

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：21K09515

研究課題名（和文）内因性NF- $\kappa$ B転写阻害因子MTI-1による分娩制御機構の解明と治療効果の検討研究課題名（英文）elucidation of the mechanism of labor, derived from the intrinsic NF- $\kappa$ B inhibitor protein

研究代表者

瀧内 剛（Takiuchi, Tsuyoshi）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授（常勤）

研究者番号：40733358

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- $\kappa$ 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、リポ多糖類（LPS）を用いた炎症誘発性早産モデルマウスの早産が抑制されることを初めて証明した。早産予防薬の開発が期待される。一方、MTI-1ノックアウトマウスは早産にならなかったため、MTI-1を介したNF- $\kappa$ B活性調節経路は分娩制御に必須ではないことが推測された。早産予防薬として6A-8Rを実用化するために、分娩制御機構における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

分娩発来機構には、炎症などを調節する転写因子であるNF- $\kappa$ 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。そのため、炎症関連性妊娠合併症（早産など）に有効な治療法を確立できていない。我々は、哺乳動物に普遍的に存在しNF- $\kappa$ 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、リポ多糖類（LPS）を用いた炎症誘発性早産モデルマウスの早産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、安全な出産を実現可能とする新規の早産予防薬が開発される可能性がある。

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- $\kappa$ B transcriptional activity, suppresses preterm birth in an inflammation-induced preterm birth model in mice using lipopolysaccharides (LPS). This finding suggests the potential for developing a novel therapeutic agent for the prevention of preterm birth. On the other hand, MTI-1 knockout mice did not exhibit preterm birth, indicating that the NF- $\kappa$ B activity regulation pathway mediated by MTI-1 is not essential for parturition control. Further research is needed to elucidate the role of MTI-1 in the mechanism of parturition to realize the practical application of 6A-8R.

研究分野：生殖・周産期

キーワード：分娩発来機構 MTI-1 NF- $\kappa$ B 炎症

## 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、分娩は炎症反応の帰結としても捉えられる (Nat Rev Immunol. 2017; 17: 469-482.)。妊娠中の過剰な炎症は、炎症関連性妊娠合併症(早産など)を誘導する。早産は、本邦の分娩のうち6%に発生し新生児死亡や新生児障害の主要原因であるが、分娩発来の機序が十分に解明されていないため根本的な予防法は存在しない。炎症調節薬により制御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- $\kappa$ 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.)。分娩発来には feto-maternal interface を構成している羊膜や脱落膜における NF- $\kappa$ B 活性が深く影響している。早産では在胎週数が早いほど感染などによる子宮内炎症が高頻度に存在しており NF- $\kappa$ B も早期に活性化している。しかし、分娩発来における NF- $\kappa$ B 活性化の調節機構は未だ十分に解明されておらず、炎症関連性妊娠合併症に対する治療法も確立していない。これらの問題は、外因性 NF- $\kappa$ 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、分娩関連分子の KO マウスの多くは胎生致死であり解析に適していないこと、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- $\kappa$ B 活性を調整しているが、妊娠分娩時における MTI-1 の挙動は不明である。我々は、MTI-1 が NF- $\kappa$ B の p50 サブユニットに直接結合し NF- $\kappa$ B の転写活性を阻害する内因性 NF- $\kappa$ 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発揮し、内因性 NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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、(1) MTI-1 の活性を保持したペプチド(6A-8R)による早産モデルマウスへの治療効果・安全性を検証すること、(2) 新規内因性 NF- $\kappa$ B 直接阻害因子(MTI-1)による NF- $\kappa$ B を介した分娩制御機構を解明することの2点を目的とした。分娩発来への MTI-1 の関与が解明されれば、早産だけでなく過期妊娠に対する誘発分娩の治療薬となる可能性もある。

### 3. 研究の方法

まず、(1) 6A-8R による早産モデルマウスへの治療効果・安全性を検討した。次に、(2) 妊娠中と分娩前後のマウス・ヒト検体で MTI-1 発現と NF- $\kappa$ B 活性を検討し MTI-1 の分娩制御機構への関与を検討した。

#### (1) 早産マウスへの 6A-8R 投与による分娩時期の比較

妊娠マウスへの lipopolysaccharide (LPS) 投与は炎症誘発性早産のモデルマウスとして確立されている (Am J Pathol. 2016; 186(3):616-29.)。LPS 早産モデルマウス(C57BL/6J 系統)に対して、交配後 15 日目に 6A-8R 腹腔内連日投与/経膈連日投与による分娩時期を検討した(正期産を 19-21 日目と定義)。マウスの子宮・胎盤における MTI-1 発現量を qRT-PCR、ウエスタン

