

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670696

研究課題名(和文)分子シャペロンHSP70の妊娠における機能の解明と新規早産予防法の開発

研究課題名(英文) Analysis of the functions of a molecular chaperon HSP70 during pregnancy, and attempt to find new treatments of premature labor.

研究代表者

山下 隆博 (YAMASHITA, TAKAHIRO)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：90313147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：分子シャペロンHSP70の妊娠現象における働きを解明し、その誘導剤テプレノンの早産予防効果を確認することが本研究の目的である。テプレノンはHSP誘導作用が証明されている唯一の薬剤であり、早産予防作用があるかどうか解明することを試みた。絨毛癌細胞株BeWoの培養系で上清中のHSP70濃度の計測を行ったが濃度が極めて低く、他の細胞株JAR, JEG-3においても解析可能な濃度が得られなかった。BeWoの浸潤能、増殖能へのテプレノンの作用も有用な結果が得られなかった。またマウス胎盤におけるHSP70の発現を免疫組織染色で検討したが非特異的な染色パターンしか得られずヒトでの検討に至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Teprenone has been reported to have an effect to induce HSP70. We tried to analyze whether Teprenone is effective or not to prevent preterm labor. At first, we used choriocarcinoma cell line, BeWo. We tried to measure HSP70 concentration in the culture supernate of BeWo. However, we could not detect it in analyzable concentration. Other cell lines, JAR, JEG-3, showed similar results. Next, we tried to analyze the effect of Teprenone on the invasive and proliferative capacity of BeWo, which also was not significant. We tried to detect the expression of HSP70 on placenta of mouse with immunohistochemical staining. However, only non-specific pattern was observed. We could not proceed to the analysis on human materials.

研究分野：周産期医学

キーワード：分子シャペロン

1. 研究開始当初の背景

2000年代に入り産婦人科、特に産科医師の不足が顕在化していた。母体搬送先が見つからず不幸な転帰に至る例が全国ニュースとなり、産科医療体制の整備が喫緊の課題となっていた。ただし、わが国の高齢化が進み老年人口が増加したことで医療需要が増大した結果、全科的な医師不足が進行し、産婦人科特に産科医師不足自体の報道はその後少なくなっている。しかし出産可能施設の減少・集約化の流れは現在まで継続している。当時は医療事故に対する風当たりが強まっていた時期と重なり、母体搬送先が見つからない点についても病院側、医師側の体制を非難する報道が主であった。しかしその後、前述のように国民の高齢化、医療の高度化に伴う医療需要の増大と、それに追いつかない医師数がこの問題の根底にあること、また初期研修制度の変更に伴い初期研修医が研修先を選べる制度になり、これまでの大学医局を中心とした医療体制から豊富な臨床経験ができる市中病院の人氣が高まった。その結果大学医局の医師派遣機能が脆弱化し、地方へ派遣される若手医師が減少する結果となった。当初は地方の医師不足は大学医局が人事権を握っていることに諸悪の原因があるとの認識から、大学医局の人事権を削ぎ研修医の自主的な研修先選択が優先された。しかし実際に新臨床研修制度が始まると若手医師の研修先は都市部の病院に集まる結果となった。同時に地方大学の入局者が減少し派遣先から医師を引き上げる動きが全国的にみられた。このような中、当初もっとも注目されたのが産科医療体制であった。しかし、母体搬送先が見つからない原因の一つとして新生児集中治療室 (NICU) の不足問題も明らかとなった。つまり、母体搬送先が見つからない最大の原因は NICU の空きがないためであることが各種調査で判明した。そして、NICU 満床の原因は、早産低出生体重児が増加していたことが一因である。国民の晩婚化・晩産化によるハイリスク妊娠の増加や、体外受精・胚移植による多胎妊娠の増加等が早産児増加の原因となっていた。そのような背景の中、行政、学会、医会のイニシアチブのもと様々な対策が同時並行で進められた。例えば体外受精の移植胚数制限や、産科医の重労働を軽減するための各種補助金制度の創設、周産期母子医療センターの整備、コーディネーター制度の構築等母体搬送システムの整備、妊婦健診への補助の充実による未受診妊婦対策などである。これらの対策により東京などの大都市圏では周産期体制がある程度改善し、母体搬送先がなかなか見つからない状況は改善傾向にある。しかし、そもそもわが国の早産率は近年減少していないことが統計により示されている。医療体制は整備されても、晩産化によりハイリスク妊娠が増加していること、また超音波診断装置の進歩が急速に進み、出生前胎児診

