

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：24601
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591832
 研究課題名（和文） 大豆蛋白を用いた早産予防薬の開発

研究課題名（英文） Invention of prophylactic medicine for premature birth made from soybean.

研究代表者

佐道 俊幸（SADO TOSHIYUKI）

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50275335

研究成果の概要（和文）：現在、早産予防薬としてウリナスタチン（ビクニン）が臨床応用されており、その有用性は広く認識されている。しかし、ヒト尿から精製されており、大量精製は困難である。我々はウリナスタチンと類似構造をもつ大豆ビクニンを発見し、その強力な抗炎症作用に着目し、早産予防薬として臨床応用できることを目指している。そこで、大豆ビクニンの抗炎症作用の機序の詳細を解明することを目的とした。マクロファージを用いた検討で大豆ビクニンは細胞内リン酸化を抑制することが判明した。また、炎症系サイトカインの産生を抑制することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Premature birth caused poor prognosis in newborn. The aim of this study were to reveal anti-inflammation effect by soybean Kunitz trypsin inhibitor. Soybean Kunitz trypsin inhibitor suppressed the production of inflammatory cytokine. Therefore, soybean Kunitz trypsin inhibitor have anti-inflammation effect.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：産科学

1. 研究開始当初の背景

近年、周産期医療の問題点が数多くマスコミなどにより報道され、社会的問題となっている。問題点の一つとして新生児集中治療室の不足があり、医療者と行政が一体となって拡充の努力がなされている。一方、新生児集中治療室に収容される早産児の出生を予防することも非常に重要である。新生児医療の進歩により未熟児の生命的予後は改善されてきているが、脳性麻痺や慢性呼吸器疾患な

どの後遺障害発症の危険性がある。これらの後遺障害発症を完全に予防できない現状においては、早産自体を予防することが周産期医学分野の研究の重要な課題となっている。早産の主たる原因は細菌性膣症、子宮頸管炎などの炎症が絨毛羊膜炎として子宮内へ波及することと考えられている。したがって、膣内や子宮頸管の炎症を制御できれば早産予防に繋がると思われる。

我々はヒト羊水・尿中に生理的抗炎症作用

を有するビクニンを発見し、好中球やマクロファージといった炎症性細胞に働いて、細胞内のシグナル伝達を抑制することにより、炎症性サイトカインの産生を抑制するなどの作用により抗炎症作用を発揮することを証明してきた (Kobayashi et al, 2004)。また、ビクニンが羊膜や子宮筋の受容体に結合すると細胞内へのカルシウム流入やシグナル伝達が抑制され、サイトカインやプロスタグランジンの産生抑制を介して、子宮筋の収縮を抑制する機序を明らかにしてきた (Kobayashi et al, 1995)。そして、現在、早産予防として、この抗炎症作用を有するビクニン (ウリナスタチン) の膈内投与が臨床応用されており、早産予防効果が実証されつつある。しかし、このビクニンはヒト羊水・尿由来であり、大量精製することは困難である。

そこで我々はヒトビクニンと構造ホモロジー (類似性) を有する分子を検索したところ大豆蛋白成分中にビクニン類似物質を発見し、「大豆ビクニン」と命名した。そして、大豆ビクニンがヒトビクニンと同様な抗炎症作用を有することを明らかにしてきた (Kobayashi et al, 2004)。大豆ビクニンは大豆蛋白を精製する時に廃棄されていた分画 (大豆ホエー) から回収され、尿中ヒトビクニンと同様な方法で精製可能であり、大量に安価に精製することが出来る。また、原材料が大豆であることから、安全性や患者の安心感も得られやすいと思われる。さらに、経口投与も可能であることが予想される。これらのことから大豆ビクニンにヒトビクニンと同様な早産予防効果が確認されれば、実際の臨床においてたいへん有用な治療薬となると思われる。

