

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18204

研究課題名（和文）プロゲステロン受容体シグナルによる妊娠維持及び破綻による早産誘導の分子機構

研究課題名（英文）Molecular Mechanisms of Progesterone Receptor Signaling to Maintain Pregnancy and Induce Preterm Birth by Disruption

研究代表者

杉田 洋佑 (Sugita, Yosuke)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：60774354

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：子宮頸部におけるプロゲステロン(P4)シグナルによる妊娠維持のメカニズム解明のため、臨床背景の異なる症例の子宮頸部線維芽細胞培養系を樹立し、P4 応答を比較した。難治性頸管無力症患者(CI)に対して経腹的子宮頸管縫縮術を実施し妊娠維持したCI群と、子宮頸管未熟化のコントロール群とをそれぞれ帝王切開時に子宮頸部組織を採取した。培養細胞へのP4添加による変化を解析したところ、未熟化例で認めるP4応答がCI群で減弱していることを確認した。さらにその原因としてP4受容体(PR)の発現をリアルタイムPCR、ウエスタンブロット、細胞免疫染色で解析したところ、CI群ではPRが顕著に減少していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
原因不明であった難治性子宮頸管無力症において、プロゲステロン受容体の発現低下に起因するプロゲステロン応答の破綻が原因の一因となっていることが示唆された。新たな早産治療戦略の礎となりうる重要な知見を得た。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of pregnancy maintenance by progesterone (P4) signaling in the cervix, we established cervical fibroblast culture lines from patients with different clinical backgrounds and compared P4 responses. Cervical tissue samples were obtained from patients with refractory cervical insufficiency (CI) who underwent transabdominal cervical suture and maintained pregnancy, and from controls with cervical immaturity, respectively, at the time of cesarean section. Analysis of the changes caused by the addition of P4 to the cultured cells showed that the P4 response observed in the immature cases was attenuated in CI. Furthermore, we analyzed the expression of P4 receptor (PR) by real-time PCR, Western blotting, and cell immunostaining, and found that PR was significantly decreased in CI.

研究分野：産婦人科

キーワード：早産 子宮頸管無力症 子宮頸管縫縮術 プロゲステロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮頸部は妊娠期間の多くでは固く閉じて子宮内容を維持し、陣痛発来前には軟化・熟化し、児の通路として開大する。妊娠維持に必須のホルモンであるプロゲステロン (P4) の作用と、その消退による変化と考えられているが、分子レベルでの理解は進んでいない。

2. 研究の目的

経腹的子宮峡部頸管縫縮術 (TAC) 後のより帝王切開時にサンプリングした組織より子宮頸部線維芽細胞 (UCFs) 初代培養系を樹立し、P4 への応答を未熟化妊娠子宮頸管由来の細胞と比較することで子宮頸管無力症患者における子宮頸管熟化と P4 応答との関連を明らかにすることを目指した。さらに、マウスを用いてプロゲステロンシグナルの破綻が早産をもたらすメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト子宮頸部線維芽細胞を用いた解析

倫理委員会の承認のもと、TAC 後の子宮頸管無力症患者 (n=3) およびコントロールとした子宮頸管未熟化の妊婦 (n=3) より、妊娠 36 週以降の予定帝王切開時に子宮頸部組織を少量採取し、それぞれより UCFs 培養系を確立した。それぞれの UCFs を P4 (1.0 μmol/L) の添加もしくは非添加で 6 時間培養し、培養細胞から抽出した mRNA を RNA シークエンスとリアルタイム PCR で遺伝子発現の変動を比較解析した。さらに PR の発現についてリアルタイム PCR、ウエスタンブロッティング、細胞免疫染色で比較した。また、P4 添加もしくは非添加での LPS (2.0 μg/mL) 刺激に対する炎症抑制効果を比較した。

プロゲステロン消退型マウス早産モデルによる解析

妊娠 15 日目マウスにプロゲステロン拮抗薬 mifepristone 500 μg を投与し 12 時間後に子宮頸管組織を摘出し解析を実施した。

4. 研究成果

ヒト子宮頸部線維芽細胞を用いた解析

培養細胞から抽出した RNA を用いた RNA シークエンスにおいて、コントロールでは P4 添加による共通した遺伝子発現応答が見られたが、子宮頸管無力症では P4 応答が消失していた。

