

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：32307

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09592

研究課題名(和文) 絨毛膜羊膜炎で上昇するアクチピンは何をしているのか - 胎児と胎盤への作用の解析

研究課題名(英文) The role of elevated Activin in the amniotic fluid of chorioamnionitis - Analysis of the effects on the fetus and placenta.

研究代表者

安部 由美子 (Abe, Yumiko)

群馬医療福祉大学・医療技術学部・教授

研究者番号：70261857

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)：絨毛膜羊膜炎では羊水中のアクチピンが増加することが報告されている。アクチピンは多機能性の増殖因子だが、羊水中で増加したアクチピンが胎児胎盤系にどのような影響を及ぼしているかは判明していない。このため、マウス羊水中へのアクチピンの注入実験と、羊水が接している羊膜細胞を用いた研究により、アクチピンの作用を探索した。アクチピンへの曝露により胎仔肺で発現量に相違のある遺伝子を検出した。一方、羊膜細胞では同様の変化は見られなかったことから、羊水中のアクチピンは胎盤よりも胎児への影響が大きいことが考えられた。更に、薬物送達に汎用される脂質ナノ粒子が、羊水中において血清中と同様の安定性を示すことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

絨毛膜羊膜炎は早産の主因であるとともに、新生児慢性肺疾患などのリスクを増加させる疾患である。一方、炎症により多機能性の増殖因子アクチピンが羊水中で増加することが報告されているが、アクチピンの胎児胎盤系への作用は不明であった。今回、アクチピンにより胎仔肺で発現が抑制される遺伝子を見出したこと、及び、薬物送達システムで汎用されている脂質ナノ粒子が、羊水中において血清中と同様の安定性を示すことを明らかにしたことにより、アクチピンの負の制御因子で生体内物質であるインヒピンやフォリスタチンを用いた、羊水中注入による胎児治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chorioamnionitis is the primary cause of premature delivery. Activin is a pluripotent growth factor and elevated activin concentrations in amniotic fluid are reported in chorioamnionitis. However, the effects of activin in amniotic fluid on the fetus and placenta have not been elucidated. Therefore, we investigated the effects of activin by injecting activin into mouse amniotic fluid. We also studied the effects of activin by using amniotic cells which had direct contact with amniotic fluid. In fetal mice exposed to activin on embryonic day 17.5, we found a gene in the fetal lung was suppressed by activin. Conversely, a similar phenomenon was not found in amniotic cells. Activin in amniotic fluid seemed to affect the fetus more than the placenta. We also studied the kinetics of the liposomal nanoparticles, which are often used as drug delivery systems, in amniotic fluid. The liposomal nanoparticles were stable in amniotic fluid as long as they were in serum.

研究分野：産科婦人科学

キーワード：アクチピン インヒピン フォリスタチン 絨毛膜羊膜炎 胎児胎盤系 羊水 羊膜細胞 胎仔肺

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

絨毛膜羊膜炎は早産の主因であるとともに、新生児慢性肺疾患などのリスクを高める疾患であるが、子宮内感染を伴う妊婦の羊水中のアクチピンは高濃度で (Rosenberg VA, et al. Am J Reprod Immunol 67: 122-131, 2012)、早産児の羊水中アクチピンも高値であること (Petraglia F, et al. J Endocrinol 15:95-101, 1997) が報告されていた。増殖因子アクチピンは様々な細胞で多様な作用を発揮することが知られていたが、羊水中で増加したアクチピンが胎児や胎盤に対してどのような影響を及ぼしているかについては不明であった。アクチピンによる胎児胎盤系への作用を明らかにすることにより、アクチピンの作用を打ち消す生体内物質であるインヒビンやフォリスタチンを用いた胎児治療に繋がることが期待された。

2. 研究の目的

多機能性の増殖因子であり、絨毛膜羊膜炎/子宮内感染症の羊水中で増加することが報告されているアクチピンが、胎児胎盤系にどのような影響を及ぼしているかを明らかにすることを目的として本研究を行った。なかでも、羊水に直接接する羊膜細胞にどのような影響を及ぼしているか、また、器官の成熟が胎仔期後期に盛んになる胎仔の肺発育に対してどのような影響を与えているかを明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