2. 研究の目的

そこで今回の研究の目的は、ヒトビクニンおよび大豆ビクニンの生理活性を調べることならびに早産惹起炎症マウスモデルで早産予防効果につき検討することである。

3. 研究の方法

(1) 抗炎症作用として単球細胞内シグナル伝達系の抑制効果で評価する。

培養細胞 (マウスマクロファージ系 RAW 2647 細胞及びヒト末梢血単球細胞) にリポポリサッカライド 100 ng/ml 添加することにより、細胞内リン酸化蛋白として MAP キナーゼの MEK1/2・ERK1/2, JNK, p38, PI3 キナーゼ・Akt 系のリン酸化が起こるかどうかをウエスタンブロットで評価する。

(2) 大豆ビクニンによる細胞内タンパクリン酸化抑制実験

培養細胞に事前に大豆ビクニンを 1 μ M 添加しておき、その後 30 分後にリポポリサ

ッカライド 100 ng/ml 添加することにより、細胞内蛋白リン酸化として MAP キナーゼの MEK1/2・ERK1/2, JNK, p38, PI3 キナーゼ・Akt 系のリン酸化が抑制されるかどうかをウエスタンブロットで評価する。

(3) 大豆ビクニンによるサイトカイン産生抑制実験

培養細胞に事前に大豆ビクニンを 1 μ M 添加しておき、リポポリサッカライド 100 ng/ml 添加することにより、サイトカイン (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8) の産生が抑制されるかどうかを ELISA で測定する。

(4) マイクロアレイ法による遺伝子発現実験

マクロファージに大豆ビクニンを添加したときの遺伝子発現の相違について、マイクロアレイを用い遺伝子発現をクラスター解析し、比較検討する。

4. 研究成果

大豆ビクニンの抗炎症作用に対する基礎的検討結果：

(1) 抗炎症作用の評価：単球細胞内シグナル伝達系の抑制実験

マウス単球細胞培養系にリポポリサッカライド 100 ng/ml 添加することにより、細胞内リン酸化蛋白として MAP キナーゼの MEK1/2・ERK1/2, JNK, p38, PI3 キナーゼ・Akt 系のリン酸化が起こることをウエスタンブロットで確認した。

(2) 大豆ビクニンによる細胞内蛋白リン酸化抑制実験

培養細胞に事前に大豆ビクニンを 1 μ M 添加しておき、その後 30 分後にリポポリサッカライド 100 ng/ml 添加することにより、細胞内蛋白リン酸化として MAP キナーゼの MEK1/2・ERK1/2, JNK, p38, PI3 キナーゼ・Akt 系のリン酸化が抑制された。大豆ビクニン抑制効果は濃度依存性であり、1~5 μ M 濃度で薬 70% の抑制を認めた。

(3) 大豆ビクニンによるサイトカイン産生抑制実験

培養細胞に事前に大豆ビクニンを 5 μ M 添加しておき、リポポリサッカライド 100 ng/ml 添加することにより、サイトカイン (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8) の産生がそれぞれ 60~90% 抑制された。

(4) マイクロアレイ法による遺伝子発現実験

マクロファージに大豆ビクニンを添加したときの遺伝子発現の相違について、マイクロアレイおよび Gene Ontology 解析を行い遺伝子発現とパスウェイ解析を行った結果、NF-kappaB および Egr-1 といった炎症に関連する転写因子発現が制御されていた。以上より大豆ビクニンの抗炎症効果が確認された。

ヒト羊水・尿由来ビクニンは、①精製する技術はすでに確立されている、②ビクニンは腔内投与により早産患者の予後を改善することは臨床治験・基礎実験で確認されている、③注射の場合でもビクニンには毒性がなく、副作用発現は認められないこと、が利点であり、国内外で他に類似した報告はみられず、ビクニンは我々のオリジナルである。今後、ビクニンのもつ強力な抗炎症作用のため、早産予防薬として広く臨床で普及するものと思われる。さらに、大豆ビクニンの強力な抗炎症作用に着目すれば、ステロイドに変わる副作用のない抗炎症薬としても非常に有用であると思われる。今後、高齢化社会に向け、感染症対策は急務である。内服可能な大豆ビクニンの開発により、早産予防薬としてだけでなく高齢者の感染症対策としても多く使用されることが予想される。

