

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870150

研究課題名(和文)分娩とその異常におけるプロゲステロン受容体の機能解析

研究課題名(英文)Progesterone receptor signaling contributing to parturition and preterm labor

## 研究代表者

藤田 知子(TOMOKO, SAITO-FUJITA)

東京大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：60375441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：分娩発来には子宮におけるプロゲステロン(P)-P受容体(PR)作用減弱が重要である。P-PRシグナルと早産との関連を明らかにするため本研究を行った。子宮特異的p53欠損マウスは約半数の個体が自然早産となることがわかっていたが、研究の結果、コントロールマウスでは影響のない少量のLPS投与により、p53欠損マウスでは卵巣のP産生が低下し100%早産をきたした。このLPS投与早産モデルに対し、PとmTOR阻害剤ラパマイシンとの同時投与によって、母体および胎仔に明らかな副作用なく早産とそれに伴う新生仔死亡を予防できた。PとmTORの経路を抑制する薬剤による新しい早産予防法の可能性を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：More than 15 million babies are born preterm each year. A better understanding of prematurity is necessary to prevent it effectively. This study revealed that a mild inflammation induced by LPS absolutely causes preterm birth and neonatal deaths in the uterine p53-deleted mouse model, which naturally exhibits approximately 50% incidence of spontaneous preterm delivery due to cellular senescence and prostaglandin induction in the uterus, and these impairments of parturition are markedly rescued by the combination treatment with an mTOR inhibitor rapamycin and progesterone. Our findings suggest that the combined treatment with low doses of rapamycin and progesterone help to reduce the incidence of preterm birth in its high-risk women.

研究分野：産婦人科学、周産期医学、生殖医学、生殖生物学

キーワード：黄体ホルモン プロゲステロン受容体 分娩 早産 mTOR マウスモデル

## 1. 研究開始当初の背景

世界では毎年 1500 万件の早産が起こっている。早産の原因として、感染・炎症、子宮の過伸展、子宮頸管の異常などが考えられているが、詳細は未だ明らかでなく、現在の治療法は子宮収縮抑制剤や抗生剤などの対症的なアプローチに限定されている。早産に対する新たな視点からの基礎研究の展開が緊急の課題である。早産の高リスク群のうち子宮頸管短縮例や反復早産例では卵巣の黄体ホルモンであるプロゲステロン投与による早産予防の有効性が示されている一方、2~4割の症例には無効であった。また同じく早産の高リスク群である双胎についてはプロゲステロン投与でも早産を防ぐことができない。リスク因子による有効性の違いや無効例の存在から、早産におけるプロゲステロン応答遺伝子誘導能の低下した状態、いわゆる「プロゲステロン抵抗性」という概念を提起されている。プロゲステロンが無効の症例ではプロゲステロン作用に対するより一層強い抵抗性が存在する可能性が推測される。プロゲステロンは核内受容体であるプロゲステロン受容体 (PR) を介して遺伝子の転写を活性化する。分娩時には機能的なプロゲステロン作用の低下、つまりプロゲステロン応答性遺伝子活性化の抑制が起こると考えられているが、その詳細や早産との関連は不明のままである。

プロスタグランジン (PG) 合成酵素 cyclooxygenase-2 (COX2) により生成した PGF2 $\alpha$  によって、子宮収縮が誘起されて自然早産が起こる新しいマウスモデルを開発されている。「ゲノムの門番」といわれる癌抑制遺伝子 p53 をコードする癌抑制遺伝子 Trp53 を loxP サイトで挟んだマウス (Trp53loxP/loxP) とプロゲステロンレセプターのプロモーター特異的に Cre リコンビナーゼを産生するマウス (PgrCre/+) を交配させて作製した Trp53loxP/loxPPgrCre/+ マウスは p53 を子宮で欠損しており、約半数の個体では新生仔死を伴う早産を自然発症する。細胞老化マーカー senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) 染色により、p53 欠損の子宮内膜間質細胞において細胞老化が促進されていた。また、この早産モデルのマウスの子宮には細胞老化が認められており、疫学的にヒトの分娩年齢の上昇は早産のリスク増加をもたらすという報告やマウスでは p53 活性が加齢によって低下するという報告と合わせると、母体の加齢が p53 低下を介して子宮の細胞老化をもたらす、早産を誘発している可能性が考えられた。

