

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03654

研究課題名(和文) マウス卵母細胞再構成系を利用した感染や炎症による胚リプログラミングへの影響研究

研究課題名(英文) Research on the effects of infection and inflammation on embryo development

研究代表者

柳原 格 (Yanagihara, Itaru)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター(研究所)・免疫部門・部長

研究者番号：60314415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,200,000円

研究成果の概要(和文)：不妊症は、生殖年齢カップルの15%程度に及ぶ。マウス精子にマイコプラズマ科ウレアプラズマ細菌を感染させたところ、菌量依存的に運動性を阻害した。また、感染マウス精子を用いた体外受精によってマウス受精卵内にウレアプラズマが侵入し、その後の発生を阻害した。さて、酵母のスクリーニングで液胞輸送を障害した新規のウレアプラズマ膜障害性分子を同定した。ウレアプラズマ空胞化因子(UpVF)と名付けた本因子は、子宮頸がん細胞におけるERストレスを回避させ癌のエンハンサーとして働いていた。また、超低出生体重児における長期的な呼吸器予後と、ウレアプラズマの胎内感染が関連することを疫学的に証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はこれまで、ウレアプラズマが胎盤における羊膜絨毛膜炎を引き起こし、感染性流産の最大の起因微生物であることを明らかにした。マウス精子の運動性を菌量依存的に低下させることや、感染精子を用いたIVFで受精卵の発生が阻害されることを明らかにし、不妊症との関連を科学的に証明することができた。また、後方視的な解析で、胎内ウレアプラズマ感染が早産児の長期的な児の呼吸器予後(小気道閉塞)に関わっていることを世界で初めて明らかにした。超低出生体重児においては、長期的な呼吸器のフォローが必要である。

研究成果の概要(英文)：Infertility affects about 15% of couples of reproductive age. Infection of mouse sperm with Ureaplasma inhibited motility in a bacterial lode-dependent manner, and in vitro fertilization using infected mouse sperm allowed Ureaplasma to invade into mouse fertilized eggs and impede their development. We also identified a novel Ureaplasma membrane-disrupting molecule that impaired vacuolar transport in a yeast screen. This factor, named Ureaplasma parvum vacuolating factor (UpVF), evaded ER stress in cervical cancer cells and acted as a cancer enhancer. We also provided epidemiological evidence that Ureaplasma infection in utero is associated with long-term respiratory prognosis in infants with extremely low birth weight.

研究分野：周産期感染症

キーワード：ウレアプラズマ 生殖細胞 不妊

1. 研究開始当初の背景

ウレアプラズマが胎盤の感染や炎症を誘導し、流産を引き起こすことは我々や、他の研究者らによって明らかとなった。一方で、ウレアプラズマが男性不妊と関連するののかといった点については相反する報告があり、一定の見解が得られていなかった (J Microbiol Immunol Infect, 2018;51:778-83, Andrologia, 1990;22:118-21, Andrologia, 2009;29:219-26, Urol Int, 2003; 71:377-81, Asian J Androl 2006;8:562-8)。我々は、ウレアプラズマの引き起こす炎症が外膜リポ蛋白質のMBAであること、そのN末端のリポペプチド (UPM-1) が Toll-like receptor を介した炎症誘導に重要であること。また、UPM-1 による妊娠マウスの流産が容量依存的に起こることも見出ししていた (J Reprod Immunol 2013)。これらのことから、ウレアプラズマの存在の有無だけで議論されていた臨床的な男性不妊との関係については、ウレアプラズマの菌量を検討する必要があると考えていた。一方で、受精した卵の発生に及ぼす影響についての解析はこれまで報告がなかった。