プロット法を用いて比較検討した。腹腔内洗浄液の炎症性サイトカイン量 (IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ ) を比較検討した。また、6A-8R 投与による胎仔の安全性を検討するため、胎仔・胎盤の数・大きさ・重量を測定し、MTI-1 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) 分娩前後のマウスとヒトの子宮・胎盤などにおける MTI-1・NF- $\kappa$ B 活性の比較

妊娠中・分娩前 (交配後 10.5-18.5 日目) と比べ、分娩中・直後のマウスの子宮における MTI-1・NF- $\kappa$ B 活性を比較検討した。子宮・胎盤における MTI-1 発現量を qRT-PCR、ウエスタンブロット法を用いて、また、子宮・胎盤における MTI-1 と p50 の発現・局在を免疫組織学的検査にて比較検討した。妊娠 15 日目のマウスの胎盤組織から物理的/酵素処理により細胞を調製し免疫細胞集団を分離し、single cell RNA-Seq (scRNA-seq) 解析を行い MTI-1 発現が優位である細胞集団の同定を試みた。また、PBS 投与/LPS 投与 4 時間後のマウス胎盤における MTI-1 遺伝子発現変動の差を scRNA-seq 解析にて評価した。陣痛発来前に予定帝王切開となった早産・正期産妊婦と、陣痛発来後に緊急帝王切開となった早産・正期産妊婦の胎盤・羊膜を同様に比較検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) LPS 誘導性早産モデルマウスに対する 6A-8R を用いた早産抑制効果の検証

妊娠 15 日目に LPS+PBS/6A-8R (経腹投与) の 2 群で分娩時期を評価したところ、PBS 投与群は 100% 早産となったが、6A-8R 群では分娩時期の延長効果が見られた。6A-8R の腹腔内投与量を増量しても 100% の早産防止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。6A-8R の経腔投与群の早産率は経腹投与群より低下した。6A-8R の経腹 + 経腔投与の早産率は 50% であり、6A-8R に早産抑制効果があることを見出した。また、6A-8R 投与群で子宮の MTI-1 発現量が抑制される傾向があることを見出した。6A-8R 投与群の胎仔胎盤の数・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 の母仔への安全性は示された。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。

#### (2) 分娩前後のマウスとヒトの子宮・胎盤などにおける MTI-1・NF- $\kappa$ B 活性の比較

MTI-1 は通常のウエスタンブロット法では検出が困難なタンパクであり、ヒト・マウスでの子宮・胎盤などの組織からの検出方法を確立するのに時間を要した。マウスにおいて、分娩の進行とともに子宮・胎盤における MTI-1 発現量の変化が見られたが、一貫性のある結果がえられず、当初予想していたような分娩時期における MTI-1 発現量の特徴的な変化が見いだせなかった。ヒトにおいても、陣痛発来前後の胎盤における MTI-1 発現量については一貫した結果は得られなかった。

妊娠中のマウス胎盤の scRNA-seq 解析では、M $\phi$  や樹状細胞などの自然免疫担当細胞で MTI-1 が高発現していることを見出した。一方、PBS 投与マウスと LPS 投与マウスの胎盤における MTI-1 遺伝子発現変動に有意な差はみられなかった。

(1) の 6A-8R 投与実験では、予想外に 6A-8R による NF- $\kappa$ B 活性の抑制が不十分であっても早産が抑制される効果がみられ、MTI-1 の NF- $\kappa$ B 以外の経路への関与が示唆される実験結果がえられた。

マウス/ヒトにおいて、分娩の進行における MTI-1 の関与を示す結果はえられたが、その制御機構を一元的に示す結果がえられなかったため、MTI-1 KO マウス/M $\phi$  cKO マウスを作成し解析する方針とした。

### (3) MTI-II KO マウス/M cKO マウスにおける分娩制御機構の評価

MTI-II KO マウスは作成完了した。離乳前死亡も報告されていたが、我々の作成した MTI-II KO マウスは離乳後も生存した。同マウスの分娩時期を評価したが正期産であった。よって、MTI-II は分娩制御に必須の分子ではないことが示唆された。現在、M cKO マウスは作成中である。

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、LPS を用いた炎症誘発性早産モデルマウスの早産が抑制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、MTI-II KO マウスは早産にならなかったため、MTI-II を介した NF- $\kappa$ B 活性調節経路は分娩制御に必須ではないことが推測された。早産治療薬としての 6A-8R 実用化のために、分娩制御機構における MTI-II 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1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 瀧内剛	4. 巻 90
2. 論文標題 適正な分娩発来機構および早産と過期産	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 産科と婦人科	6. 最初と最後の頁 518-523
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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	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
---------	---------