

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2009
課題番号：19591893
研究課題名 (和文) プロスタグランジン受容体 EP4 を介した子宮頸管熟化制御機構の検討
研究課題名 (英文) Regulation of cervical ripening of the uterus through prostaglandin E2 receptor 4

研究代表者
杉村 基 (SUGIMURA MOTOI)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：30273189

研究成果の概要 (和文)：

分娩過程における劇的現象のひとつである子宮頸管熟化を調節できれば、将来の安産、早産防止に大きな役割を果たせると考え、プロスタグランジン(PG)E2 受容体 EP4 を介した子宮頸管熟化の調節、子宮頸管部における EP4 発現の調節の検討を目的とした。EP4 阻害剤は LPS 誘発のうさぎ頸管熟化を抑制したことから頸管熟化抑制による早産の防止に有効である可能性が示唆され、安産、早産の予知とともに、将来の安産、早産防止に役立つ可能性がある。

研究成果の概要 (英文)：

BACKGROUND: The purpose of this study was to examine whether EP4 as prostaglandin (PG) E2 receptor is involved in lipopolysaccharide (LPS)-induced cervical ripening. METHODS: New Zealand White non-pregnant rabbits were randomly allocated to 4 equal groups and treated with vaginal suppositories containing LPS with various concentrations of EP4-selective antagonist once daily for 3 days, and then sacrificed for analysis. Analysis was performed in order to examine the inhibitory effect of EP4 antagonist on LPS-induced cervical ripening. The expression of EP4 in a cervix treated with LPS was examined immunohistochemically. The percent of cervical extensibility in the segment of cervix as the tensile strength was determined with 5.8 g of constant perpendicular stretching. The ripening area of the cervix with edematous changes in H&E sections was calculated by a microscopic system with a computer-assisted digital analyser. Type-1 collagenase activity was determined in cervical tissue using FITC-labelled type-1 collagen. RESULTS: Immunohistochemical study shows the positive staining of EP4 at the interstitial cells in the cervix treated with LPS. The extensibility, cervical edematous area and type-1 collagenase activity are significantly reduced in the cervix treated with LPS in the

presence of EP4 antagonist compared with that treated with LPS alone. CONCLUSIONS: These data implicates the EP4 as the PGE2 receptor involved in LPS-induced cervical ripening.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：子宮頸管熟化、プロスタグランジン (PG) E2、PGE2受容体 EP4

1. 研究開始当初の背景

子宮頸管熟化現象は分娩の中心をなす生理的炎症と捉えることができるきわめて興味深い現象であり、近年の研究により陣痛発来とは車の両輪の関係である可能性が明らかにされてきた。また生理的分娩現象と近似した現象である早産は頸管熟化を伴い、児の生命ならびに脳性麻痺などの神経学的後遺症を引き起こし、産科臨床において未だ完全に防止することのできないきわめて重要な疾患である。

頸管熟化の最初の過程には胎児因子、胎盤因子、羊水因子、物理的刺激因子など複数の頸管熟化の誘引となる因子が関与することが考えられている。抗リン脂質抗体症候群といった血栓傾向のある妊婦では早産率が高いことも報告されており、血栓、炎症がこうした機序に深く関与していることが示唆される。これら刺激因子はケモカインであるIL-8や単球遊走ペプチド (MCP) とともにマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) によって炎症性細胞遊走のプロセスを引き起こす。さらに遊走した炎症性細胞は局所でIL-1やTNF- α を誘導、IL-8、NO誘導体を介して、サイクロオキシゲナーゼ (COX) II、プロスタグランジン (PG) Eの増加、PGDHの減少、コラーゲン分解酵素誘導を介しコラーゲン分解をおこない頸管熟化を誘導することから、中心的メディエーターはIL-8などの炎症性サイトカインであることがしだいに明らかになってきた。

一方、PGがmatrix metalloproteinase (MMP)を誘導することや、PGE2がコラーゲン分

解を通じて子宮頸管熟化をおこなうことが観察されてきていた。また、PG系の各種受容体塩基配列が同定され、受容体欠損マウスモデルを用いてリュウマチをはじめとする炎症疾患においてその機能解析が急速に進んでいる。PGE2においては4個の異なるGタンパク結合型の受容体を介しその生物活性を発現すると考えられており、血管、血小板、骨、神経といった多様な組織での生理活性発現の機序が検討され始めていた。