さて、ウレアプラズマの病原因子については上記の我々の MBA による炎症誘導や、古くは IgA プロテアーゼ (J Clin Microbiol, 1984;19:255-258) が知られていた。また、マイコプラズマ科細菌はしばしば培養細胞にコンタミすることが知られているが、一般的な他の細菌と異なり宿主細胞と共に生存することが可能で (一種の片利共生) 宿主培養細胞を殺すことなく菌も生存することができる。この宿主細胞に侵入し生存できるメカニズムについての解析はこれまでほとんど知られていない。さて、我々はウレアプラズマは宿主細胞内にはクラスリン依存的に侵入し、宿主細胞内で膜組織を破壊しながらオートファジー経路を逸脱して増殖することを発見していた (MicrobiologyOpen, 2017)。宿主細胞内において、分解系の膜成分を破壊するメカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

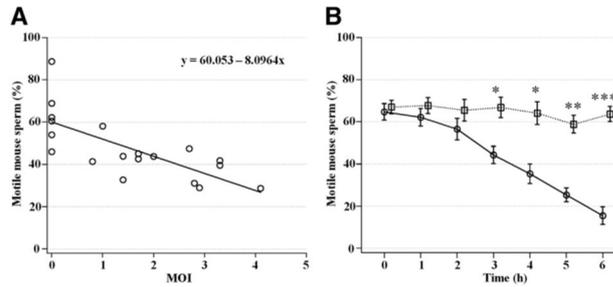
- 1) ウレアプラズマのマウス精子の運動性やマウス初期胚発生への影響について検証する。
- 2) ウレアプラズマがどのようにして宿主細胞の中で生存できているのか、宿主細胞への影響について検討する。
- 3) ウレアプラズマの胎内感染が及ぼす影響について、超低出生体重児の長期的な呼吸機能の解析で検証する。

3. 研究の方法

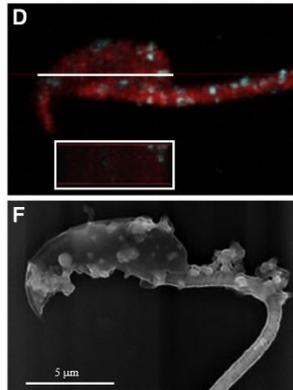
- 1) マウス精子にウレアプラズマ臨床分離株 (OMC-P162 株) を感染させ、マウス精子の運動性を WHO の推奨する Swim-up 法、精子運動解析システム (SMAS) で分析した。また感染マウス精子は、簡易卓上走査型電子顕微鏡や、共焦点レーザー顕微鏡で形態学的な観察を行った。感染精子の ROS 産生能や、DNA の断片化を TUNEL 法で解析した。さらに、マウス感染精子を用いた IVF において、ウレアプラズマが受精卵に存在するののかといった点について共焦点画像を取得し検証した。
- 2) 酵母の液胞輸送系を用いてウレアプラズマの機能未知遺伝子をスクリーニングした。スクリーニング遺伝子を宿主細胞内で強発現させた場合の変化や、安定発現させた際の miRNA の変化を調べた。また、安定発現細胞における抗がん剤や、放射線照射への抵抗性を検証した。また、安定発現細胞のヌードマウスへの Xenograft によるマウス生存を調べた。一方で、ウレアプラズマにはこれまで遺伝子改変技術が存在しない。そこで米国ペンター研究所で開発された合成ゲノム生物 (JCVI-syn3) へのウレアプラズマ遺伝子の導入を行う系を構築し、病原因子の解析を行った。
- 3) 1981 年から 2004 年までに出生した超低出生体重児 (1000 g 未満) 1,310 例を対象として、学齢期呼吸機能測定を行い、胎盤が残されている検体については、胎盤におけるウレアプラズマの定量を行った。

4. 研究成果

1) ウレアプラズマを感染させた精子は、容量・感染時間依存的に運動性を低下させた(下図)。



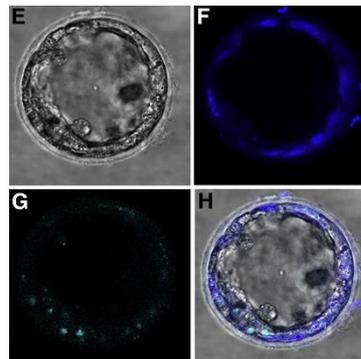
ウレアプラズマ感染マウス精子画像



感染マウス精子頭部に付着する
ウレアプラズマ (Cyan)