また、これまでの研究により、p53 欠損子宮内膜において mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) 活性化の下流のシグナル因子である S6 リン酸化 (pS6) の亢進が認められ、mammalian target of rapamycin (mTOR) の活性化が起こっていることが明らかとなっている。

また、mTORC1 阻害剤ラパマイシン投与により、p53 欠損マウスの自然早産が完全に抑制されること、ラパマイシン処理後の妊娠後期子宮においては細胞老化が抑制され、p21 発現および COX2 発現が抑制されていることがわかっている。さらには、子宮の p53 欠損に加えて細胞老化の調節因子である p21 欠損を伴うマウスでは、早産の表現型が p21 欠損によって改善され、p53/p21 の 2 重欠損マウスでは早産が完全に抑制されることがわかっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、プロゲステロンおよび mTOR 経路の早産への関与の可能性を考えて検討を行った。p53 欠損マウスによる自然早産マウスモデルを応用して LPS 誘導性の早産モデルを作成し、分娩発来の機序に関するプロゲステロンの関与と共に、新しい早産の予防法の確立を目指すために、プロゲステロンと合わせた複合的な予防的投薬が早産の発症を抑える可能性について検討した。

## 3. 研究の方法

ヒト早産では子宮内の細菌感染・炎症を合併することが多いことから、早産子宮における細菌感染に対する感受性の低下が示唆される。子宮における細胞老化の存在が、細菌感染による早産のリスクを高めているという仮説のもと、細菌感染のモデルとして LPS 投与実験を行うことにした。本研究では、まず、子宮の p53 欠損マウスを用いて、コントロールマウスにおいては影響を受けない少量の LPS 投与によって 100% 早産に至る早産モデルの確立を試みた。次に、プロゲステロンおよび mTOR 阻害剤であるラパマイシンを用いて、早産マウスモデルの早産抑制を試みた。

## 4. 研究成果

研究の結果、コントロールマウスでは妊娠の障害にならない量 10 $\mu$ g の LPS を腹腔内投与によって、子宮の p53 欠損マウスでは 100% 早産をきたすことが明らかとなった (図 1)。LPS による早産発症促進のメカニズムとして、脱落膜形成不全を介した子宮内膜由来の卵巣保護因子分泌の低下によって卵巣の LPS 感受性が高まり、卵巣のプロゲステロン代謝酵素 20 $\alpha$ -HSD が上昇して血中のプロゲステロン濃度が低下し、最終的に子宮収縮に関わる子宮収縮関連蛋白群の発現が高まり、早産が促進されている可能性が考えられた (図 2)。この研究結果は、感染などによる軽度の炎症が環境因子として存在した場合に、遺伝的異常をもつ個体は早産をきたしてしまう可能性を示している。本研究により、遺伝的因子と環境因子が協調して早産が高率に発症する可能性を示すことができた。疫学的にはヒトの早産は反復しやすい

予防的投与:  
 ラバマイシン (0.25 mg/kgBW/day, day8, 12, 16)  
 プロゲステロン (2 mg/body, day16)