断が普及し胎児救命のための人工早産が増加していることなどが、早産が減らない要因としてあげられている。また、もっと根源的な問題として、母体にとって半同種移植片である胎児が妊娠中なぜ母体から拒絶されないか、という妊娠現象の謎が十分に解明されていない。すなわち、胎児の遺伝子の半分は夫由来であり、ましてや卵子提供妊娠では胎児は母親と遺伝的つながりはまったくない。それにもかかわらず妊娠が成立することは非常に不思議な現象である。その原理が完全には解明されていたため、妊娠現象の不調である習慣流産、切迫流産、切迫早産の原因も十分解明されておらず、その結果それらに対する治療法も完全ではないのである。特に切迫早産に対する治療法は安静、子宮収縮抑制剤、抗生剤、膣洗浄等、対症療法が主で、この四半世紀ほとんど進歩していないのが実情である。

早産に関する研究は世界中で行われているが、上記のような早産を増加させる背景が増大しているため実質的に早産率が低下しない状態が続いていた。早産は周産期死亡や脳性麻痺の原因にもなるため WHO はレポート "Born Too Soon" "The Global Action Report on Preterm Birth" を 2012 年 5 月に公表し、早産対策の推進を世界にアピールした。しかし依然として早産の予防法・治療法には決定打がないのが現状である。そこで新しい切り口による早産研究が必要と考えたのが今回の研究の背景である。早産は医療体制が整備されていない貧困地域で特に多いが、そのような社会背景のある地域で治療を普及するためには経済性、すなわち安価であること、薬剤を使用する場合には冷蔵設備を必要とせず、運搬が容易であることが前提となる。その点プレノン[®]は安価なカプセル状の胃薬として実績があった。

< 早産対策の重要性と、新しい治療法の必要性について >

早産児、特に妊娠 20 週台の早産児は死亡率が高く、生存したとしても脳性麻痺等の障害が残るリスクがあり、本人および両親にとって非常に重要な問題である。また長期呼吸・栄養管理を要し NICU 長期入院が必要で、医療経済的にも重要である。また NICU を長期に占有することから慢性的な NICU 不足をもたらし、母体搬送先が見つからない一因となっている。

早産増加の一つの要因として子宮頸管炎がある。近年若年層の性活動の活発化等により膣内環境が悪化し子宮頸管炎が潜在的に増加していると考えられている。そこで、近年切迫早産妊婦に対して膣洗浄、抗生剤膣座薬、ウリナスタチン膣座薬等の抗炎症治療がわが国では広く行われるようになった。しかし前述のように早産は減少していない。そのためこれまでとは抜本的に異なる考えに基づく治療法が重要であると考えた。また薬物療法については妊娠中使用するので、胎児に対

する安全性も求められる。今回注目したテプレノン(セルベックス®)は胃薬として約30年の歴史があり妊娠中も比較的よく処方されているがこれまで特に催奇形性等の児への有害事象の報告はない。また、近年そのHeat Shock Protein (HSP) 誘導効果から様々な疾患への臨床応用の可能性が注目され始めていた。(Mizushima T: Curr Pharm Des. 2010; 16(10): 1190-6)

<Heat Shock Protein (HSP) 70 およびテプレノンについて>

HSP はストレスを受けた細胞内で増加するタンパク質として1970年代に発見された。その後、変性したタンパク質の再生や他のタンパク質を補助する作用など、種々の有益な機能を発揮していることが分かり、分子シャペロンとも呼ばれている。しかしその作用は複雑で、細胞内では炎症を抑制する方向に作用する一方、細胞外に分泌された場合、免疫系の賦活化や炎症の惹起等の一見反対の機能を示すことが分かってきた。なお後者についても有害な作用ではなく、創傷治癒を促す等の有益な作用と考えられている。

妊娠中の母体血中濃度についてはこれまで相反する報告がなされており、HSPの妊娠における意義は確定していない(Molvarec A, et al.: Cell Stress and Chaperones 2010; 15: 237-247)。しかしHSPは通常生体に有益な方向に働いていることから、妊娠においても何らかの有用な機能を果たしている可能性が高いという仮説を立てた。また、テプレノンは妊娠中もよく処方される安全性の高い胃薬であるが、HSP誘導作用を持つため、切迫早産における子宮頸管炎にどのような影響をもつか興味深いと考えた。