PGF2 α 受容体欠損妊娠マウスでは、陣痛発来が起こらないことが観察されており、子宮収縮の中心的役割が示唆される。またPGE2受容体は4個のサブタイプ (EP1、EP2、EP3、EP4)を有することが解明され、子宮収縮に対する作用が検討されつつある。しかしながらEP1およびEP3は子宮筋収縮を惹起すること、EP2は子宮筋弛緩を惹起することが明らかとなっているが、EP4についてはその意義が明確には解明されておらず、子宮頸管熟化に関与する受容体の検討もほとんどなされてこなかった。

下部妊娠子宮筋にはEP1からEP4まで発現していることが知られておりEP1は妊娠満期において子宮筋収縮に関与することは明らかになっている。EP4を含め4個の受容体は分娩発来時に発現が最大となるが、子宮頸管コラーゲン線維の微小変化からEP4がこうした変化に関与することを示唆する報告もある。一方で、PGE2が妊娠中期において家兎子宮頸管熟化に有効でないことから熟化に関与する特定の時期での特異的受容体発現の関与を示唆するものもある。

2. 研究の目的

そこで本研究では、EP4 の発現が十分でない非妊家兎子宮頸管において PGE2 サブタイプ受容体 EP4 に対する選択的合成刺激物質により頸管が熟化されることから、分娩過程における劇的現象のひとつである子宮頸管熟化について、検討を行うことを目的とした。

1) EP4 を介した子宮頸管熟化の制御機構の検討、

2) 子宮頸管部における EP4 発現の制御機構の検討を目的とした。

なかでも特に EP4 に対する刺激自身による autocrine / paracrine としての促進機序、PG 受容体間の相互情報伝達の機序、また EP4 を介した子宮頸管熟化にヒアルロナン受容体であるヒアルロナン—CD44 系による子宮頸管熟化機序と PG 受容体間の情報伝達の機序に焦点を当てて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) EP4 を介した家兎子宮頸管熟化の制御機構の検討

①妊娠家兎子宮頸管を用いて子宮頸管熟化に関し以下の各種検討を行った。

PG 阻害剤含有膣坐剤前処置の後、EP4 受容体刺激剤含有膣坐剤を投与し子宮頸管熟化に関し以下の検討を行った。

1) 摘出子宮頸管部を垂直に牽引 (5.8g) し伸長度を測定した。

2) HE 染色標本を作製、任意の 3 視野 (10 倍拡大) について浮腫化した領域の面積を顕微鏡下で測定した。

3) 超音波破碎し遠心、上清を FITC 蛍光標識した I 型コラーゲンに添加、分解された I 型コラーゲナーゼの蛍光強度により I 型コラーゲナーゼ (TIMP-1) 活性を測定した。

②すでに確立している lipopolysaccharide (LPS) 膣坐剤の局所投与による非妊家兎子宮頸管熟化モデルを用いて子宮頸管熟化に関し以下の各種検討を行った。

LPS (1ng 含有) 膣坐剤を作成、19 週齢の非妊家兎に LPS 膣坐剤を 3 日連続投与の後屠殺し、子宮頸管部を摘出し検討を行った。

1) LPS 膣坐剤投与が EP4 受容体を誘導することを抗 EP4 受容体抗体を用いて子宮頸管部凍結切片を用い免疫組織学的にその局在発現を検討した。

2) 抗 CD44 抗体を用いて子宮頸管部凍結切片並びにホルマリン固定切片を用い免疫組織学的染色法により CD44 の局在を検討した。

3) 各種濃度 (64 μ g、6.4 μ g、0.64 μ g) の EP4 受容体阻害剤含有膣坐剤を LPS 膣坐剤投与第 1 日目に投与しその作用を各群で以下のごと

く検討した。

1. 摘出子宮頸管部を垂直に牽引 (5.8g) し伸長度を測定した。

2. HE 染色標本を作製、任意の 3 視野 (10 倍拡大) について浮腫化した領域の面積を顕微鏡下で測定した。

3. 超音波破碎し遠心、上清を FITC 蛍光標識した I 型コラーゲンに添加、分解された I 型コラーゲナーゼの蛍光強度により TIMP-1 活性を測定した。

(2) ヒト子宮頸管部の EP4 発現の制御機構の検討

ヒト子宮頸管よりヒト線維芽細胞を既に確立した方法で分離培養し以下の検討した。

①プロゲステロン、TNF α 、IL-1 β 、IL-6 の各種濃度下で培養し、EP4 mRNA 発現が Northern blot analysis により濃度依存性に発現が増加するか検討した。

