

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592389

研究課題名(和文) ヒアルロン酸をキーワードに新たな早産予知と治療に挑む

研究課題名(英文) A premature delivery forecast and medical treatment new in a keyword are challenged to hyaluronic acid.

研究代表者

伊東 麻美 (Ito, Asami)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30536511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：ヒアルロン酸(HA)は子宮頸管の主要構成成分で、このHAの急増により頸管は軟化開大し急速に分娩に向かう。切迫早産においても同様の変化が起こることからHA合成の抑制が切迫早産治療となり得る。そこでHA合成阻害剤4-methylumbelliferone(MU)の切迫早産治療薬としての臨床応用の可能性について基礎的研究を行った。ヒト子宮頸管培養線維芽細胞ではMUの投与によりHA合成は有意に抑制され、またMUは濃度依存的にHA合成を抑制した。またラット早産モデルを作成しMU皮下持続投与を行ったが有意な妊娠期間の延長はみられなかった。臨床応用には投与経路(膣座薬や経口)や投与量の検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Hyaluronate is a main component of the uterine cervix. Rapid increase of hyaluronate affects ripening and dilatation of the uterine cervix, and delivery is performed quickly. Therefore, it can be the medical treatment of preventing premature labor to inhibit the synthesis of hyaluronate. I researched about the fundamental study of 4-methylumbelliferone (MU), and the possibility of controlling cervical ripening. In the cultured fibroblasts from human uterine cervix, the effects of MU were evaluated by the suppression of hyaluronate synthesis, and it suppressed dependently by a concentration. Moreover, in the rat models of preterm labor, MU subcutaneous continuous infusion cannot significantly extend their gestational age. Although the usefulness of MU was shown in the cultured fibroblasts from human uterine cervix, clinical application requires examination of an administration route (a vagina suppository and taking orally).

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：切迫早産 子宮頸管無力症 ヒアルロン酸 4-methylumbelliferone

1. 研究開始当初の背景

1) 我が国の早産の現状

我が国の出生数は減少傾向にあるのに対し、妊娠 37 週未満の早産数、2,500 g 未満の低出生体重児出生数は逆に増加傾向にある。新生児医療の進歩によって、早産児の予後は改善されているとはいえ、なお早産は周産期死亡の最大の要因であり、また早産児には intact survival を脅かす多くの疾患が存在する。従って早産の予知・予防への一層の努力が求められると共に、早産の前段階である切迫早産、子宮頸管無力症の病態解明と治療法の確立は、早急に解決すべき問題である。

2) 早産原因は絨毛膜羊膜炎 (chorio-amnionitis ; CAM) だけにあらず

現在早産の主因として CAM が考えられている。CAM を主因とする早産の発症機序は、

腔内病原菌上行性感染による CAM 発症

炎症による感染防御因子の過剰反応 子宮収縮や子宮頸管の軟化開大(熟化)、破水が起り、最終的に早産へというものである。

そして近年この発症機序を前提として、早産の予知も治療も行われている。予知マーカーとして臨床的に用いられているのは CAM 発症時に子宮頸管より分泌される顆粒球エラストラーゼや産胎児性フィブロネクチンである。一方、治療については、CAM 発症の原因となる細菌性膣症を治療する抗生剤膣錠や抗炎症作用を持つウリナスタチン (ulinastatin ; UTI) 膣座剤である。

しかし、抗生剤による治療が早産防止に役立つか否かについては懐疑的なデータが続出し、また抗炎症作用を有する UTI によっても抑制できず早産に至る例も少なくない。実際に CAM の原因となる細菌性膣症が全くないにも関わらず子宮頸管が早期に開いて早産となってしまう患者が多く存在する。つまり早産の発症機序は単純に CAM によるものだけでは考えられず、頸管無力症をはじめとした種々の原因・病態が考えられ、その全貌は未だ明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では CAM を早産の主因とする立場とは異なる視点から早産予知、治療へのアプローチを試みた。Key word はヒアルロン酸 (hyaluronic acid ; HA) である。

