

博士論文

頸管熟化制御における
抗炎症性蛋白プログラニュリンの関与

秋葉 直也

頸管熟化制御における
抗炎症性蛋白プログラニュリンの関与

所属：東京大学大学院 博士課程 医学系研究科 生殖・発達・加齢医学専攻

指導教官：藤井知行

申請者：秋葉直也

目次

要旨・・ 5

序文・・ 6-18

1. 妊娠・分娩期の子宮頸管の変化
2. 頸管熟化の臨床的評価法と問題点
3. 頸管熟化の制御に関わる分子生物学的機構
4. 妊娠維持とプロゲステロンの作用
5. 流早産における病的頸管熟化の背景因子
6. プログラニューリンについて

研究目的・・ 19

各検討課題に共通した実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 20-25

検討課題 1 妊娠期における PGRN の発現と頸管熟化との関係・・・・・・・・・・・・ 26-35

実験方法

- 1-1. ヒト妊娠胎盤における PGRN 産生の確認
- 1-2. ヒト妊娠中の血清 PGRN 推移
- 1-3. ヒト妊娠中期の頸管粘液中の PGRN、SLPI と頸管長の関係

1-4. ヒト頸管粘液中の PGRN、SLPI と Bishop score の関係

検討課題 2 PGRN の発現制御におけるプロゲステロンの役割について・・・36-54

実験方法

2-1. マウス早産モデルの PGRN、SLPI の子宮頸管組織 mRNA 発現解析

2-2. 分娩遅延モデルと P 作用減弱早産モデルでの頸管の PGRN 発現

2-3. 培養細胞に性ホルモンを添加した際の PGRN mRNA 発現解析

2-4. 各種細胞株のプロゲステロン受容体、グルココルチコイド受容体の発現

2-5. グルココルチコイド受容体特異的刺激による PGRN 発現誘導

検討課題 3 子宮頸管に対する PGRN による抗炎症作用について・・・・・・55-63

実験方法

3-1. P 作用減弱早産モデルに対する PGRN 投与実験

3-2. 子宮頸管上皮細胞における TNF- α の炎症性サイトカイン発現誘導に対す

る PGRN の抑制作用

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・64-74

1. プロゲステロンによる PGRN 制御について

2. PGRN による子宮頸管熟化の抑制と妊娠維持への関与

3. 臨床的観点からの早産機序と PGRN の関係

4. 分娩予知マーカーとしての可能性

5. 本研究の限界

結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 75

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 76

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 77-82

【要旨】

妊娠期の抗炎症性蛋白プログランニューリン (PGRN) の発現と子宮頸管熟化の関連についてヒト臨床検体を用いて検討を行い、妊娠中の頸管における PGRN の発現が頸管熟化に関連していることを発見した。また、性ホルモンによる PGRN の発現制御を細胞培養実験とマウスモデルを用いて検討し、プロゲステロンが PGRN の発現を誘導する因子であることを確認した。そして、PGRN が子宮頸管細胞に対して TNF- α シグナルの抑制により抗炎症作用を生じることを確認した。これらの知見は、PGRN およびその機能に関わる分子機構が早産発症の予知マーカーや治療ターゲットとなりうることを示している。

【序文】

1. 妊娠・分娩期の子宮頸管の変化

子宮頸部は子宮体部と膣を接続する組織であり、妊娠時には子宮体部内腔の胎児と外界を隔てる構造的障壁となる[1]。子宮頸部は、妊娠進行に伴い成長する胎児を子宮内に保持して子宮内部からの圧力に抗する物理的な組織学的特性を有し、また外界からの病原性微生物の侵入を防ぐという免疫学的防御の役割を担っている。

非妊娠時の子宮頸部組織は分子構造としては、約 85～90%がプロテオグリカン、グリコサミノグリカン、エラスチンを含む均質で水和したコラーゲン構造と細胞外マトリックスで、約 10～15%が免疫細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞、腺/血管細胞を含んだマトリックス細胞タンパク質で構成されている[2-4]。そして、子宮頸部の中心には、単層のムチン分泌性円柱上皮に覆われた子宮頸管の内腔構造が存在する。その表面に粘液腺を有する深い裂溝が存在し、そこで産生される豊富な頸管粘液により頸管内腔は満たされている。膣側に露出した子宮頸部の表面は、角質化されていない重層扁平上皮で覆われている[5]。そうした子宮頸管上皮および頸管粘液の複合的な働きにより、子宮体部内腔への病

原体の侵入を防ぐための免疫機構が機能している。

子宮頸管熟化とは一般的には分娩に向けて生じる妊娠子宮における子宮頸管の組織学的変化を意味するが、統一された定義はない。本研究では、そうした一般的な概念の中でも特に分娩の約1か月間前ごろから顕在化する子宮頸管組織の変化を“頸管熟化”と定義する[6]。妊娠期間中の子宮頸部は、固く閉じた構造であるのに対して、分娩中にはしなやかに伸展して胎児の通過が可能な産道の一部を形成してその役割が劇的に変化する[7]。そして分娩終了後には急速に妊娠前の状態への復元が進む。こうした一連の子宮頸管の組織学的特性の変化プロセスを子宮頸管のリモデリングという[1]。そして、齧歯類の研究から得られた知見をもとに、リモデリングの進行過程は、Softening、Ripening、Dilation、Postpartum repairの四段階（図1）に分けられている。

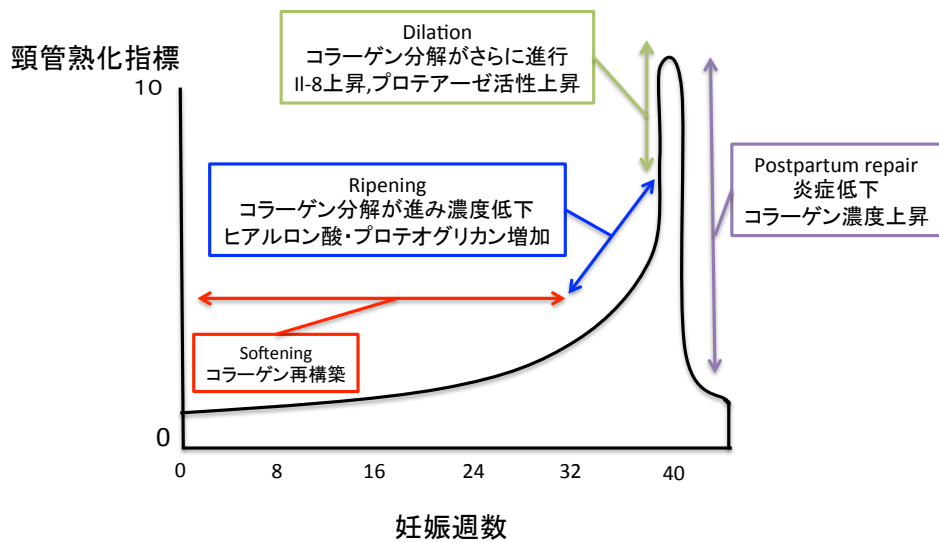


図 1. 頸管リモデリングの概要

頸管リモデリングの4段階の各段階の時期、組織変化を縦軸に頸管熟化指標、横軸に妊娠週数を用いて示した。(文献[1]をもとに作成)

2. 頸管熟化の臨床的評価法と問題点

妊娠末期の頸管熟化の状態の把握のための臨床的指標として Bishop score が利用される [8]。Bishop score は、内診によって得られる情報である 5 つの項目（子宮口の開大度 (cm)、子宮頸管の展退度 (%)、児頭下降度 (Station)、子宮頸部の硬度、子宮口の位置）をスコア化したものであるが、検者間誤差もあり分娩時期を正確に予測することが難しいという問題点があり、Bishop score だけに基づく判断では正確な分娩時期の推定は困難である。また、切迫流産や前期破水の早期診断マーカーとして子宮頸管粘液中顆粒球エラスターゼの測定や、頸管腔分泌液中癌胎児性フィブロネクチンの測定が臨床で使われているがこれらも臨床的には感度や特異度が低いという問題点がある [9]。そのため、頸管熟化状態を反映して分娩時期の予測につながる新規バイオマーカー開発への期待は大きい [10, 11]。

3. 頸管熟化の制御に関わる分子生物学的機構

頸管熟化の制御を司る要素として組織内の炎症-抗炎症およびプロテアーゼ-抗プロテアーゼのそれぞれのバランスが重要となる。妊娠中には抗炎症、抗プロテアーゼ側への調整が行われて頸管熟化が抑制されているのに対して、内的

あるいは外的な要因によって炎症の促進およびプロテアーゼの活性化が誘導されうる[6]。頸管熟化に連動して生じる現象では子宮筋の収縮が重要である。分娩につながる子宮収縮を陣痛と呼び、この陣痛が発来すると、子宮筋層から好中球の遊走を促進するケモカインである IL-8 が増加して子宮筋層への好中球浸潤が生じる[12]。活性化した好中球からは蛋白分解酵素である好中球エラスターゼが放出されて、頸部間質のコラーゲン分解が進行して頸管熟化が導かれる[13]。さらに、活性化好中球および頸部組織の免疫担当細胞からは IL-1 β 、IL-6、TNF- α に代表される炎症性サイトカインが産生されて、子宮筋層局所におけるプロスタグランジン E2 (PGE2) の産生増加を引き起こしてさらなる子宮収縮の増強につながるというポジティブフィードバック機構により分娩が進行する[14]。炎症性プロスタグランジンは、アラキドン酸カスケードの代謝産物であり、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ (COX) を介する代謝経路を経て生成される。COX には COX-1 と COX-2 の 2 つの種類があり、いずれも種々の細胞において発現が確認されている。COX-1 が比較的恒常的に発現しているのに対して、COX-2 は炎症性因子に反応して誘導されることが知られている[15]。子宮頸管を含めた妊娠組織においても炎症性サイトカインや病原体由来成分等によって誘導される[15-17]。特に、外来病原体の侵入に際しては組織マクロファージが病原体

の成分に反応すると IL-1、TNF- α などを産生して、線維芽細胞、血管内皮細胞、絨毛細胞など組織を構成する種々の細胞から IL-6 が分泌されて組織全体の免疫防御機構が活性化する [18]。

このように子宮頸管では、分娩に向けて炎症性カスケードが活性化するが、同時に抗炎症作用を有する種々の因子も活性化することが知られている [19]。妊娠時に増加する代表的な抗炎症性サイトカインとしては Th2 細胞から分泌される IL-4、IL-10、IL-13 があげられる。こうした炎症と抗炎症という相反作用を有する分子機構が同時に機能することで、過剰な炎症による組織障害を回避しつつ頸管熟化が進行していることが推定される [20]。

子宮頸管熟化に関わるもう一つの重要な分子機構としてプロテアーゼと抗プロテアーゼのバランスがある。分娩が近づくと、matrix-metalloproteinase (MMP) や好中球エラスターゼなどの蛋白分解酵素が活性化して細胞外マトリックスの分解が亢進することが知られている [21, 22]。そうした蛋白分解酵素の活性化と並行して、それを抑制する抗プロテアーゼ因子の誘導も生じる。その 1 例として陣痛発来中の子宮頸管では抗プロテアーゼ作用を有する Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) の発現が顕著に増加しているとの報告がある [23]。また、Secretory Leukocyte Protease inhibitor (SLPI) は、好中球エ

ラスターゼに拮抗する抗プロテアーゼ作用を有する分泌蛋白である。SLPI は分娩直前の頸管熟化の進行に際して頸管上皮での発現が亢進することが、過去の検討で示されている [24-26]。炎症-抗炎症バランスと同様に、頸管熟化ではプロテアーゼ-抗プロテアーゼバランスが適切に制御されつつ進行することで過度な組織破壊を防いでいると推測されている。

4. 妊娠維持とプロゲステロンの作用

女性ホルモンの 1 つであるプロゲステロンは妊娠維持における中心的役割を担う。子宮内膜の胚受容能の獲得、着床とその後の子宮内膜間質細胞の脱落膜化、さらに胎盤形成という一連の妊娠初期過程において、プロゲステロンによる直接的あるいは間接的な分子生物学的機構の調節が必須である [27]。さらに、妊娠経過の最終点である陣痛発来や分娩進行ではプロゲステロン作用の変化が密接に関与している [28, 29]。

ヒトの妊娠では、プロゲステロンの産生源は妊娠初期には卵巣黄体であり、妊娠 9 週以降は胎盤へと移行する。末梢血中のプロゲステロン濃度は妊娠進行とともに徐々に増加して妊娠末期には 150ng/mL に達して、分娩時にもその濃度の低下は認められない [28]。一方で齧歯類では妊娠中のプロゲステロンの産生

源は卵巣内の妊娠黄体にのみ依存し、卵巣の黄体融解に伴い血液中のプロゲステロン濃度が減少することが分娩開始の起点となる。ヒトと齧歯類の間では妊娠中のプロゲステロンの産生動態が異なる。しかし、プロゲステロンのアンタゴニストであるミフェプリストン（RU486）を投与することでヒトと齧歯類のいずれにおいても頸管熟化と子宮収縮が誘導されて分娩が生じる[30]。そのため、ヒトにおいては末梢血中のプロゲステロンが維持されつつその作用が減弱することが分娩の起点となっていることが推測されている[31-33]。それを裏付けるように早産リスクの高い妊婦に対してプロゲステロンあるいはその誘導體（プロゲスチン）を投与することで早産防止効果が発揮されることが報告されてきた[34-37]。分娩進行に向かう過程において関わる諸因子の関係について図2に示す。病的分娩である早産のみならず正常分娩においても、炎症性カスケードおよび免疫担当細胞の活性化が確認されてきた[38]。このような背景から、分娩は制御された生理的な炎症として捉えられてきた。しかし、個々の分子がどのように連動して作用して頸管熟化が制御されているのかその全体像は完全には解明されていない。

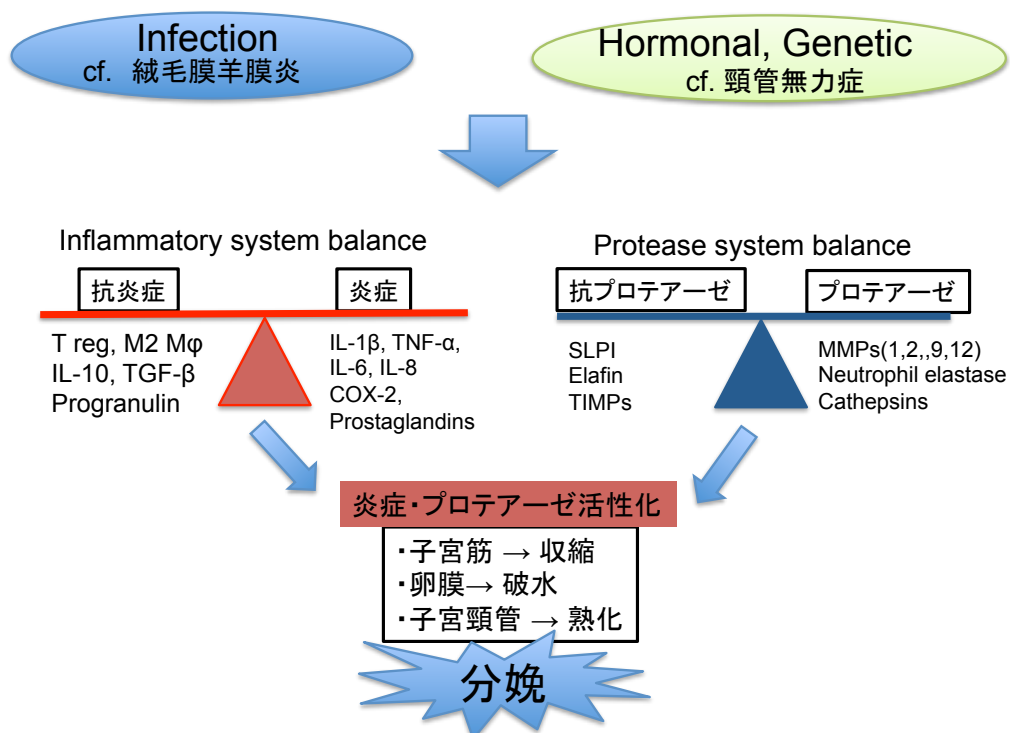


図 2. 炎症・プロテアーゼバランスのシフトと分娩進行カスケード

絨毛膜羊膜炎に代表される子宮感染や、非感染性に生じる頸管無力症では、ともに炎症-抗炎症およびプロテアーゼ-抗プロテアーゼバランスに変調をきたして、向炎症、プロテアーゼ活性化にシフトすることで、頸管熟化が進行して早産に至る。

5. 流早産における病的頸管熟化の背景因子

妊娠 22 週 0 日以降で妊娠 37 週 0 日未満の分娩が早産と定義されている。世界で毎年 1500 万人の新生児が早産で生まれ、このうち 100 万人以上が生後 1 か月以内に死亡している [39, 40]。日本における早産は分娩全体の約 5%だが、早

産率は世界的に増加しており、アメリカ合衆国でも過去 25 年間で早産率が 36% 増加しほとんどの先進国でも同様の傾向が見られている[41]。早産は、新生児死亡の 75%、長期神経学的後遺症の 50%を占めると言われており、早産の予防・治療は、現代の周産期医療にとって重要な課題である[42]。

早産は、遺伝学、ホルモン、免疫システム、生殖組織の特性（子宮、子宮頸部、胎児膜、および胎盤）、血管系、神経系、母体解剖学（幾何学的因子）、マイクロバイオーーム、環境など非常に多数の要因が複雑に相互作用し引き起こされる。全早産のうち、母体合併症などから人工的に早産となるものをのぞいた自然早産が 75%である[41]。

妊娠時期に応じたりモデリングの適切な進行が正常分娩の達成に不可欠であり、その機構の破綻は流産、早産などの妊娠異常の原因となる。頸管熟化の過程で関与する分子機構に関して多くの研究が行われてきたが、未解明な部分が多い。膣炎、頸管炎、絨毛膜羊膜炎を含めた子宮内感染/炎症が、自然早産の主たる原因とされている。特に、妊娠 28 週未満の自然早産例では、高率に組織学的絨毛膜羊膜炎が確認される[43]。第 2 三分期以降に経膣超音波法により頸管長の測定を行うことで、その後の早産リスクを評価することが一般臨床として普及している。子宮内感染に続発して早産となる場合には、子宮出血や子宮

収縮などの自覚症状が生じる場合が多い。一方でそうした自覚症状がないままに、頸管長の短縮が進行して子宮口が開大して分娩に至る病態が存在し、従来“頸管無力症”と呼ばれてきた。近年、頸管無力症を子宮頸管のリモデリング過程の中で、ripening と dilation が早期に生じる病態と捉えて“早期頸管リモデリング”という名称が使用されることもある。頸管無力症では非感染性に子宮頸管組織の炎症が誘導されていることが示唆されている[44]。

