

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09448

研究課題名（和文）内因性NF- κ B転写阻害因子MTI-1による着床機構の解明と治療効果の検討研究課題名（英文）Mechanism of implantation by endogenous NF- κ B transcriptional inhibitor (MTI-1)

研究代表者

三宅 達也 (Miyake, tatsuya)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00814766

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）：我々は、哺乳動物に普遍的に存在しNF- κ Bの転写活性を阻害する核内タンパクMTI-1の活性部位を利用したペプチド(6A-8R)投与により、マウスの着床が阻害されることを初めて証明した。新規の避妊薬の開発が期待される。一方、6A-8Rの着床阻害効果はNF- κ B以外の経路の関与も示唆される結果であった。避妊薬として6A-8Rを実用化するために、着床機構におけるMTI-1の役割について更なる研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚の着床機構には、炎症などを調節する転写因子であるNF- κ Bの関与が報告されているがその分子機序は明らかではない。我々は、哺乳動物に普遍的に存在しNF- κ Bの転写活性を阻害する核内タンパクMTI-1の活性部位を利用したペプチド(6A-8R)投与により、マウスの着床が抑制されることを初めて証明した。本薬剤の臨床応用を目指し研究を継続することにより、ホルモン非依存的な避妊薬の開発が可能となる。また、MTI-1の着床機構における役割が解明されることにより難治性の不妊症である着床障害に対する治療法となりうる。

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated for the first time that the administration of a peptide (6A-8R) derived from the active site of the nuclear protein MTI-1, which ubiquitously exists in mammals and inhibits NF- κ B transcriptional activity, impedes implantation in mice. This finding suggests the potential development of a novel contraceptive. On the other hand, the anti-implantation effect of 6A-8R suggests the involvement of pathways other than NF- κ B. Further research is needed to elucidate the role of MTI-1 in the implantation mechanism to realize the practical application of 6A-8R as a contraceptive.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：NF- κ B MTI-1 6A-8R 着床阻害

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠は着床時より複雑な炎症反応経路の相互作用による均衡のうえに形成され、着床もその例外ではない (Nat Rev Immunol. 2017; 17: 469-482.)。着床周辺期に子宮内膜の炎症は一過性に亢進することが知られている。よって着床時に炎症調節薬を子宮に作用させることにより、着床を阻害できる可能性が示唆される。

炎症、細胞の増殖などに関与する事が知られている多機能転写因子である nuclear factor-kappa B (NF- κ B) は妊娠に関与する炎症反応経路の重要な調節因子でもあり、着床から分娩発来制御まで妊娠全期間に密接に関与している (BJOG. 2018; 125: 1379-1387.)。ヒトでは NF- κ B 活性は黄体期から妊娠前期にかけて上昇し、子宮内膜細胞や様々な免疫細胞から分泌される Interleukin (IL)-6, leukemia inhibitory factor (LIF) などの脱落膜化に関する炎症性サイトカインの発現に深く関与している。NF- κ B は着床周辺期から妊娠初期まで幅広く関与していることが示唆されているが、NF- κ B 活性化の調節機構は十分に解明されていない。これらの問題は、外因性 NF- κ B 阻害剤を用いた研究では非特異的な影響が予想しにくく、また、NF- κ B の内因性調節因子の詳細が判明していないこと、加えて妊娠中に安全に使用できる薬剤の開発が困難であることに起因している。

MTI-1 は哺乳動物に普遍的に存在する核内タンパクであり、免疫担当細胞含めて多くの細胞で発現しており NF- κ B 活性を調整しているが、着床時における MTI-1 の挙動は不明である。我々は、MTI-1 が NF- κ B の p50 サブユニットに直接結合し NF- κ B の転写活性を阻害する内因性 NF- κ B 直接阻害因子であることを同定し (Endocrinology (2016) 157, 4973-4986、特許第 4874798 号)、MTI-1 の阻害活性は中央部の 40 アミノ酸配列(40A)にあり、その中でも特に 6 アミノ酸配列(6A)が強い阻害活性を持つことも明らかにした(特願 2016-564896 号)。MTI-1、40A、6A に細胞導入配列(8R)を付加したペプチドは種々の炎症モデル動物で強い抗炎症作用を發揮し、内因性 NF- κ B 直接阻害因子であるステロイドが有する副作用(血糖値上昇・消化管潰瘍・好中球遊走能の低下など)を示さないことを報告している。NF- κ B 直接阻害薬の開発のために、これまで新たなステロイド誘導体の合成や大規模化合物ライブラリーのスクリーニングが行われてきたが、未だに実用化した成功事例は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究は、MTI-1 の活性を保持したペプチド(6A-8R)によるマウスの着床阻害効果・安全性を検証すること、新規内因性 NF- κ B 直接阻害因子(MTI-1)による NF- κ B を介した着床制御機構を解明することの 2 点を目的とした。着床への MTI-1 の関与が解明されれば、避妊薬だけでなく難治性の不妊症である着床不全に対する治療薬となる可能性もある。

