

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861488

研究課題名(和文)胎児ファイブロネクチンの早産発症における病態解析および早産の新規治療法開発

研究課題名(英文) Analysis of fetal fibronectin, a pathogenic factor of preterm rupture of membrane and preterm birth

研究代表者

最上 晴太 (Mogami, Haruta)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40378766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は胎児ファイブロネクチン(fFN)が羊膜において、コラーゲン分解酵素であるマトリックスメタロプロテナーゼの発現を増加させて羊膜の脆弱化、つまり前期破水を生じたり、子宮頸管熟化や子宮収縮を促すプロスタグランジン産生を促進し、早産発症の重要な病態形成因子であることを示して来た。本研究ではさらに、fFN中のEDAというエクソンがfFNの活性部位であることを証明し、その羊膜における受容体は自然免疫で重要なToll like receptor 4であることが判明した。さらにEDAを妊娠マウスに投与すると早産を生じることを見出した。これらによりfFNによる早産発症のメカニズムの一端が解明された。

研究成果の概要(英文)：Fetal fibronectin (fFN) has been used as a marker of preterm birth. We have shown that fFN increased the synthesis of matrix metalloproteinases, which degraded collagens, in primary amnion mesenchymal cells, or the production of prostaglandin E2, which led to the ripening of cervix or uterine contraction. These results indicate that fFN is a pathogenic factor in preterm rupture of membrane (PROM) and preterm birth.

In this study, we showed that extra domain A (EDA) is the functional exon in fFN, which activated toll-like receptor-4 (TLR4) in amnion mesenchymal cells. Moreover, intrauterine injection of EDA in pregnant mice caused preterm birth in vivo. We clarified the one of mechanisms how fFN caused PROM and preterm birth.

研究分野：周産期医学

キーワード：早産 前期破水 胎児フィブロネクチン 細胞外マトリックス

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 本邦における早産率および問題点

わが国では早産は近年増加傾向である。早産は新生児死亡の大部分を占め、時に後遺症を残す。また早産などにより低出生体重児で出生すると、児の成長後の高血圧、糖尿病、脂質代謝異常、発達障害、統合失調症などの発症のリスクファクターとなることが指摘されている。このように早産は医学的、社会的にも大きな問題であり、病態解明ならびに予防・治療法開発のための研究推進が急務である。

### (2) 早産の発症因子

妊娠 37 週未満に破水が生ずる前期破水は早産症例の 30-40% を占め、早産発症の主要な原因である。前期破水は卵膜中の羊膜が脆弱になり発症するが、これにはコラーゲン分解酵素であるマトリックスメタロプロテナーゼ(MMP)が活性化され、羊膜のコラーゲン分解が促進されることが関与している。一方、羊膜におけるプロスタグランジン E2 (PGE<sub>2</sub>)の産生は生理的には子宮頸管の熟化や子宮収縮を生じ、分娩発来に重要な役割を果たすが、PGE<sub>2</sub> の病的な上昇は早産を生じることが知られている。

## 2. 研究の目的

フィブロネクチン(FN)は細胞外マトリックスタンパクであり、細胞と細胞外マトリックスとの接着因子である。胎児フィブロネクチン(fetal fibronectin, fFN)は胎児組織より産生されるフィブロネクチンであり、羊水から卵膜(羊膜、絨毛膜、脱落膜)にまで広く存在している。膣分泌物・子宮頸管粘液より検出される fFN は従来より早産の予知マーカーとして広く使用されている。しかし子宮内環境における fFN の機能はこれまで明らかではなかった。本研究では

- 1) fFN が羊膜・子宮体部平滑筋・子宮頸管へ作用する分子メカニズムの解明
- 2) fFN が妊娠マウスに早産を引き起こす病態の解明
- 3) fFN を阻害する薬剤(物質)の発見、並びに早産治療応用への基礎的な検討

を行うことにより、早産発症における fFN の役割を明確にし、最終的には fFN を阻害することによる早産予防・治療を目的とする。

## 3. 研究の方法

これまでの fFN のヒト羊膜細胞に対する基礎研究をもとに、本研究は以下の検討を行う。

- 1) 羊膜における fFN の作用機序の同定
- 2) fFN の子宮平滑筋収縮、および子宮頸管熟化への影響の解析
- 3) 妊娠マウスを用いた in vivo での fFN の

