

令和元年5月19日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16847

研究課題名(和文) 早産治療を目指したヒト羊膜におけるTLR4阻害化合物の探索

研究課題名(英文) Search for the TLR4 inhibitor as a novel treatment strategy for preterm birth

研究代表者

千草 義継 (Chigusa, Yoshitsugu)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80779158

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)：まず6種の化合物のEDA阻害効果(IC50)を検討したところ、化合物C=Econazole nitrateおよびD=Parthenolideが最も強力にTLR4を阻害した。次に化合物CあるいはDとヒト羊膜間葉細胞を培養し、そこへLPS、fFN、EDAを添加したところ、対照群ではIL-8、IL-6、TNF、COX2、MMP1、PGE2のmRNAあるいはタンパク発現が増加したが、化合物CあるいはDを添加した群ではこれらの発現が有意に抑制された。Econazole nitrateおよびParthenolideはヒト羊膜におけるTLR4を阻害する点で、早産治療の有力な候補であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早産の病態生理に鑑みれば、TLR4を阻害するアプローチは合理的かつ効果的であるが、これまでにこの方法を用いた早産治療の研究は存在しなかった。我々がヒト羊膜での有力なTLR4阻害化合物を同定し、その効果を確認できた学術的意義は大きい。またTLR4を有効に阻害する化合物は、重症感染症や敗血症性ショックといったTLR4を介する別の重篤な疾患の治療への応用の可能性があり、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：The IC50 of 6 compound was assessed, and compound C (econazole nitrate), and compound D (parthenolide) had the lowest IC50, suggesting they are potent TLR4 inhibitors. Both econazole nitrate and parthenolide significantly inhibited EDA- or LPS-induced IL-8, IL-6, COX2, MMP1, and PGE2 expression in primary human amnion mesenchymal cells. Our data suggest that both econazole nitrate and parthenolide would be the promising compounds which can prevent preterm labor via inhibition of fNA-EDA-TLR4 interaction.

研究分野：周産期医学

キーワード：早産 羊膜 TLR4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

早産とは妊娠 37 週未満での出産と定義され、本邦では全妊娠の約 5% に発生する。早産は新生児死亡、後遺症の最も重要な原因のひとつであり、病態の成立機序には子宮内における感染および炎症反応の惹起が深く関与していると考えられるが、不明な点も多く、根本的な治療法が存在しない。一方、腔分泌物中の fetal fibronectin (fFN) は、早産のリスクを示す有用なバイオマーカーとして臨床の現場で広く用いられている。われわれは、fFN 中に含まれる Extra domain A (EDA) が、ヒト羊膜間葉細胞(間葉細胞)に存在する TLR4-MD2 と相互作用し、炎症のカスケードを進行させることで早産が惹起されることを、間葉細胞とマウスモデルを用いて明らかにしてきた(Mogami et al, J Bio Chem, 2013)。

そこで、われわれは EDA-TLR4 相互作用を阻害する化合物を探索することを目的として、アメリカ合衆国テキサス大学 (Southwestern Medical Center) と協同し、High Throughput Screening を行い、8320 の化合物ライブラリーの中から、候補となる化合物 6 種 (化合物 A ~ F とする) を同定した。

2. 研究の目的

本研究では、われわれがすでに同定した 6 種類の候補化合物を用いて、ヒト羊膜間葉細胞において、Toll-like receptor 4 (TLR4) の活性化を阻害することで、炎症 (子宮頸管熟化・子宮収縮) およびコラーゲン分解 (羊膜破綻) を抑制し、早産治療に資する薬剤の発見と効果判定を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

High throughput Screening によって抽出された 6 種類の TLR4 阻害化合物 (候補) について、早産治療の観点から効果と安全性を検討することを目的に、以下の研究を実施 (予定) した。

(1) 6 種類の化合物 (化合物 A ~ F) が、ヒト羊膜間葉細胞において EDA-TLR4 相互作用を阻害する効果を確認する。

6 種類の化合物の有効濃度の確認

ヒト羊膜間葉細胞 (以下間葉細胞と呼ぶ) を 96well プレートで初代培養し、そこへ 6 種類の化合物を添加 (7.5, 5, 2.5, 1, 0.25 μ M) する。その後、リコンビナント EDA (30nM) を添加、24 時間後の培養上清中の IL-8 を ELISA 法によって測定する。EDA は IL-8 を増加させるが、TLR-4 が阻害されれば IL-8 の上昇が抑制される。このことから、6 種類の化合物の効果を IL-8 を指標に判定することができ、50% 阻害濃度 (IC50) を算出することが可能となる。

6 種類の化合物が EDA によって誘導される遺伝子発現に与える影響を検討

間葉細胞に EDA (10nM) を添加培養すると、EDA-TLR4 相互作用によって、COX2、IL6、IL8、コラーゲン分解酵素である MMP1 といった遺伝子発現が増加する (右図)。そこで間葉細胞に 6 種類の化合物を添加した後、EDA を加えて 24 時間培養する。細胞を回収し、定量 PCR 法によって上記遺伝子の発現が抑制されているかを検討する。さらに Western blot 法 (COX2) や ELISA 法 (培養上清中の PGE2 や IL-1, IL-8, TNF などのサイトカインを測定) によって、6 種類の化合物が、EDA によって誘導される遺伝子発現や産

