

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659771

研究課題名(和文) 早産の分子メカニズムとその予防について

研究課題名(英文) The investigation for molecular mechanisms and the prevention of preterm birth

研究代表者

木暮 圭子 (KIGURE, KEIKO)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00598609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は炎症性サイトカインであるIL-6とTNF- $\alpha$ がLHR発現にどのように関与するかを、ヒト羊膜上皮とラット顆粒膜初代培養を用いて検索した結果を報告する。TNF- $\alpha$ はIL-6の産生を促進し、LH-R発現に関してIL-6は促進的にTNF- $\alpha$ は抑制的に作用した。ヒト羊膜では、TNF- $\alpha$ は、アクチビン産生を増強することが判明した。作用メカニズムに関しては、IL-6はLHR発現をJAK/STAT系を介して増強し、自己のレセプターを誘導することからIL-6の自律的なpositive actionを証明した。TNF- $\alpha$ はNF- $\kappa$ Bの核内への移行により作用を示すことが推測された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined the effect of IL-6 and TNF-alpha on the expression of LH-R mRNA and protein expression levels and the mechanisms of regulation in rat primary granulosa cells and human amniotic epithelial cells. TNF-alpha stimulated the expression of IL-6 and negatively regulated LH-R mRNA. TNF-alpha enhanced acutivin A production in time- and dose-dependent manner in amniotic epithelial cells.

We have shown that IL-6 up-regulates LHR due to increase transcription level of mRNA, and JAK/STAT3 signaling is required for this up-regulation by IL-6. In terms of TNF-alpha, we speculate that TNF-alpha enhanced the transportation of NF-kappaB from cytosol into nucleus.

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：cAMP AM LH-R 子宮収縮 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 妊娠中に特異的に上昇するホルモン生理活性物質は多く存在し、妊娠の生理状態を作り上げている。この内でも、hCG は特に卵巣(黄体)を刺激し、妊娠維持に必須のものと理解されている。一方、最近、LH-R は子宮にも存在し、妊娠維持に必須のものであるとの報告もある。今回の研究は、妊娠中に分泌される hCG が羊膜の特異的受容体に結合し、子宮筋弛緩に作用することを検討する点でユニークである。

(2) 羊膜は、様々な物質を分泌することが判明し、AM は胎盤や羊膜から分泌されているとの報告もあり、羊膜、羊水による静菌作用が子宮収縮抑制に貢献する可能性も検討し、その効果を評価する。羊膜を用いることで胎児性成分における AM、hCG の作用を検討することは、実験材料として重要な意味がある。

(3) 塩酸リトドリンの重篤な副作用として、肺水腫、顆粒球減少症、横紋筋融解症などがある。特に投与が長期間にわたる場合は、これらの合併症の発生に注意が必要である。硫酸マグネシウムについては、血中マグネシウム濃度を測定するなど過剰投与に注意が必要である。一方、妊娠中の生理的物質としての AM、hCG はその濃度の正常値に大きな幅があり、その感受性を高める工夫を子宮筋に行うことができれば、副作用の少ない治療法の開発につながると考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 子宮弛緩のための物質のレセプターとそのレセプター発現に対するサイトカインの作用。

早産の発生メカニズムとしては、子宮に感染が生じると、局所でサイトカインが合成され、そのサイトカインによる PG 産生に必要なアラキドン酸遊離を生じる酵素の上昇と Cox2 の上昇により最終的に PG の上昇が子宮の収縮をもたらすと考えられる。一方、子宮の弛緩に作用する物質の子宮における発現を考えると、我々の結果からは妊娠初期には hCG、その後は AM が推定される。これら cAMP を上昇させる物質やそのレセプターが減少すると、cAMP 量が減少し、子宮収縮がもたらされると考えた。このため、炎症 サイトカイン産生量増加と AM、LH/hCG 受容体への作用を検討し、サイトカインの作用メカニズムを明らかにして、感染が原因と考えられる早産に対する関与を検討する。

(2) 生理的妊娠維持機構として、特に子宮の内容の増大に関しては、子宮筋の弛緩を誘導するメカニズムが存在すると考える。この子宮筋弛緩を司る物質は妊娠により増加し、その受容体が子宮筋に存在すると予想される。今回は、これらの条件を満たす AM と hCG に

