

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461652

研究課題名(和文) 妊婦・早産児における免疫反応の発動と制御に関する研究

研究課題名(英文) Preventative agents in mouse preterm birth models induced by bacterial virulence factors.

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府立母子保健総合医療センター(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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：早産のおよそ半数に感染や炎症が関与する。主たる病態は局所における過剰な免疫反応である。ウレアプラズマリポペプチド(UPM-1)誘導性早産モデルマウスに対して、抗炎症・抗酸化分子である水酸化フラレン投与したところ、早産率が有意に低下し、胎仔生存率が上昇する傾向にあった。また、LPS誘導性早産モデルマウスに対して、ヒトが元々有している抗炎症・抗酸化分子であるチオレドキシン1投与が、マウス早産を有意に抑制した。

研究成果の概要(英文)：Intrauterine infection such as by *Escherichia coli* and *Ureaplasma* spp. induce placental inflammation and are one of the leading causes of preterm birth. We investigated the preventative effect of hydroxylated fullerene in a mouse preterm birth model induced by ureaplasma TLR-2 ligand, UPM-1. The preterm birth rate decreased from 72.7% to 18.2% after an injection with hydroxylated fullerene in mice. The preventative effect of thioredoxin-1 was also investigated in *Escherichia coli* lipopolysaccharide induced preterm birth mouse model. Recombinant human thioredoxin-1 prevented the rise of systemic proinflammatory cytokine levels in dam mice. After LPS challenge, placentas exhibited severe maternal vascular dilatation and congestion and a marked decidual neutrophil activation. These placental pathological findings were ameliorated by recombinant human thioredoxin-1, and the rate of inflammation-induced preterm delivery was attenuated.

研究分野：周産期感染症

キーワード：ウレアプラズマ LPS 水酸化フラレン チオレドキシン1 感染性流早産

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の早産率はおよそ6%程度で推移している。早産のおよそ4~5割は感染・炎症が関与する。我々は2002年から早産原因微生物の探索を行っていた。当施設の流早産胎盤の解析の結果、およそ4割からマイコプラズマ科のウレアプラズマ細菌を同定した(Ped Res, 2010)。しかしながら、ウレアプラズマは多くの生殖年齢の腔内から分離されることから、当時は常在菌とする考え方が米国産婦人科学会を中心として広がっていた。我々はウレアプラズマの外膜リポタンパク質MBAがマウスにおいて流早産を起こすことを発見し、流早産の病原因子として報告し病原細菌であることを証明した(J Reprod Immunol, 2013)。我が国のバイオセーフティー(BSL)分類で *Ureaplasma urealyticum* はBSL2に指定された。

胎内における過剰な免疫反応が感染性流早産の主な病態として挙げられる(Fetal inflammatory Response Syndrome)。ウレアプラズマ等による感染性流早産に対して、母体の過剰な免疫反応を抑止することが早産制御方法につながると考え、研究を行った。

## 2. 研究の目的

感染性流早産モデルマウスへの新たな抗炎症、抗酸化分子による効果の検証を2つの方法で行う。

マイコプラズマ感染症においては、薬剤耐性が問題となっている。ウレアプラズマにおいて、我が国の周産期医療領域での現状を把握するとともに、薬剤感受性低下の原子レベルでの *in silico* 解析を行う。

## 3. 研究の方法

(モデルマウスを用いた早産制御法の開発)

### 1. 水酸化フラレーン(F)

ウレアプラズマ由来の Toll-like receptor (TLR)2 リガンド(MBA由来のジアシル化した合成リポペプチド:UPM-1)を妊娠14日目のC3H/HeNマウスに子宮内に注射し、4時間後に尾静脈よりFを投与した。その後、妊娠16日目に早産率、胎仔生存率、胎盤病理検索を行った。

### 2. チオレドキシシン1

LPSはTLR4リガンドの代表的な分子である。そこで、今回は、LPS誘導性の早産モデルマウスを作成し、そのマウスに対して生体が有するレドックス制御系分子であるチオレドキシシン1タンパク質を作用させマウス早産の予防的な効果があるか、治療効果が得られるか検討した。