このようにヒト早産では感染炎症およびプロゲステロン作用の減弱が主要な背景要因であるが、それぞれの原因因子に適合した複数の早産マウスモデルが作成されてきた。それらを用いることで早産の背景原因別に頸管熟化機序の相違点や関連遺伝子についての解析がなされている。ヒト早産の抑制のために、慢性炎症に対する抗炎症作用を有する新規治療薬の開発が望まれている。

6. プログラニュリンについて

プログラニュリン (progranulin: PGRN) は胚発生、組織修復、腫瘍形成、および炎症制御に関与する自己分泌型成長因子として報告されてきた糖タンパク質である。細胞周期進行や細胞運動性にかかわるシグナル伝達を活性化する作

用を有することも知られている[45]。PGRNは染色体17q21.32に位置し、593個のアミノ酸残基からなる糖タンパク質で、プロテアーゼ(MMP-9, MMP-12, MMP-14, ADAMTS-7, NEなど)の作用を介して活性型の6 kDaのペプチド(granulins (GRNs) A-Gおよびparagranulin)が生成される(図3)。

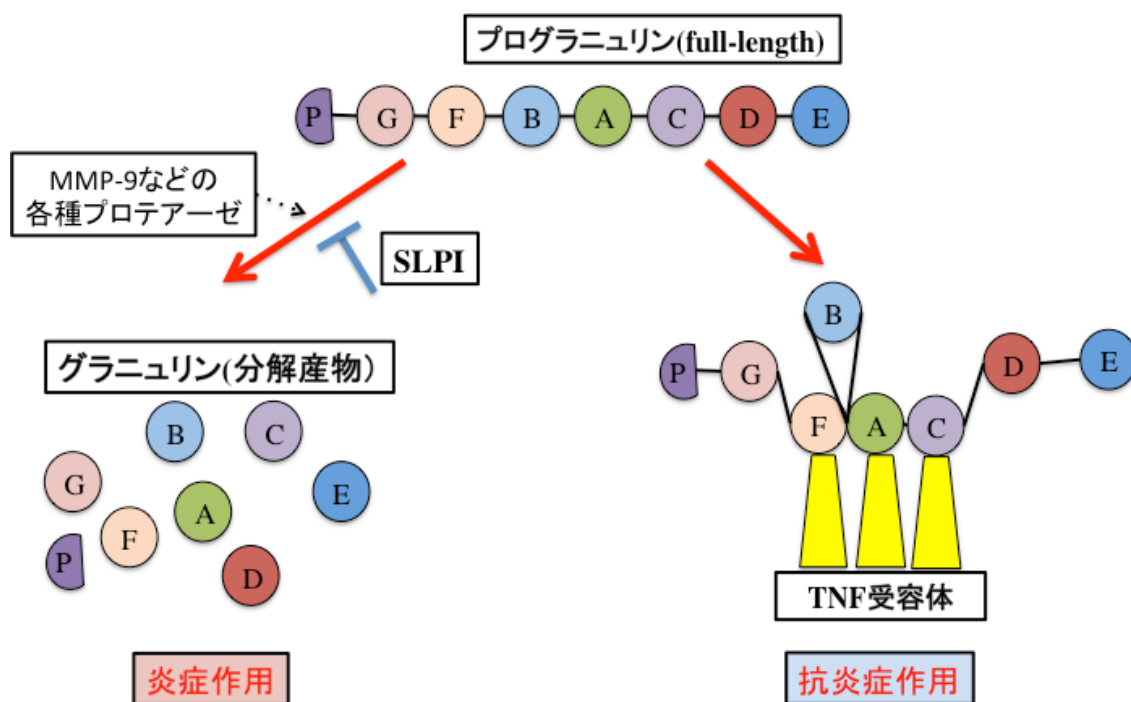


図3. プログラニューリンの物質特性と受容体の概要

英字が記載された円形構造は、それぞれPGRNを構成するグラニューリンドメインを示している。MMP-9などの各種プロテアーゼはプログラニューリンを分解して炎症性作用を有するグラニューリンの産生を引き起こす。一方でSLPIはこの分解を抑制する方向に働く。完全な長さのプログラニューリンはtumour necrosis factor receptor (TNF受容体)に結合し抗炎症作用をもたらす。(文献[45]をもとに作成)

炎症制御の観点では PGRN は抗炎症性、GRNs は向炎症性の相反する特性を有する。SLPI は PGRN が GRN に分解されることを阻害することが示されている [46]。PGRN の抗炎症性作用の機序としては TNF 受容体に直接結合することで TNF- α のシグナル伝達を遮断することがその中心として考えられている。そして、PGRN のプロテアーゼ反応部位を変化させて分解を受けない人工的な TNF- α 阻害物質を用いることでリウマチ性関節炎の発症が抑制できることが報告されている [47, 48]。さらに、血清中 PGRN 濃度の上昇と内臓肥満、高血糖値、脂質異常症などのメタボリックシンドロームとの関連性が指摘されている [49]。中枢神経系では PGRN の神経栄養活性や神経性炎症との関連が知られており、PGRN 遺伝子の変異は、認知症の原因の一つである前頭側頭葉変性症の発症と関連があるとされている [50, 51]。このように PGRN は種々の慢性炎症の病態に関わることが示されてきた [50, 52]。一方で PGRN に関して妊娠維持および頸管熟化制御機構との関わりについては知見が乏しい [53, 54]。

【研究目的】

本研究は、子宮頸管熟化の分子生物学的機構における PGRN の関与について解明することを目的とした。そして、下記の3つの課題について検討した。

検討課題 1 妊娠期における PGRN の発現と頸管熟化の関連について

検討課題 2 PGRN の発現制御におけるプロゲステロンの役割について

検討課題 3 子宮頸管に対する PGRN による抗炎症作用について

【各検討課題に共通した実験方法】

本研究は東京大学医学部研究倫理委員会の承認のもと行われた。（承認課題名：経会陰超音波を用いた分娩進行評価法に対する研究（前向き観察研究）（承認番号：11257）、承認課題名：頸管粘膜と口腔粘膜の相互的關係に着目した粘膜免疫防御機構についての研究（承認番号：10531）、承認課題名：妊娠・分娩・産褥の生理と病理に関する後方視的研究（承認番号：3053(3)）マウスモデルを用いた実験について東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センターの医学部・医学系研究科動物実験委員会承認を得て実施した。（承認課題名：Progranulinによる子宮頸管熟化制御機構の検討（医-P17-090）、承認課題名：SLPIノックアウトマウスにおける早産との関連性について（医-P14-146））

1. mRNA抽出およびreverse transcription (RT) 法

子宮頸管細胞、マウス子宮頸管組織、培養細胞から、Total RNAを回収した。Blood/Cultured Cell Total RNA Purification Mini Kit (FAVORGEN)のプロトコール通り行った。回収したRNAの純度を、分光光度計 (Epoch Micro-Volume Spectrophotometer System: Bio-Tec) での吸光度比 (260nm/280nm) により評

値し、1.7~2.1の間の値が確認された検体のみ、次のcDNAへの逆転写を行った。

cDNAへの逆転写は、Rever Tra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を使用し、

反応液は、総量 35 μ l (5 \times RT Master Mix 7 μ l、RNA 抽出液+Nuclease-free water

28 μ l) で、サーマルサイクラーの設定は 37 $^{\circ}$ C15 分 \rightarrow 50 $^{\circ}$ C5 分 \rightarrow 98 $^{\circ}$ C5 分で行っ

た。

2. Real time polymerase chain reaction (real time PCR) 法

mRNA から変換した cDNA を用いて、各遺伝子発現を real-time PCR 法で定量比較した。各遺伝子の特異的プライマー配列を表 1 に示す。Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche) を使用し測定した。PCR 反応液は、総量 20 μ l (c DNA 5 μ l、SYBR Green I Master 10 μ l、PCR grade H₂O 3 μ l、forward および reverse primer (10 μ M) 1 μ l) で、PCR protocol は 95 $^{\circ}$ C10 分間の後、95 $^{\circ}$ C10 秒 \rightarrow アニーリング 10 秒 \rightarrow 伸長反応 72 $^{\circ}$ C 5-15 秒 (プロダクトサイズ bp/25 秒) を 40 サイクルで行った。内因性コントロール遺伝子として、 β -actin を用いて、各遺伝子発現を相対比較した。

標的遺伝子	Forward (5' -> 3')	Reverse(5' -> 3')	Product size
ヒト			
PRA+B	AGCCACAATACAGCTTCGAG	TTTCGACCTCCAAGGACCAT	254
PGRN	ATCTTTACCGTCTCAGGGACTT	CCATCGACCATAACACAGCAC	215
SLPI	GGATGGCCAGTGCAAGCGTGA	GCCTGCTGTGTGCCAAGCCT	199
ACTB	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT	250

標的遺伝子	Forward (5' -> 3')	Reverse(5' -> 3')	Product size
マウス			
PGRN	GGTTGATGGTTCGTGGGGATGTTG	AAGGCAAAGACACTGCCCTGTTGG	185
SLPI	CCTTTCACGGTGCTCCTT	GGCAGACTTTCCACATATA	361
CXCL2	CATCAGTCCTCAGGTATTGGC	TTGTGATTCTCCTGTAGCTCTTC	119
IL6	AACGATGATGCACTTGACAGA	GAGCATTGGAAATTGGGGTA	283
IL8	GCCCAGACAGAAGTCATAGCC	AGGCTCCTCCTTTCCAGGTC	135
COX2	ACACACTCTATCACTGGCACC	TTCAGGGAGAAGCGTTTGC	274
IL1b	TTGACGGACCCCAAAGATG	AGAAGGTGCTCATGTCCTCA	204
ACTB	GCCTTCCTTCTTGGGTATGG	CGGATGTCAACGTCACACTT	90

表1 使用プライマー

3. Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) 法

ヒト子宮頸管粘液、培養細胞上清の PGRN、SLPI、IL-6、IL-1 β 濃度を ELISA 法で測定した。-80°C で凍結保存していた検体を氷上で融解し、Human Progranulin Quantikine ELISA Kit (Assay range, 1.6 - 100 ng/mL; R&D systems)、Human SLPI Quantikine ELISA Kit (Assay range, 62.5 - 4000 pg/mL; R&D systems)、Human IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine ELISA Kit (Assay range, 3.9

- 250 pg/mL; R&D systems)、Human IL-6 Quantikine ELISA Kit (Assay range,

3.1 - 300 pg/mL; R&D systems)の説明書の手順に従い測定した。

吸光度計の 450nm 波長の測定値を用いて、スタンダードサンプルから基準曲線を作成し、各検体の濃度を算出した。個々の蛋白濃度は、Bio-Rad protein assay (BIO-RAD) で Bradford 法を用いて測定した総蛋白濃度で補正して解析した。

4. Western blot 法

ヒト検体からはヒト胎盤組織 10mg を Magna Lyser 6500 回転 60 秒でホモジェナイズし、15000rpm 4°C 10 分間遠心し、上清を蛋白抽出液として-80°C保存した。細胞培養実験では、細胞表面を PBS で洗浄後、セルスクレイパー (IWAKI) で剥がした後、細胞浮遊液を 1500rpm 5 分で遠心し、上清を吸引し、ペレットへ CelLytic MT reagent (Sigma-Aldrich Japan) を 500 μ l 加えた。核内蛋白検出には氷水下で超音波破碎装置を 10 分間使用した。その後、15000 rpm, 4°C で 10 分間遠心し、上清を蛋白抽出液とし-80°Cで保存した。蛋白抽出液は測定前に総蛋白濃度を測定し、heat block で 95°C5 分間熱変性を加えた。

Mini-PROTEAN Precast Gels (BIO-RAD) を SDS-PAGE に装着し、各ウェルに 20 μ g

の蛋白をローディングした。iBlot 2 ドライブロットティングシステム (Invitrogen) を使用し、PVDF メンブレン (Invitrogen) へブロットティングした。取り出したメンブレンを iBind™ Flex Solution Kit (Invitrogen) のプロトコールに従って iBind™ Flex (Invitrogen) を使用してブロッキングした。一次抗体は、Anti-PCDGF polyclonal antibody 1/250 (Invitrogen)、Anti-Progranulin 1/400 (R&D)、Anti-Granulin antibody 1/500 (abcam)、Anti-Glucocorticoid Receptor 1/1000 (CST)、Anti-beta actin 1/1000 (CST) を使用した。一次交代の宿主は Rabbit を選択した。HRP 標識二次抗体には 1/1000 (GE healthcare) を使用した。ブロッキング後、TBS-T で洗浄し、Western Chemiluminescent HRP substrate (Merck Millipore) で反応させ、Image Quant LAS 4000 system (GE healthcare) で撮影した。内因性コントロール蛋白として、 β -actin を用いて、相対比較した。

5. 免疫染色

4% paraformaldehyde で固定された検体をパラフィン処理し、5 μ m の厚さで薄切し、連続切片を作成した。切片はキシレンで脱パラフィンし、熱処理 (Microwave、Citrate buffer、pH6.0) し抗原賦活化を行った。0.3%過酸化水

素／メタノールで室温 30 分間、プロテインブロッキングバッファーで室温 10 分間反応させた。一次抗体は、Anti-Granulin/GRN/Progranulin (Sino Biological)、ネガティブコントロールには非特異的 Rabbit Ig (Dako) を使用し、4°Cで一晩インキュベートした。TBS-T で洗浄後、二次抗体 Anti-Rabbit IgG Biotin (Dako) で室温 30 分インキュベートした。TBS-T で再度洗浄後、PO 標識ストレプトアビジン (ニチレイ) で室温 5 分インキュベートした。対比染色としてヘマトキシリン染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

6. 統計解析

統計分析は、JMP Pro ソフトウェア (バージョン 14; SAS Institute Inc、Cary、NC) を使用して実施した。サンプルグループ間の二群比較は、連続データは Mann-Whitney U 検定を行い、カテゴリーデータはカイ二乗検定を行った。多群比較は、Kruskal-Wallis 検定に post-hoc analysis として Steel-Dwass 検定を行った。子宮頸管粘液の PGRN 濃度と SLPI 濃度が、Bishop score との間に相関があるかを調べるために、単一線形回帰分析を実施した。 $p < .05$ を有意差ありとみなした。データは平均±標準偏差として示した。

【検討課題 1 妊娠期における PGRN の発現と頸管熟化の関連について】

PGRN の妊娠・分娩期の発現状態の推移、そして子宮頸管熟化に対する関与について調べるため妊娠女性から得た臨床検体を用いて検討を行った。

【検討課題 1 : 実験方法】

妊娠女性を対象とした検討

妊娠女性の子宮頸管粘液及び子宮頸管細胞の採取と血清検体の収集

2016 年 4 月 1 日から 2019 年 9 月 30 日の期間で東京大学医学部附属病院に通院する妊娠女性から文書による研究参加の同意を得た上で、子宮頸管細胞及び子宮頸管粘液、血清、胎盤を採取した。検体採取は内診を行う際に膣鏡診で子宮頸部を展開し、外子宮頸部に付着した膣分泌物を除去した後、子宮頸管粘液は綿棒を子宮頸管内に 10 秒ほど留置して綿棒に染み込ませて採取し、子宮頸管細胞は綿棒で子宮頸部を擦過して採取した。その後、妊娠中期の場合は経膣超音波断層法を用いて子宮頸管長を測定し、妊娠後期の場合は内診所見として Bishop score を評価した。子宮頸管長は検者間誤差を抑えるために産婦人科専門医である同一検者が測定した。対象は、産科的合併症（妊娠糖尿病、妊娠高

血圧症候群、切迫早産、子宮頸管縫縮術後、前期破水、性器出血）や慢性炎症をひき起こす合併症（糖尿病や関節リウマチ）を認めない妊婦とした。中期妊婦（妊娠 24 週 0 日から 26 週 6 日）の 166 名の子宮頸管粘液を収集した。妊娠 37 週以降に分娩誘発を目的として入院した正常経過の妊婦 49 名より子宮頸管粘液と子宮頸管細胞を入院当日に採取した。サンプルは全て異なる妊婦から採取し、同一妊婦からの繰り返しの採取は行なっていない。血清検体採取のため、研究参加妊婦の末梢血採血を行った。4ml の全血を静置凝固の後に遠心分離した血清を回収して-80℃で冷凍保存した。

子宮頸管細胞からの mRNA 抽出法

子宮頸管細胞サンプルから mRNA を抽出し、筆者のグループの過去の報告と同様の方法で抽出を行った。子宮頸部擦過後綿棒を 1.5ml の RNA 抽出液（FARB buffer、FAVORGEN）内で攪拌し、mRNA 抽出操作へ移行した。子宮頸管粘液サンプルからはタンパク質を抽出した。留置した綿棒を 1ml の PBS-0.25M NaCl 溶液内で攪拌し、4℃下 15000rpm で 10 分間遠心を行い、上清をタンパク抽出液として別容器に回収し、各種タンパク濃度測定まで-80℃で保存した。

臨床データの収集について

東京大学医学部附属病院の診療録より、研究対象となった妊婦の周産期臨床情報を抽出した。研究対象間の頸管熟化の差に影響を及ぼす可能性のある因子として年齢、分娩時週数、妊娠出産歴、出生体重、分娩時間、帝王切開の有無についてデータを収集した。

【検討課題 1 : 結果】

1-1. ヒト妊娠胎盤における PGRN 産生の確認

ヒト胎盤からの PGRN 発現を確認するため、妊娠 37 週の予定帝王切開分娩症例の胎盤を採取し、PGRN の蛋白発現を Western blot 法で確認した (図 4)。PGRN 特異的反応 (88kDa) に加えて、それよりも小さい 52kDa、38kDa、31kDa のサイズのバンドが確認された。そのため、ヒトの胎盤では PGRN が産生されており、その分解産物である GRN も産生されていることが示された。PGRN 分子量は約 88kDa、分解された GRNs は複数のバンドとして検出され特に 52kDa のサイズに最も強い反応が見られた。B actin は 40kDa であった。

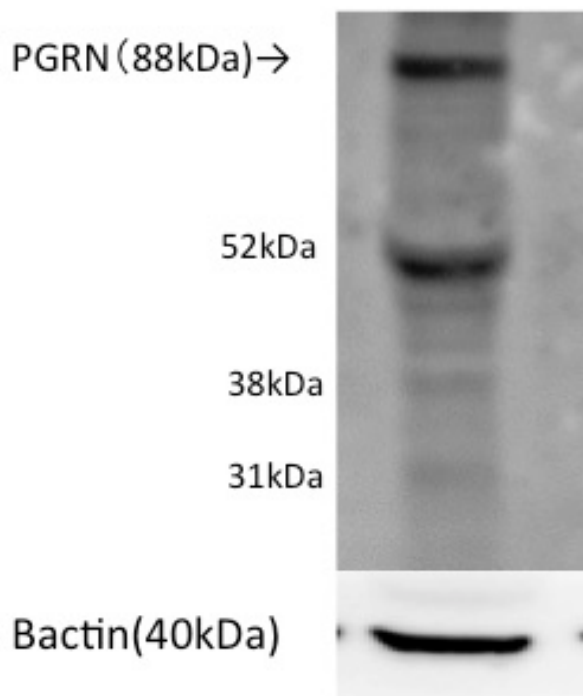


図 4. ヒト胎盤での PGRN 蛋白産生

妊娠 37 週の予定帝王切開分娩症例 3 例から、分娩後の胎盤から絨毛部分を取り出し、PBS で洗浄した後、PGRN 蛋白産生を Western blot 法で解析し、代表的な結果を示した。

