

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591813

研究課題名（和文） プロテオグリカンで切迫早産を治療しよう

研究課題名（英文） Let's treat preterm labor with Proteoglycan !

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：新生児死亡の最大の原因であり、現代の産科学の最重要課題である早産克服のため、その主要原因である絨毛膜羊膜炎の治療を目的とした基礎的研究を行った。本学で大量合成に成功したプロテオグリカン（PG）も使い、PG がヒト子宮頸管培養線維芽細胞において LPS で誘導された TLR4 の活性化を抑制することにより、抗炎症効果を発揮することを明らかにした。また、PG と P を併用することによりさらに強い抑制効果が得られ、PG と P の併用療法が効果的な早産治療となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study showed that both PG and P have an inhibitory effect on LPS-induced inflammation. This anti-inflammatory effect of PG and P was augmented by co-administration of both, suggesting for the first time that PG has an anti-inflammatory effect on human uterine cervical fibroblasts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：切迫早産、プロテオグリカン、プロゲステロン、ヒト子宮頸管由来培養線維芽細胞、炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

新生児医療の進歩によって早産児の予後は改善されてきたが、今なお早産は新生児死亡の最大原因である。したがって早産の前段階である切迫早産の治療法確立は現代産科

学において最重要課題である。

早産の主因として絨毛膜羊膜炎（chorioamnionitis; CAM）がある。CAM は主に細菌感染で発症し、炎症性サイトカインの tumor necrosis factor- α （TNF- α ）、

interleukin-1 β (IL-1 β)、interleukin-6 (IL-6)、interleukin-8 (IL-8) などが関与している。

一方、本学の Sashinami らは、プロテオグリカン (Proteoglycan; PG) が抗炎症作用をもつことを報告している。PG は細胞外マトリックスの主要構成成分であり、ヒトの皮膚、軟骨などに存在し、コラーゲンなどと共に細胞増殖や接着に関わっている。本学では、この PG をサケ鼻軟骨から簡便かつ大量に抽出することに成功している。さらに我々はヒト子宮頸管培養線維芽細胞においてプロゲステロン (P) が、分娩時に子宮頸管熟化に働くヒアルロン酸 (HA) 合成を抑制し分解を促進することも報告している。

2. 研究の目的

PG のヒト子宮頸管培養線維芽細胞に対する抗炎症作用を調べることにより、早産の治療薬としての可能性を検討すること。さらに P との併用によってその抗炎症作用が増強するか否か確認すること。

3. 研究の方法

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) を培地として培養した。線維芽細胞が confluence になった後に継代を繰り返し、4~7 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 lipopolysaccharide (LPS) を添加し炎症を惹起した。これに PG (0.5 mg/ml、1.0 mg/ml) を添加し 48 時間まで培養し、培養液中の IL-6、IL-8 の産生量を ELISA 法にて測定した。また、PG、P、PG+P を各々添加し 24 時間まで培養し、培養液中の IL-6、IL-8 の産生量を ELISA 法及び real-time PCR 法を用いて測定した。さらに、炎症反応の調節に関わる Toll-like receptor 4 (TLR4) の発現を Western blotting

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。

4. 研究成果

LPS の添加により IL-6、IL-8 の産生量は経時的に増加した。しかし、PG の添加によりその産生量は 6、12、24、48 時間で有意に抑制された (Figure 1A, 1B)。

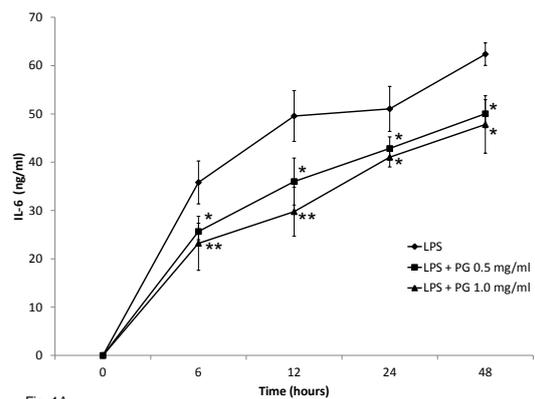


Fig. 1A

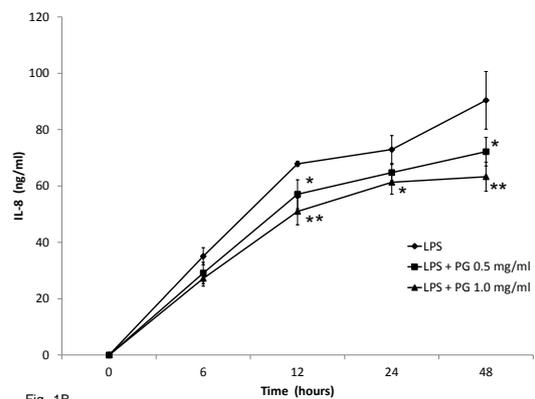
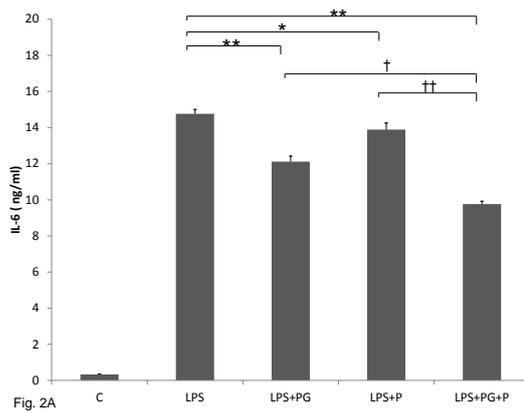


