

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592488

研究課題名(和文) 子宮頸管リモデリング制御におけるプロゲステロンシグナリングの作用分子機構

研究課題名(英文) The molecular mechanism of progesterone signaling to modulate cervical remodeling

## 研究代表者

桑原 慶充 (Kuwabara, Yoshimitsu)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40373013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：臨床検体よりヒト子宮頸部線維芽細胞培養系を確立し、E2存在下で継代後、IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、PTGS2および各種MMPの分子動態についてリアルタイムRT-PCRで解析を行った。いずれの分子群もLPS刺激(2.0  $\mu$ g/ml)により発現誘導され、この変化はIL-6、IL-8を除きP4(1.0  $\mu$ M)添加により有意に抑制された。低濃度のLPS刺激(0.2  $\mu$ g/ml)では、いずれの分子誘導もP4で抑制され、P4をLPS刺激前に投与した場合により顕著であった。プロゲステロンは頸管組織において早産病態関連分子の転写抑制作用を有し、至適時期の治療導入で早産リスク低減に寄与する。

研究成果の概要(英文)：Human uterine cervical fibroblast culture system was established from clinical specimens. Subsequently to the subculture in the medium containing beta-estradiol, expression dynamics of IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , PTGS2 and MMPs were assessed by real-time RT-PCR analysis.

LPS (2.0  $\mu$ g/ml) stimulation induced a significant increase of transcript levels of all molecules, which were significantly suppressed by progesterone (P4)(1.0  $\mu$ M) treatment except for IL-6, IL-8. On the other hand, the effect of stimulation with lower concentration of LPS (0.2  $\mu$ g/ml) was suppressed by P4 treatment in all molecules. Furthermore, the suppression was pronounced by the pretreatment of P4 1 hour before LPS stimulation.

Progesterone inhibit the expression of molecules related with preterm labor in a transcript level, and the timing of treatment is considered important in a clinical use to prevent preterm birth.

研究分野：周産期医学 生殖内分泌

キーワード：プロゲステロン 早産予防 子宮頸管

## 1. 研究開始当初の背景

近年早産ハイリスク症例に対するプロゲステロン補充が、早産リスクを低減する事が臨床疫学的に示され、欧米を中心に広く導入されるようになってきた。特に頸管長短縮症例に対しては天然型プロゲステロンの経腔投与の有効性が、複数の臨床疫学的検討より示されている。一方で現在米国のFDAが早産予防に対する使用を承認しているのはヒドロキシプロゲステロンカプロン酸エステル筋注投与のみであり、頸管長短縮症例以外の早産ハイリスクに対しても、筋注投与に比べ優位性が示唆されているプロゲステロン腔座薬の使用は制約される。プロゲステロンの経腔投与が承認されるためには、局所濃度が増加する子宮頸管への作用分子機構についての分子基盤の確立が重要である。

## 2. 研究の目的

未だ分子レベルでのエビデンスが十分でない早産予防・切迫早産治療におけるプロゲステロン療法の作用分子機構の一端を、頸管リモデリング制御作用を中心に明らかにする。

## 3. 研究の方法

頸管リモデリングの中心を担うヒト子宮頸部線維芽細胞の培養系を用いて、LPSにより誘導される分子動態に対するプロゲステロンの効果を検証した。

## 4. 研究成果

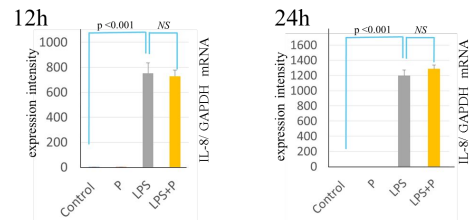
予定帝王切開時に子宮頸部組織を採取し、継代培養による純化を行い、エストロゲン (10nM beta-estradiol) 存在下で前培養・継代後アッセイに使用した。

### 既知早産病態関連分子のLPS誘導性変化へのプロゲステロンの影響

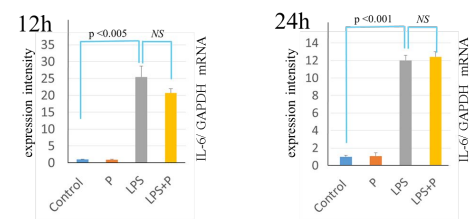
Control, LPS (2.0 µg/ml) and / or P4 (1.0 µM) 添加/非添加の条件で 12h, 24h 培養を行った (n=3)。mRNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により、IL-6, IL-8, IL-1beta,