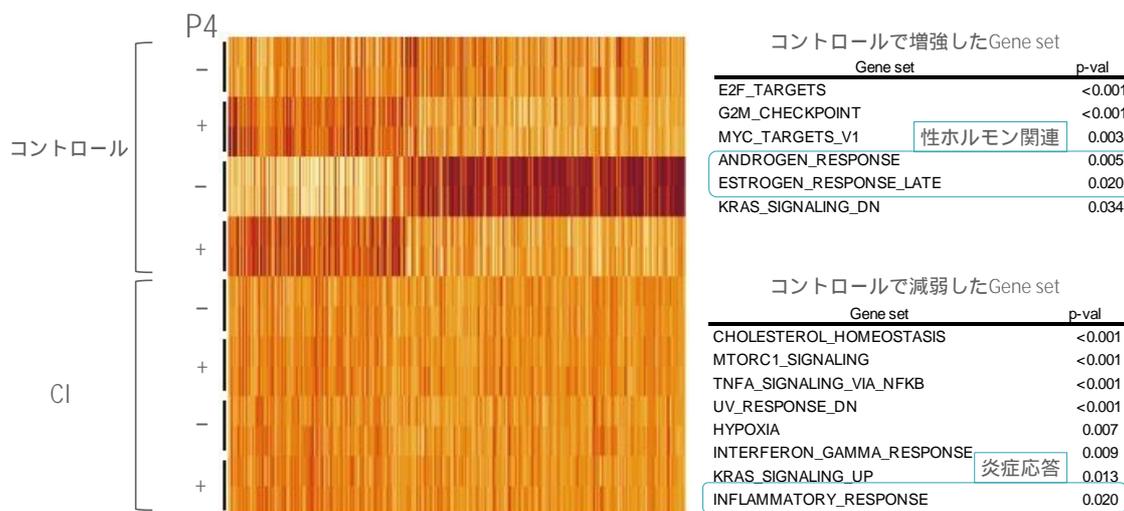


図 1 RNA シークエンスによる P4 応答の検討

また、プロゲステロン応答遺伝子(FKBP5, SPARCL1)に絞ったリアルタイム PCR の結果でも同様に子宮頸管無力症で P4 応答消失が見られた。(図 3)

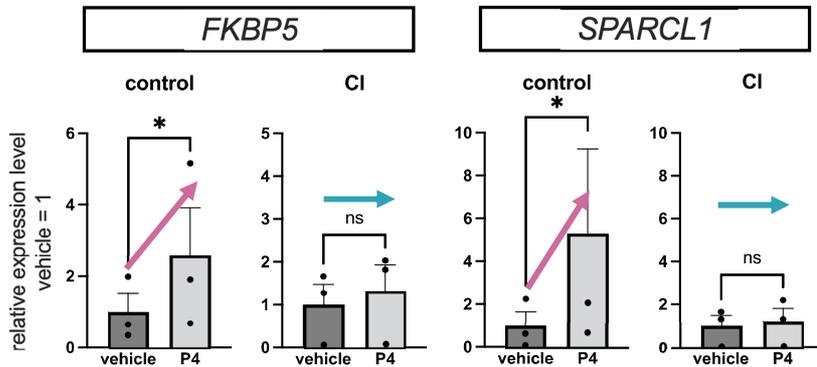


図 2 リアルタイム PCR 法による P4 応答遺伝子の検討

培養細胞を用いてリアルタイム PCR、ウエスタンブロット、免疫染色により PR 発現を検討したところ、子宮頸管無力症由来の線維芽細胞において発現が著しく低下していた。

