

博士(薬学) 加賀伸彦

学位論文題名

Urinary trypsin inhibitor(UTI) の切迫早産抑制作用に関する研究

学位論文内容の要旨

低出生体重児の最大の原因である早産は、周産期領域で最も重要な疾患の一つである。切迫早産の発症要因の一つとして絨毛羊膜炎の関与が示唆され、その主原因は腔頸管の感染による炎症の上行性波及と考えられている。しかし、現時点での切迫早産治療は子宮収縮抑制剤による対症療法のみに依存しているのが実状である。

Urinary trypsin inhibitor (UTI) は、分子量67,000 の糖蛋白で、羊水中に多量に存在し、その大部分は胎児尿由来とされている。羊水中の UTI は分娩時期が近づくにつれ減少することおよび早産患者では減少していることより、妊娠維持に深く関与している可能性がある物質として注目されている。そこで筆者はUTIを切迫早産治療薬として、開発すべく検討を行った。

1. 切迫早産モデル動物の開発

切迫早産治療薬の開発にあたっては、早産の病態を解明し、薬物の治療効果を明らかにするために、切迫早産モデル動物が必要不可欠である。そこで、著者は、まず、切迫早産モデル動物の作製を試みた。子宮内細菌感染による早産を想定して妊娠マウスへの 1 ipopolysaccharide (LPS) 投与を行った。マウスの選択、投与方法等について検討し、C3H/HeN雌マウスをB6D2F<sub>1</sub>雄マウスで妊娠させ、妊娠15または17日にLPS 50 μg /kgを3時間おきに2回腹腔内投与することにより、早産を100% 発現する切迫早産モデル動物の作製に成功した。

2. LPS誘発切迫早産モデルマウスに対するUTIの有効性

LPS誘発切迫早産モデルマウスを用い、早産抑制作用を有する薬物の探索を行った結果、UTI に早産抑制効果が確認された。Indomethacin投与群では早産率は抑制されたものの、正常分娩率は増加しなかった。Gabexateおよびeglin-C投与群ではいずれも早産率を改善することはできなかった。

3. 切迫早産の発症要因に対するUTIの作用

LPS誘発切迫早産モデルマウスを用いて、切迫早産の発症要因として考えられている次の四観点から早産の病態を解明し、それらに対するUTIの作用を検討した。

(1)子宮頸部熟化の亢進に及ぼすUTIの影響

硬さ触覚センサーを用い、妊娠マウスの子宮頸部熟化度（硬さ、 stiffness）を非侵襲的かつ定量的に測定する方法を確立した。本法を用い、子宮頸部の stiffness を測定した結果、LPS 誘発切迫早産モデル動物では stiffness 値は LPS 投与後 6 時間までに正常分娩時と同等な値まで減少し、投与後 18 時間までさらに減少した。一方、UTI 投与群では stiffness 値は投与前値に近いレベルを保っていた。

病理組織学的検査の結果、対照群ではLPS 投与により、頸管の浮腫、上皮下の出血および炎症細胞浸潤が顕著に認められたが、これに対し、UTI 投与群では子宮頸部における浮腫が軽減され、LPS投与による変化は抑制された。

## (2)子宮運動亢進に及ぼす UTI の影響

妊娠ウサギの生体位子宮運動を測定した結果、LPSの子宮内投与による子宮運動の亢進をUTIは抑制した。また、妊娠マウスから摘出した子宮平滑筋の自動運動を測定した結果、LPS添加による摘出子宮筋の自動運動の亢進をUTIは抑制した。さらに、子宮筋からのプロスタグランジン(PG)およびinterleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ )の産生量を測定した結果、UTIはLPS添加によるPGおよびIL-1 $\alpha$ 産生の亢進を抑制した。

## (3)羊膜の脆弱化に及ぼす UTI の影響

切迫早産モデル動物の羊膜を摘出し、共焦点レーザー顕微鏡により、上皮細胞の敷石状配列が崩壊し、線維芽細胞のフィプロネクチン発現の減少が観察されたが、UTIはこれらの変化を抑制した。羊膜の電顕観察により、無処置群では上皮細胞の細胞間間隙が密に入り組んでいる像が観察されたが、LPS投与群では細胞間間隙の拡張が観察され、UTI投与群では無処置群と同程度に抑制されていた。