## 作用機序の解析

### 4) 治療への臨床応用に向けた fFN とその受容体の阻害実験

以上の実験をヒト初代培養細胞と実験動物モデル(妊娠マウス)を用いて行う。

## 4. 研究成果

### (1) 胎児フィブロネクチン(fFN)の子宮平滑筋に対する影響の検討

初代培養子宮平滑筋細胞に fFN を投与したが、収縮関連蛋白であるオキシトシン受容体、プロスタグランジン受容体、Gap junction 蛋白の Connexin 43 等の mRNA の発現はいずれも変化しなかった。本研究者はこれまでに羊膜初代培養細胞で fFN が PGE<sub>2</sub> 産生を増加させることを確認している。つまり fFN が妊娠マウスに早産を生じるメカニズムとして fFN が子宮平滑筋に直接作用するのではなく、fFN が卵膜における PGE<sub>2</sub> 発現を増加させ間接的に子宮平滑筋を収縮させることが示唆された。

### (2) 胎児フィブロネクチン(fFN)による MMPs, COX-2 産生増加における作用部位の同定

FN のエクソンの 1 つである EDA は MMPs 活性を上昇させることが知られている。この EDA ドメインに対して大腸菌を用いてリコンビナント EDA(rEDA)を作成した。この rEDA(0.1μM)を羊膜間葉細胞に投与すると MMP1, MMP9, COX2 mRNA を各々 280 倍、22 倍、4 倍増加させ、さらに MMP1 活性を 34 倍、PGE<sub>2</sub> 産生を 29 倍増加させた(P<0.01、図 1)。つまり fFN の作用部位は EDA であることが明らかになった。

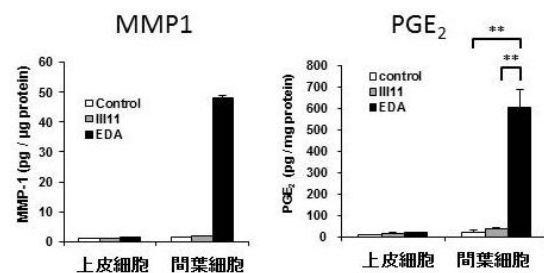


図1 羊膜細胞でのrEDAによるMMP1およびPGE<sub>2</sub>産生

### (3) EDA は in vivo で早産を発症させる

本研究者はこれまでに fFN の妊娠マウス卵膜への局所投与が早産を生じさせることを示している。今回同様の手法を用いて、rEDA (1μM)をマイクロシリンジを用いて妊娠 17.5 日目のマウス卵膜に麻酔、開腹下に局所投与した。すると、対照群では投与後 38 ± 18 時間後に分娩となったが(n=10)、rEDA 投与群では 24 ± 4 時間後での早産となった(n=8, P<0.05)。EDA は in vivo でも早産の病態発症因子であることが明らかになった。

### (3) fFN の受容体の同定

これまで、HEK293 細胞では自然免疫に関与する Toll-like receptor-4(TLR4)が EDA の受容体であることが報告されているが、羊膜細胞では明らかではない。このため、抗 TLR4 機能阻害抗体を用いたところ、羊膜間葉細胞において fFN による MMP1, COX2 mRNA の増加は Toll-like receptor-4 (TLR4)機能阻害抗体により抑制された(図 2)。つまり fFN の受容体の 1 つとして TLR4 が重要であることが明らかになった。これは自然免疫・炎症カスケードで重要な TLR4 シグナルを阻害することにより前期破水の予防・治療の可能性を示唆する重要な知見である。

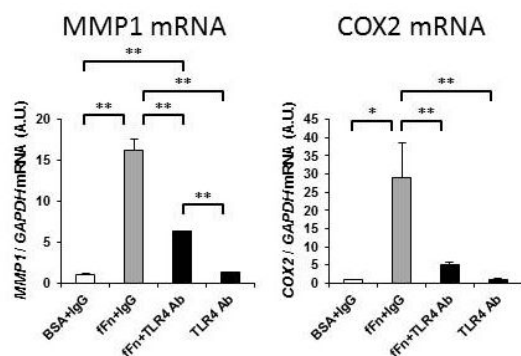


図2 羊膜間葉細胞においてTLR4機能阻害抗体は fFNによるMMP, COX2 mRNAの上昇を抑制する

#### (4) 治療応用に向けた fFN とその受容体の経路の阻害

生薬の甘草の成分であるイソリクイリチゲニン及びグリチルリチンが TLR4 シグナルを阻害することがこれまでに報告されている (Honda H 他 J Leukoc Biol. 91:967-76,2012)。甘草は妊娠中にも安全に使用できるため臨床応用の可能性がある。