着目して、妊娠中の変化をこれらの物質とそのレセプターの発現調節を明らかにする。また、早産の原因となる炎症とこれらの物質の変化の様子を明らかにすることは、切迫早産治療の新しい戦略が考慮される。このため、炎症性サイトカインなどの物質による AM、hCG 分泌、RAMP2、LH-R 発現に対する影響を明らかにして、子宮収縮の際に生じる分子メカニズムを解明する。

(3) 羊膜は子宮内感染において初期の標的となり、結果として前期破水がその後の妊娠予後に大きく影響する。このため、羊膜における感染防御のメカニズムは重要であり、また羊膜での AM 発現は報告されているので、*invitro* の実験として羊膜を用いて検討する。子宮弛緩作用のメカニズムを解明することで、切迫早産の治療法の新しい観点を導入して、生理的な治療を普及することができる。現在用いられる 2 受容体刺激剤(塩酸リトドリン)は、心臓に対する負荷や DM に対する副作用があり、改善が必要である。生理的子宮収縮抑制作用の解明を行うことで、より副作用の少ない製剤の開発が可能になる。

## 3. 研究の方法

(1) 幼若ラットの子宮でも hCG に反応して cAMP が上昇するので、ラット妊娠子宮より内膜を分離培養して RAMP2、hCG の発現を確認し、AM、hCG を作用させて cAMP 産生を測定する。

AM、hCG がそれぞれ自己のレセプター発現に促進的に作用するかを検討し、正常妊娠経過でのレセプター量の推移を測定する。

(2) ヒト羊膜培養

AM、LH-R、RAMP2 の発現を確認した上で、各々に対する発現誘導物質の実験を行う。AM、LH-R とともに E2 により発現誘導が起きるので、ヒト羊膜に対する作用を確認する。

ヒト LH-R については、短いタイプのレセプターが LH-R 蛋白発現制御を行っているので、短いタイプの LH-R が発現しているかを確認する。

羊膜に対する TNF の LH-R 発現に対する作用を確認して、羊膜におけるこれらの作用分子メカニズムを解明する。

アクチビンが静菌作用を示す可能性があり、炎症性サイトカインの添加でアクチビンの量が変化するか検討する。TNF- のアクチン分泌に対する作用をみるため、用量依存性と時間経過を観察する。

(3) ラット顆粒膜細胞を用いたサイトカインの作用の検討

細胞にサイトカインを添加し、LH-R の発現量の変化をみる。発現量増加の作用のある物質とサイトカインを同時添加して拮抗作用を評価する。

mRNA レベルでのサイトカインの作用メカニズムを確認するため、ルシフェラーゼアッセイ、mRNA の半減期の実験を行う。

#### 4. 研究成果

今回我々は炎症性サイトカインである IL-6 と TNF- $\alpha$  が LHR 発現にどのように関与するかを、ヒト羊膜上皮とラット顆粒膜初代培養を用いて検索した。TNF- $\alpha$  は IL-6 の産生を促進し、LH-R 発現に関して IL-6 は促進的に TNF- $\alpha$  は抑制的に作用した。