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 19 件)

1. Kobayashi H. The entry of fetal and amniotic fluid components into the uterine vessel circulation leads to sterile inflammatory processes during parturition. *Front. Immun.*, Vol3, 2012. Published 23 October 2012; doi: 10.3389/fimmu.2012.00321
2. Naruse K., Noguchi T., Yoshida S., Tsunemi T., Shigetomi H., Oi H., Kobayashi H. Identification of interleukin-6 (IL-6) and squamous cell carcinoma (SCC) as amniotic fluid-specific markers. *Open Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2(2):147-150. 2012 (doi:10.4236/ojog.2012.22028 Published Online June 2012)
3. Nagai A., Sado T., Naruse K., Noguchi T., Haruta S., Yoshida S., Tanase Y., Tsunemi T., Kobayashi H. Antiangiogenic-induced hypertension: the molecular basis of signaling network. *Gynecol Obstet Invest* 73(2):89-98. 2012
4. Tsunemi T., Oi H., Sado T., Naruse K., Noguchi T., Kobayashi H. An Overview of Amniotic Fluid Embolism: Past, Present and Future Directions *The Open Women's Health Journal*, 2012, 6, 24-29
5. Koyama E., Naruse K., Shigetomi H., Sado T., Oi H., Kobayashi H. Combination of B-Lynch brace suture and uterine artery embolization for atonic bleeding after cesarean section in a patient with placenta previa accrete. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 38(1)345-348, January 2012
6. Takeyama M., Uchida Y., Arai I., Kamamoto T., Nishikubo T., Kanehiro H., Sado T., Kunishima S., Takahashi Y. Efficacy of inchinkoto for a patient with liver fibrosis complicated with transient abnormal myelopoiesis in Down's syndrome. *Pediatr Int.* 53(6):1093-6 2011 Dec.
7. Kobayashi H., Naruse K., Sado T., Noguchi T., Yoshida S., Shigetomi H., Onogi A., Oi H. Search for Amniotic Fluid-Specific Markers: Novel Biomarker Candidates for Amniotic Fluid Embolism. *Open Womens Health J* 2011, 5, 7-15
8. Lash GE., Naruse K., Robson A., Innes BA., Searle RF., Robson SC., Bulmer JN. Interaction between uterine natural killer cells and extravillous trophoblast cells: effect on cytokine and angiogenic growth factor production. *Hum Reprod.* 26(9):2289-95, 2011.
9. Naruse K., Yamasaki Y., Tsunemi T., Onogi A., Noguchi T., Sado T., Oi H., Kobayashi H. Increase of high molecular weight adiponectin in hypertensive pregnancy was correlated with brain-type natriuretic peptide stimulation on adipocyte. *Pregnancy Hypertension* 1:200-205, 2011.
10. Sado T., Naruse K., Noguchi T., Haruta S., Yoshida S., Tanase Y., Kitanaka T., Oi H., Kobayashi H. Inflammatory pattern recognition receptors and their ligands: factors contributing to the pathogenesis of preeclampsia *Inflamm. Res.* (2011)60:509-520
11. Onogi A., Naruse K., Sado T., Tsunemi T., Shigetomi H., Noguchi T., Yamada Y., Akasaki M., Oi H., Kobayashi H. Hypoxia inhibits invasion of extravillous trophoblast cells through reduction of matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation in the early first trimester of human pregnancy. *Placenta* 32(2011):665-670.
12. Sado T., Kitanaka T., Naruse K., Oi H., Noguchi T., Yoshida S., Kajihara H.