1-2. ヒト妊娠中の血清 PGRN 推移

妊娠中期 (23 週 0 日から 28 週 6 日) の妊婦から 16 検体、妊娠後期 (35 週 0 日から 41 週 6 日) の妊婦から 40 検体、産褥妊婦 (分娩後 1 日目から 3 日目) から 16 検体をそれぞれ収集した。そしてそれらの 3 つの異なる妊娠時期で収集した血清サンプルにおいて ELISA 法を用いて PGRN 濃度を測定し、妊娠中の血清中 PGRN 濃度の変化を評価した (図 5)。血清 PGRN 濃度は妊娠後期では、妊娠中期および分娩後に比較して有意に高値 ($p < 0.05$) であった。

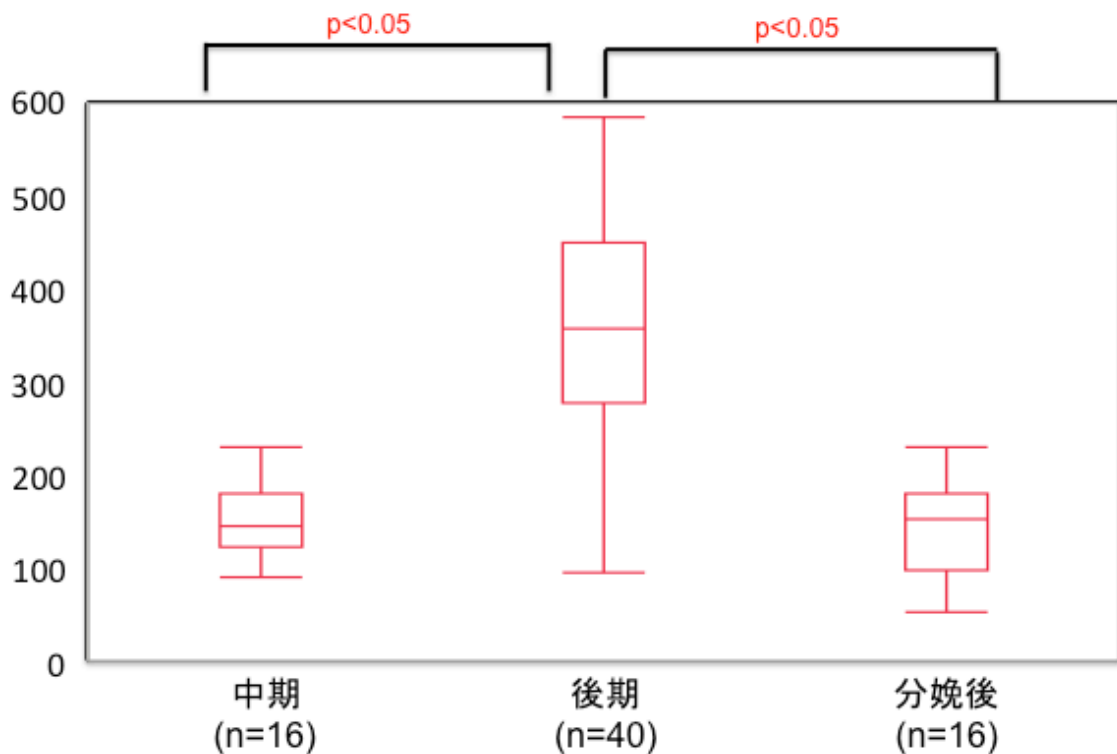


図 5. 妊娠中の血清 PGRN 濃度の時期別比較

横軸：妊娠中期 (n=16)、妊娠後期 (n=40)、分娩後 (n=16)、縦軸：血清中 PGRN 濃度 (ng/ml) とし、妊娠時期別の PGRN 濃度を比較し Mann-Whitney U 検定を行なった。箱ひげ図で表示。

1-3. ヒト妊娠中期の頸管粘液中の PGRN、SLPI と頸管長の関係

妊娠 24 週から妊娠 26 週の妊婦 (n = 166) の頸管粘液を採取し、SLPI、PGRN 濃度を ELISA 法にて測定し、採取時の子宮頸管長との関係を検討した。子宮頸管粘液中の PGRN 濃度と妊娠中期の頸管長には弱い正の相関 ($r=0.16$, $p=0.04$) が見られた (図 6)。一方で、SLPI 濃度は相関を認めなかった。

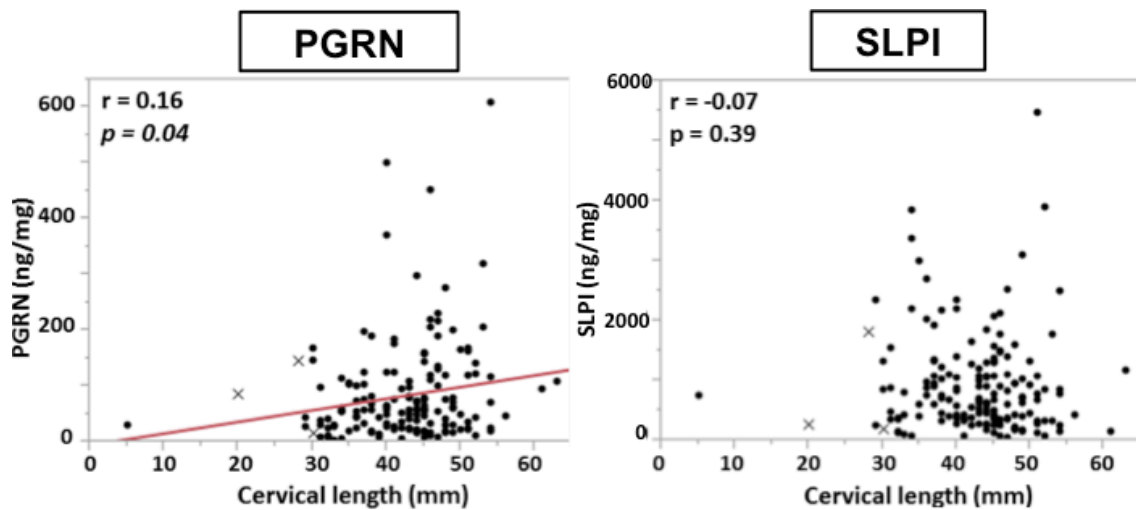


図 6. 妊娠中期における頸管長と PGRN、SLPI の相関

横軸に頸管長 (cervical length) (mm)、縦軸に PGRN 濃度と SLPI 濃度とし、相関関係をドットグラフで示し、Pearson の相関係数 (r) を比較した。●：正期産症例、×：早産症例。左グラフ：PGRN と頸管長の関係 ($r = 0.16$ 、 $p = 0.04$)、右グラフ：SLPI と頸管長の関係 ($r = -0.07$ 、 $p = 0.39$)。PGRN, Progranulin；SLPI, Secretory Leukocyte Protease inhibitor。

1-4. ヒト頸管粘液中の PGRN、SLPI と Bishop score の関係

妊娠 37 週以降に誘発分娩を目的として入院した妊婦（初産婦： $n=36$ 、経産婦： $n=13$ ）を対象として、分娩誘発開始前に内診により Bishop score を評価し、綿棒を用い子宮頸部より頸管粘液を採取した。子宮頸管粘液中の PGRN 濃度と SLPI 濃度を ELISA 法にて測定し、Bishop score との関係について初産婦と経産婦に分けて解析した（図 7）。初産婦を対象とした解析において、子宮頸管粘液中の PGRN 濃度と Bishop score には強い負の相関 ($r = -0.70$ 、 $p < 0.01$) が見られた。一方で、SLPI 濃度と Bishop score の間には相関を認めなかった。

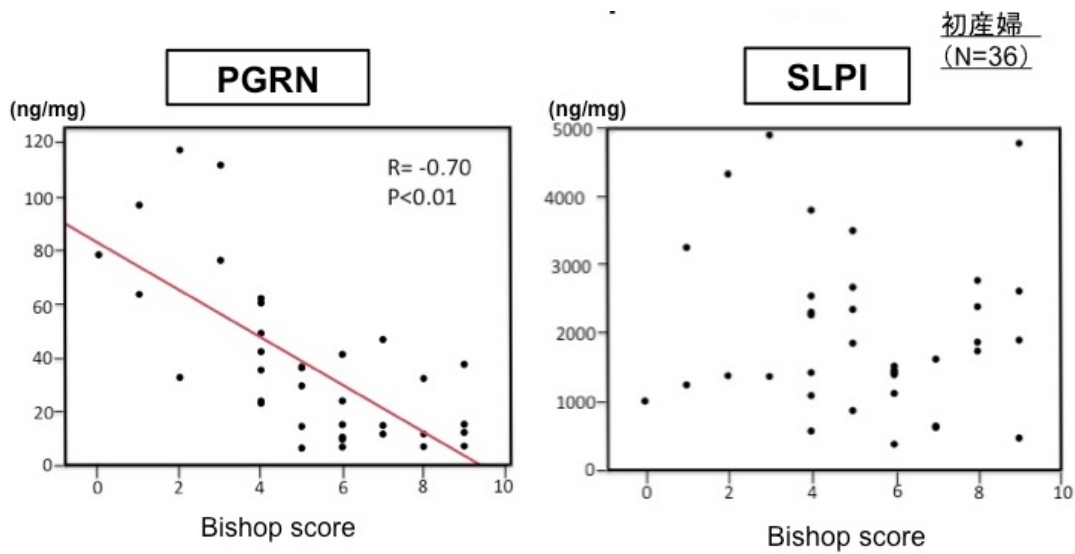


図 7. 妊娠後期初産における Bishop score と PGRN、SLPI の相関
 横軸に Bishop score、縦軸に PGRN 濃度と SLPI 濃度とし、相関関係をドットグラフで示し、Pearson の相関係数 (r) を比較した。左グラフ:PGRN と Bishop score の関係 ($r = -0.70$ 、 $p < 0.01$)、右グラフ:SLPI と Bishop score の関係。
 PGRN, Progranulin ; SLPI, Secretary Leukocyte Protease inhibitor。

さらに、初産婦を Bishop score < 6 を頸管熟化に乏しい未熟化群 ($n=19$)、Bishop score ≥ 6 を頸管熟化が進行した熟化群 ($n=17$) に分けた。両群の臨床情報を表 2 に示す。

	未熟化群 Bishop score <6 (n=19)	熟化群 Bishop score ≥6 (n=17)	P value
年齢	35.0±5.2	33.8±3.8	0.47
妊娠回数	1.2±0.4	1.4±0.7	0.48
分娩週数	39.8±1.1	39.2±1.2	0.24
出生体重(g)	3206±401	3117±363	0.45
帝王切開率 (%)	42.1%(8/19)	17.6%(3/17)	0.15
分娩時間 (分)	529±288 (n=11)	418±217 (n=14)	0.20

平均±SD

表 2 妊娠後期に検体を採取した初産婦 36 名の臨床情報

年齢、妊娠回数、分娩週数、出生体重については、両群間に有意差は認めなかった。未熟化群の方が熟化群よりも帝王切開率が高く、分娩時間については未熟化群の方が熟化群よりも長かったが有意差は認めなかった。続いて、頸管粘液中の PGRN 濃度を両群で比較した。未熟化群では熟化群よりも頸管粘液中の PGRN 濃度は有意に高かった(図 8)。

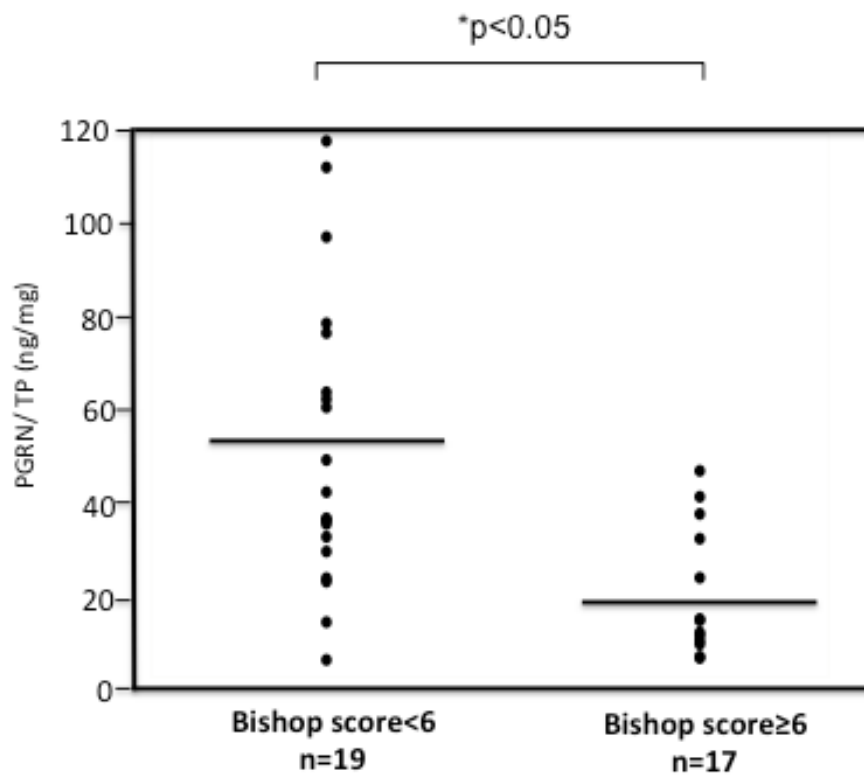


図8 妊娠後期の頸管熟化群と頸管未熟化群での PGRN 濃度の比較
 全 36 検体を、未熟化群 (n = 19) と熟化群 (n = 17) に分け、頸管粘液 PGRN 濃度を比較し Mann-Whitney U 検定を行なった。平均±SD で表示。
 PGRN, Progranulin ; TP, total protein。

経産婦における解析 (n=13) では、PGRN 濃度と Bishop score には有意な相関を認めなかった (図 9)。

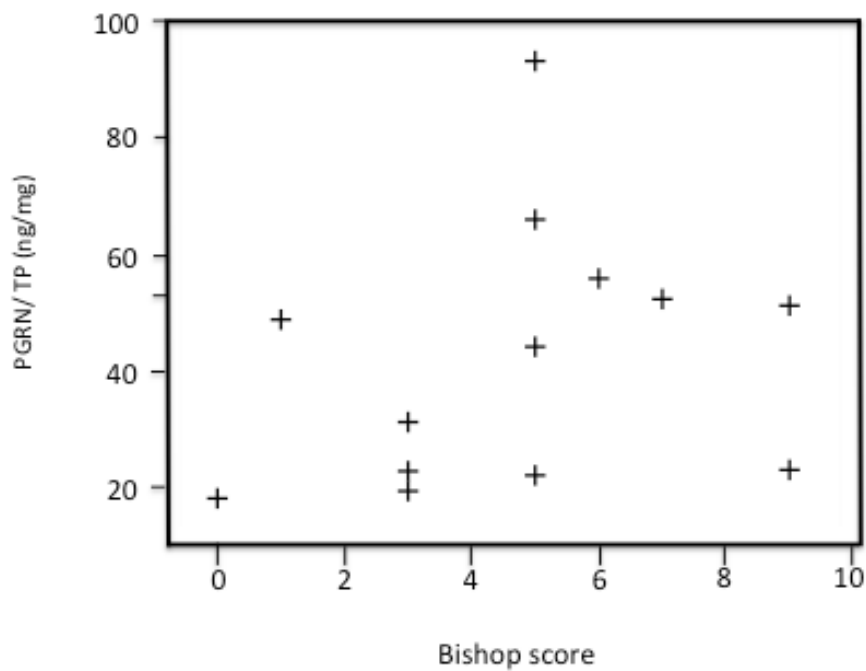


図 9. 妊娠後期経産の PGRN 濃度の Bishop score との相関
 横軸に Bishop score、縦軸に PGRN 濃度とし、ドットグラフで示し、Pearson の
 相関係数 (r) を比較した ($r = 0.27$ 、 $p = 0.37$)。PGRN, Progranulin ; TP, total
 protein。

【検討課題 2 PGRN の発現制御におけるプロゲステロンの役割について】

妊娠・分娩期の子宮頸部において PGRN の発現制御に関わる因子として、特にプロゲステロンの作用に着目して、マウスモデルおよび細胞培養実験による検討を行った。

【検討課題 2 実験方法】

マウスモデルを用いた実験

妊娠マウスの作成

マウスの飼育管理は東京大学が定める施設動物実験規則を遵守した。日本 SLC より購入した 8 週齢の C57/BL6 系統のマウスを SPF 環境下で 12 時間:12 時間の明暗環境下で飼育し、餌や給水は週に 2 回継ぎ足した。交配は、8-12 週齢の雌マウスと雄マウスを一晩同一ケージで飼育して行い、翌朝に膣栓の有無を確認した。膣栓が確認された日の午前 9 時を day 0 と設定した。

早産モデルマウス

ヒトの早産の主要な誘導因子として、プロゲステロン作用減弱 (P 作用減弱) と子宮内感染 (感染炎症) の 2 つがある。本研究では、それぞれの誘導因子に

対応した2種類の早産マウスモデルを用いて検討を行った。それらの早産マウスモデルは既報において確立されたプロトコールに従い作成した[13, 30, 55]。

P作用減弱モデルは、day 14.5にプロゲステロン受容体拮抗薬であるRU486

(Sigma-Aldrich Japan) 150 μ g を200 μ lの70%エタノールに溶解させて皮下投与した。感染性早産モデルは、LPS (from *Escherichia coli* 037M4014V,

Sigma-Aldrich Japan) 10 μ g を経頸管投与した。

分娩遅延モデルマウス

血清プロゲステロンレベルを維持するプロゲステロン投与 (P投与) 分娩遅延モデルと、マウスにおける子宮頸部局所のプロゲステロンレベルを維持する方法としてプロゲステロン代謝酵素であるSRD5Aの阻害剤を投与するSRD5A阻害剤分娩遅延モデルの2種類の分娩遅延モデルを使用し、頸管熟化時の変化を解析した。まず、分娩遅延の表現型確認の実験のために、P投与分娩遅延モデル[56]で、day 17, 18に2mg、1mgのプロゲステロン (Wako) を200 μ lごま油に溶解させて皮下投与した。SRD5A阻害剤分娩遅延モデルでは、day 17, 18に75、25 μ gのSRD5A inhibitorであるDutasteride (Aadoq Bioscience) を200 μ l PBSに溶解させて頸管投与した。Day20 (AM 9:00) の時点で分娩していない個体を分娩遅延ありとした。

