



TITLE:

Fetal macrophages assist in the repair of ruptured amnion through the induction of epithelial-mesenchymal transition(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Kawamura, Yosuke

CITATION:

Kawamura, Yosuke. Fetal macrophages assist in the repair of ruptured amnion through the induction of epithelial-mesenchymal transition. 京都大学, 2023, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2023-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k24790>

RIGHT:

This is the author's version of the work. It is posted here by permission of the AAAS for personal use, not for redistribution. The definitive version was published in Science Signaling on Vol 15, Issue 751, 13 Sep 2022, DOI: 10.1126/scisignal.abi5453.

京都大学	博士 (医学)	氏名	川村 洋介
論文題目	Fetal macrophages assist in the repair of ruptured amnion through the induction of epithelial-mesenchymal transition (胎児マクロファージは EMT を誘導して破水した羊膜の治癒を促進する)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>早産は周産期死亡や合併症の最大の原因であり、また出生児に時に後遺症を残すことがある。前期破水は早産の原因の約3-4割を占め全妊娠の1-3%に発症するが、いまだ有効な根治療法は無い。前期破水を発症すると多くは数日以内に分娩となるが、一部の症例では破水した羊膜の自然治癒が見られ妊娠継続が可能である。しかし羊膜の自然治癒のメカニズムは未知であり、本研究はその解明を目的とした。</p> <p>まず前期破水症例のヒト羊膜を組織学的に観察すると、破水部の羊膜にCX3CR1陽性マクロファージ(MΦ)の集積が見られた。破水部の羊膜上皮細胞(AECs)には vimentin および N-cadherin 陽性細胞が増加しており、epithelial-mesenchymal transition (EMT)が示唆された。</p> <p>次に妊娠マウスの前期破水モデルを作成し破水部を組織学的に検討すると、ヒトと同様に破水部の羊膜にCX3CR1陽性MΦの集積が見られ、その周囲のAECsに vimentin および N-cadherin 陽性となる細胞が増加しており EMT が示唆された。破水部に phospho-Smad3 陽性となる AECs が増加し、Tgfb1 の mRNA 発現が増加していることから TGF-β1-Smad シグナルによる EMT が示唆された。</p> <p>羊膜治癒における MΦ の役割を明らかにするべく、Cre-lox P システムを用いて胎仔のCX3CR1陽性MΦを欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作製した。Cx3cr1^{CreER}Csf1^{flx/flx} のオスマウスと Cx3cr1^{+/+} Csf1^{flx/flx} のメスマウスをメイティング、胎仔は Cx3cr1^{CreER/+} Csf1^{flx/flx} となり、タモキシフェンを母体に腹腔内投与により胎仔のみCX3CR1陽性細胞でCSF1Rが不活化され、CX3CR1陽性MΦを欠損することを確認した。卵膜および胎児肺組織をフローサイトメトリーで解析するとCX3CR1陽性MΦが減少、CX3CR1陰性MΦは差を認めなかった。同組織でCsf1rのmRNA発現は減少していた。一方、母体肺組織においてCX3CR1陽性MΦに差を認めず、胎仔のみCX3CR1陽性MΦを欠損することを確認した。</p> <p>この胎仔マクロファージ欠損マウスを用いて破水実験を行ったところ、破水24時間後の破水部のサイズは対照群に比べて有意に大きく、羊膜の治癒が悪化していた。そして破水部ではCX3CR1陽性MΦ、vimentin、phospho-Smad3陽性となるAECsは減少していた。また卵膜でのTgfb1のmRNA発現は減少していた。以上より胎仔のCX3CR1陽性MΦが羊膜の治癒を促進し、そのメカニズムとしてTGF-β1-Smadを介したEMTの関与が示唆された。</p> <p>MΦとAECsの相互作用を解析するためin vitroで実験を行った。スクラッチアッセイではMΦとの共培養によりAECsの遊走が促進された。スクラッチ断端ではvimentin陽性細胞が増加しており、EMTを示唆する所見であった。次にTGF-β1をAECsへ添加するとAECsの遊走は亢進し、vimentin陽性細胞が増加した。そしてMΦとの共培養によるAECsの遊走促進はTGF-β1インヒビターにより阻害された。さらに妊娠マウスにTGF-β1インヒビターを投与することでも羊膜の治癒は阻害された。</p> <p>以上より胎児MΦから分泌されたTGF-β1-SmadシグナルによりAECsのEMT・遊走が亢進し、羊膜の治癒が促進されることが示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、現在治療不可能な早産期前期破水の治療を目指し、早産を減らすことを目的とした。

まずヒト破水部羊膜を観察し、CX3CR1陽性マクロファージ(MΦ)の集積と上皮間葉転換(EMT)を示唆する所見を確認した。次に妊娠マウスの前期破水モデルを用いて破水部を観察すると、羊膜の治癒およびヒト同様のCX3CR1陽性MΦの集積とEMTの所見がみられた。羊膜上皮にはSmad3のリン酸化がみられ、EMTはTGF-β-Smad経路によることが示唆された。

次に胎仔のCX3CR1陽性MΦを欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作製した。同マウスの破水部では羊膜治癒の悪化とEMTの著明な減少が確認され、羊膜の治癒には胎仔由来のMΦが必要であることが確認できた。また卵膜でのTgfb1 mRNA発現は減少していた。

ヒトMΦと羊膜上皮細胞を共培養すると羊膜上皮細胞のEMTと遊走が促進され、これはTGF-β1を介していることが示唆された。また妊娠マウスの破水部にTGF-β1阻害剤を投与すると羊膜の治癒は悪化した。

以上より胎児MΦから分泌されたTGF-β1により羊膜上皮細胞のEMT・遊走が亢進し、TGF-β-Smad経路を介して羊膜の治癒が促進されることが示唆された。

以上の研究は羊膜治癒のメカニズム解明に貢献し、従来治療不可能であった早産期前期破水の治療法開発に寄与する可能性がある。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和5年3月31日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降