- Shigetomi H, Oonogi A, Kobayashi H. Anticytokine Therapy in Preterm Labor: Current Knowledge and Future Perspectives. *Gynecol Obstet Invest.* 2011;71(1):1-10.
13. Mizutani S, Wright J, Kobayashi H. A new approach regarding the treatment of preeclampsia and preterm labor. *Life Sci.* 2011 Jan 3;88(1-2):17-23.
 14. Otun HA, Lash GE, Innes BA, Bulmer JN, Naruse K, Hannon T, Searle RF, Robson SC. Effect of tumour necrosis factor- α in combination with interferon- γ on first trimester extravillous trophoblast invasion. *J Reprod Immunol.* 2011 Jan;88(1):1-11. Epub 2010 Nov 26
 15. Noguchi T, Sado T, Naruse K, Shigetomi H, Oonogi A, Haruta S, Kawaguchi R, Nagai A, Tanase Y, Yoshida S, Kitanaka T, Oi H, Kobayashi H. Evidence for activation of toll-like receptor and receptor for advanced glycation end products in preterm birth. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010:1-10. Epub 2010 Nov 28.
 16. Shigetomi H, Oonogi A, Kajiwara H, Yoshida S, Furukawa N, Haruta S, Tanase Y, Kanayama S, Noguchi T, Yamada Y, Oi H, Kobayashi H. Anti-inflammatory actions of serine protease inhibitors containing the Kunitz domain. *Inflamm Res.* 2010;59(9):679-687
 17. Oi H, Naruse K, Noguchi T, Sado T, Kimura S, Kanayama S, Terao T, Kobayashi H. Fatal Factors of Clinical Manifestations and Laboratory Testing in Patients with Amniotic Fluid Embolism *Gynecol Obstet Invest.* 2010;70(2):138-144
 18. Naruse K, Innes BA, Bulmer JN, Robson SC, Searle RF, Lash GE. Secretion of cytokines by villous cytotrophoblast and extravillous trophoblast in the first trimester of human pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2010;86(2):148-150
 19. Lash GE, Naruse K, Innes BA, Robson SC, Searle RF, Bulmer JN. Secretion of angiogenic growth factors by villous cytotrophoblast and extravillous trophoblast in early human pregnancy. *Placenta.* 2010;31(6): 545-548
- [学会発表] (計 25 件)
1. Naruse K, Tsunemi T, Oonogi A, Koike N, Noguchi T, Sado T, Oi H, Kobayashi H. Necrotic and apoptotic death of adipocyte induced in normal pregnancy and preeclampsia: Findings under novel culture method of adipose tissue 18th World congress of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP), Geneva, Switzerland, 9-12 Jul. 2012
 2. Naruse K, Tsunemi T, Sado T, Akasaka J, Koike N, Ito F, Noguchi T, Oi H, Kobayashi H. Apoptotic and Necrotic Cell Death of Trophoblast and Adipose Tissue on Hypoxia and Preeclampsia-A Preliminary Observation. International Federation of Placenta Associations Meeting 2012 Hiroshima 18-21 Sep. 2012
 3. Tsunemi T, Naruse K, Akasaki M, Sado T, Noguchi T, Oi H, Kobayashi H. Hypoxia Increases Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor (uPAR) and Hypoxia Induced Factor (HIF)-1 Alpha in Early Human Extravillous Trophoblast. International Federation of Placenta Associations Meeting 2012 Hiroshima 18-21 Sep. 2012
 4. 大井豪一, 佐道俊幸, 野口武俊, 金山清二, 成瀬勝彦, 常見泰平, 小山恵美, 小池奈月, 小川憲二, 河原直紀, 小林 浩, 金山尚裕. 登録された羊水塞栓症例における症状別解析より本症の発症原因を探る 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 2012 年 4 月 13-15 日
 5. 成瀬勝彦, 野口武俊, 佐道俊幸, 常見泰平, 赤坂珠理晃, 小池奈月, 大井豪一, 小林 浩. 正常妊娠および妊娠高血圧腎症における血清中 RAGE 作用物質の動態と炎症への作用 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 2012 年 4 月 13-15 日
 6. 常見泰平, 成瀬勝彦, 大野木 輝, 金山清二, 野口武俊, 大井豪一, 小林 浩. 低酸素環境における妊娠初期絨毛細胞の線溶系因子に及ぼす影響 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 2012 年 4 月 13-15 日
 7. 佐道俊幸, 小池奈月, 植栗千陽, 金山清二, 成瀬勝彦, 野口武俊, 高橋幸博, 小林 浩. 前回妊娠時に深部静脈血栓症の既往がある先天性アンチトロンビンⅢ欠乏症合併妊娠の 1 例 第 22 回日本産科婦人科・新生児血液学会 三重 2012 年 6 月 29-30 日
 8. 常見泰平, 成瀬勝彦, 大野木 輝, 赤坂珠理晃, 佐道俊幸, 大井豪一, 赤崎正佳,