マウス検体採取方法（子宮頸管組織）

早産実験では day 15（LPS、RU486 投与 12 時間後）に、分娩遅延実験では day 18.5（プロゲステロンの 2 回目投与 12 時間後）に、マウスをイソフルランによる麻酔下で安楽死後に解剖し、検体を回収した。子宮頸管組織は、子宮体部との境界および膣との境界で子宮頸管を切断し回収した。回収した頸管組織は、mRNA 抽出用には RNA later（Life Technologies）溶液内に、組織免疫染色用には 4% paraformaldehyde（Wako）溶液内にそれぞれ入れた。

細胞培養実験に使用した細胞株と培養方法

ヒト子宮頸部上皮細胞株である End1/E6E7（End1）細胞と Ect1/E6E7（Ect1）細胞を ATCC 社より入手し EpiLife™ CF/PRF Kit（Thermo Fisher）で培養した。ヒト子宮内膜間質細胞の不死化細胞にプロゲステロン受容体を強制発現させた細胞株である EMI-PR 細胞（EM-E6/E7-TERT, established and characterized by Dr. Satoru Kyo, (Kanazawa University, School of Medicine, Kanazawa, Japan)) を DMEM/F-12+5%FBS（チャコール処理済）で培養した。ヒト不死化絨毛外栄養膜細胞株である HTR-8/SVneo 細胞を RPMI -1640+5%FBS（チャコール処理済）を用いて培養した。全ての実験は、3-5 回の継代数の範囲内で、細胞数を計測した

後に使用した。

【検討課題 2 結果】

2-1. マウス早産モデルの PGRN、SLPI の子宮頸管組織 mRNA 発現解析

正常妊娠マウス、および P 作用減弱モデルと感染炎症モデルのそれぞれのマウスの頸管における PGRN と SLPI 発現を確認するために以下の実験を行った。P 作用減弱モデルは、day 14.5 に RU486 150 μ g を 200 μ l の 70%エタノールに溶解させて皮下投与し、事前検討でこの RU486 の投与量では投与後 15-24 時間経過すると約 60% (7/12) が早産に至ることを確認した。感染炎症モデルは、LPS10 μ g を経頸管投与し、投与後 13-20 時間で 100% (5/5) 早産に至ることを確認した。そうした条件検討の後、(1)day 14.5 に RU486 150 μ g 投与し PBS 頸管投与した P 作用減弱モデル群、(2)day 14.5 にエタノール皮下投与し LPS10 μ g 頸管投与した感染炎症モデル群、(3)day 14.5 にエタノール皮下投与してさらに PBS を頸管投与した正常妊娠群の 3 群を用意した。3 群ともに day15 で子宮頸管を摘出し、正常妊娠群では分娩前日の day 18.5 にも頸管を摘出した。収集した子宮頸管組織の PGRN と SLPI の遺伝子発現を real-time PCR 法で解析した (図 10)。

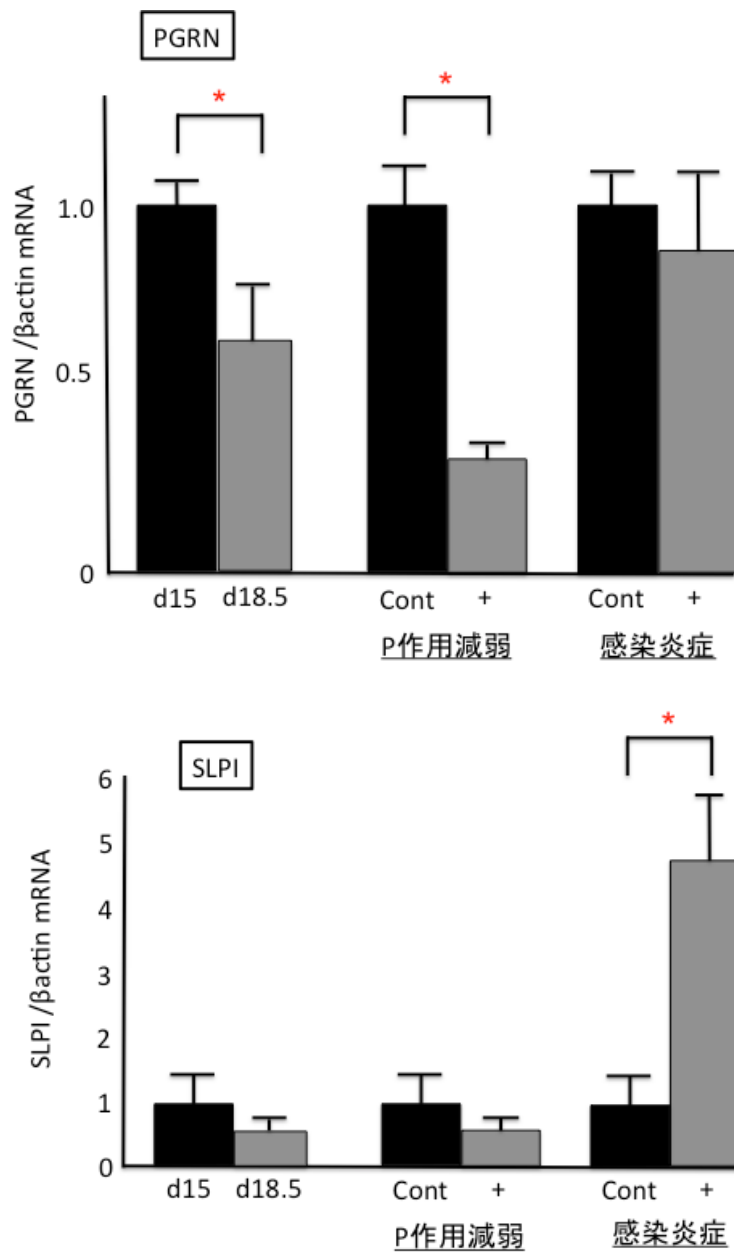


図 10. 早産モデルにおける子宮頸管 mRNA 発現比較

正常妊娠マウスの day 15 を Control 群とし、正常妊娠 day 18.5、P 作用減弱モデル、感染炎症モデルの 4 群間での頸管熟化時の遺伝子発現変化を検討した (Control 群 $n = 8$ 、day 18.5 $n = 5$ 、P 作用減弱モデル $n = 13$ 、感染炎症モデル $n = 5$)。上図：PGRN mRNA の各群の発現比較、下図：SLPI mRNA の各群の発現比較。Mann-Whitney U 検定で各 Control との比較を行った。*= $p < 0.05$ 。PGRN, Progranulin ; SLPI, Secretory Leukocyte Protease inhibitor。

子宮頸管組織の PGRN mRNA 発現は、コントロール群の day 15 との比較では、正常妊娠 day 18.5 と P 作用減弱モデルでは有意に低下しているのに対し、感染炎症モデルでは有意な変化を認めなかった。子宮頸管組織の SLPI mRNA 発現は、コントロール群の day 15 との比較では、正常妊娠 day 18.5 と P 作用減弱モデルにおいて有意な変化はなく、感染炎症モデルでは有意に上昇した。

2-2. 分娩遅延モデルと P 作用減弱早産モデルでの頸管の PGRN 発現

分娩遅延モデルマウスを作成し、早産および分娩遅延誘発効果の事前検討を行った。day 17、18 の AM9:00 に 2mg (n = 4)、1mg (n = 4) のプロゲステロンを皮下投与したところ、day 20 AM9:00 まで全例で分娩が生じることなく経過した。一方、プロゲステロンに変えて 200 μ l ごま油を同じタイミングで投与したコントロール群 (n = 4) では day 20 AM9:00 までに全例が分娩となった。同様に day 17、18 (AM9:00) にプロゲステロン代謝酵素である SRD5A の阻害剤である Dutasteride を頸管投与した。Day 20 AM9:00 までの観察で 25 μ g の投与では 63% (5/8)、75 μ g の投与では 80% (4/5) が分娩遅延した。コントロール群では同じタイミングで Dutasteride をに変えて PBS 200 μ l を投与し、day 20 AM9:00 までに全例が分娩となった (n = 5) (図 11)。

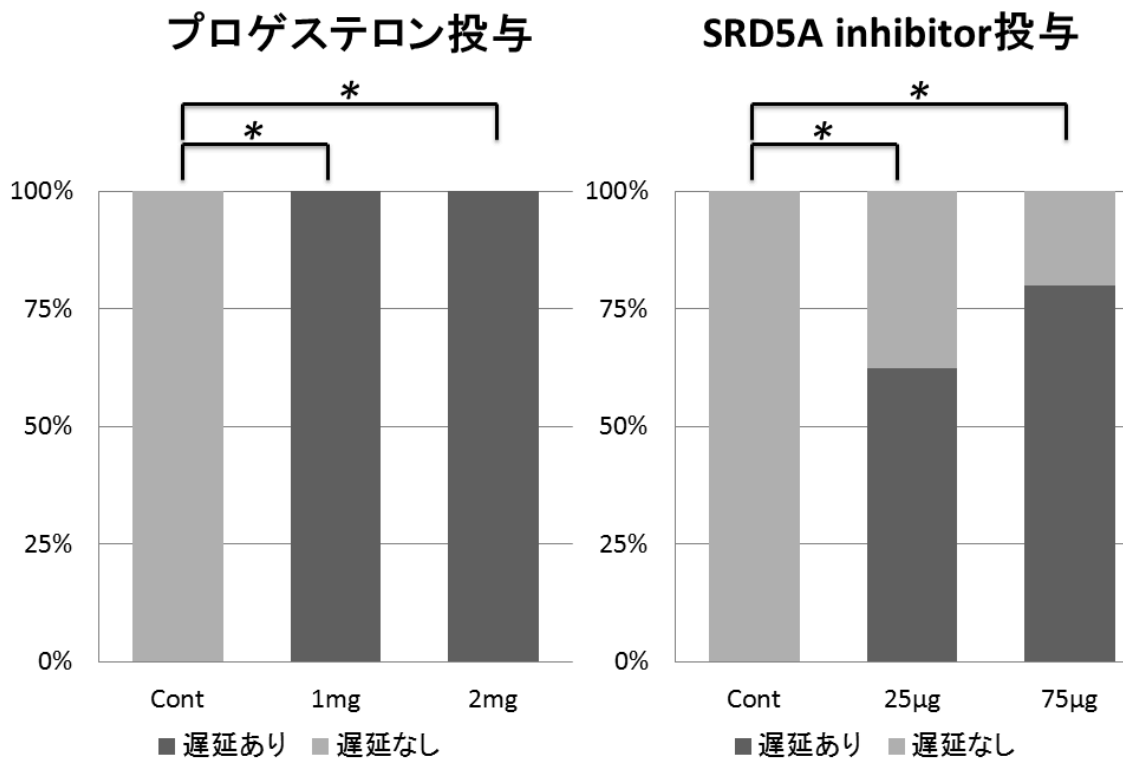


図 11. P 投与、SRD5A 阻害剤投与分娩遅延モデルでの表現型

左グラフ：プロゲステロン 1mg (n = 4)、2mg (n = 4) もしくはごま油 (コントロール、n = 4) 投与時の分娩遅延率。右グラフ：SRD5A 阻害剤 (Dutasteride) 75 µg (n = 8)、25 µg (n = 5) もしくは PBS (コントロール、n = 5) 投与時の分娩遅延率。Mann-Whitney U 検定で各 Control との比較を行った。*= $p < 0.05$ 。

つづいて、頸管組織変化について、分娩遅延モデルに加えて先の正常妊娠群、P作用減弱と感染炎症のそれぞれの早産モデルを含めて検討した。子宮頸部の組織中のコラーゲン繊維の変化を区別するためマッソントリクローム染色を行った (図12)。正常妊娠群のday 15と比較して、感染炎症早産モデルではコラーゲン繊維の量は大きな相違がない一方で、P作用減弱早産モデルではコラーゲン

繊維の減少と共に間質組織の空洞が目立ち組織の浮腫化を認めた。正常妊娠群のday 18.5では、P作用減弱早産モデルと同様の変化を認めた。正常妊娠群のday 18.5とP投与による分娩遅延モデルの比較では、P投与後はコラーゲン繊維の量がday 18.5においても維持されていた。SRD5A阻害剤による分娩遅延モデルでは、プロゲステロン投与よりもコラーゲン繊維間の空洞の増加は認めるものの、正常妊娠のday 18.5と比較してコラーゲン繊維量は維持されていた。

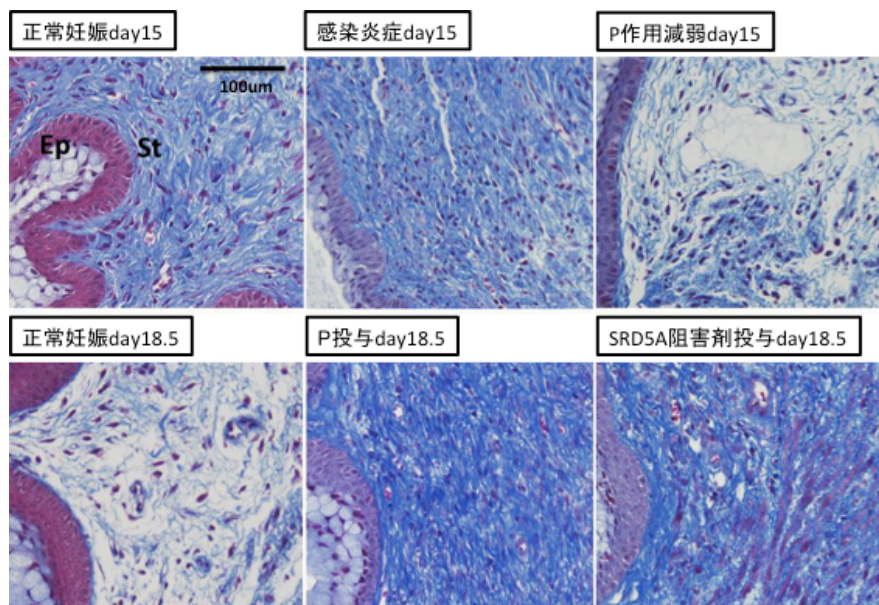


図 12. 各種モデルマウス子宮頸管のマッソントリクローム染色
 それぞれのモデルで薬剤投与後 12 時間の時点での子宮頸管組織を採取し、染色を行った。また、各群 5 匹ずつマッソントリクローム染色を行い代表的な像を示した。コラーゲン繊維は青、繊維素は赤紫、核は黒紫に染まっている。
 P, Progesterone。

さらに、マウスの各モデルにおける PGRN の子宮頸管での PGRN 産生を確認するために免疫染色を施行した(図 13)。

正常妊娠では day 15 および day 18.5 のいずれにおいても間質組織に PGRN の特異的染色を認めたが、染色強度は day 18.5 の方が強かった。正常妊娠 day 15、P 作用減弱早産モデルの間、正常妊娠 day 18.5 と P 投与による分娩遅延モデルの間ではそれぞれ明らかな違いを認めなかった。一方で、P 作用減弱早産モデルと比較して P 投与による分娩遅延モデルでは、間質組織の細胞密度が高く、PGRN 染色が強かった。

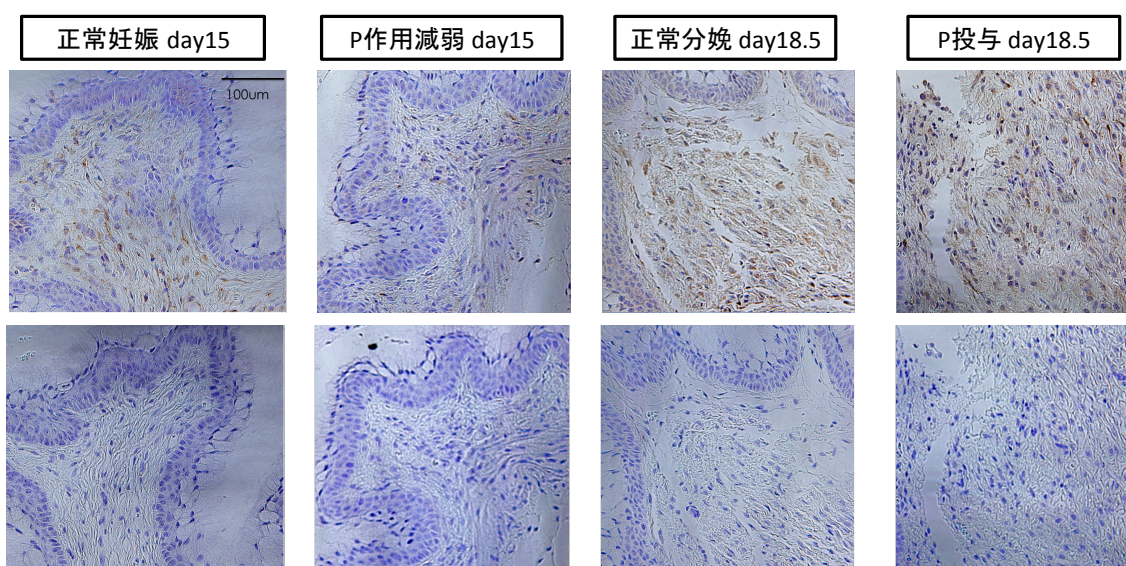
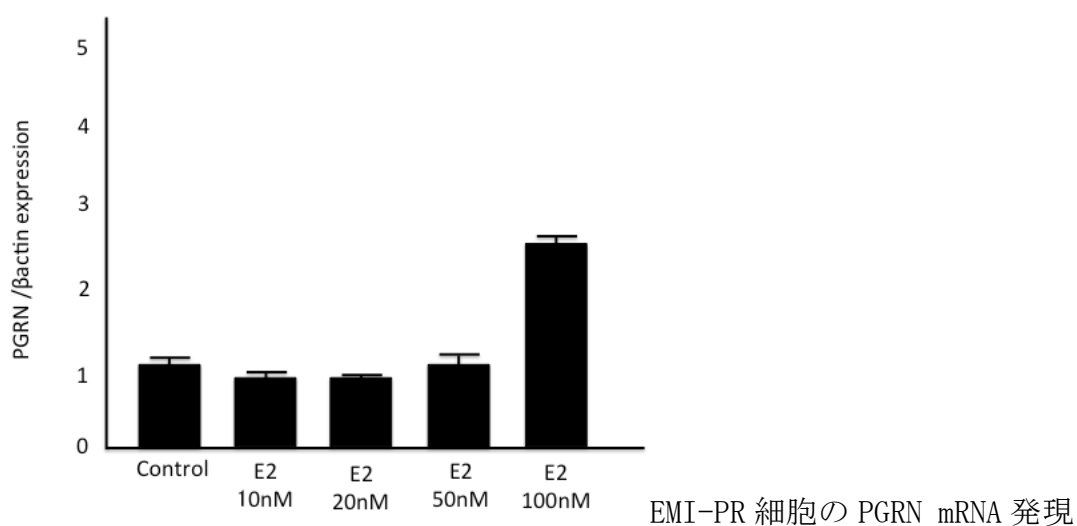


