

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09801

研究課題名(和文) 早産治療を目指した変異EDAの作成

研究課題名(英文) Creation of a Mutant EDA for the Treatment of 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：臍分泌物中のフィブロネクチンに含まれるEDAは、羊膜間葉細胞のTLR4に結合し、COX-2、MMPの産生を促進して早産を惹起する。本研究ではEDA-TLR4結合に必須のアミノ酸残基を特定し、その部位を改変した変異EDAを作成することを目的とした。まずEDAを構成する90のアミノ酸配列を4分割し、それぞれのアミノ酸を欠失したEDAを作成した。その結果、特定の7つのアミノ酸を欠失させたEDAがTLR4と結合しなかった。そのうちチロシン36を変異させたときEDAはTLR4と結合しなかった。すなわち、EDAの90のアミノ酸のうち、チロシン36こそがTLR4との結合に必須であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早産のマーカーとして知られるフィブロネクチンが羊膜と作用して早産を惹起するメカニズムの一端を解明した。特に、フィブロネクチン中のEDAを構成するわずか1つのアミノ酸(チロシン36)が、羊膜間葉細胞のTLR4との結合に必須であることを明らかにしたことは、学術的に価値がある。今後、このチロシン36は早産予防、治療のための新規薬剤開発の標的となり、全身への副作用が少ない画期的な薬剤創出につながる可能性がある。早産は新生児死亡、後遺症の重要な原因であり、早産の予防・治療は周産期医学領域における喫緊の課題であることから、早産治療薬の創出は社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Extra domain A (EDA), which is contained in fetal fibronectin in vaginal secretions, binds to TLR4 in amniotic mesenchymal cells and promotes the production of COX-2 and MMPs, thereby inducing preterm labor. In this study, we aimed to identify the amino acid residues essential for EDA-TLR4 binding and to create mutant EDA with modifications of these residues. First, the 90 amino acid sequence comprising EDA was divided into four parts, and EDA with each amino acid deleted was created. As a result, EDAs with deletions of seven specific amino acids failed to bind to TLR4. Among them, when tyrosine 36 was mutated, EDA did not bind to TLR4. In other words, of the 90 amino acids in EDA, tyrosine 36 was found to be essential for binding to TLR4.

研究分野：周産期医学

キーワード：早産 羊膜

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。早産は児の未熟性ゆえの新生児死亡、後遺症の最も重要な原因である。早産の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。さらに世界的にみれば早産の頻度は 8~10% に達し、増加傾向にある。このように早産は全世界的な周産期医学上の問題となっており、その病態解明ならびに予防・治療法開発のための研究推進は喫緊の課題である。

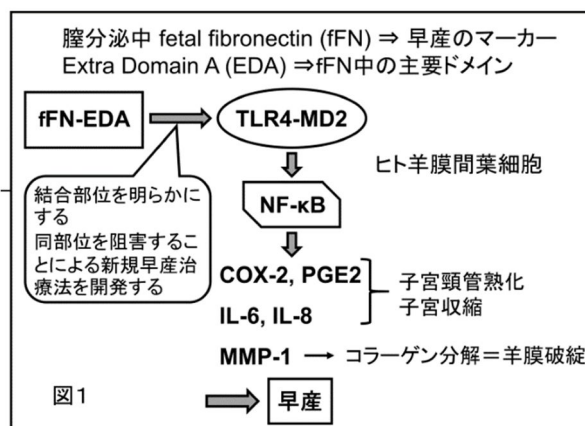
fetal fibronectin (fFN) は妊娠子宮において、卵膜 (羊膜) と子宮筋との間隙をうめる細胞接着分子である。腔分泌物中の fFN の存在は、早産のリスクを示す、極めて有用なバイオマーカーとして (Lockwood et al, N Engl J Med, 1991)、臨床の現場で広く用いられている。われわれは、fFN 中に含まれる Extra domain A (EDA) が、ヒト羊膜間葉細胞 (間葉細胞) に存在する Toll like receptor 4 (TLR4)-MD2 と相互作用し、COX-2、サイトカイン、MMP の産生を促進することで早産が惹起されることを、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)。

