

論文の内容の要旨

論文題目 ω 3 脂肪酸の早産予防効果に関する研究

氏名 山下亜紀

【序文】 必須脂肪酸である多価不飽和脂肪酸には、アラキドン酸(AA)に代表され、炎症作用のある ω (オメガ)6 脂肪酸と、エイコサペンタンエン酸(EPA)に代表され、抗炎症作用のある ω 3 脂肪酸がある。魚油に多く含まれる ω 3 脂肪酸には早産予防効果があるという疫学研究が散見されるがその機序は不明である。自然早産の原因の大半を占める感染性早産（炎症性早産）のメカニズムとして、絨毛膜羊膜炎がよく知られているが、細菌性陰症から感染や炎症が上行性に子宮頸管や子宮内に波及し、単球や好中球の活性化や遊走促進、炎症性サイトカインやプロスタグランジン、エラスターゼなどのコラーゲン分解酵素の産生増加が起こり、頸管熟化、子宮収縮、卵膜の脆弱化を経て、破水や早産に至ると言われている。 ω 3 脂肪酸の抗炎症作用は、このような炎症性早産の抑制に寄与すると考えられる。また、近年、Kang らにより fat-1 トランスジェニックマウス (fat-1) が開発された。このマウスは、 ω 6 脂肪酸から ω 3 脂肪酸へ変換する酵素を遺伝子導入されたマウスであり、体内で ω 3 脂肪酸の豊富な状態が恒常的に維持される。fat-1 マウスの高 ω 3 脂肪酸組成は細胞レベルで内因性にもたらされる結果であり、食餌として摂取する際に起こり得る微量な成分の違いや酸化の影響、消化吸收の個体差の影響を受けにくく、実験系を安定してコントロールすることが可能となる。本研究の目的は、fat-1 のマウス早産モデルを用いて ω 3 脂肪酸の早産予防効果を検証し、その機序を解明すること、 ω 3 脂肪酸代謝物を網羅的に解析し、早産予防に直接的に関わる ω 3 脂肪酸代謝物を同定し、新規の早産治療薬を探索することである。

【方法】 妊娠 15 日目に経膈的に子宮頸部へ大腸菌リポ多糖 (LPS) を局注し、早産を誘発するモデルを作成し、fat-1 マウスとその同系野生型マウス(WT)の早産率を比較した。それぞれの対照群として、同量の生食を局注した。次に、LPS 局注 6 時間後に妊娠子宮を回収し、定量的 PCR 法を用いて、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 の遺伝子発現量を比較した。また、各群の子宮体部、頸部へのマクロファージ浸潤数を、抗マウスマクロファージ F4/80 抗体による免疫組織学的検査で比較した。腹腔内を 5 ml の生食で洗浄後、回収した腹腔洗浄液中の IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 のサイトカインを ELISA 法で測定した。さらに、腹腔内のマクロファージを

単離、培養し、LPS 刺激後、経時的に IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 の遺伝子発現量を比較した。また、LPS 局注 6 時間後の血清プロゲステロン濃度を ELISA 法で測定し、妊娠黄体を HE 染色し、鏡検により確認した。その後、LPS または生食局注後の妊娠子宮における脂肪酸代謝物の網羅的解析を LC/MS/MS (高速液体クロマトグラフィー質量分析計) を用いて行い、その結果同定された代謝物を、WT の早産モデルマウスへ静注し、早産予防効果を検証した。

【結果】WT、fat-1 マウスの早産率は、LPS 量が多くなるにつれて増加し、50 $\mu\text{g}/\text{body}$ 以上の量では全てのマウスが早産したが、それより少ない量の範囲においては、WT の早産率に比べ、fat-1 の早産率は有意に低下していた(Cochran Armitage Trend test:p=0.0267)。15 $\mu\text{g}/\text{body}$ の量で最も差が出ており、WT の早産率は、55%(11/20)であったのに対し、fat-1 の早産率は 20%(3/11)であり、有意差を認めた(Fisher's exact test: p<0.05)。LPS 局注 6 時間後の妊娠子宮における IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 遺伝子発現は、生食局注後に比較し、有意に増加していたが、IL-1 β 、IL-6 の発現量は WT に比べ、fat-1 で有意に低値であった(Mann-Whitney U test: p<0.05)。TNF- α の発現量には差を認めなかった。子宮体部へのマクロファージ浸潤数は、LPS 局注後に増加していたが、fat-1 と WT マウスとの間には有意差を認めなかった。一方、子宮頸部への LPS 局注後のマクロファージ浸潤数は、WT に比べ、fat-1 で有意に少なかった。腹腔内サイトカインは、TNF- α に関しては、LPS 局注群でも検出感度以下であったが、IL-1 β 、IL-6 に関しては、LPS 局注後の上昇を認めた。IL-6 は、fat-1 と WT で有意な差を認めなかったが、IL-1 β は fat-1 マウスにおいて有意に低く抑えられていた。fat-1、WT マウスの腹腔内マクロファージを単離、培養して LPS 刺激した結果、WT では IL-1 β のサイトカイン遺伝子が経時的に上昇しているのに対し、fat-1 では WT に比べて、上昇が見られず、マクロファージによる IL-1 β の発現が抑えられていることが示された。TNF- α 、IL-6 遺伝子発現には差を認めなかった。脂肪酸代謝物の網羅的解析の結果、fat1 子宮では WT に比べ、AA 代謝物であるプロスタグランジン(PG)E₂、F₂ α が有意に低下し、EPA 代謝物である 18-HEPE が有意に上昇していた。そこで、18-HEPE を投与し、WT の LPS 誘発型早産が抑制されるかどうかを検証した。投与経路は、経静脈投与とし、投与量を漸増して試行したが、いずれの量においても有意な早産率の低下は認めなかった。そこで、18-HEPE がレゾルビンの前駆体であることに注目し、最終活性代謝物であるレゾルビン E₃(RvE₃)を、経静脈投与したところ、有意な早産率の低下を認めた。また早産を抑制されたマウスの胎仔生存状態に異常は認めなかった。

【考察】fat-1 マウスは ω 3 脂肪酸が豊富でありそれらの抗炎症作用により LPS による炎症誘導型早産が抑制された。体内で EPA リッチな状態から LPS 刺激により代謝を受け、最終的に RvE₃ の産生が増加し、RvE₃ の直接的・能動的抗炎症作用により早産が抑制されたと考えられた。RvE₃ の前駆体である 18-HEPE の投与では、早産は抑制されなかったが、18-HEPE が抗炎症作用を発揮するには、一旦細胞内へ取り込まれ、そこから代謝される必要があるため、投与のタイミング等を工夫すれば早産抑制効果が得られる可能性もある。RvE₃ の静注投与による早産抑制効果、胎仔への安全性も示されことから新規の早産治療薬

候補と考えられた。今回の研究でレゾルビンによる LPS 誘発型早産治療効果が明らかになったが、レゾルビン投与後の炎症性サイトカイン遺伝子発現や脂肪酸代謝物の解析を行うこと、レゾルビンの投与量を変動させ、その薬理効果が最適になる投与量を設定することが今後の課題となる。さらに、安全性を確立した上でヒトへの臨床応用をめざしたトランスレーショナルリサーチを行うことが将来的な展望である。