図13. マウス子宮頸管の免疫染色 (PGRN)

それぞれのモデルで薬剤投与後12時間の時点での子宮頸管組織を採取し、PGRN の免疫染色を行った。各群 5 匹ずつ染色を行い代表的な図を示した。下にそれぞれの陰性コントロール検体の染色状態を示す。P, Progesterone ; PGRN, Progranulin。

2-3. 培養細胞に性ホルモンを添加した際の PGRN mRNA 発現解析

マウスモデルの結果から P を含めた性ホルモンが子宮頸部の PGRN 発現の制御に関わる可能性が示唆された。そこで、それを検証するために in-vitro での解析を進めた。子宮内膜上皮由来細胞株に P 受容体を強制発現させた EMI-PR、子宮頸管由来細胞株 End1 のそれぞれの細胞に対してエストロゲン (E2) やプロゲステロン (P4) の刺激を与えて PGRN の発現を調べた。(図 14, 15)。



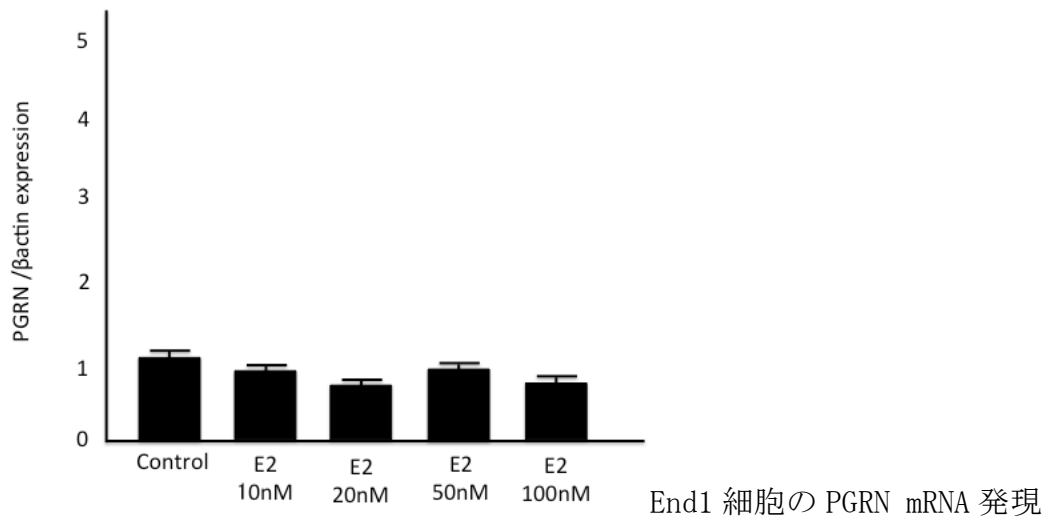
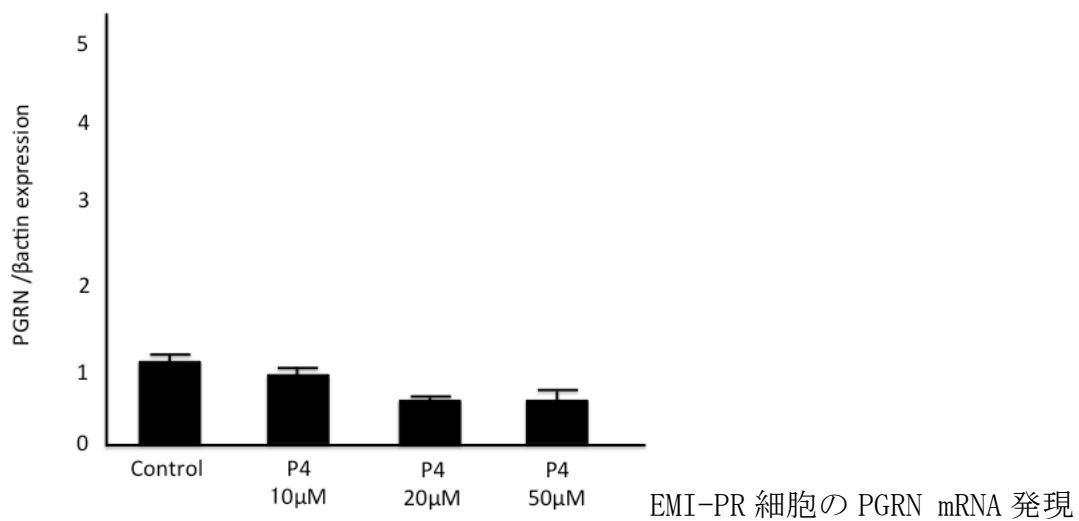


図 14. EMI-PR 細胞と End1 細胞における E2 添加による PGRN の mRNA 発現変化
 各種細胞を 24well ディッシュで培養し 1×10^5 個に調整し E2 濃度を
 (10nM, 20nM, 50nM, 100nM) の 4 群に分け、薬剤投与後 24 時間で細胞を回収し、
 real time PCR 法で PGRN の mRNA 発現を比較した。上に EMI-PR 細胞、下に End1
 細胞の結果を示す。それぞれの条件について 4 回の独立した実験の結果の平均
 \pm SD を表示した。E2、エストロゲン； PGRN, Progranulin。



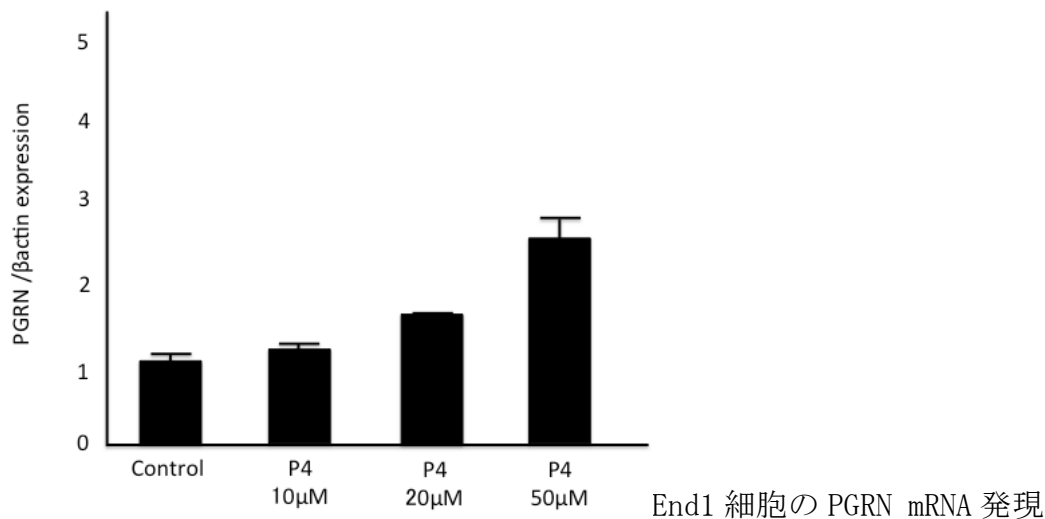


図 15. EMI-PR 細胞と End1 細胞における P4 添加濃度勾配による PGRN の mRNA 発現変化

各種細胞を 24well ディッシュで培養し 1×10^5 個に調整し P4 濃度

($10 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$) の 3 群に分け、薬剤投与後 24 時間で細胞を回収し、real time PCR 法で PGRN の mRNA 発現を比較した。上に EMI-PR 細胞、下に End1 細胞の結果を示す。独立した 4 回の実験において得られた結果の平均 \pm SD を表示。

P4、プロゲステロン ; PGRN, Progranulin。

EMI-PR 細胞では PGRN mRNA は E2 100nM において control と比較して発現が増加していたが、この変化には濃度依存性を認めなかった。一方で P4 の投与による明らかな変化を認めなかった。End1 細胞では E2 投与で PGRN の変化は認めなかった。一方で P4 投与では PGRN は濃度依存的に mRNA 発現の増加を認めた。

End1 細胞における E2 および P4 に対する PGRN mRNA 発現の変化について E2 刺激濃度を 100nM、P4 刺激濃度を $50 \mu\text{M}$ に定めた上で、生理的な状況では E2 と P4 は同時に存在しているため、同時刺激に対する変化を含めて検討した (図 16)。

End1 細胞では、P4 刺激で PGRN mRNA 発現が有意に増加する一方で E2 刺激では有意な変化は生じなかった。

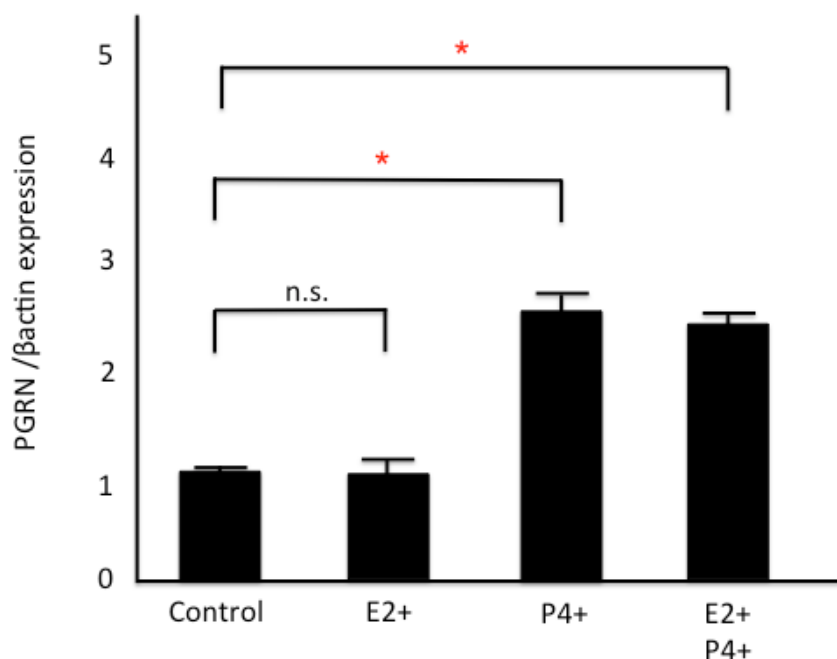


図 16. End1 細胞における E2、P4 同時添加時の PGRN mRNA 発現比較

End1 細胞を 6-well dish で 1×10^5 個に調整し、Control にはエタノールを投与し、E2 100nM の刺激群、P4 50 μ M の刺激群、E2100nM +P450 μ M の刺激群を作成した。全て、薬剤投与後 24 時間で細胞を回収し、real time PCR 法で PGRN mRNA 発現を比較した。Mann-Whitney U 検定を行った。* : $p < 0.05$ 。独立した 8 回の実験において得られた結果の平均 \pm SD を表示。E2、エストロゲン；P4、プロゲステロン。n.s., not significant ; PGRN, Progranulin。

さらに、絨毛細胞由来の HTR 細胞を用いて E2、P4 刺激による PGRN の発現変化を解析した。End1 が示した結果と同様に、P4 刺激で PGRN mRNA 発現が増加する一方で E2 刺激では有意な変化は生じなかった (図 17)。さらに、HTR 細胞について培養上清中の PGRN の濃度を ELISA 法にて測定した。P4 刺激によって PGRN

の上清中濃度 ($p < 0.05$) の増加が確認された。(図 18)

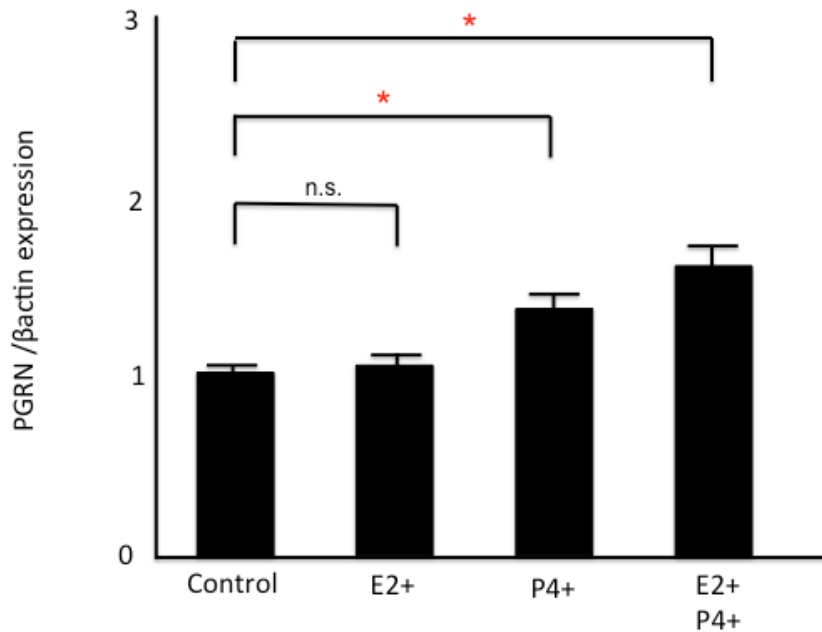


図 17. HTR 細胞での E2、P4 添加時の PGRN mRNA 発現比較

HTR 細胞 2×10^5 個を 6well ディッシュで培養し、Control にはエタノールを投与し、E2 100nM の刺激群、P4 50 μ M の刺激群、E2 100nM +P4 50 μ M の刺激群を作成した。全て、薬剤投与後 24 時間で細胞を回収し、real time PCR 法で PGRN の mRNA 発現を比較した。Mann-Whitney U 検定を行った。* : $p < 0.05$ 。独立した 6 回の実験において得られた結果の平均 \pm SD を表示。E2、エストロゲン ; P4、プロゲステロン。n. s., not significant ; PGRN, Progranulin。

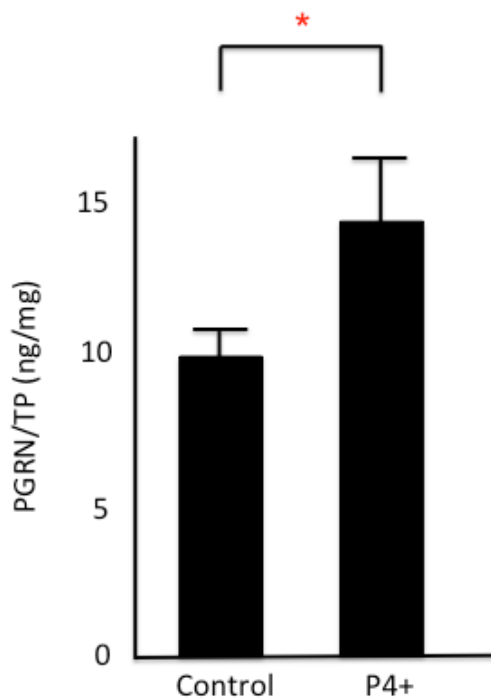


図 18. HTR 細胞での P4 添加時の PGRN 蛋白発現比較

HTR 細胞 1×10^5 個を 24 well ディッシュで培養し、P4 $50 \mu\text{M}$ の刺激群を作成した。薬剤投与後 24 時間で培養細胞上清を回収し、ELISA 法で PGRN の蛋白発現を測定し総蛋白濃度で補正した。独立した 8 回の実験において得られた結果の平均 \pm SD を表示。Mann-Whitney U 検定を行った。* : $p < 0.05$ 。PGRN, Progranulin。P4、プロゲステロン。

2-4. 各種細胞株のプロゲステロン受容体、グルココルチコイド受容体の発現

プロゲステロンシグナルは、細胞内受容体の PR あるいは GR を介して伝達される。前述の実験で示されたプロゲステロン刺激による PGRN の発現増加がいずれの受容体を介しているかを明らかにするため、ヒト子宮頸部上皮細胞株 End1 細胞の PR 発現状態の確認を行った。性ホルモン感受性のある細胞ではエストロゲン (E2) やプロゲステロン (P4) の刺激が PR の発現を誘導することが知られてい

る。無刺激の培養 End1 細胞、E2 100nM もしくは P4 50 μ M の刺激を 24 時間加えた End1 細胞について、PR の mRNA 発現量を real-time PCR 法にて解析した。PR を強制発現させているヒト子宮内膜間質細胞由来の EMI-PR 細胞を陽性コントロールとし、PR が機能していないとされる [57]Ect1 細胞を陰性コントロールとした。(図 19)。End1 細胞では無刺激の状態では PR mRNA 発現レベルは Ect1 細胞と同等であった。また、PR 誘導因子である E2, P4 を加えても有意な PR mRNA 発現増加は生じなかった。

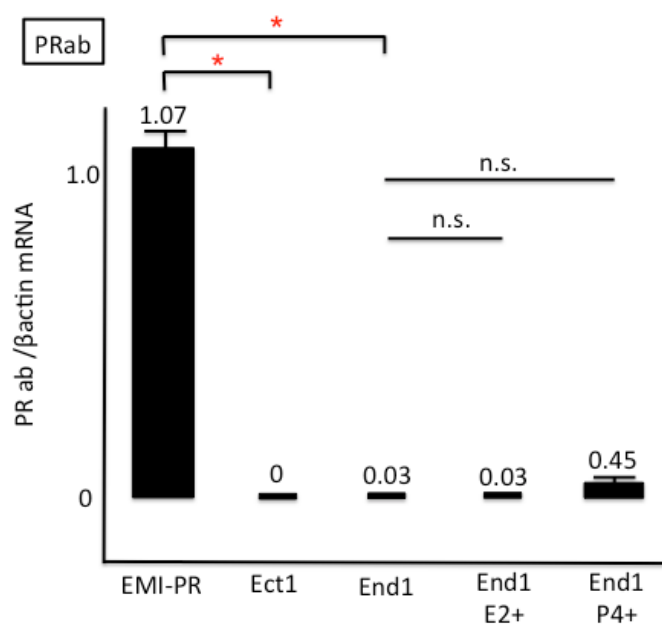


図 19. EMI-PR 細胞、Ect1 細胞、End1 細胞の PR mRNA 発現

それぞれの細胞 2×10^5 個を 6well ディッシュで培養し、End1 細胞には E2 100nM の刺激と P4 50 μ M の刺激を 24 時間加えた後に細胞を回収し、real time PCR 法で PR の mRNA 発現を EMI-PR 細胞、Ect1 細胞と比較した。Kruskal-Wallis 検定に post-hoc analysis として Steel-Dwass 検定を行った。* : $p < 0.05$ 。独立した 8 回の実験において得られた結果の平均 \pm SD を表示。n. s. : not significant ; PR, progesterone receptor。E2、エストロゲン ; P4、プロゲステロン。