2. 研究の目的

われわれは、羊膜における EDA-TLR4-MD2 相互作用を阻害することができれば、fFN によって誘導される COX-2 や MMP の産生を抑制し、早産を治療することができるのではないかと仮説を得た。そのためには EDA-TLR4-MD2 の特異的結合部位を明らかにする必要がある。

本研究では、fFN 中のドメインである EDA において、TLR4-MD2 と結合相互作用するための必須のアミノ酸部位を同定

し、同部位を改変した変異 EDA を作成することを目的とした (図 1)。



3. 研究の方法

研究には、大腸菌を用いて作成したリコンビナント EDA、ヒト羊膜間葉細胞 (初代培養)、HEL-blue-hTLR4 cells (添加した物質が TLR4-MD2 と結合してシグナルが伝わると培地が青色に変化する実験系) を用いた。遺伝子発現は定量 PCR 法によって検討した。

4. 研究成果

まず、大腸菌によるリコンビナント EDA を作成した。その wild type EDA を構成する 90 のアミノ酸配列を 4 分割し、それぞれのアミノ酸を欠失した欠失 EDA を作成し、LPS 除去を行ったうえで、それぞれの EDA が TLR4-MD2 との相互作用を持つかどうかを、HEK-blue-hTLR4 cells

を用いて検討した。

すると、そのうちの 1 つの欠失 EDA は TLR4-MD2 と相互作用しなかった (図 2)。

この欠失アミノ酸に、EDA-TLR4-MD2 相互作用に必須の部位が含まれると考えられたため、同部位をさらに分割、欠失させる方法を用いて、作成した欠失 EDA と TLR4-MD2 との相互作用を検討した。

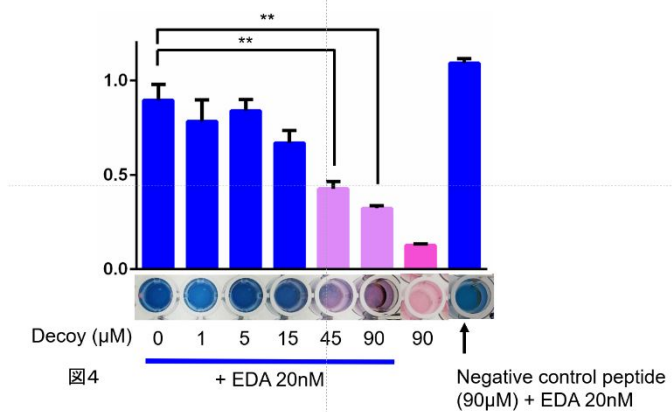
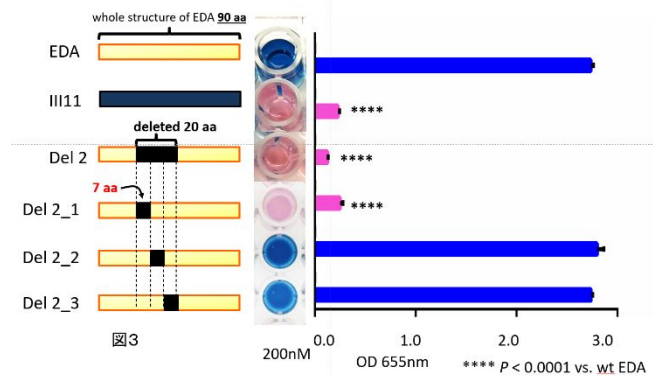
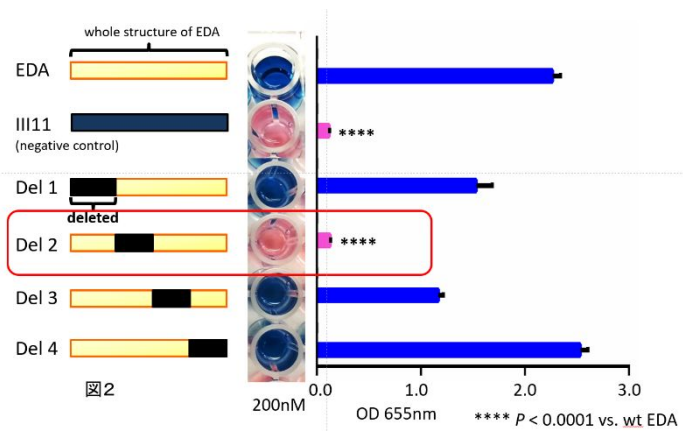
すると、EDA と TLR4-MD2 との相互作用には、わずか 7 アミノ酸のみが必須であることが明らかとなった (図 3)。