2. 研究の目的

分子シャペロン Heat Shock Protein (HSP) 70の妊娠現象における働きを解明し、その誘導剤テプレノン(セルベックス®)の早産予防効果を確認することが目的である。早産で出生する低出生体重児には脳性麻痺や慢性肺疾患等のリスクがあり、NICUへの長期入院が必要である。切迫早産治療としては安静、子宮収縮抑制剤、腔洗浄等の対症療法が主であり、早産の原因そのものを治療する試みとして、子宮頸管への感染に対する抗生剤治療や、子宮頸管炎に対する抗炎症治療(ウリナスタチン腔内投与)が行われているが、十分な効果を示しておらず、前述のようにわが国では現在まで早産率は減少していない。一方テプレノンは1984年発売の胃薬で、粘膜保護作用をもつ胃薬として妊娠中も比較的よく処方されてきた。またHSP誘導作用が証明されている唯一の薬剤であり、近年炎症性腸疾患など他疾患に対する有効性が動物実験で示されている。一方で妊娠への作用は不明である。そこでHSP70が妊娠の成立・維持において何らかの役割を有している、そしてテプレノンはHSP誘導作用を介して早産

を予防する効果を持つという仮説を立て、それを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 妊娠中のHSP70の濃度、発現を明らかにする。妊婦健診に通院している正常妊婦から妊娠前期・中期・後期に、説明と同意のもと採血する。また、切迫早産・胎児発育不全(FGR)・妊娠高血圧症候群(PIH)で入院した妊婦から、入院時及び分娩時に採血する。同一症例の分娩時に臍帯血を採取する。また胎盤組織の一部を採取する。

血中濃度測定はHSP70 EIAキット(StressGen Biotechnologies, Canada)を用いる。

胎盤におけるHSP70の発現はSPA-820キット(anti-HSP70 & anti-HSC70, StressGen Biotechnologies, Canada)を用い免疫組織染色で観察する。

目標症例数は、正常妊娠が年間30例、切迫早産が年間20例、FGRが年間10例、PIHが年間10例である。

対象: 正常妊婦・切迫早産妊婦・胎児発育不全(FGR)妊婦・妊娠高血圧症候群(PIH)妊婦

a) HSP70の母体血中濃度、臍帯血中濃度の測定

b) 胎盤におけるHSP70の発現の観察

2) 絨毛細胞株でのHSP70の発現、そのストレス下での変化、テプレノン存在下での変化の観察

培養上清中のHSP70の濃度を上記キットを用いて測定する。

培養細胞にストレスとして低酸素濃度、紫外線、高温/低温刺激を条件を変えて行い、HSP70の濃度の変化を観察する。

さらにテプレノンを添加した場合のこれらの変化を観察する。

対象: 絨毛細胞株JAR, WeBo, JEG-3

3) 絨毛細胞の増殖能・浸潤能に対するテプレノンの作用を明らかにする。

対象: 絨毛細胞株BeWo, JAR, JEG-3

方法: invasion assay, proliferation assay

4) LPS処理早産マウスでの子宮局所HSP70の発現、テプレノンによる発現変化、早産予防効果の確認

方法: テプレノン全身投与、腔内投与

妊娠15日目のマウスにLipopolysaccharide (LPS)を腹腔内投与する早産モデルマウスを用いる。子宮局所のHSP70の発現をSPA-820キット(anti-HSP70 & anti-HSC70, StressGen Biotechnologies, Canada)を用い免疫組織染色で観察する。

テプレノンを各種濃度でマウスに全身投与、腔内投与し、HSP70の発現の変化を観察する。また、テプレノン投与の有無で、LPS投与から分娩までの時間に変化が見られるか観察する。

なお、LPSは強力な早産発来物質であり、テプレノン投与下で早産が完全に予防されることは経験上不可能と思われる。そこで投与

LPS 濃度を調節し、テプレノンにより分娩までの時間に変化が現れる条件を検討する必要がある。

対象：LPS 処理早産モデルマウス

4. 研究成果

絨毛癌細胞株 BeWo 培養系の安定性を確認し上清での HSP70 濃度の計測を試みたが成功せず、他の細胞株 JAR、JEG-3 においても同様であった。そこで BeWo の浸潤能、増殖能へのテプレノンの作用を検討したが、浸潤能、増殖能の安定した測定法の確立に時間を要し、またテプレノンで明らかな変化を認めなかった。また胎盤における HSP70 の発現を免疫組織染色で検討したが非特異的な染色パターンしか得られなかった。そのためヒトでの検討に入るに至らなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 隆博 (YAMASHITA, Takahiro)

東京大学医学部附属病院 登録研究員

研究者番号：90313147

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：