

## 2022年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	<b>分泌型細胞外マトリクス蛋白に着目した子宮頸管熟化機序の解明</b>
キーワード	① 頸管熟化、② 細胞外マトリクス蛋白、③ プロゲステロン

### 研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ナカジマ リエ 中嶋 理恵
配付時の所属先・職位等 (令和4年4月1日現在)	東海大学医学部医学科 専門診療学系 産婦人科学領域 助教
現在の所属先・職位等 (令和5年7月1日現在)	東海大学医学部医学科 専門診療学系 産婦人科学領域 助教
プロフィール	2012年に東海大学医学部を卒業後、初期臨床研修医を経て、2017年に東海大学医学部医学科専門診療学系産婦人科学領域に助教として着任した。診療・教育に従事する傍ら、2019年から4月からは主に産科関連の診療と臨床研究(子宮頸管の超音波検査に関する研究)を行い、また将来の学位取得に向け、細胞培養や分子生物学的実験を開始した。2020年からはサブスペシャリティーとして周産期専門医の修練を開始し、産科・周産期医学の医師兼研究者として始動した。

### 1. 研究の概要

早産の予知や予防により周産期死亡率低下や未熟児の後遺症減少が可能となる。このためには分娩や陣痛発来メカニズムの解明が欠かせない。ヒトでは他の哺乳類と異なり妊娠維持に関わる重要なステロイドホルモンであるプロゲステロン(P4)の母体血中濃度は、分娩直前に低下しないが、P4受容体レベル、受容体サブクラスの変化、P4局所代謝、共役転写調節因子などが変化し、全体としてP4の作用が減少し、妊娠維持機構が抑制され分娩に至ると考えられている(機能的P4減少)。子宮頸管は妊娠末期まで閉鎖し、物理的強度が保たれて胎児は子宮腔内に保持される。妊娠末期には頸管熟化が始まり組織伸展性が亢進し物理的強度は弱まり、陣痛発来に向けた準備が進む。この過程にも機能的P4減少の関与が考えられるが、子宮筋に比べ子宮頸管に関する研究は不足しており、機能的P4減少の指標となるマーカーは知られていない。今回、コラーゲン構築の調節を通じて頸管の物理的強度維持に関与している可能性の高い細胞外マトリクス蛋白である、SPARCとdecorin(DCN)に着目し、これらがP4により調節されているか否かについて検討を加えることとした。結果として、子宮頸管(非妊娠)の免疫組織染色ではSPARC、DCN、PGRも頸管の間質線維芽細胞を主体に蛋白局在を認め、DCNについては強陽性であった。またヒト子宮頸管由来線維芽細胞株であるHDC細胞に対して、エストラジオール(E2, 10nM)存在下にP4(0-10 $\mu$ M)を添加したところ、SPARC mRNAにはP4依存性の変化は見られなかったが、DCN mRNAは、生理的濃度の範囲内でP4濃度依存性に発現量増加を示した。また生理的濃度を下回る10nM添加では発現量の減少が見られた。以上の結果より、ヒト子宮頸管由来線維芽細胞株であるHDC細胞において、DCNの遺伝子発現はP4濃度により調節を受けていることが示唆された。DCNは分泌される細胞外マトリクス蛋白であることから、臨床の現場で頸管粘液中の測定が可能な機能的P4減少のマーカー候補と考えられた。機能的P4減少をアクセスが容易な頸管からのマーカーで知ることができれば、早産の予知マーカーとしての活用や、プロゲステロン投与などによる早産予防の対象を知ることができ、臨床的に非常に有用である。今後、この

ような方向への展開を目指して進んで行きたい。

## 2. 研究の動機、目的

早産の予知や予防により周産期死亡率低下や未熟児の後遺症減少が可能となる。このためには分娩や陣痛発来メカニズムの解明が欠かせない。近年、妊娠維持に不可欠なプロゲステロン(P4)の作用が再度注目され、早産のハイリスク例でP4関連製剤による早産予防の有効性が示されてきている。ヒトでは他の哺乳類と異なりP4の母体血中濃度は分娩直前に低下しないが、P4受容体レベル、受容体サブクラスの変化、P4局所代謝、共役転写調節因子などが変化し、全体としてP4の作用が減少し、妊娠維持機構が抑制され分娩に至ると考えられている(機能的P4減少)。子宮頸管は妊娠末期まで閉鎖し、物理的強度が保たれて胎児は子宮腔内に保持される。妊娠末期には頸管の熟化が始まり、組織伸展性が著明に亢進し物理的強度は弱まり、陣痛発来に向けた準備が進む。このプロセスにも機能的P4減少が関与していると考えられるが、子宮筋に比べ子宮頸管に関する研究は不足しており、頸管由来の機能的P4減少を示すマーカーも知られていない。そこで今回は、コラーゲン構築の調節を通じて頸管の物理的強度維持に関与している可能性の高い細胞外マトリクス蛋白である、SPARCとdecorin(DCN)に着目し、これらがP4により調節されているか、機能的P4減少の頸管由来マーカーとなり得るか、について検討することとした。

## 3. 研究の結果

- ①子宮頸管(非妊娠)の免疫組織染色の結果では、SPARC、DCN、P4受容体(PGR)のいずれも頸管の間質線維芽細胞を主体に蛋白局在を認め、特にDCNでは強陽性であった。SPARCとPGRは一部円柱上皮にも蛋白局在を認めた。
- ②ヒト子宮頸管由来線維芽細胞株であるHDC細胞を用い、妊娠環境を模倣するためエストラジオール(E2, 10nM)存在下にP4(0-10 $\mu$ M)を添加し、48時間後のSPARC、DCNのmRNA発現レベルをrealtime RT-PCR法により検討したところ、当初の予想と反しSPARC mRNAにはP4依存性の変化は見られなかった。しかしながらDCN mRNAレベルは、生理的濃度の範囲内で添加P4濃度依存性に増加を示した。また生理的濃度を下回る10nM添加では発現レベルの減少が見られた。以上より、ヒト子宮頸管由来線維芽細胞株であるHDC細胞において、DCNの遺伝子発現はP4濃度により調節を受けていることが示唆された。DCNは分泌される蛋白であることから、P4作用の多寡を示す(機能的P4減少の)マーカー候補と考えられた。

## 4. 研究者としてのこれからの展望

当初、文献的考察よりSPARCを機能的P4減少のマーカー候補として考えていましたが、培養細胞を用いて検討したところ、予想に反してP4によりSPARC mRNAの発現は制御されていませんでした。そこで視点を変え、SPARCと同じように分泌型の細胞外マトリクス蛋白であり、コラーゲン構築の調節にもかかわり頸管熟化に関わる可能性があるDCNに着目したところ、こちらはP4により発現調節を受けている結果を得ました。研究にはこのようなことがしばしば起きるとは聞いてはいましたが、実体験し大変に勉強になりました。

本来であれば網羅的解析を行なって検討すれば近道だったのかもしれませんが、網羅的解析には多額の費用を要するため、資金的に初めからそのようにはできませんでした。

今回いただいた研究援助により、偶然にも意外な形でDCNという新たな研究ターゲットを発見することができましたので、これを無駄にすることなく、結果を礎に研究を発展させ科研費を含む外部研究費も得て行きたいと考えています。

まだまだ研究者としては駆け出しですが、ゆくゆくは医学博士の学位取得を目指したいと思えます。また同時並行で周産期専門医の取得にも挑戦しておりますので、診療から得たヒントを研究に活かし、また逆に研究成果を臨床にフィードバックし、少しでも周産期医学・医療の発展に貢献できるように前進したいと思えます。

## **5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ**

この度は、本研究へのご支援をいただき誠に有難うございました。御援助により、早産の予防や減少に向けた研究の、ささやかな一歩を踏み出すことができました。今回得られた結果を足がかりとして研究を発展させると共に、周産期医療・医学の進歩に少しでも貢献できるような医師・研究者になることを目指し、今後も努力したいと考えております。