ウレアプラズマを感染させたマウス
精子頭部 (電顕画像)

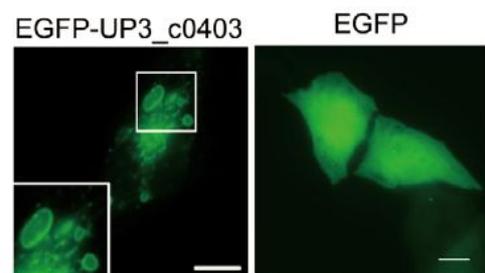
マウス受精卵内に感染マウス精子から侵入したウレアプラズマ



非感染受精卵 (左上段: 明視野、右上段: 蛍光)

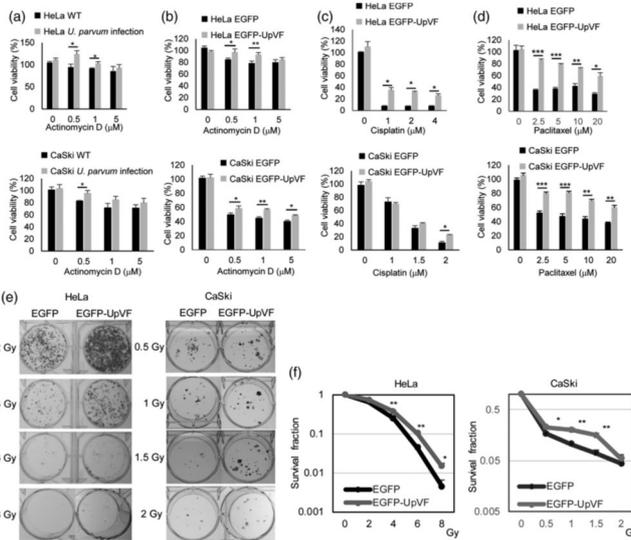
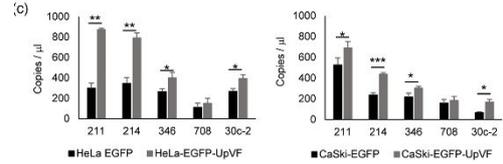
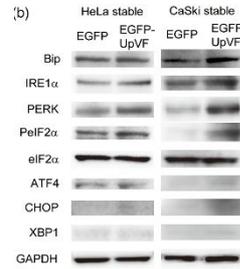
左感染マウス精子を用いた IVF
(左下段: ウレアプラズマ蛍光 Cyan、
右下段: 明視野 Merge)

2) 酵母液胞輸送系を障害する機能未知ウレアプラズマ 2 遺伝子を同定した。その中で特に障害活性の強かった UP3_c0403 遺伝子を HeLa 細胞に発現させると、宿主細胞内に空胞を形成した。このことからこの遺伝子産物をウレアプラズマ空胞化因子 (UpVF) と名付けた (右図)。



UpVF を発現させた細胞は ER ストレスの PERK, PeIF2α を活性化させたが、その下流の CHOP, XBP1 の発現を抑制した。

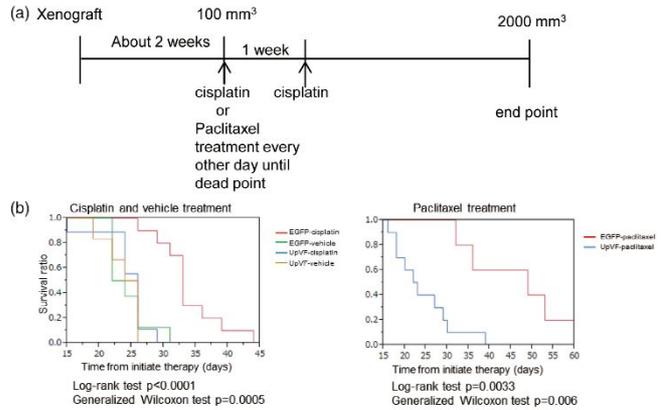
miRNA の網羅的なスクリーニングにてこの ER ストレス下流のシグナル遮断には主に miR-211, 214 が関与していた。