HA はコラーゲンや他のグリコサミノグリカン (glycosaminoglycan ; GAG) と共に子宮頸管の主要構成成分だが、妊娠末期に他の GAG とは全く異なる挙動を示し、数時間のうちにそれ以前の 10 倍以上に急増しながら分娩終了と共に急速に代謝され元に復する。この HA の急増により子宮頸管は膨潤化され、コラーゲンによるネットワークが破壊されて頸管はどんどん軟化開大し急速に分娩に向かうことが知られている。早産でも同様の機序で頸管熟化が進んでいることが予想されている。

従って、この HA 合成を抑制できれば切迫早産を治療できる可能性がある。我々は過去に子宮頸管細胞において 4-methylumbelliferone (MU) が HA 合成を抑制することを報告しており、この MU を用いた切迫早産治療の可能性について検討した。この MU は、利胆剤として開発され胆石や胆嚢炎の治療薬として臨床応用されており、人体への安全性も確認されている。また本学の研究により HA 合成阻害物質として世界で初めて報告された物質でもある。

今回の研究期間内では、新規切迫早産治療薬 MU の基礎的研究及び動物を用いて臨床応用の可能性について検討した。

3. 研究方法

1) インフォームドコンセントを得て手術時採取した子宮頸管組織片を、10 % 牛胎仔血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を培地として、5% CO₂/95% air、37 °C で培養した。ヒト子宮頸管培養線維芽細胞が confluence になった後に継代を繰り返し、5 代目の線維芽細胞を実験に使用した。得られた線維芽細胞の培地に MU 0.5 mM/L、1.0 mM/L を各々添加し 48 時間まで培養した後に、培養液中の HA 合成量を ELISA 法にて測定した。実験は triplicate で行い、統計は一元配置分散分析、多重比較検定を用いて $P < 0.05$ を有意とした。

2) 妊娠ラットに対して早産を誘発する薬物を投与することで早産モデルを作成し、これに対する被験物質皮下持続投与の効果を検討した。

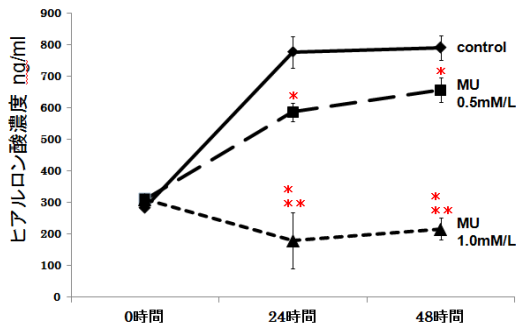
交配 14 日目の妊娠ラットを 2 日間馴化飼育後、イソフルラン麻酔下で被験物質入りオスミックポンプを背部に留置した。以下の 4 群各々 10 匹に分けて実験を行った。生食皮下持続投与群 (1 群)、RU486 皮下投与 + 生食皮下持続投与群 (2 群)、RU486 皮下投与 + MU 10 µg/kg/min. 皮下持続投与群 (3 群)、RU486 皮下投与 + MU 20 µg/kg/min. 皮下持続投与群 (4 群)。この翌日に妊娠ラットに対し抗プロゲステロン剤である RU486 を皮下注することにより早産モデルを作成した。その後、分娩の有無を 2 時間間隔で観察した。娩出時間、仔体重、子宮頸管の組織学的差異について検討した。

4. 研究成果

研究成果

1) ヒト子宮頸管線維芽細胞における HA 合成量は経時的に増加した。MU を投与することにより HA 合成はコントロール群に比較して有意に抑制された。また、MU は濃度依存的に HA の合成を抑制した(下記グラフ参照)。以上のことが判明し、MU は子宮頸管無力症の治療薬となり得る可能性が示唆された。

ヒアルロン酸の経時的変化



* <0.01 significantly different from controls

** <0.01 significantly different from 0.5mM MU

2) 娩出時間は1群の生存個体において、妊娠22日もしくは23日で全ての個体が出産した。2群では、妊娠19日で8匹が出産したが、残り2匹は妊娠26日までの期間で出産は確認されなかった。3群では、妊娠19日で6匹が出産したが、残り4匹は妊娠26日までの期間で出産は確認されなかった。4群では、妊娠19日で9匹が出産し、残り1匹は妊娠26日までの期間で出産は確認されなかった。また、各群の仔体重平均は1群: 5.97 ± 0.08 g (mean \pm SE)、2群: 1.39 ± 0.05 g、3群: 1.39 ± 0.03 g、4群は 1.39 ± 0.03 gであった。