3. 研究の方法

まず、(1) 着床前マウスへの 6A-8R 投与による着床時期の比較・安全性を検討した。次に、(2) 脱落膜化を誘導したヒト子宮内膜間質細胞(HESC)における 6A-8R 投与による脱落膜化阻害効果を検討し、MTI-1 の着床機構への関与を検討した。

(1) 着床前マウスへの 6A-8R 投与による着床時期の比較・安全性の検討

6A-8R を妊娠初期より連日腹腔内/経膣投与し、着床時期について比較検討した。妊娠 5.0 日目に尾静脈より Evans blue を静注し着床率を計算した。また、妊娠 4.0 日目に子宮内腔を洗浄し胚を回収し胚発育が阻害されていないことを確認した。子宮を HE 染色で着床・脱落膜化の評価を行い、MTI-1 発現量を qRT-PCR、WB 法を用いて評価、また、着床関連遺伝子(STAT-3, LIF, IL-6, PR-A など)などの発現量を比較検討した。STAT3 のリン酸化や PR を免疫染色で評価した。

また、6A-8R 投与による胎仔の安全性を検討するため、6A-8R 投与下の避妊不成功例の胎仔・胎盤の数・大きさ・重量を測定し、MTI- が胎仔に与える影響も評価した。6A-8R はイオン性かつ水溶性、分子量は 1150 と 1000 以上あるため、胎盤通過性が極めて不良と予測されるが、胎仔・胎盤組織抽出液から高速液体クロマトグラフィー法で測定し検証した。

(2) 脱落膜化を誘導したヒト子宮内膜間質細胞(HESC)における 6A-8R 投与による脱落膜化阻害効果の検討

HESC を cAMP+MPA により脱落膜化誘導後に 6A-8R を投与し、PRL と IGFBP-1 といった脱落膜化マーカーや着床関連遺伝子 (STAT-3, LIF, NF- B, COX-2 など) の発現を測定した。

4. 研究成果

(1) 着床前マウスへの 6A-8R 投与による着床時期の比較・安全性の検討

当初、妊娠 3.5 日目より 6A-8R を連日経腹投与したが、着床阻害効果は見られなかった。6A-8R の腹腔内投与量を増量しても着床阻害効果が得られなかったため、更に強力な早産抑制効果を期待して子宮の初回通過効果を鑑み 6A-8R の経腔剤を開発した。しかし、妊娠 3.5 日目からの 6A-8R の経腔投与でも着床阻害効果は見られなかった。そのため、妊娠 2.5 日目より 6A-8R の経腔投与を開始したところ、6A-8R 非投与マウスに比して有意に着床阻害効果を示した。また、妊娠 3.5 日目にマウス子宮から胚を回収し、形態及び回収胚数を測定したが、6A-8R を投与した妊娠マウスと 6A-8R 非投与マウスとを比較して有意な差を認めなかった。着床期の妊娠マウスへの 6A-8R 投与は胚への影響を及ぼさず着床阻害効果を生じていると推測された。6A-8R 投与下の避妊不成功例の胎仔胎盤の数・体重・大きさは対照群と有意差を認めず、母マウスも異常を認めなかったため、6A-8R の母仔への安全性が示唆された。胎仔・胎盤組織抽出液から高速液体クロマトグラフィー法で 6A-8R 測定を試みたが検出されなかった。

一方、6A-8R 投与マウスの子宮を用いて炎症性サイトカイン(IL-1 ,IL-1 ,TNF- ,COX2 など)や着床関連遺伝子(LIF,Wnt,Areg など)など NF- B が制御する遺伝子の mRNA を測定したが、非投与マウスと比較して明らかな有意差を認めなかった。網羅的な遺伝子解析を目的として、RNA シーケンシングにて妊娠マウス子宮を解析したところ、幾つかの候補遺伝子が同定され、現在、検証中である。また、6A-8R 投与マウスの子宮の pSTAT-3 は非投与群と比較して変化がなかった。HE 染色では、6A-8R 投与マウスの子宮では脱落膜化が障害されている所見が示唆された。

(2) 脱落膜化を誘導したヒト子宮内膜間質細胞(HESC)における 6A-8R 投与による脱落膜化阻害効果の検討

HESC を cAMP+MPA により脱落膜化誘導後に 6A-8R を投与したところ、光学顕微鏡下に脱落膜化は認められず、脱落膜化マーカー (PRL, IGFBP-1 など) の発現は抑制された。

以上より、我々は、MTI-II の活性部位を利用したペプチド(6A-8R) 投与により、マウスの着床が阻害されることを初めて証明した。また、6A-8R の胎仔への安全性も示した。一方、6A-8R の着床阻害効果は、NF- B 活性調節経路に非依存的に脱落膜化が障害され誘導されている可能性も推測された。避妊薬/着床不全治療薬としての 6A-8R 臨床応用のために、着床制御機構における MTI- が果たす役割について更なる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	岡本 一起 (okamoto kazuki) (40177085)	大阪大学・大学院医学系研究科・招へい准教授 (14401)	
研究分担者	瀧内 剛 (takiuchi tsuyoshi) (40733358)	大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授(常勤) (14401)	
研究分担者	木村 正 (kimura tadashi) (90240845)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	

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