HTR 細胞、EMI-PR 細胞、End1 細胞での GR 発現の確認実験

次に、End1 細胞における GR 発現について検討した。ここでは、GR 蛋白レベルでの発現を Western blot 法により解析した。HTR 細胞では GR が発現していることが知られているため、陽性コントロールとして利用した。無刺激、E2 および P4 刺激の状態での GR 蛋白発現を合わせて調べた (図 20)。無刺激のコントロール、E2 100nM の刺激と P4 50 μ M の刺激後 24 時間の時点のそれぞれの条件で GR 蛋白発現を検討した。HTR 細胞では、GR 発現が確認された。End1 細胞では HTR 細胞と比較して低レベルであるが恒常的な GR 発現があり、P4 の刺激に対して GR の蛋白レベルが減弱していた。EMI-PR 細胞においても GR 蛋白が発現していた。

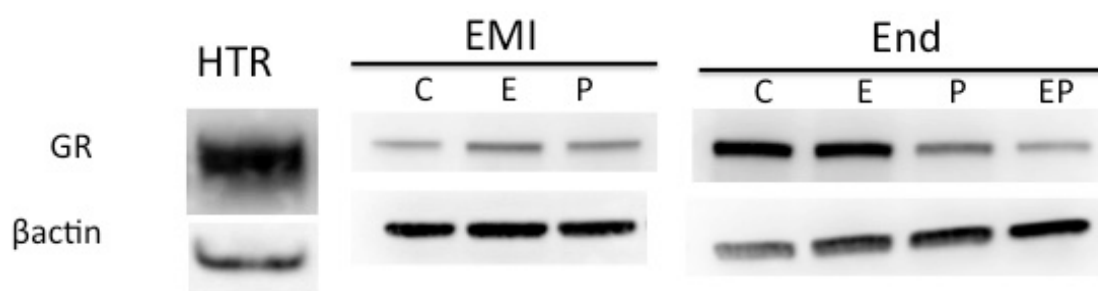


図 20. 各種細胞における E2、P4 添加の有無での GR 発現

1×10^5 個の HTR 細胞、EMI-PR 細胞、End1 細胞を 6-well ディッシュで培養し、E2 100nM の刺激と P4 50 μ M の刺激で 24 時間刺激後に細胞を回収し、Western blot 法で細胞の GR 発現の有無を評価した。無刺激群をコントロール (C) とした。独立した 4 回の実験で得られた代表的な結果を示す。E2、エストロゲン ; P4、プロゲステロン。GR, Glucocorticoid receptor。

2-5. グルココルチコイド受容体特異的刺激による PGRN 発現誘導

プロゲステロンによる PGRN の誘導が、GR を介して行われていることを確認するために End1 細胞に GR 特異的 agonist であるクロベタゾールとデキサメタゾンによる刺激を加えた際の PGRN mRNA 発現を real time PCR 法で解析した(図 21)。

PGRN 発現は、デキサメタゾンの 1nM 濃度の刺激で有意に上昇したが、クロベタゾール刺激では変化を認めなかった。

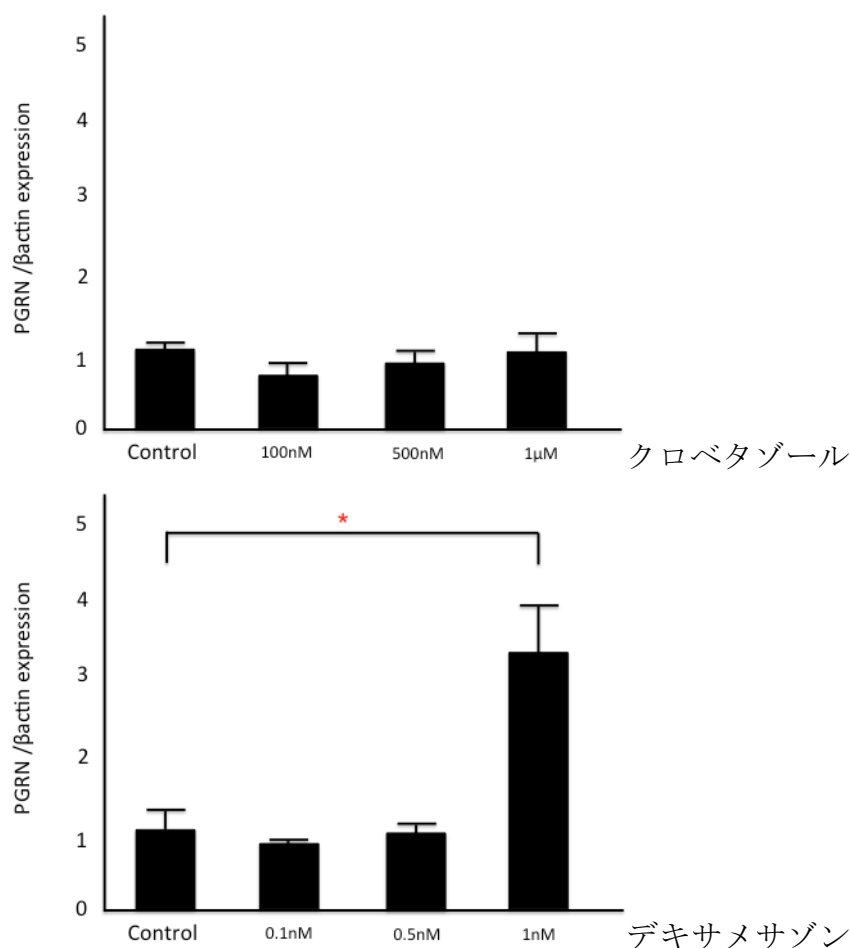


図 21. End1 細胞へのグルココルチコイド刺激による PGRN mRNA 発現
2×10⁵個の End1 細胞を 6well ディッシュで培養し、クロベタゾール (100nM, 500nM, 1μM)、デキサメタゾン (0.1nM, 0.5nM, 1.0nM) の刺激を 24 時間し

た後細胞を回収し、real time PCR 法で PGRN の mRNA 発現を比較した。
Mann-Whitney U 検定を行った。*: $p < 0.05$ 。上：クロベタゾール添加での結果、
下：デキサメサゾン添加での結果。独立した 6 回の実験から得られた結果の平均 \pm SD を表示。PGRN, Progranulin。

【検討課題 3 子宮頸管に対する PGRN による抗炎症作用について】

頸管熟化の制御のメカニズムの中心的な要素である炎症-抗炎症バランスに対して PGRN が関与するという仮説を立てた。TNF- α シグナルに対する PGRN の機能に着目してその仮説の検証を行った。

【検討課題 3 実験方法】

P 作用減弱早産モデルに対する PGRN 投与実験

PGRN の頸管熟化および早産発生に与える影響を調べるために RU486 投与による P 作用減弱早産モデルを用いて検討した。前述の RU486 投与プロトコールに追加して、RU486 の投与の直前に、Recombinant Progranulin 10 μ g/body を子宮頸管に局所投与した (RU+PGRN 群)。PBS のみを頸管に投与した群を RU 群とした (図 22)。検討課題 2 で示した早産マウスモデルと同様のプロトコールで実験を行い、頸管組織を採取した。

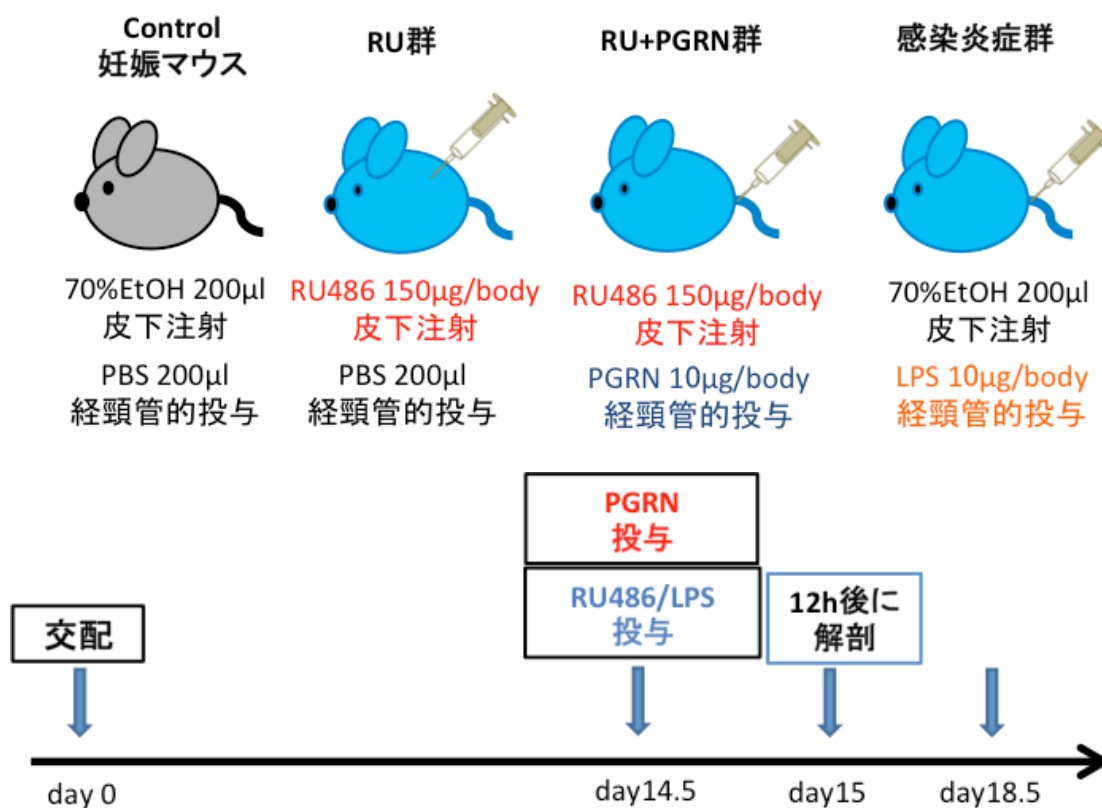


図 22. 各種モデルマウスの投与薬剤と投与時期
PGRN, Progranulin ; LPS, Lipopolysaccharide。

細胞培養実験

PGRN の分子作用として TNF- α シグナルの抑制が知られている。P 作用減弱モデルにおいて PGRN の子宮頸管投与が子宮頸管熟化因子の発現抑制を生じた機序について、TNF- α シグナルとの関係を明らかにすることを目的として in-vitro での検討を行った。ヒト子宮頸管上皮由来細胞 End1 を TNF- α 10ng/ml で刺激してその直後に PGRN 2.5nM を添加して子宮頸管熟化因子である IL-1 β 、IL-6、IL-8 の mRNA 発現量に生じる変化を解析した(図 26, 図 27)。

【検討課題 3:結果】

3-1. P作用減弱早産モデルに対する PGRN 投与実験での早産発生

RU486により誘導される早産発生に対して PGRN が与える影響を調べるため、RU486 投与後の早産発生状況を経時的に観察した。RU+PGRN 群(n=10)と RU 群(n=12)において早産の有無を 12 時間、15 時間、18 時間、21 時間、24 時間に調べた(図 23)。各個体において 1 匹でも胎仔が娩出された時間を早産発生の時間とした。投与後 12 時間までの早産発生はなく、15 時間以降に早産が生じていた。RU 群と RU+PGRN 群の間で早産発生に有意な差を認めなかった。RU486 投与後 24 時間の時点で、RU 群 58.3% (7/12 匹) に対して、RU+PGRN 群では 60% (6/10 匹) の早産発生率であり、両群の間で早産発生率の差異を認めなかった。

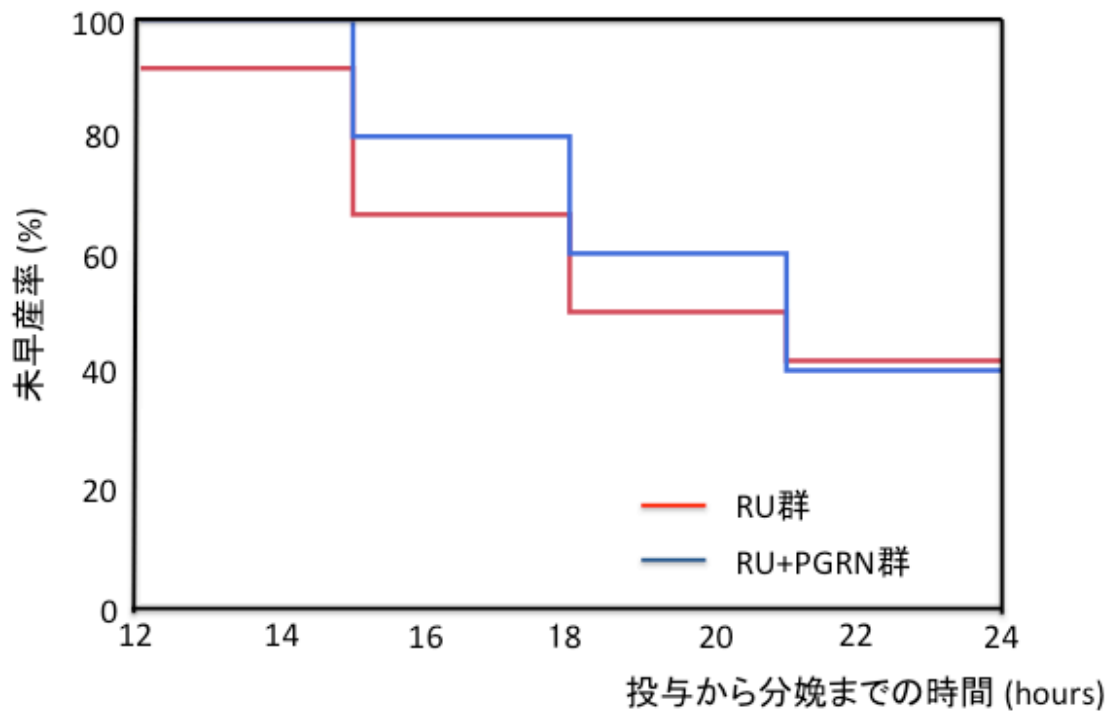


図 23. RU 群と、RU+PGRN 群での早産発生状況

Day 14.5 に RU486 $150 \mu\text{g}$ を $200 \mu\text{l}$ の 70%エタノールに溶解させて皮下投与し PBS のみを頸管に投与した群を RU 群 (赤) ($n=12$)。RU486 の投与の直前に、Recombinant Progranulin $10 \mu\text{g}/\text{body}$ を子宮頸管に局所投与した RU+PGRN 群 (青) ($n=10$) の早産発生状況を生存時間分析した。縦軸を未早産率 (まだ分娩に至っていないマウスの割合) とし、その時間での累積未早産数/全個体数 $\times 100$ (%) で表示した。ログランク検定を行った ($p=0.837$)。

3-2. 頸管熟化関連分子の発現の検討

P 作用減弱早産モデルにおいてマウスの子宮頸管への PGRN 投与に伴う頸管熟化関連因子の発現変化を調べた。RU486 および PGRN 投与の 12 時間後 (早産発生前) の子宮頸管組織における IL-8、IL-6、IL-1 β 、COX2、CXCL2 のそれぞれの mRNA 発現量を real-time PCR 法により定量化した (図 24)。前述の RU 群、RU+PGRN 群に加

えて、正常妊娠day 15のControl群(Cont)、分娩の直前の正常妊娠day 18.5のマウス群(d18.5)、そしてLPS頸管投与による感染炎症早産モデルの妊娠マウス群(LPS)を陽性コントロールとして加えた計5群について検討した。

検討したすべての遺伝子でLPSによる炎症により顕著に発現誘導が確認された。

RU486単独投与によるP作用減弱状態においてもそれらすべての遺伝子発現の上昇が確認されたが、IL-8とIL-1 β ではLPS刺激と比較して上昇の程度が低かった。RU+PGRN群ではこの炎症性サイトカインの誘導が低下していた。

陽性コントロールとしての感染炎症群では、IL-6、IL-8、IL-1 β 、COX2、CXCL2といった炎症性サイトカインのControl群からの有意な上昇を認めていた。

RU群では、コントロール群と比較して、IL-8、IL-6、IL-1 β 、COX2、CXCL2でmRNA発現は感染炎症群よりは低いものの有意な発現上昇を認め、RU+PGRN群ではその発現がRU群よりも総じて低い傾向を認めた。特にIL-1 β では有意な差を持って($p < 0.05$)低い発現を認めた。

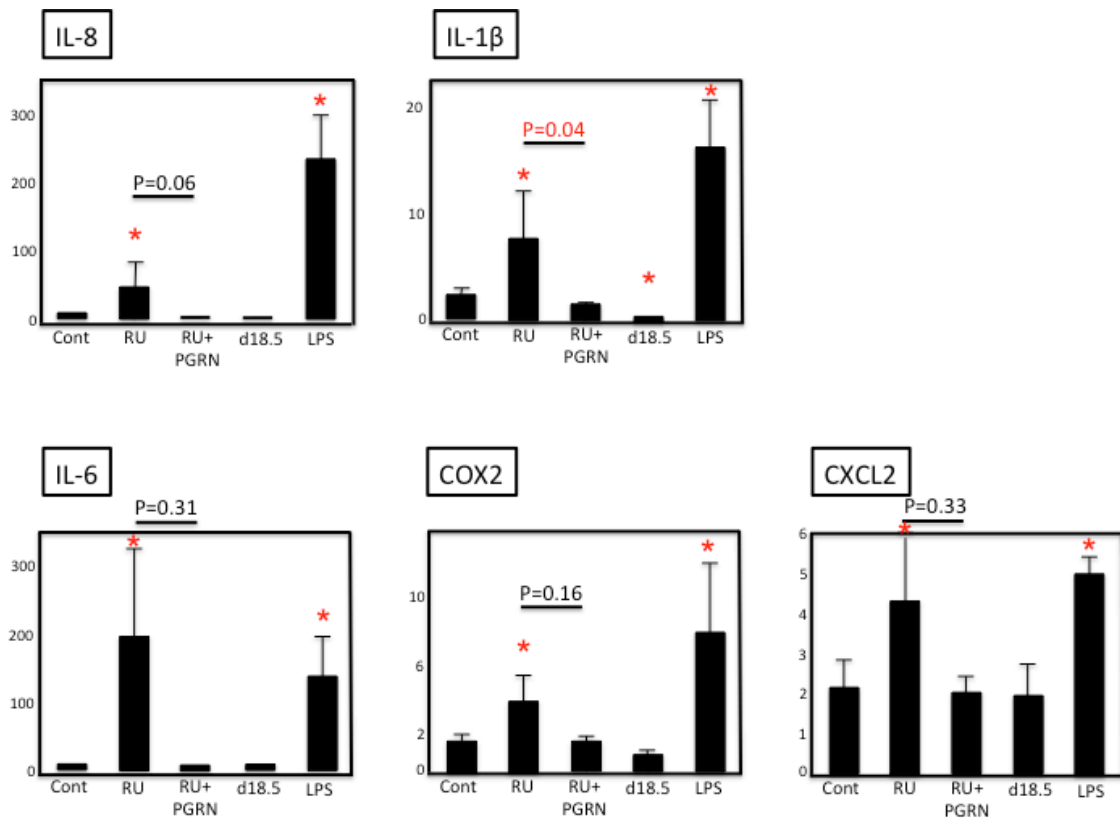


図24. マウス子宮頸管におけるPGRN投与が炎症性サイトカインmRNA発現に与える影響

Cont: day 14.5にPBS経頸管投与とエタノール経皮投与し、day 15に解剖したControl群 n=8、RU:RU486単独投与群 n=8、RU+PGRN: RU486投与の直前に、Recombinant Progranulin 10 μ g/bodyを子宮頸管に投与した群 n=9、d18.5:正常分娩前群 n=5、LPS:感染炎症モデルとしてLPSを単独投与した群 n=5。Day 14.5に薬剤投与して12時間後のday 15に頸管組織を収集し、IL-8、IL-6、IL-1 β 、COX2、CXCL2のmRNA発現をreal time PCR法で解析した。Kruskal-Wallis検定にpost-hoc analysisとしてSteel-Dwass検定を行った。*: p<0.05 vs control群。