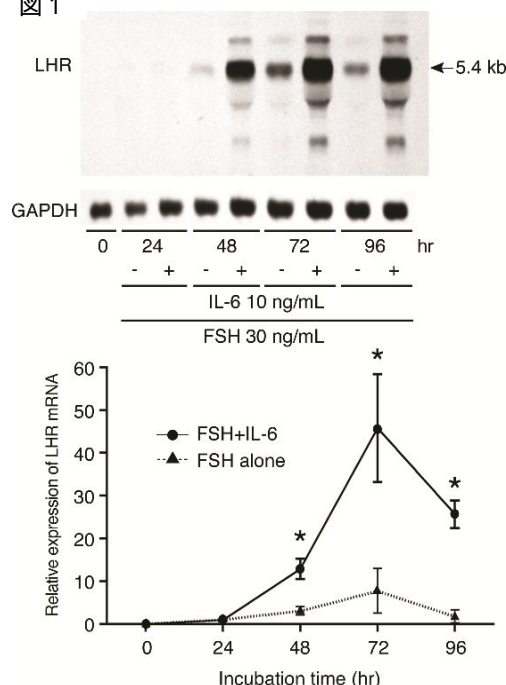
ヒト羊膜では、TNF- $\alpha$  は、アクチビン産生を増強することが判明した。一方 LH-R の発現に関しては、抑制的であるが、IL-6 の発現にも促進的であることから、間接的に促進的に作用する側面もあり今後のさらなるメカニズムの検討が必要である。このため均一なラット顆粒膜細胞を用いて TNF- $\alpha$  を投与すると LH-R の発現をはじめ、ステロイド合成に關する酵素の発現が抑制される結果となった。この際に cAMP の産生を測定すると、従来から考えられていたように TNF- $\alpha$  は cAMP の産生を抑制する結果は得られなかった。さらに LH-R の半減期を減少させる結果は得られなかったため、TNF- $\alpha$  はこれらの cAMP により誘導せられる遺伝子発現を抑制する共通のメカニズムで抑制をかけていることが示された。またアクチビン産生に関しても、促進的に作用する結果がえられたので、TNF- $\alpha$  がアクチビン産生を介して間接的に LH-R の発現を抑制している可能性もある。TNF- $\alpha$  は NF- $\kappa$ B の核内への移行により作用を示すことが推測された、またルシフェラーゼアッセイを用いた LH-R の転写の抑制作用は確認できた。ルシフェラーゼアッセイに用いた 5' 転写開始点から 100 塩基ほどの長さであることからこの部位に作用することが考えられるが、一方 CREB のリン酸化や ERK1/2 のリン酸化に対する FSH の作用を抑制することはなかった。AKT のリン酸化に対する作用もなく、また細胞数に対する効果もコントロールと相違はなく、現在までのところアポトーシスに関しても関連していないと思われる。一方 TNF- $\alpha$  の作用メカニズムの検討のため p65 の関与を核内への移行とともにその移行を阻害する物質の影響を観察した。その結果 TNF- $\alpha$  は p65 の細胞質から核内への移行を促進していることが判明し、さらにその移行を阻害する物質により LH-R 産生に対する抑制効果も阻害された。これらの結果から TNF- $\alpha$  は NF- $\kappa$ B の核内への移行により LH-R の産生を抑制することが強く推測された。興味深いこと TNF- $\alpha$  は IL-6 の産生を促進することから炎症性サイトカイン間の関係についてもその関与の検討が必要である。TNF- $\alpha$  はさらに LH-R の細胞内から細胞膜に移動させるため重要な働きをする GPR78 の産生を抑制することが判明したため、この作用は LH-R の膜蛋白として移行する作用を抑制

している可能性が示された。

妊娠ラット子宮を妊娠後継時的に摘出して mRNA を抽出し LH-R の発現を検討したが、発現は検出することはできなかった。これはラットにおいても妊娠している機関に LH-R に結合する分子が多量に発現していて Down regulation されている可能性がある。

幼若ラットにエストロゲンを前投与し採取した卵巣からの顆粒膜細胞の初代培養系は、FSH を作用させることで LH-R の発現誘導を行うことができる特徴がある。我々はこの系を用い、FSH の LH-R 発現作用に対して局所的に修飾する因子を報告している。この実験系を用いて、われわれは過去の報告と異なり、IL-6 が FSH 誘導性の顆粒膜細胞 LH-R 発現を増強することをはじめ明らかにした (図 1)。

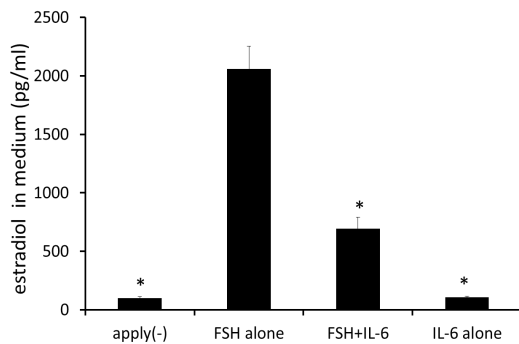
図 1



また IL-6 による発現増強効果は LH 受容体 mRNA 転写活性を増強することで惹起され、JAK/STAT 系シグナルがこの増強効果に關与していることを示し、さらに IL-6 は IL-6 受容体の発現を FSH と協調的に増強させることを示した。この報告発表後の研究において IL-6 は顆粒膜細胞において FSH 誘導性のエストロゲン分泌を低下させる働きがあることも明らかにした (図 2)。

この基礎研究の結果から、PCOS では高 LH 環境を背景とし、卵胞液中の高濃度の IL-6 により顆粒膜細胞の LH-R の発現が高まっている状態であるため LH による作用が増強し、未成熟の卵胞における FSH 作用を抑制する可能性がある。また IL-6 存在下で顆粒膜細胞のエストロゲン分泌が抑制され、これが卵巣局所でのアンドロゲン分泌亢進の理由になりうる。