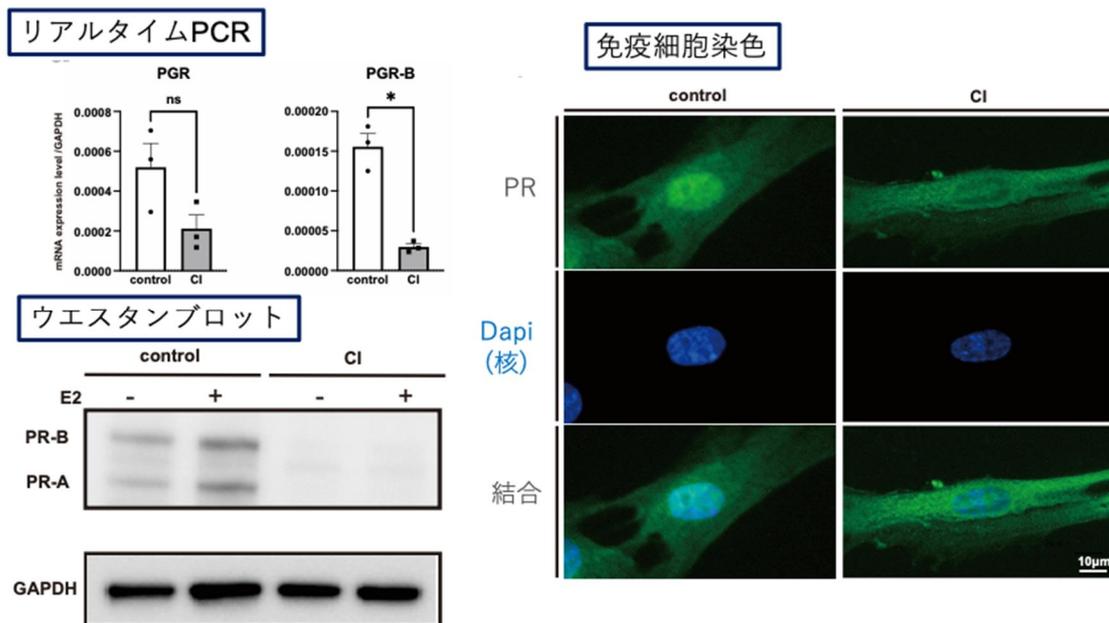


図 3 プロゲステロン受容体(PR)の発現の比較

さらに、コントロールでは LPS 刺激による IL1b、IL6、PTGS2 の増強に対してプロゲステロン添加による抑制効果が確認されたが、子宮頸管無力症では P4 添加による炎症抑制効果が消失していた。(図 5)

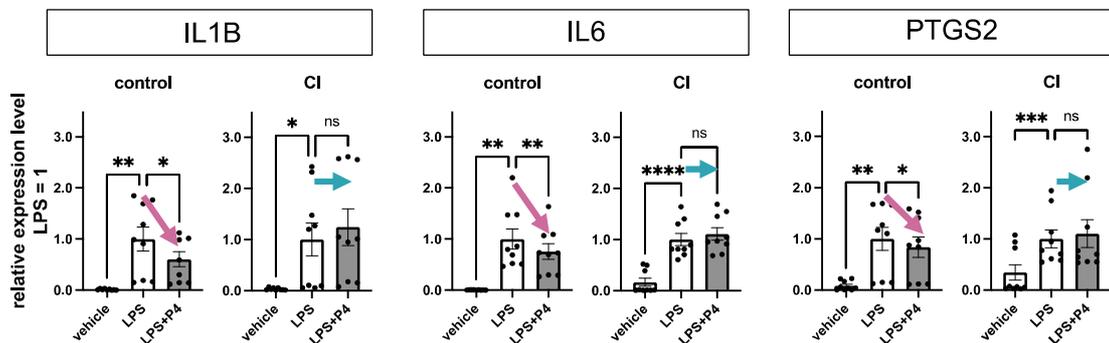


図 4 プロゲステロンによる LPS 炎症の抑制作用の比較

プロゲステロン消退型マウス早産モデルによる解析
 妊娠 15 日目マウスにプロゲステロン拮抗薬 mifepristone 500 μ g を投与し 12 時間後に子宮頸管組織を抽出したところ、子宮頸部間質のコラーゲン構造の分解が確認された(図 5)