(薬剤感受性)

菌株は2007年から2013年の間に母子医療センターおよび関連施設を受診した早産母体、

早産児より分離した。検体は、胎盤、腔、羊水、新生児鼻腔・咽頭、新生児気管より採取し、選択培地にて培養後にDNAを抽出し16S rRNAのシーケンスにて *Ureaplasma parvum* (*U. p.*)、*Ureaplasma urealyticum* (*U. u.*)を判別、さらに *U. p.*についてはPCR法で血清型を決定した。感受性試験は微量液体希釈法に準拠して実施し、MICを測定した。薬剤は、ciprofloxacin (CIP)、levofloxacin (LVFX)、tosufloxacin (TFLX)、garenoxacin (GRNX)、sitafloxacin (STFX)について検討した。また、キノロン耐性遺伝子変異は、DNA ジャイレース (*gyrA*, *gyrB*)、トポイソメラーゼⅡ (*parC*, *parE*)の各ホットスポットの塩基配列決定により解析した。

## 4. 研究成果

(モデルマウスを用いた早産制御法の開発)

### 1. 水酸化フラレーン(F)

早産率はUPM-1投与群の72.7%(8/11dams)、UPM-1+F投与群では18.2%(2/11dams)と有意に改善した( $p < 0.05$ )。胎仔生存率はUPM-1投与群では14.9%(11/74pups)、UPM-1+F投与群では47.8%(32/67pups)と有意に上昇した( $p < 0.01$ )。UPM-1投与群の胎盤で spongiotrophoblast 層の菲薄化と好中球浸潤を認めるもUPM-1+F投与群では改善した。水酸化フラレーンはTLR2リガンドによる早産モデルマウスにおいて、早産を抑制し胎仔生存率を改善した(AJOG, 2015)。

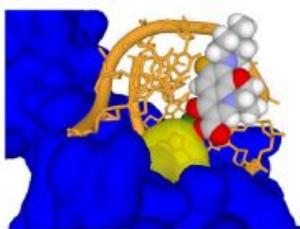
### 2. チオレドキシシン1

母獣にLPSを単独投与すると16匹中15匹が早産した(94%)。一方で、LPSとOVA(オボアルブミン)を投与した場合は9匹中8匹(89%)が早産した。一方、LPSとチオレドキシシンを投与した場合は10匹中4匹のみが早産し(40%)早産率は低下した。次にLPS投与後にチオレドキシシンを投与する治療プロトコルの早産率を検討した。こちらでは、LPS投与群は68%の早産率(25匹中22匹)であったのに対して、チオレドキシシンによる治療群では早産率は41%(34匹中14匹)と早産を抑制した。また、病的には好中球の遊走を抑制した。ヒトが元々有するチオレドキシシン1の有用性が示された。

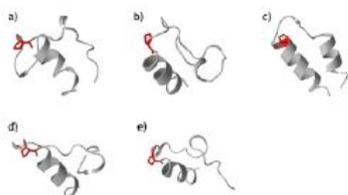
(薬剤感受性)

分離ウレアプラズマ属は計28株で、*U. p.*が19株、*U. u.*が9株であった。薬剤感受性は $10^4$  CCUの菌量を用いて各抗菌薬存在下に48時間培養し判定した。CPFXのMICは4-128 g/ml、LVFXとTFLXはそれぞれ、1-16 g/mlと2-16 g/mlであった。GRNXとSTFXは0.5-4 g/mlで他薬剤より良好であった。続いてキノロン耐性に関係する *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*の遺伝子の解析を

行った。9株(32.1%)で既報の変異であるParCのS83Lを認めた。さらにウレプラズマ陽性130検体より抽出したDNAのキノロン耐性遺伝子の解析を行ったところ、ParCのS83L(28検体)及び新規の変異S83W(1検体)、S84P(1検体)変異を認めた。新規2変異はhomology modeling及び、*de novo* peptide folding予測などによる構造予測よりキノロン系抗菌薬の結合を立体的に障害することが推測された。細菌が薬剤耐性能を獲得する背景に、抗菌薬の不適切な使用が考えられる。周産期医療分野から関連学会に対して生殖年齢層への適切な抗菌薬投与を積極的に呼びかける必要がある。