②LPS ならびに合成 EP4 受容体刺激剤を投与し CD44 発現を免疫組織学的染色法および Western blot analysis により検討した。

③ EP4 受容体刺激剤ならびに EP4 受容体阻害剤の各種濃度存在下でヒト線維芽細胞への作用を検討した。

1) EP4 受容体刺激剤を各種濃度投与し、濃度依存性に PGE2 産生量が増加するか検討した。

2) EP4 受容体阻害剤の各種濃度存在下で EP4 受容体刺激剤による PGE2 産生量が濃度依存性に抑制されるか検討した。

4. 研究成果

家兎子宮頸管熟化制御について

①妊娠家兎子宮頸管を用いて PG 阻害剤含有膣坐剤前処置の後、EP4 受容体刺激剤含有膣坐剤を投与し子宮頸管熟化に関し検討を行ったところ、

1) 子宮頸管部の伸長度 (%) は EP4 阻害剤により濃度依存性に抑制された。2) EP4 阻害剤投与により有意に頸管部浮腫化領域面積 (mm^2) の縮小が観察された。3) TIMP-1 活性 (mU/ml/mg タンパク量) は EP4 阻害剤により濃度依存性に抑制された。

②LPS 膣坐剤誘発非妊家兎熟化子宮頸管を用いて検討を行ったところ、

1) LPS 膣坐剤が 19 週齢の非妊家兎子宮頸管部凍結切片において抗 EP4 受容体抗体を用いた免疫組織学的局在発現を間質細胞に認めた。

2) LPS 膣坐剤並びに合成 EP4 受容体刺激剤含有膣坐剤投与非妊家兎は vehicle 投与非妊家兎と比較して CD44 発現が増強していた。

- 3) 1. 子宮頸管部の伸長度 (%) は EP4 阻害剤により濃度依存性に抑制された。
2. EP4 阻害剤投与により有意に頸管部浮腫化領域面積 (mm²) の縮小が観察された。
3. TIMP-1 活性 (mU/ml/mg タンパク量) は EP4 阻害剤により濃度依存性に抑制された。

また、ヒト子宮頸管部 EP4 発現制御についてヒト子宮頸管より分離培養したヒト線維芽細胞について検討したところ、
①プロゲステロン、TNF α 、IL-1 β 、IL-6 存在下、EP4 mRNA 発現が濃度依存性に増加した。

②培養ヒト線維芽細胞は LPS および EP 受容体刺激剤投与によりコントロールと比較して CD44 発現が増加していた。

③1) EP4 受容体刺激剤存在下、濃度依存性に PGE2 産生量が増加した。

2) 各種濃度の EP4 受容体阻害剤存在下での EP4 受容体刺激剤投与により、濃度依存性に PGE2 産生量が減少した。

これら結果より EP4 阻害剤は LPS 誘発の家兎頸管熟化を抑制したことから頸管熟化抑制による早産の防止に有効である可能性が示唆された。また、炎症性サイトカインが EP4 受容体発現を促進し、産生増加した PGE2 が子宮頸管熟化を促進する機序、PGE2 受容体 EP4 を介した、ヒアルロン受容体である CD44 発現が誘導され、細胞内への情報伝達から炎症性サイトカインの誘導、子宮頸管熟化を促進する autocrine /paracrine 機序の存在が示唆された。

以上より、今後、子宮頸管熟化に関連した受容体の検討により、早産の予知とともに、将来の分娩誘発や早産防止に役立つ可能性がある。また、細胞内伝達系の制御についての検討がこれからも進められるべきと考える。

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 1 件)

1. Fukuda Y, Sugimura M, Suzuki K, Kanayama N.

Prostaglandin E2 receptor EP4-selective antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced cervical ripening in rabbits.

Acta Obstet Gynecol Scand. 査読有 Vol. 86, No. 11, 2007, 1297-1302.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉村 基 (SUGIMURA MOTOI)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：30273189

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし