

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	成育科学領域周産期医学教育研究分野 氏名 田中誠悟
<p>(論文題目)</p> <p>Development of new therapeutic agents of preterm birth by glycosaminoglycan chain remodeling of urinary trypsin inhibitor (ウリナリートリプシンインヒビターのグリコサミノグリカン糖鎖組み換えによる新規切迫早産治療薬の開発)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>【緒言】</p> <p>全世界の早産率は 9.7%にのぼる。新生児医療の進歩によって、早産児の予後は改善されてきているとはいえ、なお早産は周産期死亡の最大の原因の一つである。そのため早産の前段階である切迫早産の治療法の確立は早急に解決すべき問題である。切迫早産における子宮頸管熟化は絨毛膜羊膜炎 (CAM) 等の炎症が誘因となり引き起こされる。切迫早産治療薬として現在使用されている urinary trypsin inhibitor (UTI) はエラスターゼなどのプロテアーゼや IL-8 等のサイトカインを低下させ、子宮頸管の炎症、熟化を抑制するとともに、子宮収縮抑制作用があることが知られている。UTI は多くの施設で膣座剤として使用されているが、UTI によっても抑制できず早産に至る症例が存在するのが現状である。</p> <p>UTI は 1 本のコアタンパクの 10 番目のセリン残基に低硫酸化コンドロイチン 4-硫酸 (Ch4S) 鎖が 1 本結合したプロテオグリカンである。UTI の抗炎症作用はコアタンパク部分のプロテアーゼ阻害反応に基づくと考えられているが、分子の 30%近くを占めるグリコサミノグリカン (GAG) 糖鎖の構造に基づく機能は充分には明らかにされていない。本研究では UTI の作用における糖鎖部分の役割を明らかにすることを目的とする。そして、その研究結果をより効果のある新規切迫早産治療薬の開発に繋げたいと考えた。</p> <p>【方法】</p> <p>CNBr-activated Sepharose にヒアルロニダーゼを固定したカラムを使用して、加水分解反応 (NaCl 存在下、pH 4.0、4 °C、O/N) により、元の UTI (native UTI) から GAG 糖鎖を欠損させた UTI (linkage-UTI) を調整した。次に、この linkage-UTI をアクセプターとし、ヒアルロン酸 (HA) もしくは元の構造とは異なるコンドロイチンをドナーとして糖転移反応 (NaCl 非存在下、pH 7.0、37 °C、24 h、あるいは 72 h) を行い、糖鎖組み換え UTI (HA-linkage-UTI、Ch4S-linkage-UTI) を調整した。更に、native UTI をアクセプターとし、HA もしくはコンドロイチンをドナーとして糖転移反応 (NaCl 非存在下、pH 7.0、37 °C、24 h あるいは 72 h) を行い、HA hybrid-UTI 及び Ch4S hybrid-UTI を調整した。調整した各 UTI はポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) にて糖鎖組み換えの成否を確認した。</p> <p>次に、婦人科手術の残余検体から得たヒト子宮頸管線維芽細胞 (UCFs) を培養し、調整した各 UTI を機能解析ツールとして添加した。1 時間後に lipopolysaccharide (LPS) で刺激して炎症モデルとした。24 時間の培養後、培養上清から IL-8、IL-6、MMP-8、MMP-9 を測定した。</p>	

【結果】

LPS による刺激後、IL-8、IL-6、MMP-8、MMP-9 の全てで有意な上昇を認めた。Native UTI、HA hybrid-UTI、Ch4S hybrid-UTI といった元の GAG 糖鎖をもつ UTI は、linkage-UTI、HA-linkage-UTI、Ch4S-linkage-UTI 等の元の GAG 糖鎖を加水分解で欠損させた UTI より強く IL-8 を抑制する傾向があった。IL-6 抑制は GAG 糖鎖の有無や種類によって一定の傾向を示さなかった。MMP-8 と MMP-9 は IL-8 とは反対に、元の GAG 糖鎖を欠損させた UTI が、GAG 糖鎖をもつ UTI よりそれぞれを強く抑制する傾向がみられた。

【考察】

切迫早産における子宮頸管熟化のメカニズムは以下の二通りである。一つは子宮頸管の細胞外マトリックスを構成するコラーゲンの分解で、もう一つは子宮頸管における HA などの GAG の増加である。MMP-8、MMP-9 等はコラーゲン分解に関与し、IL-8 等は GAG 増加に関与するといわれている。今回の我々の研究では、元の GAG 糖鎖をもつ UTI の方が強く IL-8 を抑制する傾向があり、MMP-8、MMP-9 に対しては、逆に元の GAG 糖鎖を欠損させた UTI の方が強く抑制する傾向を認めた。このことから、UTI における GAG 糖鎖の特徴として、子宮頸管熟化における HA などの GAG 増加を抑制する働きを持ち、子宮頸管の細胞外マトリックスを構成するコラーゲンの分解に対しては逆の働きを持つ可能性が示唆された。また、IL-8 では Ch4S hybrid-UTI が、MMP-8 と MMP-9 では、それぞれ Ch4S-linkage-UTI が最も強い抑制効果を示しており、Ch4S を含む GAG 糖鎖を持つ UTI で特に強い効果を示す傾向を認めた。これらは Ch4S の抗炎症反応による影響である可能性が示唆された。なお IL-6 抑制に対しては、UTI のもつ GAG 糖鎖は大きな影響を与えない可能性が示唆された。

【結論】

本研究は UTI の作用における GAG 糖鎖部分の役割の一端を示した初の研究である。今後更なる研究の継続が必要であるが、本研究により、より有効な新規切迫早産治療薬の開発に繋げることができる可能性が示唆された。生体に由来し細胞毒性のない UTI の糖鎖組み換え新規治療薬を用いて副作用の心配なく子宮頸管の炎症を抑制することができれば、現在の産科医療の中で最重要課題である早産の減少と早産新生児の予後改善が期待できる。

- ※1 乙の場合、〇〇領域〇〇教育研究分野にかえて、所属の〇〇講座を記入すること。
- ※2 論文題目が英文の場合は（ ）内に和訳を付記すること。