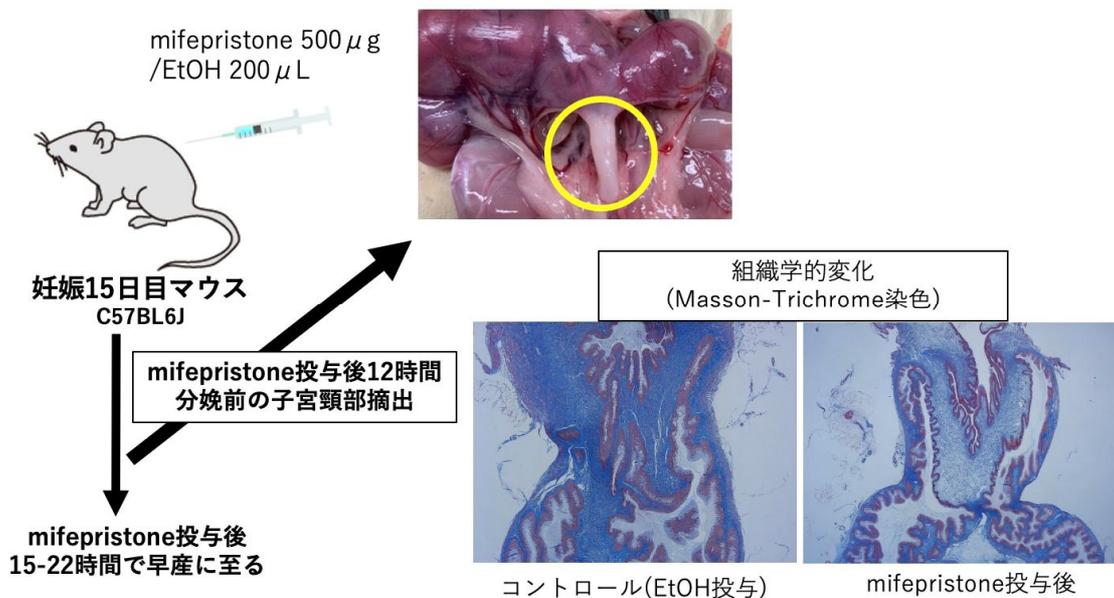


図 5 マウス早産モデル概要

抽出した RNA を用いて PCR アレイを実施したところ、複数のサイトカイン及びケモカインが mifepristone 投与マウスの子宮頸部において発現が亢進していた。その中から好酸球誘導ケモカインである CCL11 と好酸球の表面マーカーで CCL11 の受容体である CCR3 について免疫染色およびウエスタンブロットで検討したところ、mifepristone 投与マウスの子宮頸部において CCL11 の発現増強及び好酸球の増加が確認された。

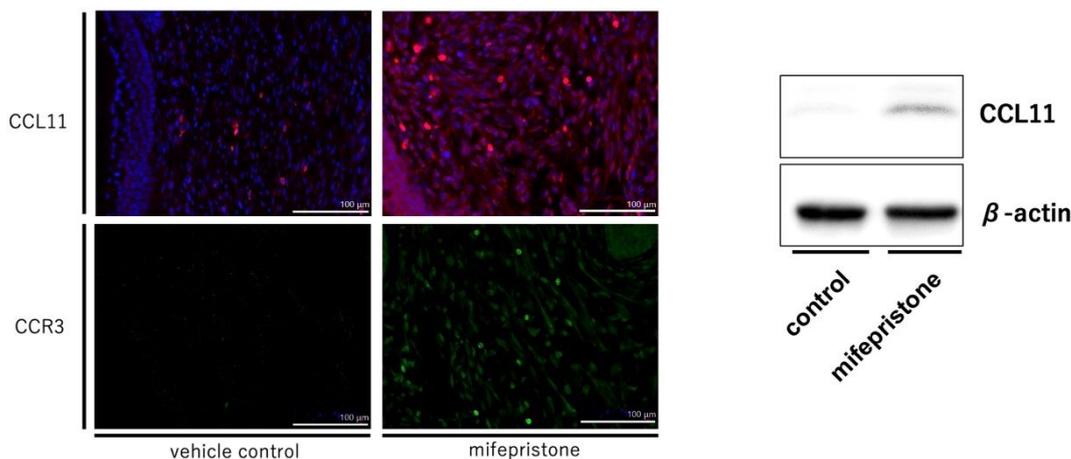


図 6 mifepristone 投与マウスにおける CCL11-CCR3 系の増強

結果まとめ

プロゲステロン作用は妊娠維持に必須であり、子宮頸管無力症の病態にはプロゲステロン受容体の発現調節破綻が関与している可能性が示唆された。さらに、子宮頸部におけるプロゲステロン消退が早産につながるメカニズムとして、CCL11-CCR3 を中心とした好酸球性炎症が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉田 洋佑、桑原 慶充、松田 繁、大石 由美子、鈴木 俊治
2. 発表標題 プロゲステロン消退型早産マウスの頸管熟化過程におけるCCL11を介した好酸球性炎症の検討
3. 学会等名 日本産科婦人科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉田 洋佑、桑原 慶充、松田 繁、大石 由美子、鈴木 俊治
2. 発表標題 マウス頸管熟化過程において、プロゲステロン消退はCCL11を介した好酸球性炎症を誘導する
3. 学会等名 日本生殖免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉田 洋佑、桑原 慶充、竹下 俊行
2. 発表標題 プロゲステロン消退に伴う子宮頸管熟化にCCL11-CCR3 axisによる無菌性炎症が関与する
3. 学会等名 日本周産期新生児学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉田 洋佑、桑原 慶充、大石 由美子、竹下 俊行
2. 発表標題 難治性頸管無力症検体を用いた頸管熟化に伴うプロゲステロン応答性変化の検証
3. 学会等名 日本産科婦人科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yosuke Sugita, Yoshimitsu Kuwabara, Shigeru Matsuda, Yumiko Oishi, Toshiyuki Takeshita
2. 発表標題 Progesterone withdrawal induces eosinophilic inflammation in the process of mouse cervical ripening
3. 学会等名 Society for Reproductive Investigation
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉田洋佑、桑原慶充、竹下俊行
2. 発表標題 ヒト子宮頸部線維芽細胞を用いた頸管熟化に伴うプロゲステロン応答性および潜在的な炎症性変化の検証
3. 学会等名 日本生殖免疫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yosuke Sugita, Yoshimitsu Kuwabara, Yumiko Oishi, Toshiyuki Takeshita
2. 発表標題 Progesterone responsiveness change associated with cervical ripening using a human cervical fibroblast culture system
3. 学会等名 日本産科婦人科学会
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

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