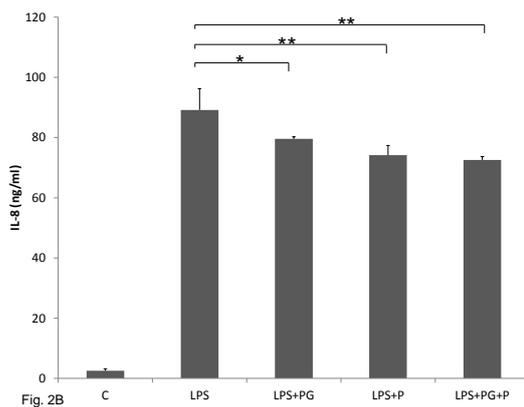
Fig. 1B

PG はまた、濃度依存的にその産生量を抑制した。

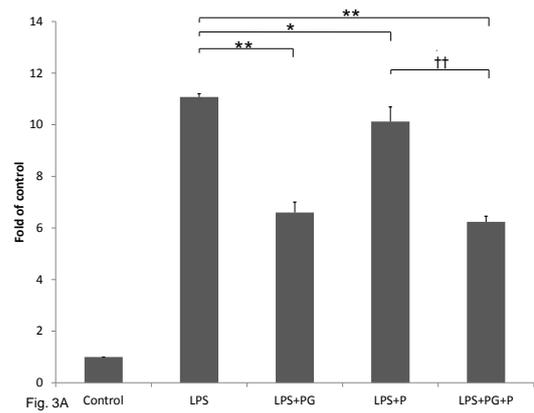
IL-6 の産生量は LPS 単独添加に比較し、+PG、+P、+PG+P の添加群において有意に減少した。また、PG+P の併用群では PG 及び P 単独添加群と比較し、さらに有意な減少を示した (Figure 2A)。



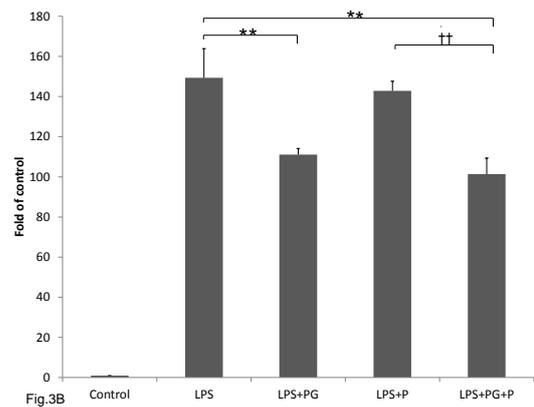
一方、IL-8 の産生量も、LPS 単独添加に比較し、+PG、+P、+PG+P の添加群において有意に減少した。PG+P 併用群は PG 及び P の単独添加群と比較し有意差は出なかったが、減少幅が大きかった (Figure 2B)。



IL-6 mRNA では、LPS 単添加に比較し、+PG、+P、+PG+P の添加群においてその発現は有意に減少した。また、PG+P の併用群では P 単独添加群と比較し、さらに有意な減少を示した (Figure 3A)。



一方、IL-8 でも、LPS 単添加に比較し、+PG、+PG+P の添加群においてその発現は有意に減少した。PG+P 併用群は P の単独添加群と比較し有意に減少した (Figure 3B)。



TLR4 は LPS で発現が増強し、+PG、+PG+P で減弱した。

今回 PG がヒト子宮頸管線維芽細胞において抗炎症効果を有するかを検討した結果、PG は IL-6 及び IL-8 mRNA の発現を抑制しており、PG は P と共に免疫システムを抑制できることを発見した。

切迫早産に炎症反応が関与することが判明して以来、TLR4 の関与も注目されている。TLR は炎症反応の開始や調節に関わっており、これを制御することで炎症反応に起因する陣痛発来を調節できる可能性がある。本研究

においてP及びPGの投与によりTLR4の発現は減弱し、PGはTLR4を介して抗炎症効果を発揮している可能性が示唆された。

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7件)

1. Anti-inflammatory effect of proteoglycan and progesterone on human uterine cervical fibroblasts.
Fukuyama A, Tanaka K, Kasai K, Nakamura T, Mizunuma H. Life Sci. 査読有り
90, 484-488, 2012. DOI:10.1016/j.lfs.2011.12.024. Epub 2012 Jan 30.

[学会発表] (計7件)

1. 福山麻美、田中幹二. プロテオグリカ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64回日本産科婦人科学会学術講演会 2012.4.13~4.15. 神戸市
2. 福山麻美、田中幹二. 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的研究. 第5回日本早産予防研究会学術集会. 2011.12.13 東京
3. 福山麻美、田中幹二. 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的研究. 第59回北日本産科婦人科学学術講演会. 2011.9.24~9.25、秋田市
4. 福山麻美、田中幹二. 切迫早産新規治療薬としてのプロテオグリカンの可能性に関する基礎的研究. 第63回日本産科婦人科学会学術講演会 2011.8.29~8.31、大阪市
5. Fukuyama A, Tanaka K. Role of proteoglycan as a new tool for treatment of preterm labor. 31st Annual meeting of

the American Society for Reproductive immunology. 2011.5.19 Salt Lake, USA.

[図書] (計1件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

福山 麻美 (FUKUYAMA ASAMI)
弘前大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 30536511

柿崎 育子 (KAKIZAKI IKUKO)
弘前大学・医学(系)研究科・准教授
研究者番号: 80302024

(3) 連携研究者

なし