物を有意に阻害しているかどうかを、多面的に検討する。

6 種類の化合物が EDA-TLR4 相互作用を阻害する分子機構の解明

EDA-TLR4 相互作用の阻害効果は、NF- κ B の抑制によって得られるものと予想される。したがって間葉細胞に EDA および化合物を添加し、p65 とリン酸化 p65 の免疫蛍光染色、Western blot 法で化合物が NF- κ B を抑制しているかどうかを検討する。

なお、 から の実験は EDA のかわりに、より病態生理に即している fFN、あるいは子宮内感染を想定した LPS を用いても行う。そうすることで、より実際の早産の病態に近い実験系で化合物の効果を検討することができる。

(2) 候補化合物の EDA-早産モデルマウスにおける効果を確認する。

平成 29 年度実験の結果から、最も有用と考えられる候補化合物を 2-3 種類に絞り込み順位付けを行う。ついで、C57BL6 マウスを用いて妊娠マウスを作成し、Vehicle、EDA、

EDA + 化合物、化合物の 4 群に分割する。Mating 後 17 日目に、麻酔下にマウスを開腹し、子宮筋層および卵膜の間にマイクロシリンジを用いて薬剤を注入する。注入量は胎仔あたり 5 μ l とし、最大 6 胎仔までとする。その後マウスを各ケージに個別に入れ、複数の CCD カメラモニターシステムによって分娩までの時間を正確にモニターする。

4 . 研究成果

High throughput Screening によって抽出された 6 種類の TLR4 阻害化合物は以下の通りであった。

A = 5-methyl-2-[2-(2-nitrophenyl)vinyl]-8-quinoliny acetate

B = N,N-dimethyl-N'-[4-(2-pyridinyl)-1,3-thiazon-2-yl]-1,4-benzenediamine

C = Econazole nitrate

D = Parthenolide

E = Chloroxine

F = Beta-Escin

まず、HEK-Blue-hTLR4 細胞およびヒト羊膜間葉細胞を用いて 6 種の化合物の EDA 阻害効果を検討したところ、それぞれの 50%阻害濃度 (IC50) は以下の通りであった。

A = 4.2 μ M

B = 1.1 μ M

C = 0.30 μ M

D = 0.31 μ M

E = 0.86 μ M

F = 2.0 μ M

この結果から、化合物 C および D が最も強力に TLR4 を阻害することが判明した。化合物 C は Econazole nitrate で、D は Parthenolide であった。

次に、これら化合物 C、あるいは D とヒト羊膜間葉細胞を培養し、そこへ LPS、fFN、EDA といった TLR4 を介する早産誘発物質を添加して培養を継続した。

化合物のない群では LPS、fFN、EDA によって IL-8、IL-6、TNF α 、COX2、MMP1 の mRNA が増加したが、化合物 C、あるいは D を添加した群においてはこれらの発現が有意に抑制され

た。さらに、ELISA 法によって培養上清中の IL-8、IL-6、TNF α 、PGE2 を検討したところ、化合物を添加しない群では LPS、fFN、EDA によって培養上清中の IL-8、IL-6、TNF α 、PGE2 が著明に増加していたが、化合物 C、あるいは D を添加した群においては、これらサイトカイン、PGE2 の上昇が有意に抑制されていた。

同様に COX2 のタンパク発現を Western blotting 法で検討したところ、COX2 タンパク発現は LPS、fFN、EDA によって増強されるが、化合物 C、あるいは D を添加して培養することによって COX2 のタンパク発現の増強は有意に抑制された。

これらの結果から、化合物 C (Econazole nitrate) および D (Parthenolide) はヒト羊膜間葉細胞において、fFN-EDA-TLR4 相互作用を阻害することで、サイトカインの産生増強、MMP の産生増強、PGE2 の産生増強をそれぞれ有意に抑制することが示された。これらの効果によって、子宮頸管の熟化や卵膜の脆弱化、子宮収縮がそれぞれ抑制されることが予想される。したがって、化合物 C (Econazole nitrate) および D (Parthenolide) 早産治療の有力な候補であることが示された。

現在、これら化合物が EDA-TLR4 経路を阻害する分子機構を解明すべく、NF- κ B の Western blotting を行っている。予備実験では、化合物 C および D は NF- κ B の活性化を阻害していることが判明している。最終的には化合物 C および D を妊娠マウスに投与することで EDA によるマウスの早産を遅らせることができるかどうかの検討を予定している。予備検討においては、1 μ M EDA を 5 μ l 注入することで概ね 24 時間程度で分娩（早産）に至る（EDA 群; 24.1 \pm 1.5h vs. 対照群; 42.7 \pm 6.3h, P < 0.01）ことが明らかとなっている。分娩までの時間が EDA 投与群に比べて有意に延長していた場合、その化合物について効果ありと判定される。同時に胎仔の生存率（出生後 48 時間）についても各群で検討する。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Maternal Glucocorticoids Make the Fetal Membrane Thinner: Involvement of Amniotic Macrophages.

Kiyokawa H, Mogami H, Ueda Y, Kawamura Y, Sato M, **Chigusa Y**, Mandai M, Kondoh E. *Endocrinology*. 2019 Apr 1;160(4):925-937.

doi: 10.1210/en.2018-01039.

PMID: 30776301

Metabolomic Profiles of Placenta in Preeclampsia.

Kawasaki K, Kondoh E, **Chigusa Y**, Kawamura Y, Mogami H, Takeda S, Horie A, Baba T, Matsumura N, Mandai M, Konishi I.

Hypertension. 2019 Mar;73(3):671-679.

doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12389.

PMID: 30595122

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：Ruth Ann Word (University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas, U.S.A.)

ローマ字氏名：Ruth Ann Word

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。