3-3. 子宮頸管熟化に伴う組織変化に対するPGRNの影響

RU486投与後に生じる頸管熟化による組織変化に対してPGRN投与が与える影響について検討を行った。子宮頸管組織のマッソントリクローム染色により分

娩前のコラーゲン繊維の変化に着目して解析した。前述のプロトコールにおいてRU群、RU+PGRN群の子宮頸部組織をday 15 (RU486およびPGRN投与後12時間の早産発生前)で採取してマッソントリクローム染色を行った (図25)。Day 15の正常妊娠マウスの子宮頸部組織をコントロール群とした。コントロール群と比較して、RU群では間質のコラーゲン繊維の減少と浮腫化が顕著であった。一方でRU+PGRN群では、RU486投与に伴うコラーゲン繊維の減少および浮腫化は抑制されていた。

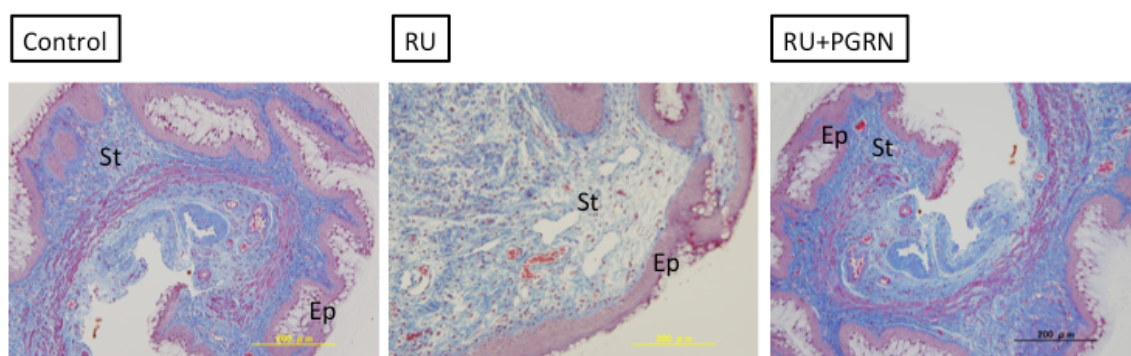


図 25. PGRN 投与によるマッソントリクローム染色の変化

Control : day 14.5にPBS経頸管投与とエタノール経皮投与した。RU群: day 14.5にRU486 150 μ gを200 μ lの70%エタノールに溶解させて皮下投与しPBSのみを頸管に投与した群。RU+PGRN群 : day 14.5にRU486の投与直前に、Recombinant Progranulin 10 μ g/bodyを子宮頸管に局所投与した群。薬剤投与後12時間の時点での子宮頸管組織を採取し、染色を行った。また、各群3匹ずつ染色を行い代表的な図を示した。コラーゲン繊維は青、繊維素は赤紫、核は黒紫に染まっている。Ep=上皮、St=間質。

3-4. 子宮頸管上皮細胞における TNF- α の炎症性サイトカイン発現誘導に対する PGRN の抑制作用

TNF- α 刺激のないcontrol群に対して、TNF- α 刺激により3種類の頸管熟化因子はいずれも有意なmRNA発現上昇 ($p < 0.05$) が確認された。そして、PGRN投与によりそれらの発現上昇がいずれも有意に抑制された ($p < 0.05$)。さらに、培養上清中のIL-6、IL-1 β の濃度を測定したところ、その双方の因子についてPGRNがTNF- α により誘導された分泌増加を有意に抑制していることが示された ($p < 0.05$)。

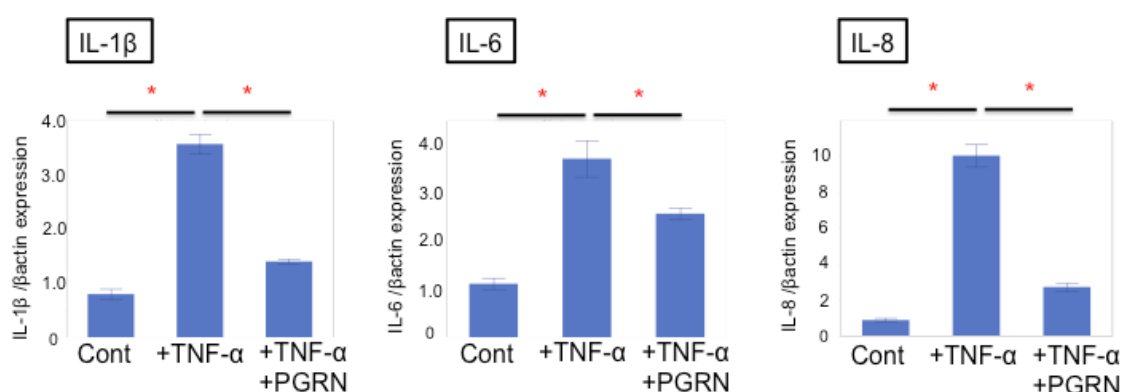


図 26. End1 細胞への TNF- α 刺激と PGRN 投与での炎症性サイトカイン mRNA 発現比較

培養 End1 細胞に対して TNF- α (10ng/ml) で刺激を行いその直後に PGRN (2.5nM) を加えた群 (+TNF- α + PGRN) と加えない群 (+TNF- α) と、TNF- α の刺激を行わないコントロール群 (Cont) の 3 群を用意した。TNF- α 刺激後 4 時間で各群の細胞を回収し、IL-1 β 、IL-6、IL-8 の mRNA 発現を real time PCR 法で比較した。Kruskal-Wallis 検定に post-hoc analysis として Steel-Dwass 検定を行った。*: $p < 0.05$ 。独立した 6 回の実験から得られた結果の平均 \pm SD を表示。

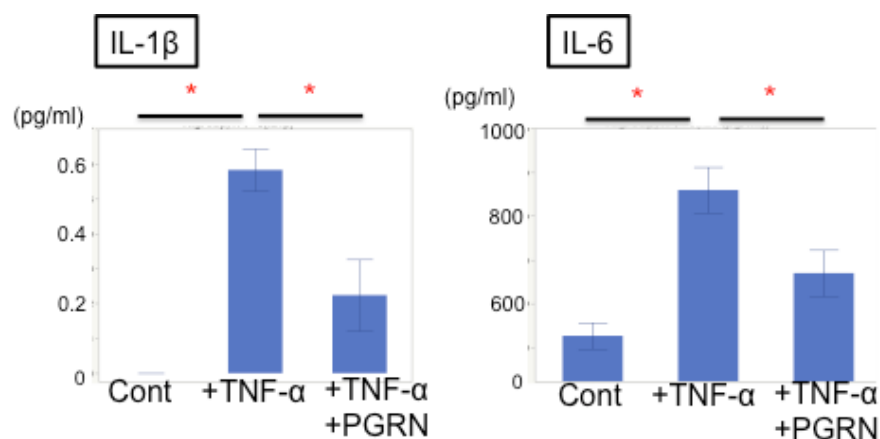


図 27. End1 細胞への TNF- α 刺激と PGRN 投与での炎症性サイトカイン上清比較
 図 26 と同様の細胞群において、TNF- α 刺激の 12 時間後に培養上清を回収し、IL-1 β と IL-6 の濃度を ELISA 法にて測定した。Kruskal-Wallis 検定に post-hoc analysis として Steel-Dwass 検定を行った。*: p<0.05。独立した 6 回の実験から得られた結果の平均 \pm SD を表示。

【考察】

本研究により得られた知見の主要な点をまとめる。妊娠女性の末梢血中の PGRN 濃度は、妊娠中期から後期にかけて増加して分娩後に減少しており、その由来が妊娠子宮および胎盤であることが推測された。初産の頸管粘液中の PGRN 濃度は分娩前の Bishop score と逆相関しており、妊娠中期の子宮頸管長短縮例では低かったことから、子宮頸管における PGRN 産生は頸管熟化の進行と相反する関係が存在することが示唆された。また、早産および分娩遅延マウスモデルにおいて P 作用により子宮頸管の PGRN 発現が維持されており、さらに in-vitro での検討からこの P 作用は GR を介したシグナルを介した PGRN の発現誘導に起因していることが明らかになった。子宮頸管熟化過程における PGRN 関与について、P 作用減弱マウスモデルにおいて得られた結果から、PGRN は頸管熟化を促進する炎症性因子の発現を抑制して子宮頸管熟化の進行に対して拮抗的な作用を発揮していることが示唆された。また、in-vitro での検討において、この PGRN の抗炎症性作用は TNF- α 刺激に対する抑制が背景機序となっていることが推測された。

1. プロゲステロンによる PGRN 制御について

本研究では、正常妊娠では末梢血中の PGRN 濃度が中期から後期にかけて増加して産褥で低下していることが確認され、この変化は一般的に良く知られた妊娠・産褥期のプロゲステロンの血中濃度の変化と一致している。そして、妊婦の血清 PGRN 濃度がプロゲステロンと正の相関があるという過去の報告があり本研究の結果を支持している [53]。本研究では子宮頸管上皮細胞および絨毛細胞が PGRN 産生源となっており、それらの細胞においてプロゲステロンが PGRN の発現促進因子であることを見出した。また、過去の報告によるとミンクの着床期の PGRN 発現に関する解析では、着床後早期の胎盤形成期において絨毛細胞および子宮内膜上皮細胞において豊富な PGRN 発現が確認されている [58]。こうしたことから、妊娠維持の中心的ホルモンであるプロゲステロンが子宮-胎盤における PGRN の産生制御の中心的因子となり、妊婦の末梢血中の PGRN の濃度変化の背景要因となっていることが推測される。

本研究のマウス実験の結果で、子宮頸管における PGRN mRNA 発現は day 15 から day 18.5 に向けて低下していた。PGRN の免疫染色では day 18.5 の頸管で day 15 よりも間質での PGRN 発色増強を認める点に関しては、P 作用減弱による PGRN の発現変化が day18 の時点では mRNA で生じているが蛋白レベルではまだ生じて

いない可能性が考えられる。P 投与による分娩遅延モデルでは、マッソントリクローム染色で P 作用減弱モデルに比べて頸管内コラーゲン繊維量が多く、その際に PGRN が間質において増強していることから、マウス頸管において P 作用によって PGRN 産生が制御されていることが示された。

本研究の細胞実験の結果では、子宮頸管内頸部上皮細胞 End1 では GR 受容体の蛋白レベルでの発現が確認され、かつ GR 特異的アゴニストに反応して PGRN の発現上昇が示された。一方で End1 の PR mRNA 発現は PR の蛋白レベルでの発現がないとされる Ect1 細胞と同等であった [57, 59]。これらのことから、プロゲステロン刺激に対して PGRN 発現が増加する機序として GR を介したシグナル経路が関与すると考えられる。このことは、PR を強制発現している EMI-PR 細胞ではプロゲステロンによる PGRN の増加が見られなかった結果とも一致している。過去の研究において、子宮頸管における別の抗炎症性分泌蛋白である SLPI の発現も GR を介したプロゲステロン作用によって増加することが示された [25]。また、PGRN と SLPI は互いに相互的に作用することが知られている。具体的には SLPI はプロテアーゼの働きを抑制することで PGRN のグラニュリンへの分解を阻止して、PGRN の抗炎症作用を増強する [46]。絨毛細胞由来の HTR 細胞においても P 刺激によって PGRN が mRNA レベルでも蛋白レベルでも増加していた。こう

した一連の知見から GR を介したプロゲステロン作用という共通の制御機構の下で PGRN と SLPI がともに産生増加することにより、組織局所における抗炎症作用が効率的に発揮されるという分子機構が推測される。(図 28)

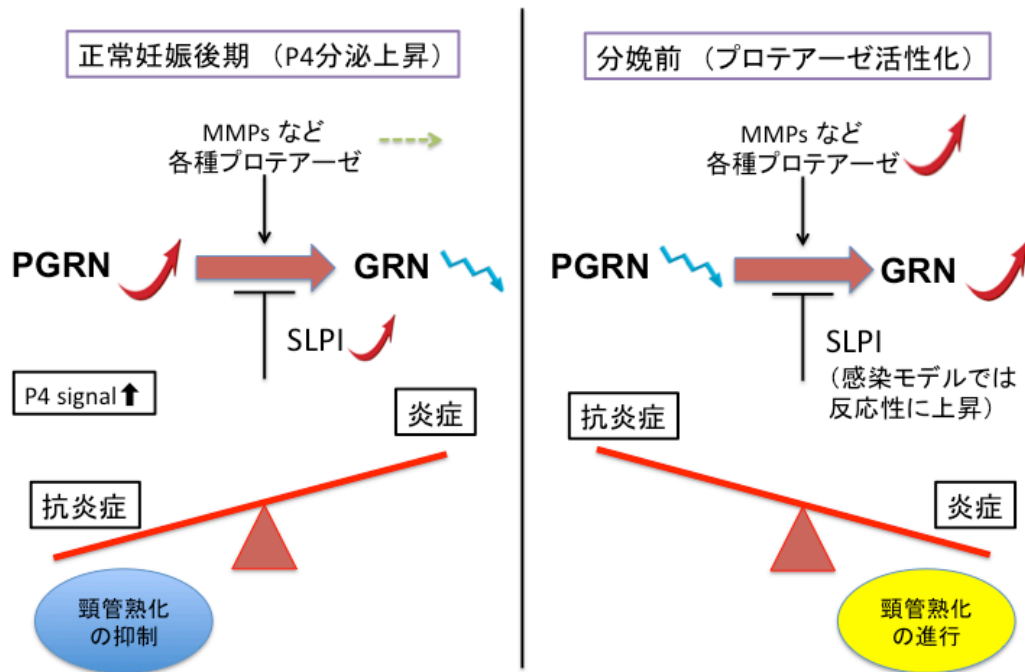


図 28. ヒト子宮頸管における PGRN が頸管熟化抑制に働いている模式図
左：正常妊娠後期の状態、右：分娩直前の状態

P4, プロゲステロン。PGRN, Progranulin ; GRN, Granulin ; SLPI, Secretory Leukocyte Protease inhibitor ; MMPs, matrix-metalloproteinases。

2. PGRN による子宮頸管熟化の抑制と妊娠維持への関与

周分娩期の頸管熟化および陣痛に関する先行研究では、炎症性サイトカイン、ケモカインの働きとそれと連動するプロテアーゼの活性化が指摘されてきた

[27, 28]。そして、それらの炎症・プロテアーゼ活性化をもたらす分娩開始の契機となるのは、プロゲステロン作用の低下であるとされている[7]。RU486を含めたプロゲステロン拮抗薬によりヒト、齧歯類のいずれにおいても早産が誘発されることがそれを証明している。逆に、妊娠中にはプロゲステロンの働きにより抗炎症・抗プロテアーゼの状態が維持されていることで適切な時期まで分娩が開始しないような何らかの精緻な分子機構が存在すると推測されてきた。今回の研究結果は、P作用により発現誘導されるPGRNが、妊娠維持機構の一翼を担っていることを示している。本研究ではP作用減弱モデルで惹起された頸管組織の炎症性因子の発現増加がPGRNの頸管投与により抑制された。PGRNにより発現抑制が確認された因子の中で、IL-1 β 、IL-6は正期産と早産の双方において子宮・胎盤で発現が上昇する代表的な炎症性サイトカインである[60]。また、COX-2は炎症性プロスタグランジンの産生酵素として働いてプロテアーゼの活性化を惹起して、頸管熟化の進行を導く。反対にCOX-2の阻害剤のインドメサシンは強力な子宮収縮抑制効果を発揮する[61]。本研究でPGRN頸管投与により発現が抑制されたそれらの遺伝子の機能からは、PGRNによる分娩進行の抑制効果が予測された。実際に分娩進行に伴う現象の1つである頸管熟化については、頸管組織内のコラーゲン繊維の減少をPGRNが抑制することが確認された。

しかし、最終的な P 作用減弱による早産発生の防止効果は認められなかった。

この結果に対する解釈として、PGRN の機能はプロゲステロンによる妊娠維持機構の一部であり、PGRN の補充だけでは RU486 投与による P 作用減弱の全体を代償することが出来ないということが考えられる。

PGRN は TNF 受容体と結合して、TNF- α のシグナル伝達を阻害することが報告され、特に関節リウマチの病態機序の分野における検討が進んでいる [62]。早産発症の初期段階において、活性化したマクロファージが子宮頸管組織内に集積して TNF- α を産生することが知られており [63]、妊娠マウスに対して TNF- α を投与することにより早産が誘発されることが示されている。そのため、TNF- α は妊娠維持に対して強い負の影響を与えるサイトカインである。本研究の *in-vitro* 実験で、PGRN は TNF- α 刺激に対して頸管上皮細胞に生じた IL-6 および IL-1 β の発現上昇を抑制する効果を示した。こうしたことから子宮頸管において PGRN は TNF- α のシグナル遮断により病的な頸管熟化進行を抑制する作用を発揮して早産発症に対する防御的役割を担っている可能性がある。

P 作用の不全状態とは異なる早産発症原因として絨毛膜羊膜炎などの子宮内感染に伴う感染炎症がある。本研究において LPS 投与による感染炎症早産モデルでは子宮頸管における PGRN の発現変化は認められず、RU486 投与の P 作用減

弱では PGRN 発現低下が生じたことと異なる反応であった。一方で、SLPI の子宮頸管での発現変化については、P 作用減弱により低下することは PGRN と共通であったが、感染炎症に対して SLPI は顕著な発現増加を示し、PGRN の反応とは対照的であった。SLPI と PGRN はいずれも多面的な作用を有する分泌蛋白であり、抗炎症、抗プロテアーゼ作用の面では共通性がある。一方で、SLPI は抗菌ペプチドとしての機能を有し、外来病原体に対する自然免疫系の防御因子としての役割を担う点が PGRN にはない特徴となっている [64]。分子機能の特性に目を向けると、感染性炎症刺激に対しては PGRN ではなく SLPI が上昇することは感染防御の面から合目的であると言える。また、2 つの早産マウスモデルの間での違いとして頸管組織のコラーゲン繊維の変化が確認された。P 作用減弱モデルでは正常分娩前と同様に頸管内コラーゲン繊維量の減少が確認されたのに対して、感染炎症モデルではコラーゲン繊維量の減少が生じないという結果であった。

