

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592458

研究課題名(和文) 妊娠ヒツジ子宮内炎症モデルを用いた胎児皮膚組織における炎症進展機序の解析

研究課題名(英文) The research on how intrauterine inflammation transmit to fetus by the intermediary of fetal skin with using ovine model.

研究代表者

齋藤 昌利 (SAITO, Masatoshi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00451584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：早産の主要原因である子宮内炎症がどのように胎児に波及し、どのように影響するかは未だ不明な部分が多いが、我々は妊娠ヒツジを用いて子宮内炎症モデルを作成し、子宮内炎症環境下に胎児皮膚組織が炎症メディエータとして働くことを明らかにした。また、Polymyxin Bという抗生物質を用いて、胎児皮膚組織において炎症性サイトカインのメッセンジャーRNA発現が抑制されることを示した。この結果は、進行しつつある子宮内炎症を沈静化する治療方法の開発の一助になるとと思われる。

研究成果の概要(英文)：Intrauterine infection is a leading cause of preterm birth, most notably in deliveries occurring before 32 weeks gestation. However, the details of the mechanism and pathway from intrauterine infection to fetal inflammation are still unknown. We made an intrauterine inflammation model with using pregnant sheep, and also could indicate that a cationic peptide antibiotic, Polymyxin B have a possibility to calm the intrauterine inflammation down causing with Escherichia coli lipopolysaccharides (LPS) in fetal skin tissue with decreasing of the expression of messenger RNA of inflammatory cytokines such as IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-8 and MCP-2. These data are consistent with a partial resolution of LPS-driven intrauterine inflammation. They suggest the potential for agonist capture as a conceptual means of resolving the pro-parturition inflammation caused by infection of the amniotic cavity.

研究分野：周産期医学 胎児生理学

キーワード：早産 子宮内感染 子宮内炎症 胎児皮膚組織 炎症性サイトカイン Polymyxin B

1. 研究開始当初の背景

(1) 周産期医療領域における診断技術の向上と開発により周産期医療はここ数十年で飛躍的な進歩を遂げた。しかしながら、依然として全世界的に早産の発症率は約 10%前後を推移しており、周産期医療上大きな問題となっている¹⁾。

(2) 一方、妊娠中の子宮内炎症は種々の周産期合併症を引き起こすばかりでなく、早産の原因となることが広く知られている。近年の報告においては、早産の約 70%が、羊水内への微生物感染による子宮内炎症が原因であると考えられている²⁾。また子宮内炎症の環境下にあった早産児の場合、子宮内での急性～慢性炎症環境暴露にともなう種々の組織障害性を同時に有している場合が多く、出生後に有効かつ強力な新生児治療を施しても永続的な中枢神経障害や新生児慢性肺疾患、循環器疾患を罹患してしまう可能性が高いことが示唆されている³⁾。

(3) 妊娠中の子宮内炎症は日常診療上、遭遇する機会の多い病態と言える。しかしながら、広く臨床現場で用いられている子宮収縮抑制剤や一般的な抗生剤を投与しても、子宮内炎症を抑制できず、早産期に妊娠を中断し、新生児治療に切り替えざるを得ない状況も存在する。増悪しつつある子宮内炎症を的確に判断し、沈静化することは周産期医療の大きな課題の1つであり、有効な治療法の開発は早産率の劇的な減少、新生児予後の改善に寄与するものと考えられる。

(4) Polymyxin B (図1) は 1960～1970 年代に広く用いられた抗生剤の一つであるが、グラム陰性菌の代表的な病原成分である Lipopolysaccharide (LPS) の lipid-A 領域に親和的に結合することにより、LPS の活性を抑制する事が知られている。しかしながら、Polymyxin B を妊娠中に用いた報告は皆無であり、子宮内炎症に対する効果は未だ不明である。

(5) 我々はこれまで子宮内炎症と早産の関連性を解析するために、妊娠ヒツジを用いた子宮内炎症モデルを作成し、胎子の皮膚組織が病原体感染から炎症が波及する際に重要な「橋渡し」役となりうることを明らかにした⁴⁾。

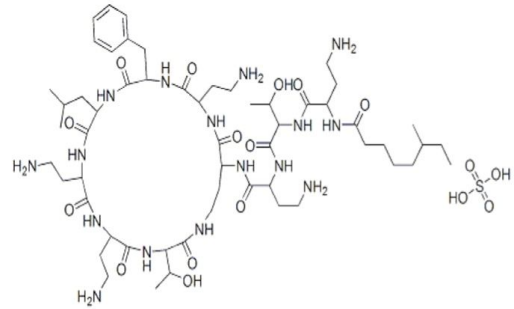


図1 PolymyxinBの化学構造

2. 研究の目的

(1) ヒツジ胎子皮膚組織において子宮内炎症が進行する過程を Polymyxin B が抑制できるか否かを妊娠ヒツジを用いて解明することが本研究の主要な目的である。