今回基礎検討として、エンドトキシンである lipopolysaccharide (LPS)を羊膜間葉細胞に投与したところ、MMPs, COX2 mRNA は増加したが、グリチルリチンはこれらの上昇を部分的に抑制することができた(未発表)。これはグリチルリチンが前期破水や早産発症の予防、治療に応用できる可能性を示唆する重要な発見であり、今後の臨床応用にむけてさらなる検討を重ねていく。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

最上晴太、小西郁生、Ruth Ann Word、血液凝固線溶からみた早産機序 - 新たな早産予防戦略、産科と婦人科、査読無、81 巻、2014、20-25

最上晴太、胎児フィブロネクチン - 前期破水・早産発症における新規病態形成因子、産科と婦人科、査読無、81 巻、2014、1253-1256、

最上晴太、小西郁生、絨毛膜下血腫 - 常

位胎盤早期剥離・発症予知と対策、産婦人科の実際、査読無、63 巻、2014、1911-1914

Mogami H, Keller PW, Shi H, Word RA, Effect of thrombin on human amnion mesenchymal cells, mouse fetal membranes, and preterm birth. J Biol Chem, 査読有、289 巻、2014、13295-13307 DOI: 10.1074/jbc.M114.550541

Mogami H, Kishore AH, Shi H, Keller PW, Akgul Y, Word RA, Fetal fibronectin signaling induces matrix metalloproteases and COX-2 in amnion cells and preterm birth in mice, J Biol Chem. 査読有、288, 2013, 1953-66. DOI: 10.1074/jbc.M112.424366

[学会発表](計 22 件)

伊藤拓馬、最上晴太、杉並興、佐藤麻衣、馬場長、近藤英治、小西郁生、妊娠 16 週のカンジダ菌血症・臨床的絨毛膜羊膜炎に対し抗真菌剤が奏功した 1 例、第 131 回近畿産科婦人科学会学術集会、2014 年 10 月 26 日、大阪府大阪市

伊藤拓馬、最上晴太、杉並興、佐藤麻衣、馬場長、近藤英治、小西郁生、妊娠 16 週発症のカンジダ絨毛膜羊膜炎・菌血症の 1 例、京都産科婦人科学会、2014 年 10 月 18 日、京都府京都市

神崎優、最上晴太、杉並興、佐藤麻衣、馬場長、近藤英治、小西郁生、当院にて帝王切開術後に集中治療室にて管理された母体最重症症例の検討、第 37 回日本産婦人科手術学会、2014 年 10 月 11 日、北海道札幌市

鈴木悠、最上晴太、杉並興、佐藤麻衣、馬場長、近藤英治、小西郁生、当科で経験した卵管間質部妊娠の 3 症例、第 22 回日本胎盤学会学術集会、2014 年 10 月 4 日、京都府京都市

最上晴太、中北麦、馬場長、近藤英治、山田博之、塚本達雄、柳田素子、小西郁生、妊娠 15 週より発症した加重型妊娠高血圧腎症に対して sFlt1 を標的とした血漿吸着療法を行い生児を得た 1 例、第 35 回日本アフェレーシス学会学術大会、2014 年 9 月 26 日~28 日、東京都新宿区

伊藤拓馬、中北麦、最上晴太、杉並興、佐藤麻衣、馬場長、近藤英治、小西郁生、妊娠 15 週より発症した加重型妊娠高血圧腎症に対して sFlt1 を標的とした血漿吸着療法を行い生児を得た 1 例、京都周産期カンファレンス、2014 年 9 月 6 日、京都府京都市

今井更衣子、中北麦、最上晴太、馬場長、

近藤英治、浮田真吾、小西郁生、重症妊娠高血圧腎症を発症した睡眠時無呼吸症候群合併妊娠の1例、第50回日本周産期新生児医学会学術集会、2014年7月13日～15日、千葉県浦安市