ParC S83W による立体障害



*de novo* 構造予測(上位5位)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計10件)

1: Namba F, Kobayashi-Miura M, Goda T, Nakura Y, Nishiumi F, Son A, Kubota A, Yodoi J, Yanagihara I. Human thioredoxin-1 attenuates the rate of lipopolysaccharide-induced preterm delivery in mice in association with its anti-inflammatory effect. *Pediatr Res*. 2016 Sep;80(3):433-9. doi: 10.1038/pr.2016.100.

2: Wakimoto T, Uchida K, Mimura K, Kanagawa T, Mehandjiev TR, Aoshima H, Kokubo K, Mitsuda N, Yoshioka Y, Tsutsumi Y, Kimura T, Yanagihara I. Hydroxylated fullerene: a potential antiinflammatory and antioxidant agent for preventing mouse preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2015 Nov;213(5):708.e1-9. doi: 10.1016/j.ajog.2015.07.017.

3: Saka R, Yanagihara I, Sasaki T, Nose S,

Takeuchi M, Nakayama M, Okuyama H. Immunolocalization of surfactant protein D in the liver from infants with cholestatic liver disease. *J Pediatr Surg*. 2015 Feb;50(2):297-300. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2014.11.020.

4: Kawai Y, Nakura Y, Wakimoto T, Nomiyama M, Tokuda T, Takayanagi T, Shiraishi J, Wasada K, Kitajima H, Fujita T, Nakayama M, Mitsuda N, Nakanishi I, Takeuchi M, Yanagihara I. *In vitro* activity of five quinolones and analysis of the quinolone resistance-determining regions of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* in *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* clinical isolates from perinatal patients in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Apr;59(4):2358-64. doi: 10.1128/AAC.04262-14.

5: Yokoi S, Ishihara N, Miya F, Tsutsumi M, Yanagihara I, Fujita N, Yamamoto H, Kato M, Okamoto N, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Kojima S, Saitoh S, Kurahashi H, Natsume J. TUBA1A mutation can cause a hydranencephaly-like severe form of cortical dysgenesis. *Sci Rep*. 2015 Oct 23;5:15165. doi:10.1038/srep15165.

6: Wu HN, Nakura Y, Motooka D, Nakamura S, Nishiumi F, Ishino S, Kawai Y, Tanaka T, Takeuchi M, Nakayama M, Fujita T, Yanagihara I. Complete Genome Sequence of *Ureaplasma parvum* Serovar 3 Strain SV3F4, Isolated in Japan. *Genome Announc*. 2014 May 22;2(3). pii: e00256-14. doi: 10.1128/genomeA.00256-14.

〔学会発表〕(計35件)

2016年度

1. 名倉由起子、中山雅弘、柳原格、第23回日本SIDS・乳幼児突然死予防学会・学術集会、「次世代シーケンスを用いたSIDS肺組織由来細菌叢の解析」、三重、2017.3.17-18

2. Mehandjiev TR, Tenno N, Nakura Y, Wakimoto T, Mimura K, Nakayama M, Kanagawa T, Tomimatsu T, Fujita T, Onouchi Y, Takeuchi M, Kimura T, Yanagihara I. Europran Society of Human Reproduction and Embryology, “Association between *MTHFR* C677T polymorphism with intervillous and decidual pathology in human cases with pregnancy loss” Helsinki, 2016.6.3-6

3. 西海史子、柳原格、第43回日本マイコプラズマ学会、「*U. parvum* 感染とガレクチンの関係」長崎、2016.6.24-25

4. 名倉由起子、中山雅弘、竹内真、柳原格、第52回周産期新生児学会、「死産あるいは早期新生児死亡肺炎例における肺組織メタゲノム解析」富山、2016.7.16-18