PTGS2 の発現を定量解析した。いずれの分子も LPS 添加による有意な発現増加を認めたが、この変化は IL6, IL8 においては P4 添加による抑制を認めなかった。一方、IL-1beta, PTGS2 に於いては P4 添加による有意な発現抑制を認めた。

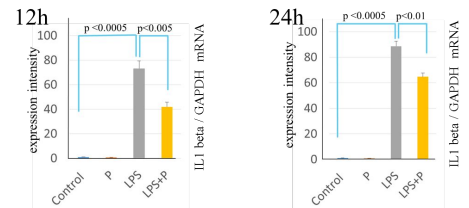
### IL-8



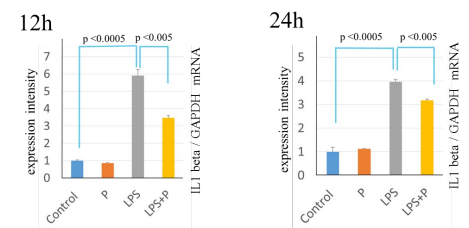
### IL-6



### IL-1beta



### PTSG2



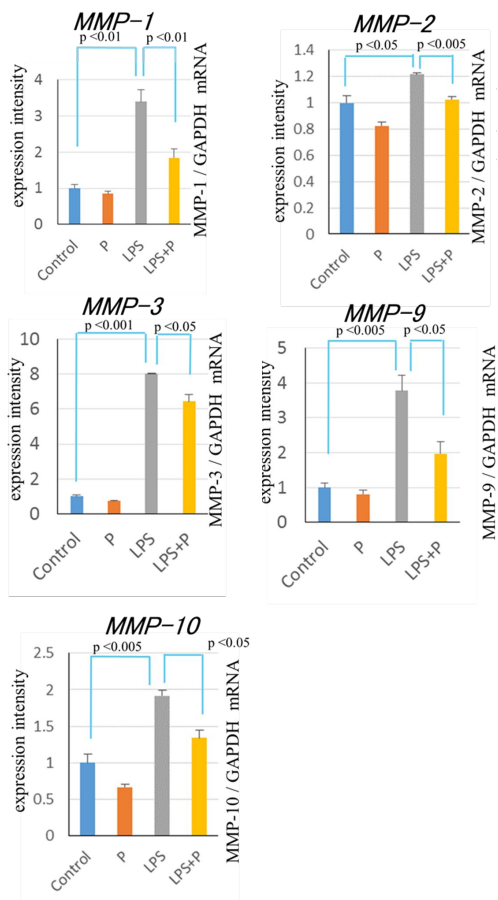
### 細胞外マトリクス関連分子のLPS誘導性変化へのプロゲステロンの影響

頸管リモデリングの主体は、コーラー言を中心とした細胞外マトリクス (ECM) の組成変化である事から、プロゲステロンによって発現調節を受ける ECM 関連分子のスクリーニングを行った。

Control, LPS (2.0 µg/ml), LPS (2.0 µg/ml)+P4 (1.0 µM) の条件で 12h 培養を行っ

た。mRNA を抽出し ECM 関連分子をターゲットとした PCR アレイ (RT<sup>2</sup> Profiler Extracellular Matrix and Adhesion Molecules PCR Array, SABiosciences) を用いた比較解析により、LPS により発現が増加し、プロゲステロン添加で発現が抑制される分子群として MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-10 が同定された。