中北麦、最上晴太、近藤英治、小西郁生、妊娠15週より高血圧、蛋白尿を呈した加重型妊娠高血圧腎症に対しsFlt1を標的とした血漿吸着療法を行った1例、第50回日本周産期新生児医学会学術集会、2014年7月13日～15日、千葉県浦安市

浮田真吾、最上晴太、近藤英治、馬場長、松村謙臣、小西郁生、当院において妊娠中および分娩後に凝固第13因子欠乏症の診断に至った症例の検討、第50回日本周産期新生児医学会学術集会、2014年7月13日～15日、千葉県浦安市

藤井温子、最上晴太、近藤英治、馬場長、浮田真吾、水野林、小西郁生、滲出性網膜剥離を発症した重症妊娠高血圧腎症・常位胎盤早期剥離の2症例、第130回近畿産科婦人科学会学術集会、2014年6月28日～29日、大阪府大阪市

安田枝里子、最上晴太、近藤英治、馬場長、浮田真吾、水野林、小西郁生、当院でのBreus' mole(巨大絨毛膜下血腫)7症例の病理学的検討、第130回近畿産科婦人科学会学術集会、2014年6月28日～29日、大阪府大阪市

最上晴太、胎生期の低栄養状態が胎児発育に及ぼす影響とその治療の可能性、日本赤ちゃん学会 第14回学術集会、2014年6月22日、神奈川県川崎市

高橋希実、最上晴太、小林弘尚、水野林、浮田真吾、馬場長、近藤英治、小西郁生、子宮内感染・流産に至った周産期リステリア症の1例、第31回日本産婦人科感染症研究会、2014年6月7日～8日、兵庫県神戸市

植田彰彦、最上晴太、水野林、浮田真吾、馬場長、近藤英治、小西郁生、Senior-Loken症候群合併妊娠で生児を得た1例、第24回腎と妊娠研究会、2014年3月1日、埼玉県川越市

最上晴太、胎生期の低栄養状態が胎児発育に及ぼす影響とその治療の可能性、第1回新胎児学研究会 シンポジウム「胎児中枢神経系の機能評価」、2013年11月23日、香川県高松市

小椋淳平、最上晴太、近藤英治、馬場長、浮田真吾、水野林、小西郁生、当科における常位胎盤早期剥離の管理、京都産婦人科救急

診療研究会、2013年10月27日、京都府京都市

最上晴太、近藤英治、藤田浩平、千草義継、西村史朋、宇治田麻里、川崎薫、清川晶、小西郁生、R. Ann Word、胎児ファイブプロネクチンは前期破水・早産の病態形成に關与する、第21回日本胎盤学会、2013年10月25日～26日、愛知県名古屋市

榮智恵子、植田彰彦、最上晴太、近藤英治、馬場長、浮田真吾、今井更衣子、小西郁生、妊娠25週に発症したイレウスに対し、保存的治療により正期産で成熟児を得た1症例、第14回 京都女性のヘルスケア研究会、2013年10月6日、京都府京都市

藤井温子、最上晴太、近藤英治、馬場長、浮田真吾、今井更衣子、小西郁生、滲出性網膜剥離を発症した重症妊娠高血圧症候群・常位胎盤早期剥離の2症例、京都産科婦人科学会、2013年10月5日、京都府京都市

中北麦、最上晴太、馬場長、近藤英治、浮田真吾、小西郁生、重症妊娠高血圧症候群を発症した睡眠時無呼吸症候群合併妊娠の1例とその管理、京都周産期カンファレンス、2013年9月14日、京都府京都市

21 最上晴太、近藤英治、馬場長、浮田真吾、今井更衣子、小西郁生、当科における超早期の重症胎児発育不全の管理 - 重症胎児発育不全を伴った巨大絨毛膜下血腫 (Breus' mole)の1例から、第6回温知会 サマークリニカルフォーラムシンポジウム、2013年7月15日、京都府京都市

22 最上晴太、近藤英治、藤田浩平、川崎薫、松村謙臣、佐藤幸保、藤原浩、小西郁生、救急・他科連携診療体制により妊産婦を救う - 京都大学医学部附属病院産科分娩部の試み、第49回日本周産期新生児医学会、2013年7月14日～16日、神奈川県横浜市

〔図書〕(計1件)

京都産婦人科救急診療研究会 編著、メディカ出版、産婦人科必修 母体急変時の初期対応 - 羊水塞栓症、2013年

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

最上 晴太 (MOGAMI, Haruta)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40378766