5.柳原格. 第 61 回日本新生児成育医学会、「ウレアプラズマ子宮内感染のメカニズムの解析」大阪、2016.12.1-3

2015 年

6. 西海史子、柳原格. 第 88 回日本細菌学会、「*Ureaplasma parvum* の細胞内侵入メカニズムの解析」岐阜、2015.3.26 - 28

7. Heng Ning Wu, Yukiko Nakura, Itaru Yanagihara. 第 88 回日本細菌学会、「Complete Genome Sequence of *Ureaplasma parvum* serovar 3 strain SV3F4, Isolated in Japan」岐阜、2015.3.26 - 28

8. 河合 泰宏、名倉 由起子、柳原格. 第 42 回日本マイコプラズマ学会、「本邦における周産期由来ウレアプラズマ属のキノロン系薬感受性および耐性遺伝子の解析」東京、2015.5.22 - 23

9. 脇本哲、内田薫、味村和哉、金川武司、光田信明、木村正、柳原格. 第 51 回日本周産期新生児医学会、「水酸化フラーレンによる早産モデルマウスの抑制」福岡、2015.7.10-12

10. 内野美穂、徳永真梨子、川崎いずみ、田中智子、中橋弘顕、徳田諭道、野見山亮、柳原格. 第 51 回日本周産期新生児医学会、「子宮内感染に対する抗菌薬の効果についての検討」福岡、2015.7.10-12

2014 年度

11. 脇本哲、味村和哉、金川武司、林周作、石井桂介、光田信明、柳原格、木村正. 第 31 回日本産婦人科感染症研究会、「Progesterone, Fullerene の TLR2 依存性炎症反応に対する影響の検討」神戸、2014.6.7-8

12. 名倉由起子、脇本哲、野見山亮、徳田諭道、高柳俊光、白石淳、北島博之、中山雅弘、光田信明、竹内真、柳原格、「流早産起因微生物ウレアプラズマの薬剤耐性遺伝子解析」、第 50 回日本周産期・新生児医学会学術集会、千葉、2014.7.13-15

13. Heng Ning Wu, Yukiko Nakura, Itaru Yanagihara, 「Complete Genome Sequence of *Ureaplasma parvum* serovar 3 Strain SV3F4, Isolated in Japan」, The 6<sup>th</sup> Meeting of the Asian Organization for Mycoplasmaology, China,2014.8.22-25

14. 入村健児、清家奈保子、園田敏雅、柳原格、第 49 回日臨技九州支部医学検査学会、「MALDI パイオタイパーによるウレアプラズマのマススペクトル取得の試み(第 1 報)」沖縄、2014.11.1-2

15. 江頭政和、岩出晃、川崎祥平、井上博晴、江頭智子、水上朋子、高柳俊光、柳原格、第 59 回日本未熟児新生児学会・学術集会、「気管チューブと羊水を材料としたウレア

プラズマ(U)検出の疫学的検討」、愛媛、2014.11.10-12

〔図書〕(計 1 件)

柳原格、最新マイコプラズマ学 近代出版  
「周産期におけるマイコプラズマ感染症」  
P129-130 (全体 P259)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.mch.pref.osaka.jp/research/developmental/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

柳原 格 (YANAGIHARA, Itaru)

大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・免疫部門・部長

研究者番号：60314415

(2)研究分担者

北島 博之 (KITAJIMA, Hiroyuki)

大阪府立母子保健総合医療センター・新生児科・主任部長

研究者番号：10501041

光田 信明 (MITSUDA, Nobuaki)

大阪府立母子保健総合医療センター・産科・主任部長

研究者番号：50209805

(3)連携研究者

(4)研究協力者

味村 和哉 (MIMURA, Kazuya)

河合 泰宏 (KAWAI, Yasuhiro)

西海 史子 (NISHIUMI, Fumiko)

中平 久美子 (NAKAHIRA, Kumiko)  
呉 恒寧 (WU, Heng Ning)  
名倉 由起子 (NAKURA, Yukiko)  
難波 文彦 (NAMBA, Fumihiko)  
内田 薫 (UCHIDA, Kaoru)  
阪 龍太 (SAKA, Ryuta)  
脇本 哲 (WAKIMOTO Tetsu)  
メハンデジエフ ツベトザール  
(MEHANDJIEV, R Tzvetozar)