この 7 個のアミノ酸を順次欠失、変異させるなどして EDA-TLR4-MD2 の相互作用に必須である部位を検討したところ、Tyrosine36 を変異させたときのみ、EDA と TLR4-MD2

相互作用がおこらなかった・すなわち、EDA-TLR4-MD2 相互作用には、EDA を構成する 90 のアミノ酸のうち、Tyrosine36 のみが必須であることが判明した。

しかし、この Tyrosine36 を変異させた EDA は、ヒト羊膜間葉細胞における wild type EDA による COX2、IL8、MMP1 の発現誘導を阻害できなかった。そこで、Tyrosine36 を含む 30 アミノ酸配列を Decoy peptide として作成し、その Decoy peptide が wild type EDA と TLR4-MD2 の相互作用を阻害するかどうかを検討した。

すると、decoy peptide は容量依存性に wild type EDA と TLR4-MD2 相互作用を阻害した (図 4)。



これらの研究成果から、臍分泌中の胎児フィブロネクチン (その中の EDA) がヒト羊膜間葉細胞における TLR4-MD2 と相互作用して早産や破水を惹起する機構には、EDA 中の Tyrosine36 が必須であることが明らかとなった。早産に対する予防・治療薬は有効なものが存在しないが、EDA の Tyrosine36 は早産予防・治療薬の分子的標的となり得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishimura Fumitomo, Mogami Haruta, Moriuchi Kaori, Chigusa Yoshitsugu, Mandai Masaki, Kondoh Eiji	4. 巻 15
2. 論文標題 Mechanisms of thrombin-Induced myometrial contractions: Potential targets of progesterone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0231944 ~ 0231944
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0231944	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Io Shingo, Kondoh Eiji, Chigusa Yoshitsugu, Kawasaki Kaoru, Mandai Masaki, Yamada and Shigehito	4. 巻 26
2. 論文標題 New era of trophoblast research: integrating morphological and molecular approaches	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Reproduction Update	6. 最初と最後の頁 611 ~ 633
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/humupd/dmaa020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishida Ayami, Minamiguchi Sachiko, Yamada Yosuke, Nakagawa Ryota, Chigusa Yoshitsugu, Kondoh Eiji, Mandai Masaki, Haga Hironori	4. 巻 105
2. 論文標題 Histological distribution pattern of hemosiderin deposition on the chorionic plate and fetal membrane of diffuse chorioamniotic hemosiderosis related to chronic abruption oligohydramnios sequence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Placenta	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.placenta.2021.01.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kondoh E, Kawamura Y, Chigusa Y, Mogami H, Ueda A, Hamanishi J, Mandai M.	4. 巻 19
2. 論文標題 Intracervical elastomeric sealant in an ex vivo model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Matern Fetal Neonatal Med.	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14767058.2019.1626367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umemiya Maki、Chigusa Yoshitsugu、Minamiguchi Sachiko、Horie Akihito、Mandai Masaki、Kondoh Eiji	4. 巻 N/A
2. 論文標題 Cushing's syndrome during pregnancy with different clinical courses: Two case reports	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension Research in Pregnancy	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14390/jsshp.HRP2019-019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	近藤 英治 (Kondoh Eiji) (10544950)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	異動により、現在は熊本大学大学院生命科学研究部 (産婦人科)教授。
研究分担者	最上 晴太 (Mogami Haruta) (40378766)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関