- 小林 浩. ヒト妊娠初期絨毛細胞における低酸素環境によるuPA系制御に関する検討 第17回日本病態プロテアーゼ学会 浜松 2012年8月10-11日
9. 成瀬勝彦, 常見泰平, 赤坂珠理晃, 小池奈月, 野口武俊, 佐道俊幸, 大井豪一, 小林 浩. 新たな脂肪組織培養系を用いた正常妊娠・妊娠高血圧における細胞傷害機序の推測 第36回日本産科婦人科栄養・代謝研究会 鹿児島 2012年8月23-24日
 10. Naruse K, Onogi A, Tsunemi T, Akasaki M, Sado T, Noguchi T, Yamada Y, Oi H, Kobayashi H. REGULATION OF INVASION BY OXYGEN IN PRIMARY EXTRAVILLOUS TROPHOBLAST AND CHORIOCARCINOMA CELL LINE International Federation of Placenta Associations Meeting 2011(IFPA) Geilo, Norway September 14-17
 11. Tsunemi T, Onogi A, Naruse K, Akasaki M, Sado T, Noguchi T, Yamada Y, Oi H, Kobayashi H. HYPOXIA DECREASES MATRIX METALLOPROTEINASE (MMP)-2 ACTIVATION WITHOUT INCREASING HYPOXIA INDUCED FACTOR (HIF)-1ALPHA IN HUMAN TROPHOBLAST International Federation of Placenta Associations Meeting 2011(IFPA) Geilo, Norway September 14-17
 12. 大野木輝, 成瀬勝彦, 常見泰平, 佐道俊幸, 重富洋志, 赤崎正佳, 大井豪一, 小林浩. 生体由来妊娠初期絨毛細胞の低酸素環境下におけるプロテアーゼ活性の検討 第16回日本病態プロテアーゼ学会 大阪 2011年8月26-27日
 13. 大井豪一, 佐道俊幸, 野口武俊, 成瀬勝彦, 大野木輝, 常見泰平, 西岡和弘, 岩井加奈, 山田有紀, 小林 浩, 木村 聡, 金山尚裕. 致死的因子を含む割合が関連する羊水塞栓症における死亡率 第63回日本産科婦人科学会総会学術講演会 大阪 2011年8月29日-31日
 14. 大野木輝, 成瀬勝彦, 重富洋志, 常見泰平, 野口武俊, 佐道俊幸, 山田嘉彦, 赤崎正佳, 大井豪一, 小林 浩. 低酸素環境が妊娠初期絨毛細胞の matrix metalloproteinase2 (MMP2) 活性化と浸潤能に及ぼす影響とその調節機構の解明 第63回日本産科婦人科学会総会学術講演会 大阪 2011年8月29日-31日
 15. 成瀬勝彦, 大野木輝, 常見泰平, 重富洋志, 野口武俊, 金山清二, 佐道俊幸, 大井豪一, 小林 浩. 妊娠初期絨毛細胞の低酸素刺激によるプロテアーゼ系調節機構: MMP-TIMP 複合体の調節 第19回日本胎盤学会 東京 2011年9月30日-10月1日
 16. 成瀬勝彦, 常見泰平, 小山恵美, 小池奈月, 金山清二, 野口武俊, 佐道俊幸, 大井豪一, 小林 浩. 正常妊娠経過中の AGEs/RAGE 系変動と妊娠糖尿病ならびに高血圧への関与 第27回日本糖尿病・妊娠学会 神戸 2011年11月11-12日
 17. 成瀬勝彦, 野口武俊, 佐道俊幸, 常見泰平, 小山恵美, 小池奈月, 大井豪一, 小林 浩. 正常妊娠および妊娠高血圧症候群における RAGE 作用物質および炎症関連物質の動態 第26回日本生殖免疫学会 名古屋 2011年12月2-3日