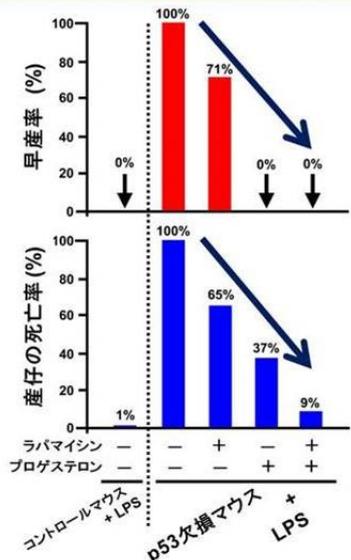


図1. p53欠損マウスへのLPS投与による早産モデルとプロゲステロンとラバマイシン投与による予防効果

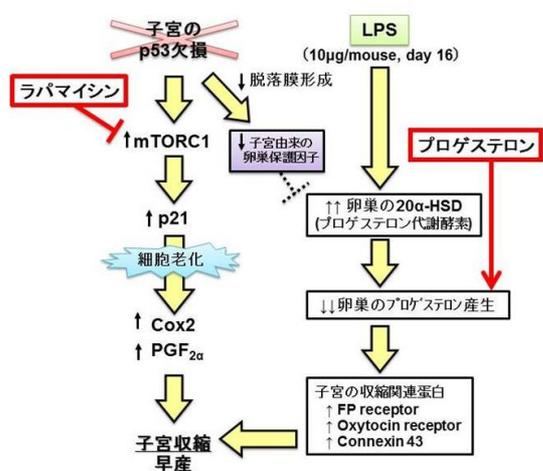


図2. p53欠損マウスへのLPS投与による早産モデルにおける早産の機序

こと知られているが、「遺伝 - 環境の相互作用の早産への寄与」という概念によって、この反復早産の原因の1つを説明できるのかもしれない。さらには、ヒトの早産検体においても子宮内膜の細胞老化、mTORC1 活性の増加が認められ、ヒト子宮内膜細胞の初代培養系では、LPS による炎症性サイトカイン IL-6 および IL-8 の分泌増加や COX2 をプロゲステロンおよびラバマイシンが抑制することが示された。早産既往や子宮頸管短縮などの早産のハイリスク女性に対する今後の早産の予防・治療法の確立に向けて、本研究の成果は有益な基礎的知見であると考えられる。

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4件)

1. Haraguchi H, Saito-Fujita T, Hirota Y, Egashira M, Matsumoto L, Matsuo M, Hiraoka T, Koga K, Yamauchi N, Fukayama M, Bartos A, Cha J, Dey SK, Fujii T, Osuga Y. Mol Endocrinol. 査読有, Vol.28, 2014, pp.1108-1117, DOI: 10.1210/me.2014-1097.
2. Cha J, Bartos A, Egashira M, Haraguchi H, Saito-Fujita T, Leishman E, Bradshaw H, Dey SK, Hirota Y. Combinatory approaches prevent preterm birth profoundly exacerbated by gene-environment interactions. J Clin Invest. 査読有, Vol.123, 2013, pp.4063-4075, DOI: 10.1172/JCI70098.
3. 藤田知子, 廣田泰. 着床における黄体ホルモン(プロゲステロン)の作用. 医学のあゆみ. 査読無, Vol.248, 2014, pp. 914-915, DOI: なし
4. 廣田泰, 藤田知子, 大須賀穰, 藤井知行. 着床期子宮におけるプロゲステロンの作用機構. 日本生殖免疫学会誌. 査読無, Vol.29, 2014, pp. 6-11, DOI: なし

〔学会発表〕(計3件)

1. 江頭真宏, 廣田泰, 藤田知子, 原口広史, 松本玲央奈, 松尾光徳, 平岡毅大, 大須賀穰, 藤井知行. 分娩後子宮に存在する老化細胞の除去機構と次回妊娠への影響. 第29回日本生殖免疫学会. 2014年12月13日, 東京大学伊藤謝恩ホール(東京).
2. 江頭真宏, 廣田泰, 藤田知子, 原口広史, 松本玲央奈, 松尾光徳, 平岡毅大, 大須賀穰, 藤井知行. 分娩後子宮に存在する老化細胞のクリアランス機構と子宮機能への影響. 第35回日本炎症・再生医学会. 2014年7月2日, 万国津梁館(名護).
3. 江頭真宏, 廣田泰, 藤田知子, 原口広史, 松本玲央奈, 松尾光徳, 大須賀穰, 藤井知行. マウス妊娠子宮に出現する老化細胞のクリアランス機構. 第87回日本内分泌学会学術総会. 2014年4月26日, 福岡国際会議場(福岡)

〔その他〕

1. ホームページ: <http://square.umin.ac.jp/kyobgyn/>
2. Haraguchi H, et al. Mol Endocrinol 論文が、Nature Reviews Endocrinology の Research Highlight で紹介された(Nature Reviews Endocrinology 10, 445, 2014)。
3. 第29回日本生殖免疫学会での江頭真宏らの演題が学会賞および最高得点演題賞を受賞した。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤田 知子 (旧姓：齊藤)

( SAITO-FUJITA, Tomoko )

東京大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号： 60375441