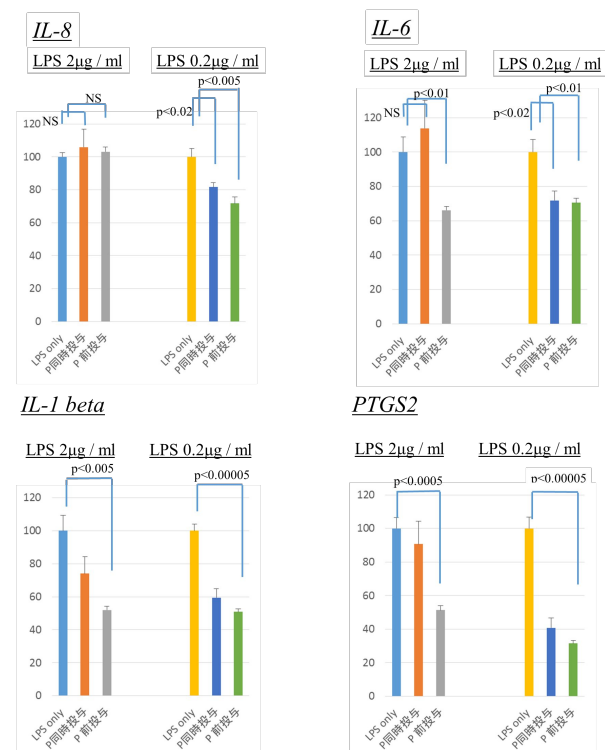
次に Control, LPS (2.0 μg/ml) and / or P4 (1.0 μM) 添加/非添加の条件で 12h 培養を行い、(n=3)。mRNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により、これら分子群の発現を定量解析した。その結果、いずれの分子も LPS 添加による有意な発現増加を認め、P4 添加により有意に抑制された。MMP 群 は、子宮頸管の大部分を構成する I, III 型コラーゲンをはじめとした細胞外マトリクス蛋白を基質として、これを分解する。したがって、プロゲステロンはこれら MMP 群の発現を転写レベルで抑制する事で、頸管熟化に抑制的に作用すると考えられる。



### 低濃度 LPS 刺激, プロゲステロン前投与による早産関連分子の発現動態の変化

LPS (2.0 μg/ml) による IL-6, IL-8 の発現誘導は、プロゲステロン投与によって抑制しなかった。共に、早産病態の中心を担う炎症性サイトカインとしてであり、特に IL-8 は頸管局所への好中球をリクルートするケモカインとして重要である。したがって、局所に白血球浸潤を伴う様な進行した早産病態にはプロゲステロンは奏功しない可能性が示唆される。これは、4 つのランダム化試験のメタアナリシスより、子宮収縮や頸管熟化を伴う症候性切迫早産に対する治療的プロゲステロンの経膈投与は奏功しなかったと結論付けている臨床疫学的報告と合致している (Su LL et al. Cochrane Database Syst Rev. 2014)。

この点を、分子レベルで検証する目的で、条件を変えた実験を行った。早期の病態を模し、LPS 刺激を 1/10 濃度で行った場合の変化について、またプロゲステロンが病態形成前に予防的に投与されている状況を模して、LPS 刺激の 1 時間前にプロゲステロン投与を行った場合の変化について解析した。



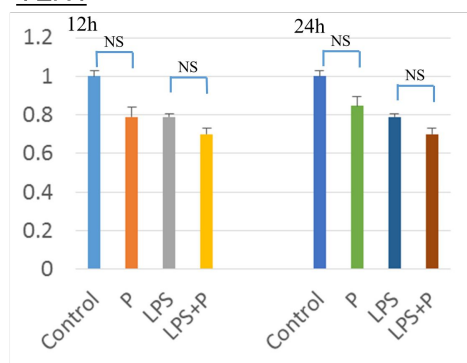
図は LPS 刺激で誘導された発現量を 100 とし、何パーセントまで抑制されるかの割合を示している。低濃度 LPS (0.2 μg/ml) 刺激による発現誘導は、IL-6、IL-8 に於いても P4 添加による有意な発現抑制を認め、さらにこの変化は LPS 刺激の一時間前にプロゲステロンを前投与した場合、より顕著である事が明らかとなった。この結果は早産ハイリスク症例に対するプロゲステロン投与は、早産病態の早期での投与、あるいは予防的投与が重要である事を示唆している。

### プロゲステロンの作用標的について

LPS は主に子宮頸部線維芽細胞の TLR4 に作用して、細胞内シグナルを介して既知早産関連分子や MMP 群を発現誘導し、ECM の分解や頸管熟化に寄与すると考えられ、プロゲステロンはその発現を抑制する事により、早産リスク低減に寄与すると考えられる。