 18. Naruse K, Onogi A, Noguchi T, Sado T, Kitanaka T, Oi H, Kobayashi H. Invasive activities of primary extravillous trophoblast via altered proteinases activity in low oxygen condition. XIth International Congress of Reproductive Immunology (ICRI), Cairns, Australia August 15-19 2010
 19. Naruse K, Onogi A, Sado T, Noguchi T, Komeda S, Koyama E, Nishioka K, Kitanaka T, Oi H, Kobayashi H. Correlation of free fatty acid and adiponectin in hypertensive pregnancy: key molecules for homeostatic inflammatory linkage. 17th World congress of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP), Melbourne, Australia October 4-6 2010 (Oral)
 20. 佐道俊幸, 小林 浩, 吉川紀子, 松村広恵, 堂本万起, 坂本信子, 町井淳子, 西浦真千代. 切迫早産妊婦の居住環境とストレスに関する研究 2009年度「病室環境研究」成果報告会 榎原 2010年8月20日
 21. 大野木輝, 成瀬勝彦, 佐道俊幸, 重富洋志, 山田嘉彦, 赤崎正佳, 大井豪一, 小林 浩. The role of a low oxygen environment on the invasion of extravillous trophoblast from first trimester of pregnancy 第25回日本生殖免疫学会 大阪 2010年8月28-29日
 22. 成瀬勝彦, 大野木輝, 小山恵美, 米田聡美, 西岡和弘, 野口武俊, 佐道俊幸, 北中孝司, 小林 浩. 正常妊娠と妊娠高血圧症における遊離脂肪酸 (FFA) とアディポネクチンの連関 第34回日本産科婦人科栄養・代謝研究会 三重 2010年9月3-4日
 23. 大野木輝, 成瀬勝彦, 野口武俊, 佐道俊幸, 北中孝司, 大井豪一, 小林 浩. 低酸

素環境での妊娠初期絨毛細胞のプロテアーゼ産出と浸潤能に関する検討 第 18 回日本胎盤学会学術集会 熊本 2010 年 9 月 30 日-10 月 1 日

24. 大野木 輝、成瀬勝彦、野口武俊、佐道俊幸、山田嘉彦、北中孝司、大井豪一、小林 浩. 低酸素環境における妊娠初期絨毛細胞のプロテアーゼ産出と浸潤能の変化に関する検討 第 31 回日本妊娠高血圧学会 東京 2010 年 10 月 15-16 日
25. 成瀬勝彦、大野木 輝、常見泰平、野口武俊、佐道俊幸、北中孝司、大井豪一、小林 浩. 妊娠中の遊離脂肪酸 (FFA) 変動ならびにアディポサイトカインとの連関. 第 26 回日本糖尿病・妊娠学会学術集会 埼玉 2010 年 11 月 27 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐道 俊幸 (SADO TOSHIYUKI)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：50275335

(2) 研究分担者

小林 浩 (KOBAYASHI HIROSHI)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：40178330
吉田 昭三 (YOSHIDA SHOZO)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：4034755
成瀬 勝彦 (NARUSE SADO))
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：70453165

(3) 連携研究者

なし