羊水中で増加したアクチピンが胎児胎盤系に及ぼす影響を明らかにするために、以下の方法により研究した。

(1) 羊膜細胞を用いた研究

院内臨床試験審査委員会の承認の下、インフォームドコンセントを得て、感染症、羊水異常、胎児異常等の合併症の無い妊婦より予定帝王切開時に羊膜を得て細胞を培養し、実験に用いた。羊膜炎のモデルとして培養羊膜細胞に炎症性サイトカインを添加し、アクチピン、および、アクチピンの負の制御因子であるインヒビン、フォリスタチン、FSL3 の遺伝子発現量の変化を、RT-qPCR と RT-ddPCR により解析した。次に、DNA microarray と RT-qPCR によりアクチピン添加により発現量が変動する遺伝子を探索した。

(2) マウス胎仔を用いた研究

マウス羊水量と羊水中アクチピン、インヒビン、フォリスタチン濃度の解析

研究に用いた JcL:ICR マウスの羊水量は報告されていなかったため、最初に、胎仔齢に伴う胎仔付属物の容量・重量を測定した。マウス羊水中のアクチピン、インヒビン、フォリスタチン濃度はどの系統のマウスでも報告がなかったため、入手可能な ELISA で、希釈直線性等を確認した後、測定が可能であった、アクチピンとインヒビンの羊水中濃度を測定した。

マウス羊水中へのアクチピン注入実験

で得た羊水量とアクチピン濃度をもとに、羊水中へのアクチピン注入量を決定した。肺発育段階管状期の胎生 16.5 日 (ヒトの妊娠中期に相当) に羊水中にアクチピンを注入したマウスと、肺発育段階終末嚢期の胎生 17.5 日 (ヒトの妊娠後期に相当) に羊水中にアクチピンを注入したマウスを作製し、胎生 18.5 日に帝王切開術にて胎仔を採取し、肺組織等を得た。肺胞は肺胞期に成熟肺胞の形態となり、急速に数を増加させるため、生後 5 日 (肺胞期初期) と生後 14 日 (肺胞期) の肺も採取した。

胎仔肺の組織形態学的解析：採取した肺の HE 染色標本を作製し、アクチビン注入群で変化が生じるかを観察した。

胎仔肺の分子遺伝学的解析： -1. RNA の質の解析：研究代表者達は研究分担者が採取、発送した胎仔肺を用いて解析したため、抽出した RNA の質がその後の実験を進めることのできる質であるかを RNA Integrity Number 解析で調べた。 -2. アクチビンレセプター発現の解析：アクチビンのシグナルが伝達されるためには、II 型と I 型の両アクチビンレセプターが必要である。このため、胎生 16.5 日、17.5 日、18.5 日と成獣の肺のアクチビンレセプター遺伝子 (Acvr2a, Acvr2b, Acvr1b, Acvr1c) の発現量を RT-qPCR により解析した。 -3. 肺サーファクタント関連遺伝子の解析：Sftpa1, Sftpb, Sftpc, Pcyt1a 遺伝子の発現量を RT-qPCR で解析した。 -4. マトリックス関連遺伝子発現の解析：DNA microarray と RT-qPCR により解析した。

羊水中における脂質ナノ粒子の安定性の解析：薬物輸送システム (drug delivery system; DDS) でキャリアーとして頻用される脂質ナノ粒子の、胎生 12.5 日、14.5 日および 16.5 日の羊水中における安定性を calcein 含有脂質ナノ粒子を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 羊膜細胞を用いた研究で以下の結果を得た。 RT-qPCR 解析で、炎症性サイトカイン IL-1 添加によりアクチビン遺伝子発現が有意に増加したのに対して、インヒビン、フォリスタチン、FSL3 遺伝子発現は不変または低下傾向を示した。 RT-ddPCR 解析では、アクチビン遺伝子のコピー数/(インヒビン、フォリスタチン、FSL3 遺伝子コピー数の和)が添加前に比べ、添加後に顕著に増加することが明らかになった (添加前：1.8、添加後：27.0)。すなわち、炎症性サイトカインにより、羊膜ではアクチビン優位になることが示唆された。 羊膜細胞においてアクチビンにより発現量の変化する遺伝子を DNA microarray と RT-qPCR により探索した。今回の研究では有意に変動する遺伝子は見い出せなかった。