この系において TLR4 の発現をリアルタイム PCR で定量すると、LPS 投与は TLR4 の発現を誘導せず、プロゲステロン投与によって TLR4 の発現には有意な変化を認めなかった。

### TLR4



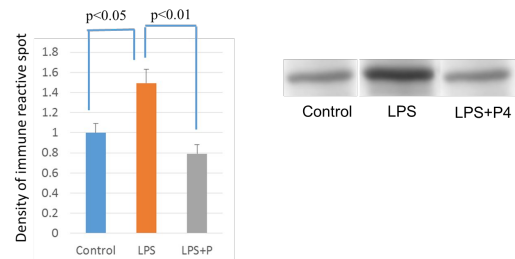
プロゲステロンの作用機序は、TLR4 の発現抑制ではなく、レセプター下流の細胞内シグナルの阻害作用であると考えられる。

現在、プロゲステロン投与による各種シグナリングのリン酸化レベルの変化について解析を進めており、Preliminary な結果を一部提示する。

Control, LPS (0.2 μg/ml), LPS (0.2 μg/ml)+P4 (1.0 μM, 一時間前投与) の条件で

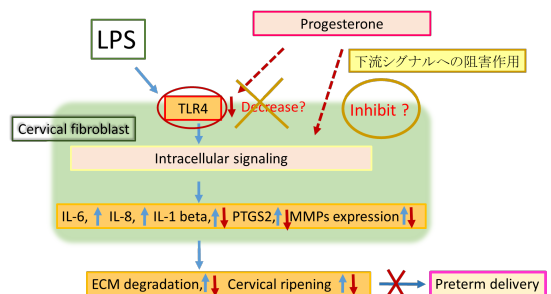
一時間培養を行い、TLR4 下流シグナルの MAPK signaling の細胞内伝達分子一つである p38MAPK のリン酸化フォームをウェスタンブロットティングで検出し Densitometric analysis で定量を行った。

Detection of Phosphorylated p38 MAPK



プロゲステロンの前投与により、p38 MAPK のリン酸化レベルは有意に抑制されることが明らかとなった。MAPK signaling は TLR 誘導性炎症性サイトカイン産生の中心であり、こうした細胞内シグナリングの阻害作用により、プロゲステロンが子宮頸管における早産関連分子群の転写制御を行っていると考えられる。

### LPS誘導性分子群のプロゲステロンによる抑制機構



### まとめ

プロゲステロンは、子宮頸部線維芽細胞より産生される Interleukins, プロスタグランジン, MMP 群を転写レベルで抑制する事により、頸管リモデリングを制御し、早産予防に寄与していると考えられる。この抑制効果は、低濃度 LPS 刺激および刺激前投与で有意に高く、早産病態が顕性化する前からの予防的投与の重要性が示唆された。

### 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1件)

Y. Kuwabara, A. Katayama, S. Kurihara, M. Yonezawa, N. Ouchi, R. Sawa, T. Takeshita, Progesterone transcriptionally inhibits LPS-induced matrix metalloproteinase up-regulation in human cervical fibroblasts. Journal of Reproductive Immunology, 査読有  
106巻, 2014, 16-17,  
DOI: 10.1016/j.jri.2014.09.040

〔学会発表〕(計3件)

The effect of progesterone on the gene expression profile of LPS-stimulated cultured human uterine fibroblasts (Society for Reproductive Investigation, 2015年3月)

培養ヒト頸部細胞におけるLPS誘導性分子動態に対するプロゲステロンの効果。(日本産科婦人科学会 学術集会, 2015年4月)

プロゲステロンはヒト子宮頸部線維芽細胞培養系において、LPS誘導性MMP群の発現を転写レベルで抑制する。(日本生殖免疫学会総会・学術集会, 2014年12月)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

桑原 慶充 (KUWABARA, Yoshimitsu)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 40373013

### (2) 研究分担者

片山 映 (AKIRA, Katayama)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 10333113

中井章人 (AKIHITO, Nakai)  
日本医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 20227721

川端伊久乃 (IKUNO, Kawabata)  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 20328793

竹下 俊行 (TOSHIYUKI, Takeshita)  
日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 20227721

(3) 連携研究者  
無し