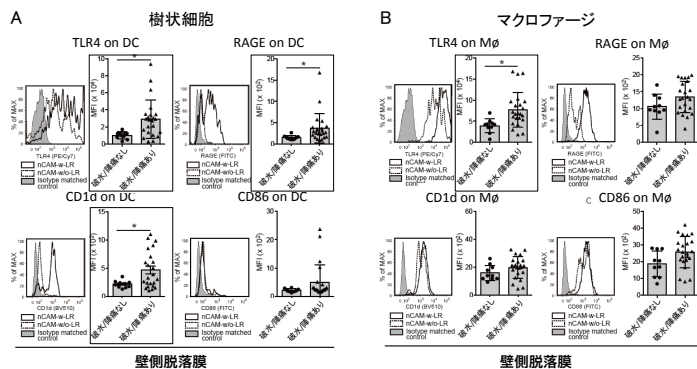


Kato, Negishi, and Shima et al. 2020, Am. J. Reprod. Immunol.より改変

図1. ヒト早産胎盤解析。胎盤膜中存在する免疫細胞の割合。

✓ 結果 2. 破水・陣痛を伴う CAM 陰性胎盤胎盤膜では、抗原提示細胞の免疫刺激活性は亢進している

つぎに抗原提示細胞数の割合を検索したところ、これら細胞上に発現する TLR4、Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)、CD1d、CD86 といった表面マーカーは、一部有意差はないものの概ね nCAM-wo-LR に比して nCAM-w-LR で発現が有意に高かった(図 2A、2B)。すなわち CAM(-)早産胎盤中の破水、陣痛発生には、DC やマクロファージなどの抗原提示細胞の免疫刺激活性が亢進している可能性が示唆された。



Kato, Negishi, and Shima et al. 2020, Am. J. Reprod. Immunol.より改変

図2. ヒト早産胎盤胎盤膜における、抗原提示細胞上の表面マーカー発現 (A)DC、(B)マクロファージ上のTLR4、RAGE、CD1d、CD86の発現。破水/陣痛なし群にくらべ破水/陣痛あり群において概ね亢進している(有意差ありは黒枠)。

✓ 結果 3. 破水・陣痛を伴う CAM 陰性胎盤胎盤膜中の細胞には HMGB1 の放出が亢進している

nCAM-w-LR で発現が亢進していた TLR4 や RAGE は、アラミンである HMGB1 (high mobility group box-1)の共通の受容体として知られている。そこで次に抗原提示細胞、また非免疫細胞 (CD45 陰性で定義)の細胞質内の HMGB1 の放出を、細胞内染色法を用いてフローサイトメーターにて解析したところ、一部有意差を認めないものの概ね DC、マクロファージ、非免疫細胞中の HMGB1 の放出が亢進していることが認められた(図 3A、3B)。すなわち、CAM (-)の破水、陣痛を有する症例では、各細胞内の HMGB1 レベルは亢進していることが示唆された。

✓ 結果 4. ヘパリンの抗炎症作用はアラミンの阻害か？

本邦において、流産を繰り返す不育症にはヘパリン療法が広く行われているが、最近このヘパリンは HMGB1 と結合しその構造変化を引き起こし、HMGB1-RAGE の相互作用を阻害するという興味深い報告がなされている¹。我々はこの報告をヒントに、「ヘパリンは抗原提示細胞とアラミンの結合を阻害して早産胎盤で増加していた iNKT 細胞の増殖抑制効果を有するのではないか」と考え、次の *ex vivo* の実験を試みた。破水、陣痛を伴わない term の定帝王切開で得られた胎盤脱落膜より磁気ビーズ法により iNKT 細胞および CD11c 陽性細胞 (DC、マクロファージを含む) を別個に分離し、iNKT 細胞を CFSE でラベリングしたのちコンビナント HMGB1、ヘパリンの存在下で CD11c 陽性細胞と共培養を行った。培養 24 時間後フローサイトメーターにて iNKT 細胞の増殖能を検討したところ、HMGB1 によって亢進した iNKT 細胞の増殖は、ヘパリン添加によって抑制されることが認められた (図 4A、4B)。ヘパリンは抗凝固作用の他抗炎症作用も有していることも知られているが、そのメカニズムは不明な点も多い。本研究の結果より、HMGB1-RAGE axis の阻害がヘパリンの抗炎症の作用点であり、結果流産予防効果を発揮し得るのではないかと推察している。