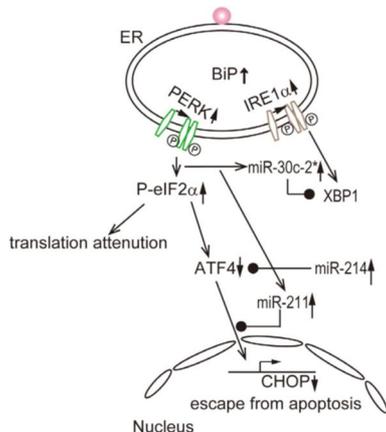
ER ストレスを遮断することで、アポトーシスを回避している可能性があったため、各種抗癌剤や放射線に対する抵抗性を獲得しているか検証した。

その結果、HeLa 細胞、或いは CaSki 細胞においてアクチノマイシン D、シスプラチン、パクリタキセルといった抗がん剤への抵抗性が示され、また、放射線に対する感受性も低下した。

ヌードマウスに Xenograft を行った結果、抗がん剤に対する抵抗性が低下し、腫瘍の悪性度が増した。UpVF には Tumor Enhancer 機能が存在することが示された。



UpVF の役割 (まとめ)



3) 後方視的に超低出生体重児の学齢期における呼吸機能とウレアプラズマ胎内感染の関係を調べた。

対象： 1981年から2004年出生した超低出生体重児 1310例
 新生児期の死亡を除いた 1,099例
 学齢期検診 530例
 呼吸機能検査 484例
 胎盤解析例 360例
 胎盤ウレアプラズマ定量 113例

小気道閉塞 (SAO)

n = 113	SAO/total	% SAO	Odds ratio	95% CI	p value
pU-DNA <50 units (ref)	16/64	25%	1		
pU-DNA 50-1000 units	11/25	44%	1.8	0.49-7.0	0.3787
pU-DNA >1000 units	18/24	75%	12	2.4-74	0.0019
Male sex			9.1	2.9-33	<0.001

気管支肺異形成症 (BPD)

n = 113	Severe BPD/total	% Severe BPD	Odds ratio	95% CI	p value
pU-DNA <50 units (ref)	3/64	5%	1		
pU-DNA 50-1000 units	5/25	20%	2.1	0.28-17	0.4728
pU-DNA >1000 units	9/24	38%	31	4.5-349	0.0002
Hemosiderin deposition			18	3.5-132	0.0004