(2) また、本研究の結果から、増悪する子宮内炎症を抑制する有効な治療方法を検討、開発することも本研究の目的の一つである。

3. 研究の方法

(1) 本研究は妊娠ヒツジを用いて、子宮内炎症下において Polymyxin B が胎子皮膚組織の「橋渡し」機能を抑制できるかを解析するものであり、以下に示す6つの研究計画をデザインし遂行する。

*in vitro*における胎子皮膚細胞の培養
胎子皮膚細胞の培養を行うために、妊娠日数が確定しているヒツジを用いる。妊娠 110 日(満期 145 日)に、胎子皮膚細胞採取を行う。胎子を娩出し胎子の臀部より皮膚組織を採取する。採取した皮膚切片は培養液内で保存し、その後、デコンタミネーションを行い皮膚組織と真皮組織の剥離を行う。その後、採取された皮膚組織からその中心的細胞であるケラチノサイトを分離する(図2)。分離さ

れたケラチノサイトを継代培養し本研究に用いる。

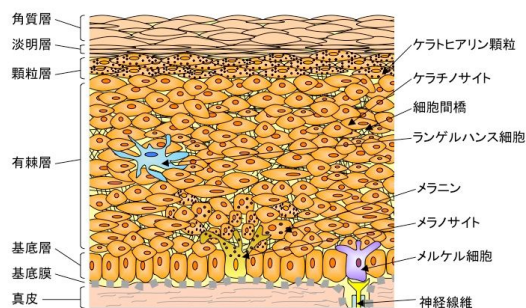


図2 表皮の組織構造の模式図

*in vitro*における胎児皮膚細胞へのLPS負荷実験、ならびにLPS + Polymyxin B負荷実験

培養された胎児皮膚細胞に、LPSを負荷する（LPS負荷群）、また、LPSと濃度を調整したPolymyxin Bを負荷する（LPS + Polymyxin B負荷群）。

*in vitro*における炎症性受容体、サイトカインの発現解析

LPS単独、ならびにLPS + Polymyxin B負荷後の胎児皮膚細胞よりRNAを抽出し、対象時間における各種炎症性サイトカインのRNA発現量をリアルタイムPCRにて測定する。

妊娠ヒツジを用いた子宮内炎症モデルの作成（*in vivo*実験）

妊娠日数が確定しているヒツジを用いる。妊娠102日前後に母獣を開腹し、子宮を切開する。胎子のソケイ動静脈にそれぞれカテーテルを挿入し、羊水腔にもカテーテルを留置し、閉腹する。術後2日目より術後7日まで、胎子動脈カテーテルからG-CSF製剤を投与し、胎子血中の顆粒球数を増加させる。その後、術後7日目に羊水中にLPSを投与し、子宮内炎症を活性化する。その後、妊娠110日目に胎子を娩出した後、と同様に、臀部から皮膚組織を剥離する。その後の胎児皮膚細胞分離までの過程はと同様のプロセスをとる。

妊娠ヒツジを用いた羊水内LPS + Polymyxin B投与実験（*in vivo*実験）

麻酔方法、妊娠日数、手術手技、G-CSF投与の開始時期、投与日数はと同様に行う。術後7日目に羊水腔カテーテルより羊水中にLPSとPolymyxin Bを投与する。その後、術後9日目に胎子を娩出した後、と同様に、臀部から皮膚組織を剥離する。その後の胎児皮膚細胞分離までの過程はと同様のプロセスをとる。

*in vivo*実験から得られた胎児皮膚細胞における炎症性サイトカインの発現解析

から採取した胎児皮膚組織よりRNAを抽出し、対象時間における各種炎症性サイトカインのRNA発現量をリアルタイムPCRにて測定する。

4. 研究成果

(1) 研究試薬の調達や予定した頭数の妊娠ヒツジの確保が困難であったため、当初予定したすべての研究目的を遂行できなかったわけではない。しかしながら、当初目的とした研究成果をある程度得ることができたので報告する。

(2) 研究の主な成果

胎児皮膚ケラチノサイト細胞を用いた実験（*in vitro*実験）成果

培養されたケラチノサイトにLPS単独とLPS + Polymyxin Bを負荷し、炎症性サイトカイン（IL-8、TNF- α ）のメッセンジャーRNAの発現量を統計学的に比較した。LPSの量は各群とも1マイクログラムとしたが、Polymyxin Bの量は、量による違いを見るために、1マイクログラム、10マイクログラム、100マイクログラムの3種類を用意し比較検討した。その結果、代表的な炎症性サイトカインであるIL-8（図3）やTNF- α （図4）のメッセンジャーRNAの発現量において、LPS単独投与群よりもPolymyxin B投与群において各対象時間において統計学的に有意な低下を認められた。その傾向はPolymyxin Bを10マイクログラム添加した群で強く認められた。これは、

ケラチノサイトにおいてLPSの活性が抑制されたことを意味している。しかしながら、Polymyxin Bを100マイクログラム添加した群においては、統計学的に有意な差を得難い傾向があり、Polymyxin B そのものの毒性が発現されてしまった可能性が少なからず考えられた。