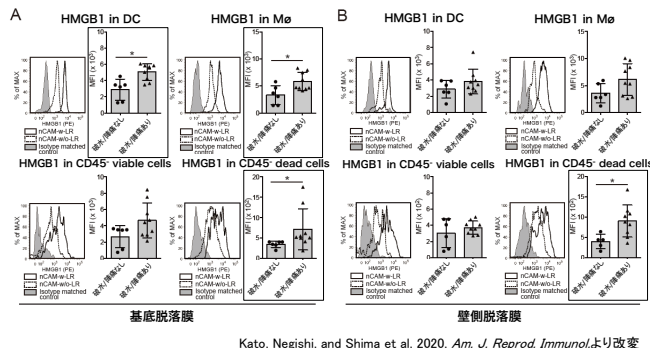


図3. ヒト早産胎盤脱落膜における、細胞内HMGB1レベル (A)基底脱落膜、(B)壁側脱落膜中の抗原提示細胞およびCD45⁺細胞中のHMGB1レベル。破水/陣痛なし群にくらべ破水/陣痛あり群において概ね亢進している (有意差ありは黒枠)。

✓ 考察 1. 新しい早産発症のメカニズム考察

以上の結果より、CAM を伴わない早産には、DC、マクロファージ、iNKT 細胞といった自然免疫系の活性化が、そのトリガーもしくは増悪因子になる可能性、また HMGB1 などのアラミンの関与が示唆された。そこで我々は、次のような自然免疫を中心とした新しい早産発症メカニズム仮説を考えている (図 5)。何らかの抗原刺激によって免疫刺激活性が亢進した DC、マクロファージなどの自然免疫細胞は、直接的もしくは間接的に iNKT 細胞を活性化する。この活性化した iNKT 細胞から大量の炎症性サイトカイン、細胞障害性物質 (パーフォリン、グランザイム B など) が放出され、胎盤局所に強い炎症が誘導され早産が発症するというものである。しかしながら、iNKT 細胞は頻回の刺激に対してすぐに不応状態 (アナジー) に陥ってしまうことが知られており¹⁹、そもそも生体に対する iNKT 細胞の割合は非常に少ない。そこで我々は、活性化した iNKT 細胞の細胞障害性によって、母体、胎児、胎盤の組織障害が生じ、そこから HMGB1 などの内因性抗原が放出、これらを抗原提示細胞が再認識しさらに炎症が亢進していく、炎症サイクルが生じている

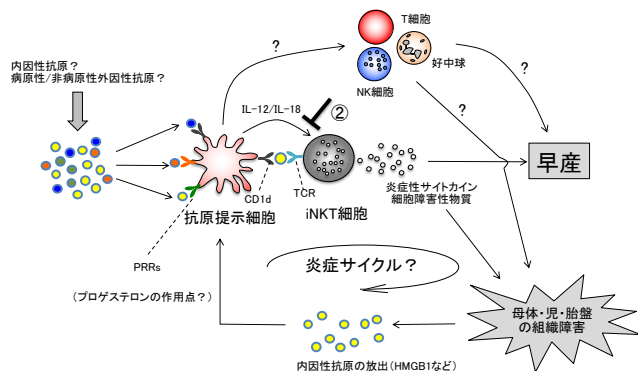


図5. 無菌性炎症に起因する流産発症メカニズムの提案 アラミンなどの刺激を受けた抗原提示細胞は、iNKT細胞を刺激し炎症性サイトカイン、細胞障害性因子産生を誘導する。これにより障害を受けた組織、細胞から内因性抗原が放出され、再び抗原提示細胞に認識、炎症サイクルを形成する。

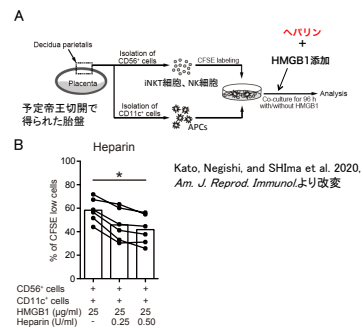


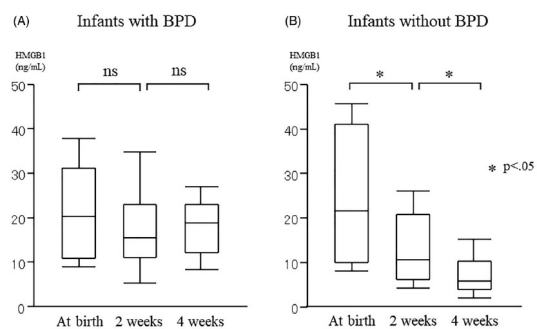
図4. 抗原提示細胞、iNKT細胞の共培養実験 (A)実験シエマ。磁気ビーズ法でCD11c陽性細胞 (DC、マクロファージを含む)、CD56陽性細胞 (iNKT細胞を含む) を分離、CD56陽性細胞をCFSEでラベリングした後、HMGB1、ヘパリン存在下で24時間培養、その後FACSによりiNKT細胞の増殖を検討。(B)iNKT細胞の増殖。ヘパリンによりiNKT細胞の増殖は有意に抑制されている。

のではないかと推察している。そして炎症サイクルが進むにつれ、iNKT 細胞以外の NK 細胞、顆粒球、また T 細胞などの獲得免疫系も動員され、胎盤におけるより強い炎症、早産が誘導されるのではないかと考えている。