早産児のSAO (small airway obstruction)が世界的に問題となっている。

- ・ウレアプラズマによる胎内感染が学齢期のSAOと相関することが明らかとなった
- ・新生児期に呼吸器異常 (bronchopulmonary dysplasia)を呈さない場合でも、学齢期以降にSAOをおこすことがある。超低出生体重児の生存率の上昇と、児の高年齢化によりウレアプラズマの胎内感染はCOPDを発症するリスク要因となる可能性がある為、超早産児については、長期間のフォローが必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Lintao RCV, Padua AJP, Nakura Y, Llamas-Clark EF, Yanagihara I.	4. 巻 24
2. 論文標題 Genetic Characterization of Ovarian Tumor Tissues from Patients with Epithelial Ovarian Cancer in a Philippine Tertiary Hospital: A Descriptive Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Asian Pac J Cancer Prev.	6. 最初と最後の頁 1187-1197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.31557/APJCP.2023.24.4.1187.	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 該当する
1. 著者名 Y, Ono T, Kozuma Y, Nakura Y, Yanagihara I, Tsumura K.	4. 巻 137
2. 論文標題 Relationship of maternal inflammatory response and fetal inflammatory response to duration and intensity of intra-amniotic infection and inflammation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Placenta	6. 最初と最後の頁 23-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.placenta.2023.04.003.	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 Ohkuma K, Ono T, Oshima Y, So K, Tsumura K, Yamasaki F, Nakura Y, Yanagihara I, Nomiyama M, Yokoyama M.	4. 巻 49
2. 論文標題 Diagnostic accuracy of amniotic fluid interleukin-6 for fetal inflammatory response syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res.	6. 最初と最後の頁 1498-1505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.15630.	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 Hirata K, Nishikawa M, Nozaki M, Kitajima H, Yanagihara I, Wada K, Fujimura M.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Urine Desmosine as a Novel Biomarker for Bronchopulmonary Dysplasia and Postprematurity Respiratory Disease in Extremely Preterm or Low Birth Weight Infants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Perinatol.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/a-1979-8501.	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 Yoshimura M, Shimizu K, Nakura Y, Kawahara K, Katano H, Motooka D, Takeuchi M, Nagamune K, Imamura Y, Nakamura S, Yasukawa K, Hasegawa H, Yoshida Y, Yanagihara I.	4. 巻 48
2. 論文標題 A fatal case of hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with gestational psittacosis without symptoms of pneumonia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res.	6. 最初と最後の頁 3325-3330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.15429.	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 Kitajima H, Fujimura M, Takeuchi M, Kawamoto Y, Sumi K, Matsunami K, Shiraishi J, Hirano S, Nakura Y, Yanagihara I.	4. 巻 57
2. 論文標題 Intrauterine Ureaplasma is associated with small airway obstruction in extremely preterm infants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatr Pulmonol.	6. 最初と最後の頁 2763-2773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ppul.26098	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 Tsuda S, Shinagawa T, Tsumura K, So K, Yamasaki F, Kawaguchi A, Nakura Y, Yanagihara I, Nomiya M, Yokoyama M.	4. 巻 61
2. 論文標題 Estimated time to emergence of secondary intra-amniotic infection or inflammation since the onset of the preterm premature rupture of membranes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Taiwan J Obstet Gynecol.	6. 最初と最後の頁 634-640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tjog.	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 Nakano S, Yamamura-Miyazaki N, Michigami T, Yazawa K, Yanagihara I, Yamamoto K.	4. 巻 11
2. 論文標題 A case of a preschool child with a successful kidney transplant following the long-term administration of antibiotics to treat peritoneal dialysis-related ESL/peritonitis by Mycobacterium abscessus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CEN Case Rep.	6. 最初と最後の頁 408-411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-022-00689-z	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 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柳原格、西海史子
2. 発表標題 ヒト流早産原因細菌ウレアプラズマの宿主細胞への影響
3. 学会等名 ヒト流早産原因細菌ウレアプラズマの宿主細胞への影響、近畿腸管微生物研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 名倉由起子、柳原格
2. 発表標題 ウレアプラズマの薬剤感受性に関する検討
3. 学会等名 第58回日本周産期・新生児医学会学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳原格
2. 発表標題 新型コロナウイルスの核酸増幅法と変異型ゲノム解析
3. 学会等名 第235回 大阪小児科学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上瑛介、柳原格、保川清、藤原伸介、福田青郎
2. 発表標題 耐熱性DNAポリメラーゼの鎖置換活性に関する領域の比較解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤由美子、井関明子、杉井裕和、阿萬紫、柳原格、若狭朋子
2. 発表標題 病理解剖により診断に至った妊娠オウム病の1例
3. 学会等名 第68回日本病理学会 秋季特別総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Itaru Yanagihara
2. 発表標題 Bacteria-Host interactions:Survival strategies of the smallest bacteria
3. 学会等名 FRONTIERS IN CELL &DEVELOPMENTAL PHYSIOLOGY (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪母子医療センター研究所免疫部門 https://www.wch.opho.jp/research/developmental/index.html
--

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	西海 史子 (Nishiumi Fumiko) (60599596)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター (研究所)・免疫部門・流動研究員 (84408)	

6. 研究組織（つづき）

	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	呉 恒寧 (Wu Heng Ning) (80648139)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター (研究所)・免疫部門・研究技術員 (84408)	

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