また、羊膜細胞から再構築した人工羊膜を用いて透過性実験を行った結果、切迫早産モデル動物から得られた羊水の添加による羊膜細胞の透過性の亢進をUTIは抑制した。

## (4)胎盤剥離に及ぼす UTI の影響

切迫早産モデル動物の胎盤を光顕および電顕観察した結果、迷路部および栄養膜細胞領域で傷害像が認められ、栄養膜細胞でアポトーシス像が観察され、また、TUNEL染色陽性細胞が栄養膜細胞層に多数認められた。しかし、UTI投与によりこれらの変化は抑制され、UTIが胎盤の傷害を抑制することが明らかとなった。

妊娠15日の胎盤の薄切標本を培養した結果、無処置群では核の濃縮および核崩壊は全く認められなかった。IL-1 $\alpha$ 添加群ではアポトーシス像は観察されなかった。TNF- $\alpha$ 添加mediumで培養した胎盤ではアポトーシス像を呈する栄養膜細胞が観察されたが、TNF- $\alpha$ およびUTI添加mediumで培養した胎盤ではアポトーシス像は観察されなかった。この結果より、栄養膜細胞におけるアポトーシスはIL-1 $\alpha$ では誘発されず、TNF- $\alpha$ により直接的に誘発され、UTIはこれを抑制することが確認された。

## 4. 血漿および羊水中サイトカインに及ぼす UTI の影響

UTIの作用機序を検討するため、切迫早産モデル動物における血漿および羊水中の炎症性サイトカイン濃度を測定した結果、LPS投与後、IL-1 $\alpha$ 、IL-6およびTNF- $\alpha$ いずれも経時に上昇したが、UTI投与により、これらの変化は抑制された。

また、LPS刺激により、ヒト単球ハイブリドーマからの炎症性サイトカイン(IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8およびTNF- $\alpha$ )産生が亢進されたが、UTIの添加により、これらのサイトカイン全ての産生亢進が抑制された。特に、IL-8産生に対するUTIの抑制作用は顕著であった。

## 5. RitodrineとUTIの併用効果

妊娠17日のLPS誘発切迫早産モデルマウスを用い、今回、初めて ritodrine の in vivo での早産に対する有効性を用量相関的に確認することができた。また、 ritodrine と UTI の併用投与により、 ritodrine または UTI 単独投与に比して、著明な早産抑制が認められた。

以上の結果より、LPS誘発切迫早産モデルマウスにおいて、UTIは早産を抑制し、これを裏付ける作用として、子宮収縮抑制作用、子宮頸部熟化抑制作用、羊膜の脆弱化抑制作用および胎盤剥離抑制作用を有することが明らかとなった。また、UTIおよび ritodrine の併用効果も明らかとなった。更に、UTIの早産抑制作用機序としてサイトカイン産生抑制作用および一部のサイトカイン抑制作用が関与しているものと考えられた。

本研究により、UTIは切迫早産治療薬として臨床応用されることが充分に期待される。

## 学位論文審査の要旨

主査 教授 長澤滋治

副査 教授 野村靖幸

副査 教授 徳光幸子

副査 助教授 高橋和彦

### 学位論文題名

### Urinary trypsin inhibitor(UTI)の切迫早産抑制作用に関する研究

近年の目覚ましい新生児医療の進歩によっても、低出体重児における未熟児網膜症等の新生児障害および新生児死亡は未解決の課題であり、低出体重児の最大の原因である早産は周産期領域で最も重要な疾患の一つである。切迫早産の発症要因の一つとして絨毛羊膜炎の関与が示唆されており、その主たる原因は膣管の感染による炎症の上行性波及と考えられている。しかし、現時点における切迫早産の唯一の治療薬であるRitodrineは、交感神経 $\beta$ 2受容体刺激を介して子宮収縮抑制効果を示すものであり、頻脈や肺水腫などの副作用が報告されている。このような状況に於いて、薬物療法の立場からは既存の薬剤とは異なる作用機序を有し、且つ安全性の高い治療薬の開発が望まれていた。