図 2



IL-6 は B cell 分化誘導因子として同定された cytokine であり、様々な細胞に多面的な働きをする。IL-6 は transmembrane 受容体の IL-6 受容体 (IL-6R) または IL-6 可溶性抗体 (sIL-6R) と結合する。IL-6R と IL-6 が結合し gp130 が重合化するが、sIL-6R も同様な結合をする。gp130 は多くの細胞で発現しているが、IL-6R は肝細胞、白血球に多く発現しているとされる。しかしこれらの細胞以外に顆粒膜細胞にも発現しているという報告がある。gp130 の重合は JAK のリン酸化を通じ STAT3 をリン酸化する。また SHP-2 が誘導され ERK/MAPK を活性化する。gp130 を通じた PI3K/Akt 経路も知られている。

IL-6 の卵巣機能における報告は、E2・P4 産生低下など ovarian dysfunctional な報告やゴナドトロピン受容体に抑制的に働くという報告がある一方、COC expansion を誘起し oocyte quality を高める、など normal ovarian function としての役割を果たすという報告もあり、IL-6 の影響は不明確である。

IL-6 は子宮内膜に対しても作用している可能性があり、妊娠初期に胚から分泌される hCG に反応する内膜の上皮について、そのレセプターの発現を抑制するようであれば、PCOS の排卵はしやすいが流産が多い事実のメカニズムとして重要かもしれない。今回の実験を臨床応用するために、STAT3 の阻害剤や抗体や siRNA を用いて IL-6 作用を阻害することで流産を抑制できるかの検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計8件)

木暮圭子、尾池妙、池田禎智、山下宗一、平川隆史、峯岸敬. 子宮体癌患者に対する妊孕性温存療法の当科における検討. 第66回日本産科婦人科学会学術講演会. 2014年4月19日、東京.

西村俊夫、木暮圭子、池田禎智、山下宗一、中村和人、峯岸敬. 子宮体癌治療における分子標的薬による治療の個別化の可能性について. 第66回日本産科婦人科学会学術講演会. 2014年4月19日、東京.

尾池妙、木暮圭子、亀田高志、平川隆史、定方久延、山下宗一、池田禎智、井上真紀、木暮さやか、岩宗政幸、阿部由佳、内山陽介、岡庭隼、峯岸敬. 子宮頸部腺癌 IB 1 期に対し、広汎子宮頸部摘出術後、自然妊娠し分娩に至った1例. 第153回群馬産科婦人科学会・群馬県産婦人科医会集談会. 2014年3月8日、群馬.

木暮圭子、峯岸敬、中村和人、青木宏、村田知美、山下宗一、池田禎智、星野正道、中尾光資郎、西村俊夫、諏訪裕人. 婦人科悪性腫瘍手術において、リンパ節郭清術施行時の後腹膜縫合の有無に関わる有害事象についての当科における検討. 第65回日本産科婦人科学会学術講演会. 2013年5月11日、札幌.

池田禎智、中村和人、青木宏、村田知美、木暮圭子、中尾光資郎、峯岸敬. 肺良性転移性平滑筋腫の一例. 第123回関東連合産科婦人科学会総会・学術集会. 2012年6月17日、東京.

木暮圭子、中村和人、青木宏、村田知美、池田禎智、中尾光資郎、西村俊夫、諏訪裕人、峯岸敬. 婦人科悪性腫瘍手術における骨盤内リンパ節郭清術後の、後腹膜縫合の有無による有害事象の頻度についての当科における検討. 第64回日本産科婦人科学会学術講演会. 2012年4月13日、神戸.

中尾光資郎、中村和人、小林未央、木暮圭子、池田禎智、村田知美、青木宏、峯岸敬. 若年女性に発症した腔壁原発卵巣状軟部肉腫の一例. 第64回日本産科婦人科学会学術講演会. 2012年4月13日、神戸.

青木宏、中村和人、池田禎智、村田知美、木暮圭子、金井真理、峯岸敬. CA125再上昇後、1年以上臨床的徴候が認められなかった卵巣癌再発の1例. 第63回日本産科婦人科学会学術講演会. 2011年8月30日、大阪.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木暮 圭子 (KIGURE, Keiko)  
群馬大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：00598609