以上に示した娩出時期および出生仔体重の結果から、2群、3群および4群の仔は1群と比較して未熟な状態で娩出された。2群、3群および4群において、妊娠26日目まで出産をしなかった個体が存在し、これは胎児の発達が途中で止まってしまい、時間の経過に伴い親の体に吸収されてしまった可能性があると考えられた。また、3群および4群について2群と比較すると、娩出時間および仔体重平均値は同等の傾向を示していたことか、少なくとも今回の試験条件においては、有意な妊娠期間の延長は得られなかった。MUは難溶性のため溶媒にうまく溶解できていなかった可能性やRU486の投与量が多すぎた可能性が考えられた。今後の薬剤量や投与経路(膣座薬や経口)について再度検討を行いたい。

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1件)

Asami Fukuyama, Kanji Tanaka, Ikuko Kakizaki, Kosuke Kasai, Mitsuru Chiba, Toshiya Nakamura, Hideki Mizunuma. Anti-inflammatory effect of proteoglycan and progesterone on human uterine cervical fibroblasts. Life

Science, 査読有, 9; 90(13-14)2012, 484-8, DOI;10.1016/j.lfs.2011.12.024. Epub 2012 Jan 30.

[学会発表](計8件)

Asami Ito, Kanji Tanaka, Mai Kamoi, Ayano Funamizu, Atsushi Fukui, Hideki Mizunuma. 4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronate synthesis in human uterine cervical fibroblasts, The 12th Congress of the International Society for Immunology Reproduction, 2013年5月30日, Boston, Massachusetts, USA

伊東麻美, 柳田毅, 千葉仁美, 飯野香理, 田中幹二, 水沼英樹: プロテオグリカン、プロゲステロンの併用における切迫早産治療薬に関する基礎的研究、第48回日本周産期・新生児医学会学術講演会、2012年7月8日~10日、大宮市

伊東麻美, 田中幹二, 水沼英樹: プロテオグリカン、プロゲステロンの抗炎症作用を利用した切迫早産治療薬に関する基礎的研究、第64回日本産科婦人科学会学術講演会、2012年4月13日~15日、神戸市

福山麻美, 田中幹二, 柿崎育子, 中村敏也, 水沼英樹: ヒト子宮頸管線維芽細胞におけるプロテオグリカン及びプロゲステロンの抗炎症効果について、第7回臨床糖鎖研究会、2012年3月6日、青森

福山麻美, 田中幹二, 柿崎育子, 中村敏也, 水沼英樹: プロテオグリカン、プロゲステロンの抗炎症作用を利用した切迫早産治療に関する基礎的研究、第5回日本早産予防研究会、2011年12月3日、東京

福山麻美, 田中幹二, 水沼英樹: プロテオグリカン、プロゲステロン併用による切迫早産治療に関する基礎研究、第59回北日本産科婦人科学会、2011年9月24日、秋田

福山麻美, 田中幹二, 水沼英樹: 切迫早産新規治療としてのプロテオグリカン、プロゲステロンの可能性に関する基礎研究、第63回日本産科婦人科学会、2011年8月29日、大阪

Asami Fukuyama, Kanji Tanaka, Megumi Yokota, Atsushi Fukui, Hideki Mizunuma. Role of proteoglycan and progesterone as a new tool for treatment of preterm labor. 31st Annual Meeting American Society Reproduction

Immunology, 2011年5月20日 Salt Lake
City, Utah, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東麻美 (ITO, Asami)

弘前大学・医学研究科・研究員

研究者番号: 30536511

(2) 研究分担者

田中幹二 (TANAKA, Kanji)

弘前大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 20311540

研究分担者

柿崎郁子 (KAKIZAKI, Ikuko)

弘前大学・医学(系)研究科・准教授

研究者番号: 80302024