羊水中には、urinary trypsin inhibitor (UTI)と呼ばれる蛋白分解酵素阻害物質が存在する。UTIは分子量67,000の糖蛋白質で、羊水中のUTIの大部分は胎児尿由来とされている。羊水中のUTI濃度が分娩時期が近づくにつれて減少すること、特に切迫早産の患者では羊水中の濃度が極めて低値を示すことなどから、UTIが妊娠の維持に関与している可能性が示唆された。

本研究は、UTIを切迫早産の治療薬として開発するために計画され、下記のような成果を上げた。

1：切迫早産の治療薬の開発に当たっては、切迫早産モデル動物が不可欠である。近年、早産と子宮内感染との関連性に着目し、妊娠動物子宮内あるいは頸管内への細菌感染による早産の誘発が試みられている。しかし、これ

までのものは母動物の全身状態の悪化または死亡発生のため、早産モデル動物として適切とは言い難い。申請者は、子宮内細菌感染による早産を想定し、LPS誘発切迫早産モデル動物（マウス）の作出を試みた。マウスの系統、交配組み合わせ、LPS投与量などを種々検討し、世界で始めて全身状態の悪化を伴うことなく、早産を100%発現するモデル動物の作成に成功した。本モデル動物においてUTIが早産抑制作用を有することを明らかにした。

2：子宮頸部は分娩に際して最もダイナミックな変化を示す組織である。子宮頸部の厚さは、子宮頸部の熟化度と良く比例している。しかし、これまで子宮頸部の厚さを直接に測定する方法はなかった。硬さ測定用の触覚センサーを応用し、妊娠マウスの子宮頸部熟化度を非侵襲的且つ定量的に測定する方法を確立した。本法により、LPS投与により、妊娠マウスの子宮頸部は急速に軟化し、組織学的にも急速に筋層の浮腫が進行すること、早産に先だって、正常分娩時に匹敵するレベルにまで熟化すること、そしてUTIが子宮頸部熟化抑制作用を示すことなどを明らかにした。

3：UTIの妊娠ウサギ生体位子宮運動および妊娠マウス摘出子宮筋運動抑制作用、羊膜の脆弱化抑制作用、および胎盤栄養膜細胞の傷害抑制作用を見だし、これらの作用の総合的な結果として切迫早産抑制作用を有することを明らかにした。

4：LPSによる早産抑制作用機序を検討した。LPSは摘出子宮筋に作用してPGE, PGFの産生を亢進させた。UTIはLPS添加によるPG類の遊離を抑制した。これらの結果から、LPSは子宮平滑筋のIL-1産生を亢進し、このIL-1がさらにPG類産生を亢進することで子宮平滑筋の収縮を亢進させること、そしてUTIはIL-1の産生を抑制することで、PG類の産生を抑制し、子宮筋収縮を抑制する可能性が示唆された。さらに、UTIが腹腔内マクロファージ、子宮平滑筋細胞及び羊膜細胞からのサイトカイン産生抑制作用、ならびにTNF- $\alpha$ への直接阻害作用も関与していることを示した。

5：唯一の治療薬であるritodrineの使用上、臨床で問題になっている子宮収縮の再発および副作用を軽減するために、ritodrineとの作用機序が異なる薬物の併用は検討に値するものと考えられた。そこで、LPS誘発切迫早

産モデルを改良して、UTIとritodrineの併用効果を解析した。その結果、UTIとritodrine併用では、それぞれ単独使用の時よりもはるかに低用量で効果が現れ、ritodrineで報告されているような副作用も観察されなかった。これは、UTIがritodrineの副作用を軽減させる治療薬としても有用なことを示唆した。

以上、申請者の主要な研究成果を示した。本研究の遂行に当たっては申請者の独自性の高い方法論の開発が随所に見られ、基礎的研究としても高水準の業績と評価できる。上記の研究成果は、新たな医薬品開発に大きく貢献するものであり、博士（薬学）の学位を受けるに値する業績と評価した。