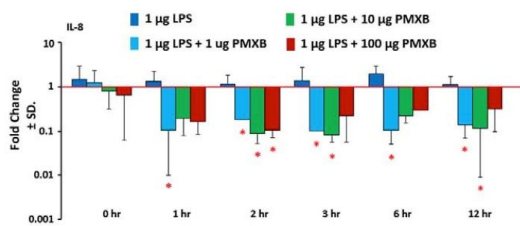


図3 培養ケラチノサイト細胞における炎症性サイトカインIL-8のmRNA発現の相対的比較

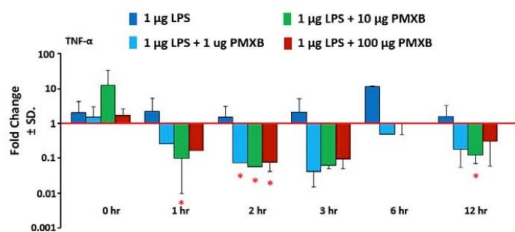


図4 培養ケラチノサイト細胞における炎症性サイトカインTNF-αのmRNA発現の相対的比較

妊娠ヒツジを用いた *in vivo* 実験

妊娠ヒツジの子宮内に LPS 単独、LPS + Polymyxin B、Polymyxin B 単独をそれぞれ投与し、胎仔皮膚組織での炎症性サイトカイン（IL-1、TNF-、IL-6、IL-8 ならびに MCP-2）のメッセンジャーRNA の発現量を比較した結果を図5に示す。この結果からは、期待に反して、LPS + Polymyxin B 群において炎症性サイトカインのメッセンジャーRNA 発現量の減少は認められなかった。

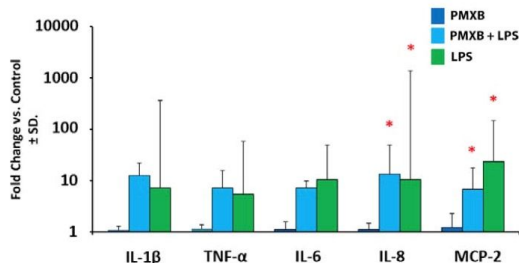


図5 胎仔皮膚組織における炎症性サイトカインのmRNAの発現量

(3) 研究成果のまとめ

この結果から、*in vitro* では期待した炎症抑制効果が得られたが、*in vivo* 実験では *in vitro* で得られたような炎症抑制効果は認められなかった。この現象を説明するためには Polymyxin B の生体内での動態や他の組織での炎症性サイトカインの発現などをさらに詳細に調査し、胎児のどの組織から炎症が波及し、どの領域を抑制できれば炎症の進行を食い止めることができるかを調べる必要があると思われた。

(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、ならびに今後の展望

今回の研究で得られた結果は、いわゆるクリアカットな結果ではなかったが、細胞レベルでの炎症抑制効果は認められた。国内外において、妊娠中の子宮内炎症の「診断」に関する研究は多数あるが、炎症を抑制あるいは沈静化しようと試みている研究は非常に少ない。そういった意味ではまだまだ今後の詳細な研究が必要ではあるが、重要なファーストステップであったと思われる。今後、さらに対象組織の範囲を広げ、子宮内感染が胎児の炎症に波及するメカニズムを解明し、子宮内炎症の治療方法の開発の一助になればと考える。

< 引用文献 >

1) Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *New England Journal of Medicine*,

18;342(20), 2000, 1500-1507

2) Andrews WW, Goldenberg RL, Hauth JC, Cliver SP, Copper R, Conner M.

Interconceptional antibiotics to prevent spontaneous preterm birth: a randomized clinical trial. American Journal of Obstetrics & Gynecology, 194(3), 2006, 617-623

3) Hack M, Fanaroff AA. Outcomes of children of extremely low birthweight and gestational age in the 1990s. Seminars in Neonatology, 5(2), 2000, 89-106

4) Kemp MW, Saito M, Nitsos I, Jobe AH, Kallapur SG, Newnham JP. Exposure to in utero lipopolysaccharide induces inflammation in the fetal ovine skin. Reproductive Science, 18(1), 2011, 88-98

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Masatoshi Saito, Matthew S. Payne, Yuichiro Miura, Demelza J. Ireland, Sarah Stock, Suhas G. Kallapur, Paranthaman S. Kannan, John P. Newnham, Boris W. Kramer, Alan H. Jobe, Jeffrey A. Keelan and Matthew W. Kemp、Polymyxin B agonist capture therapy for intrauterine inflammation: proof-of-principle in a fetal ovine model. Reproductive Science、査読有、Vol.21(5)、2014、623-631

DOI: 10.1177/1933719113508820

6 . 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 昌利 (SAITO, Masatoshi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号 : 00451584

(2)研究分担者

松田 直 (MATSUDA, Tadashi)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号 : 50361100

菅原 準一 (SUGAWARA, Junichi)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号 : 60280880