肺気腫の発症機序に関する研究では SLPI は好中球エラスターゼの働きを中和してコラーゲンを含めた細胞外マトリックスの過剰な分解を抑制することが知られている [65]。本研究の感染炎症モデルの子宮頸管組織でコラーゲン量が維持されていたことは、SLPI の発現上昇による好中球エラスターゼを含めたプロテアーゼの作用が抑制された結果であるのかもしれない。これらの結果から、感

染炎症モデルでは、子宮頸管の熟化より先に子宮収縮が惹起されることで分娩に至ると考えられた。

3. 臨床的観点からの早産機序と PGRN の関係

早産ハイリスクの妊婦に対してプロゲステロンの投与は早産発生を減少させることが示されてきた[36, 37]。臨床上でのプロゲステロンの早産予防効果の背景機序は十分には解明されていない。今回の研究結果から、プロゲステロンにより発現が誘導される PGRN の頸管熟化抑制およびその薬理機序の一端を担っていることが示唆される。子宮頸管長測定は早産リスク評価法として臨床上広く行われている。本研究で頸管長の短縮している症例で頸管粘液中 PGRN 濃度が低値を示したことは、PGRN 濃度低下と早産リスクの関連を示唆している。本研究のマウスモデル、in-vitro 実験から P 作用が PGRN の誘導因子であることが確認されたことと合わせて考えた場合に、頸管粘液中の PGRN 濃度を P 作用による個々の妊婦における妊娠維持能力、早産リスク評価の新たな指標として利用する、あるいは P 投与効果の判定法として活用するという臨床応用のアイデアが考えられる。

過去の早産マウスモデルを用いた研究では IL-6 や TNF- α の中和抗体を用いた早産抑制効果が示されてきた。しかし、抗体治療をヒト妊娠に導入する場合には IgG 抗体の胎盤通過性による胎児への影響の懸念がある。一方で本研究において示されたように PGRN はそうした早産を生じる炎症性サイトカインの作用を広く抑制する作用があり、かつ妊娠中には子宮および胎盤で豊富に産生されている生理的な物質であるため、安全性の高い早産治療アプローチとして PGRN は魅力的な候補分子である。しかし、本研究では PGRN の頸管投与を行ってもマウスの早産発生を抑制できなかったという事実には目を向ける必要がある。その一つの原因として強い炎症状態、プロテアーゼの活性化状態においては PGRN が結果的に GRN へ変換されて抗炎症作用が発揮されないということが考えられる。治療応用という点では PGRN が安定した抗炎症作用を発揮できる人工的な誘導体の作成が必要であるかもしれない。実際に、過去の研究において PGRN の機能を関節リウマチの治療に応用するための試みとしてプロテアーゼ反応部位を欠損した PGRN 誘導体の作成が行われ効果が確認されている[47]。

4. 分娩予知マーカーとしての可能性

陣痛発来の機序は完全には解明されておらず、産科臨床において分娩の時期を正確に予知することは困難である。子宮頸管熟化は分娩に向けての準備段階であり、特に初産婦では頸管熟化に伴う頸管の形態的变化が陣痛発来に先行する。Bishop score は分娩前の頸管熟化を評価する指標として用いられているが、頸管の柔らかさや展退の評価について検者間誤差が大きく客観性の面で問題が指摘されている [10]。本研究では初産婦において子宮頸管の PGRN 濃度が Bishop スコアと強い逆相関の関係を示したことは注目すべき点である。頸管粘液 PGRN 濃度は子宮頸管熟化の評価のための客観性の高い指標として臨床利用が可能であるかもしれない。ただし、初産婦と異なり経産婦においては、Bishop score との相関は乏しかった。これは、経産婦では分娩前の頸管熟化の組織特性が初産婦と異なっていることを示唆している。また、頸管未熟化群の方が頸管熟化群よりも帝王切開率が高く、分娩時間については未熟化群の方が熟化群よりも長かった点については帝王切開となった例では帝王切開による分娩誘発継続が中断されるため、未熟化群では帝王切開例が多いため分娩時間が短くなりやすいことを考慮する必要がある。一方で、過去の研究において、子宮頸管粘液 SLPI 濃度は分娩前に上昇しており、SLPI 自体は Bishop との相関がないにもかかわらず、SLPI の上昇の検出が初産、経産を問わず分娩時期の予測への有用性が高い

ことを報告している[25]。そうしたことから SLPI と PGRN の双方を組み合わせ
て評価することで、さらに分娩時期の予測性を高めることができるかという点
は将来的な研究課題である。

5. 本研究の限界

今回の研究における限界として以下が挙げられる。

ヒト臨床検体において、実際に切迫早産および早産となった症例における頸管
粘液サンプルの検討が出来ておらず、早産との関係について正確な解析ができ
ていない。PGRN の胎盤や頸管における発現の局在や両者のバランスに関しては、
子宮頸管間質細胞の培養や卵膜培養を行っておらず定かではない。同一血清サ
ンプルにおいてプロゲステロン濃度と PGRN の同時測定を行っておらず、また妊
娠中の頸管組織採取は困難であるため頸管組織の直接的な確認を行えていない
ためマウスモデルにおいて示されたプロゲステロンによる子宮頸管における
PGRN 発現調整がヒトにおいても共通しているのかどうかについてはさらなる検
討が必要である。

【結論】

妊娠中 PGRN は胎盤・子宮頸管で産生されており、末梢血中および頸管粘液中に検出される。PGRN はプロゲステロンの作用によりその発現が誘導されることが示され GR を介した作用であることが推察された。PGRN は TNF- α の作用を拮抗して、抗炎症性を発揮して子宮頸管熟化抑制および妊娠維持に関わることを示唆された。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、研究計画の立案、実験、論文の執筆まで手厚くご指導頂いた直接の指導教官である東京大学医学部産婦人科学教室 永松健准教授に深く感謝の意を表します。

また研究協力ならびに助言をいただきました、東京大学医学部産婦人科学教室 藤井知行教授、同 大須賀穰教授、同 入山高行講師、同 熊澤恵一講師、同 鮫島大輝先生に心より感謝いたします。

【引用文献】

1. Word, R.A., et al., *Dynamics of cervical remodeling during pregnancy and parturition: mechanisms and current concepts*. Semin Reprod Med, **25**(1): p. 69-79, 2007.
2. Danforth, D.N., *The fibrous nature of the human cervix, and its relation to the isthmic segment in gravid and nongravid uteri*. Am J Obstet Gynecol, **53**(4): p. 541-60, 1947.
3. Danforth, D.N., et al., *The effect of pregnancy and labor on the human cervix: changes in collagen, glycoproteins, and glycosaminoglycans*. Am J Obstet Gynecol, **120**(5): p. 641-51, 1974.
4. Danforth, D.N., *The morphology of the human cervix*. Clin Obstet Gynecol, **26**(1): p. 7-13, 1983.
5. Vink, J. and M. Mourad, *The pathophysiology of human premature cervical remodeling resulting in spontaneous preterm birth: Where are we now?* Semin Perinatol, **41**(7): p. 427-437, 2017.
6. Limvarapuss, C., N. Kanayama, and T. Terao, *Elastase activity of endocervical mucus in normal pregnancy*. Asia Oceania J Obstet Gynaecol, **18**(2): p. 147-53, 1992.
7. Carbonne, B., *Cervical maturation and labor induction*. Hypertension Research in Pregnancy, **2**(2): p. 59-64, 2014.
8. Wormer, K.C. and A.E. Williford, *Bishop Score*, in *StatPearls*. 2019: Treasure Island (FL).
9. Goepfert, A.R., et al., *The Preterm Prediction Study: association between cervical interleukin 6 concentration and spontaneous preterm birth*. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. Am J Obstet Gynecol, **184**(3): p. 483-8, 2001.
10. Kolkman, D.G., et al., *The Bishop score as a predictor of labor induction success: a systematic review*. Am J Perinatol, **30**(8): p. 625-30, 2013.
11. Navve, D., et al., *Is the Bishop-score significant in predicting the success of labor induction in multiparous women?* J Perinatol, **37**(5): p. 480-483, 2017.

12. Elliott, C.L., et al., *Interleukin 8 expression in human myometrium: changes in relation to labor onset and with gestational age*. *Am J Reprod Immunol*, **43**(5): p. 272-7, 2000.
13. Holt, R., et al., *The molecular mechanisms of cervical ripening differ between term and preterm birth*. *Endocrinology*, **152**(3): p. 1036-46, 2011.
14. Golightly, E., H.N. Jabbour, and J.E. Norman, *Endocrine immune interactions in human parturition*. *Mol Cell Endocrinol*, **335**(1): p. 52-9, 2011.
15. Gravaghi, C., et al., *Cox-2 expression, PGE(2) and cytokines production are inhibited by endogenously synthesized n-3 PUFAs in inflamed colon of fat-1 mice*. *J Nutr Biochem*, **22**(4): p. 360-5, 2011.
16. Swaisgood, C.M., et al., *Coordinate expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 genes in uterine tissues of endotoxin-treated pregnant mice*. *Am J Obstet Gynecol*, **177**(5): p. 1253-62, 1997.
17. Steinborn, A., et al., *Identification of placental cytokine-producing cells in term and preterm labor*. *Obstet Gynecol*, **91**(3): p. 329-35, 1998.
18. Dudley, D.J., et al., *A murine model of preterm labor: inflammatory mediators regulate the production of prostaglandin E2 and interleukin-6 by murine decidua*. *Biol Reprod*, **48**(1): p. 33-9, 1993.
19. Hassan, S.S., et al., *The transcriptome of cervical ripening in human pregnancy before the onset of labor at term: identification of novel molecular functions involved in this process*. *J Matern Fetal Neonatal Med*, **22**(12): p. 1183-93, 2009.
20. Dubicke, A., et al., *Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in human preterm and term cervical ripening*. *J Reprod Immunol*, **84**(2): p. 176-85, 2010.
21. Straach, K.J., et al., *Regulation of hyaluronan expression during cervical ripening*. *Glycobiology*, **15**(1): p. 55-65, 2005.
22. Uchiyama, T., T. Sakuta, and T. Kanayama, *Regulation of hyaluronan synthases in mouse uterine cervix*. *Biochem Biophys Res Commun*, **327**(3): p. 927-32, 2005.
23. Hassan, S.S., et al., *The transcriptome of the uterine cervix before and after spontaneous term parturition*. *Am J Obstet Gynecol*, **195**(3): p. 778-86, 2006.
24. Itaoka, N., et al., *Cervical Expression of Elafin and SLPI in Pregnancy and Their Association With Preterm Labor*. *Am J Reprod Immunol*, **73**(6): p. 536-44,

- 2015.
25. Samejima, T., et al., *Elevated concentration of secretory leukocyte protease inhibitor in the cervical mucus before delivery*. Am J Obstet Gynecol, **214**(6): p. 741 e1-7, 2016.
 26. Samejima, T., et al., *Labor prediction based on the expression patterns of multiple genes related to cervical maturation in human term pregnancy*. Am J Reprod Immunol, **78**(5), 2017.
 27. Garg, D., et al., *Progesterone-Mediated Non-Classical Signaling*. Trends Endocrinol Metab, **28**(9): p. 656-668, 2017.
 28. Feng, T., et al., *The association between serum progesterone level and preterm delivery*. Int J Gynaecol Obstet, **142**(3): p. 308-314, 2018.
 29. Oler, E., A.C. Eke, and A. Hesson, *Meta-analysis of randomized controlled trials comparing 17alpha-hydroxyprogesterone caproate and vaginal progesterone for the prevention of recurrent spontaneous preterm delivery*. Int J Gynaecol Obstet, **138**(1): p. 12-16, 2017.
 30. Dudley, D.J., et al., *Induction of preterm birth in mice by RU486*. Biol Reprod, **55**(5): p. 992-5, 1996.
 31. Cadepond, F., A. Ulmann, and E.E. Baulieu, *RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses*. Annu Rev Med, **48**: p. 129-56, 1997.
 32. Mirkin, S. and D.F. Archer, *Effects of mifepristone on vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 mRNA in Ishikawa cells: implication for the endometrial effects of mifepristone*. Contraception, **70**(4): p. 327-33, 2004.
 33. Zhang, L., et al., *Progesterone receptor antagonist provides palliative effects for uterine leiomyoma through a Bcl-2/Beclin1-dependent mechanism*. Biosci Rep, **39**(7), 2019.
 34. Joachim, R., et al., *The progesterone derivative dydrogesterone abrogates murine stress-triggered abortion by inducing a Th2 biased local immune response*. Steroids, **68**(10-13): p. 931-40, 2003.
 35. Shabaan, O.M., et al., *Vaginal progesterone for prevention of preterm delivery in women with twin pregnancy: a randomized controlled trial*. Facts Views Vis Obgyn, **10**(2): p. 93-98, 2018.
 36. Martinez de Tejada, B., et al., *Prevention of preterm delivery with vaginal progesterone in women with preterm labour (4P): randomised double-blind*

- placebo-controlled trial*. BJOG, **122**(1): p. 80-91, 2015.
37. Hassan, S.S., et al., *Vaginal progesterone reduces the rate of preterm birth in women with a sonographic short cervix: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Ultrasound Obstet Gynecol, **38**(1): p. 18-31, 2011.
 38. Yuan, M., et al., *Leukocytes are primed in peripheral blood for activation during term and preterm labour*. Mol Hum Reprod, **15**(11): p. 713-24, 2009.
 39. Thanh, B.Y.L., et al., *Mode of delivery and pregnancy outcomes in preterm birth: a secondary analysis of the WHO Global and Multi-country Surveys*. Sci Rep, **9**(1): p. 15556, 2019.
 40. Khatibi, T., N. Kheyrikoochaksarayee, and M.M. Sepehri, *Analysis of big data for prediction of provider-initiated preterm birth and spontaneous premature deliveries and ranking the predictive features*. Arch Gynecol Obstet, 2019.
 41. Areia, A.L., et al., *The role of innate immunity in spontaneous preterm labor: A systematic review*. J Reprod Immunol, **136**: p. 102616, 2019.
 42. Dollner, H., et al., *Histologic chorioamnionitis and umbilical serum levels of pro-inflammatory cytokines and cytokine inhibitors*. BJOG, **109**(5): p. 534-9, 2002.
 43. Lahra, M.M. and H.E. Jeffery, *A fetal response to chorioamnionitis is associated with early survival after preterm birth*. Am J Obstet Gynecol, **190**(1): p. 147-51, 2004.
 44. Romero, R., et al., *Prevalence and clinical significance of sterile intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes*. Am J Reprod Immunol, **72**(5): p. 458-74, 2014.
 45. Abella, V., et al., *Progranulin as a biomarker and potential therapeutic agent*. Drug Discov Today, **22**(10): p. 1557-1564, 2017.
 46. Zhu, J., et al., *Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair*. Cell, **111**(6): p. 867-78, 2002.
 47. Tang, W., et al., *The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice*. Science, **332**(6028): p. 478-84, 2011.
 48. Zhao, Y.P., et al., *Progranulin protects against osteoarthritis through interacting with TNF-alpha and beta-Catenin signalling*. Ann Rheum Dis,

- 74(12): p. 2244-2253, 2015.
49. Matsubara, T., et al., *PGRN is a key adipokine mediating high fat diet-induced insulin resistance and obesity through IL-6 in adipose tissue*. *Cell Metab*, **15**(1): p. 38-50, 2012.
 50. Chitramuthu, B.P., H.P.J. Bennett, and A. Bateman, *Progranulin: a new avenue towards the understanding and treatment of neurodegenerative disease*. *Brain*, **140**(12): p. 3081-3104, 2017.
 51. Shankaran, S.S., et al., *Missense mutations in the progranulin gene linked to frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-immunoreactive inclusions reduce progranulin production and secretion*. *J Biol Chem*, **283**(3): p. 1744-53, 2008.
 52. Jian, J., J. Konopka, and C. Liu, *Insights into the role of progranulin in immunity, infection, and inflammation*. *J Leukoc Biol*, **93**(2): p. 199-208, 2013.
 53. Gorkem, U., et al., *Serum progranulin levels are elevated in infertile women with obesity*. *Endokrynol Pol*, **69**(6): p. 661-666, 2018.
 54. Stubert, J., et al., *Acute-phase proteins in prediction of preeclampsia in patients with abnormal midtrimester uterine Doppler velocimetry*. *Arch Gynecol Obstet*, **294**(6): p. 1151-1160, 2016.
 55. Yamashita, A., et al., *Increased tissue levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids prevents pathological preterm birth*. *Sci Rep*, **3**: p. 3113, 2013.
 56. Hashimoto, H., et al., *Comparative study of doses of exogenous progesterone administration needed to delay parturition in Jcl:MCH(ICR) mice*. *Exp Anim*, **59**(4): p. 521-4, 2010.
 57. Haraguchi, H., et al., *MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation*. *Mol Endocrinol*, **28**(7): p. 1108-17, 2014.
 58. Desmarais, J.A., et al., *Spatiotemporal expression pattern of progranulin in embryo implantation and placenta formation suggests a role in cell proliferation, remodeling, and angiogenesis*. *Reproduction*, **136**(2): p. 247-57, 2008.
 59. Gonzalez, J.M., et al., *Cervical remodeling/ripening at term and preterm delivery: the same mechanism initiated by different mediators and different effector cells*. *PLoS One*, **6**(11): p. e26877, 2011.
 60. Leimert, K.B., et al., *Cooperative effects of sequential PGF2alpha and IL-1beta*

- on IL-6 and COX-2 expression in human myometrial cells* dagger. Biol Reprod, **100**(5): p. 1370-1385, 2019.
61. Reinebrant, H.E., et al., *Cyclo-oxygenase (COX) inhibitors for treating preterm labour*. Cochrane Database Syst Rev, (6): p. CD001992, 2015.
 62. Cerezo, L.A., et al., *Progranulin Is Associated with Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis*. Mediators Inflamm, **2015**: p. 740357, 2015.
 63. Melekoglu, R., et al., *Associations between second-trimester amniotic fluid levels of ADAMTS4, ADAMTS5, IL-6, and TNF-alpha and spontaneous preterm delivery in singleton pregnancies*. J Perinat Med, **47**(3): p. 304-310, 2019.
 64. van Wetering, S., et al., *Regulation of SLPI and elafin release from bronchial epithelial cells by neutrophil defensins*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, **278**(1): p. L51-8, 2000.
 65. Stolk, J., et al., *Pulmonary deposition and disappearance of aerosolised secretory leucocyte protease inhibitor*. Thorax, **50**(6): p. 645-50, 1995.