(2) マウス胎仔を用いた研究で以下の結果を得た。 JcL:ICR マウスの胎仔齢に伴う胎仔付属物の容量・重量の変化を明らかにした (投稿中)。 マウス羊水中のアクチビン (アクチビン A) とインヒビン (インヒビン A) の濃度と胎仔齢に伴う変化を明らかにした。マウス羊水中のアクチビン濃度はヒトと同程度であり、ヒトと同様の胎仔齢に伴う変化をみとめた。インヒビンはアクチビンの約 1/100 ~ 1/1000 の低濃度で、ヒト羊水中のインヒビンより低濃度であった。入手できたフォリスタチン ELISA で、羊水は希釈直線性を示さなかったため、今回の研究では羊水中フォリスタチン濃度を明らかにすることはできなかった。 胎生 16.5 日アクチビン注入群、胎生 17.5 日アクチビン注入群ともに、生後 5 日と生後 14 日 (肺胞期) の肺に形態学的変化は見られなかった。 -1. RNA Integrity Number 解析により胎仔肺から抽出した RNA の質が NGS 解析に供せるレベルであることを確認した。 -2. 胎生 16.5 日と胎生 17.5 日の肺に II 型と I 型、両タイプのアクチビンレセプターが発現していたが、成獣に比べ低値であった。II 型と I 型ともに、胎生 18.5 日に有意に増加し、成獣と同レベルとなることを明らかにした。この結果から、アクチビン注入時期により、作用に相違が生じる可能性が考えられた。 -3. 今回の研究では、肺サーファクタント関連遺伝子のアクチビンによる発現量変化はみられなかった。 -4. 胎仔肺におけるマトリックス関連遺伝子の発現は、胎生 16.5 日アクチビン注入、胎生 18.5 日採材群では変化を認めなかった。胎生 17.5 日アクチビン注入、胎生 18.5 日採材群で発現量が低下する遺伝子が検出された。

(3) 脂質ナノ粒子が胎生 12.5 日、14.5 日および 16.5 日の羊水中で、血清中と同等の安定性を有することを明らかにした (投稿中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋加央梨, 大町晃, 櫻井玲依, 青木亮太, 佐藤澄恵, 中川詞雄, 内山陽介, 岡庭隼, 森田晶人, 日下田大輔, 井上真紀, 亀田高志, 岩瀬明, 水谷哲也, 安部由美子
2. 発表標題 羊膜細胞におけるActivin A産生への炎症性サイトカインの影響
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 櫻井玲依, 小川典子, 佐藤澄恵, 大町晃, 齋加央梨, 青木亮太, 安部由美子
2. 発表標題 増殖因子Activin Aの胎仔肺における作用
3. 学会等名 第35回日本下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 櫻井玲依, 小川典子, 佐藤澄恵, 大町晃, 齋加央梨, 青木亮太, 安部由美子
2. 発表標題 マウス羊水中のActivin A
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大町晃, 櫻井玲依, 齋加央梨, 青木亮太, 佐藤澄恵, 内山陽介, 岡庭隼, 森田晶人, 日下田大輔, 井上真紀, 亀田高志, 岩瀬明, 安部由美子
2. 発表標題 ヒト羊膜上皮細胞におけるInterleukin-1 によるActivin A遺伝子発現促進機序
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 轟加央梨, 大町晃, 櫻井玲依, 青木亮太, 佐藤澄恵, 中川詞雄, 内山陽介, 岡庭隼, 森田晶人, 日下田大輔, 井上真紀, 亀田高志, 岩瀬明, 安部由美子
2. 発表標題 ヒト羊膜上皮細胞におけるActivin A産生へのIL-1 の影響
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木亮太, 大町晃, 櫻井玲依, 轟加央梨, 佐藤澄恵, 内山陽介, 岡庭隼, 森田晶人, 日下田大輔, 井上真紀, 亀田高志, 岩瀬明, 安部由美子
2. 発表標題 ヒト羊膜上皮細胞は低酸素状態においてもIL-1 によりINHBA mRNA発現の亢進を示す
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2021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	小川 典子 (Ogawa Noriko) (90598111)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教 (15201)	

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