● 早産児における HMGB1 と慢性呼吸障害との相関

✓ 結果 5. 早産児の慢性呼吸障害は、HMGB1 の惹起した無菌性炎症の遷延である

呼吸障害を呈さなかった児と呈した児では、出生直後の血清 HMGB1 値には差を認めなかったが、前者では時間経過とともに有意な減少が認められた。後者では、2、4 週間後においても血清 HMGB1 値は減少を見せず、出生直後と同等なレベルで推移した(図6)。これらより、BPD の発症には、無菌性炎症が慢性的に持続している可能性を示唆する結果となった。



Shima et al. 2021, *J. Maternal Fetal Neonatal Med.* より抜粋

図6. 早産児の血清HMGB1値

(A) 呼吸障害を呈した児、(B) 呼吸障害を呈さなかった児。

✓ 考察 2. 慢性炎症性疾患としての BPD

このような背景から、我々は未熟児の BPD 発症を、未熟な肺をターゲットとした慢性炎症性疾患として捉えている。そもそも炎症とは、内因性、外因性の攻撃に対する恒常性維持機能である。早産児は出生前の子宮環境下および出生後外界の様々なストレスに対応するため、炎症反応が惹起されるが、過剰な炎症とその遷延は BPD などの発症に寄与すると考察している。本研究結果では BPD を有する早産児では血清 HMGB1 の遷延化が認められた。このことは HMGB1 が呼吸状態を示すマーカー、および呼吸器装脱着の指針の一つになる可能性がある。さらに HMGB1 の制御 (HMGB1 の産生抑制、受容体遮断) は、BPD 予防の新たなターゲットになる可能性がある。

✓ 本研究成果のまとめ

炎症によって個体に有害事象が及んでも、目的論的には恒常性維持のための反応なので、原因が必ずしも外部から侵入する病原体や異物である必要はない。この立場から、多くの疾患や病態の成り立ちを説明するのが無菌性炎症という概念であるが、本研究では現代周産期医療の最大の課題である早産との関連について解析を試みた。その結果、①感染の証明できなかった早産事例の胎盤組織では自己由来の分子構造 (HMGB1) が自然免疫系の細胞群を活性化していること、またヘパリンがその反応に干渉していること、②出生後に慢性呼吸障害を示した早産児では、同じく HMGB1 の血中高値が遷延していることを見出した。以上から、無菌性炎症は早産母児の一連の合併症にも関与している可能性があり、HMGB1 以外にも原因となり得る分子構造を特定し、その反応様式を解析することで臨床応用への展開が期待できる。

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 0件）

1. 著者名 Kato Masahiko, Negishi Yasuyuki, Shima Yoshio, Kuwabara Yoshimitsu, Morita Rimpei, Takeshita Toshiyuki	4. 巻 85
2. 論文標題 Inappropriate activation of invariant natural killer T cells and antigen presenting cells with the elevation of HMGB1 in preterm births without acute chorioamnionitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 e13330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aji.13330	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 Negishi Yasuyuki, Shima Yoshio, Takeshita Toshiyuki, Morita Rimpei	4. 巻 -
2. 論文標題 Harmful and beneficial effects of inflammatory response on reproduction: sterile and pathogen-associated inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunological Medicine	6. 最初と最後の頁 1~18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/25785826.2020.1809951	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加藤雅彦、根岸靖幸、島義雄、森田林平、竹下俊行
2. 発表標題 絨毛膜羊膜炎を伴わない原因不明早産メカニズムの解析：自然免疫制御による新しい治療作用点を探る
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤雅彦、根岸靖幸、島義雄、森田林平、竹下俊行
2. 発表標題 絨毛膜羊膜炎を伴わない早産における自然免疫およびHMGB1の役割-ヘパリンの新たな作用点を探る
3. 学会等名 第35回日本生殖免疫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 根岸 靖幸
2. 発表標題 絨毛膜羊膜炎を伴わない原因不明早産の免疫学的解析 - 無菌性炎症からのアプローチ
3. 学会等名 第27回日本胎盤学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuyuki Negishi
2. 発表標題 Role of innate immune cells in murine and human reproduction
3. 学会等名 The 14th World Congress of International Society for Immunology of Reproduction (ISIR 2019)/The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology of Reproduction (34th JSIR) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根岸 靖幸
2. 発表標題 免疫学的知見による新しい流早産発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根岸 靖幸
2. 発表標題 無菌性炎症に起因する流早産発症メカニズムと自然免疫の役割
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2019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
研究 分担者	根岸 靖幸 (NEGISHI Yasuyuki) (50644580)	日本医科大学・医学部・講師 (32666)	
研究 分担者	桑原 慶充 (KUWABARA Yoshimitsu) (40373013)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	

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