

## 論文の内容の要旨

論文題目 頸管熟化制御における抗炎症性蛋白プログランニューリンの関与

氏名 秋葉 直也

早産（妊娠 37 週 0 日以前の出生）の割合は世界的に増加傾向にあり、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。早産は非常に多数の要因が複雑に相互作用し引き起こされるが膣炎や頸管炎から続発する絨毛膜羊膜炎と子宮内感染/炎症が自然早産の主たる原因と考えられている。妊娠時期に応じた頸管リ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、いまだ未解明な部分が多い。そして分娩前の子宮頸管では、適度な炎症-抗炎症およびプロテアーゼ-抗プロテアーゼのバランスを保つことで過度な炎症による組織障害を防ぐ機構が作用していることが推測されている。Secretory Leukocyte Protease inhibitor (SLPI) は、抗菌・抗炎症・抗プロテアーゼ・組織修復などの多機能を生体内で発揮している物質で、我々のグループでは抗プロテアーゼ作用に着目して妊娠維持や頸管熟化との関連を探索してきた。分娩は制御された生理的な炎症として捉えられてきたが、個々の分子がどのように連動して作用して頸管熟化制御されているのかというその全体像は完全には解明されていない。プログランニューリン (progranulin: PGRN) は胚発生、組織修復、腫瘍形成、および炎症に関与する自己分泌型成長因子であり、SLPI は PGRN が炎症性物質であるグラニューリンに分解されることを阻害することが示されている。PGRN の抗炎症性作用の機序としては TNF (tumour necrosis factor) 受容体に直接結合することで TNF- $\alpha$  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。数多くの慢性炎症に関連する有用なマーカーであると考えられているが、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。

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。各実験は東京大学医学部研究倫理委員会の承認と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。

課題1として、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した。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、血清を採取した。妊娠中期の場合は経膈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。対象は、産科的合併症（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）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。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。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。頸管粘液中のPGRN濃度は分娩前の子宮頸管熟化の指標となる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。

課題2は、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。8 週齢の C57/BL6 系統のマウスを SPF 環境下で飼育し、早産モデルとして妊娠 day 14.5 にプロゲステロン受容体拮抗薬である RU486 を皮下投与したプロゲステロン作用減弱モデルと、妊娠 day14.5 に LPS (Lipopolysaccharide) を経頸管投与した感染炎症性早産モデルを作成した。また、分娩遅延モデルとして、妊娠 day17、18 に血清プロゲステロンレベルを維持するプロゲステロンを皮下投与する分娩遅延モデルと、子宮頸部局所のプロゲステロンレベルを維持する SRD5A 阻害剤を経頸管投与する分娩遅延モデルの 2 種類を作成した。そして、4 種類のマウスの頸管熟化時の変化を解析した。早産および分娩遅延マウスモデルを用いた検討では、プロゲステロン作用減弱による早産モデルマウスでは、頸管熟化が進行し PGRN 発現が低下しているのに対して、プロゲステロン投与による分娩遅延モデルマウスでは頸管熟化が抑制されその際の頸管を免疫染色したところ、プロゲステロン作用減弱モデルと比較して PGRN 染色を強く認めた。細胞培養実験ではヒト子宮頸部上皮細胞株である End1 細胞と、絨毛細胞由来の HTR 細胞を用いて、エストロゲン (E2) やプロゲステロン (P4) の刺激により PGRN が誘導されるかを検討し、両細胞で特にプロゲステロンの刺激が PGRN 発現を誘導していることを確認した。プロゲステロンが作用している受容体を検証し、子宮頸管の PGRN 発現はグルココルチコイド受容体を介したプロゲステロンの作用により強く誘導されていると考えられた。

課題 3 として子宮頸管における PGRN の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、TNF- $\alpha$  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。プロゲステロン作用減弱早産モデルマウスに対して、Recombinant Progranulin を経頸管投与し、早産発生状況を観察し頸管熟化への変化を解析した。また、ヒト子宮頸管上皮

由来 End1 細胞を TNF- $\alpha$  で刺激し、その直後に PGRN を添加して子宮頸管熟化因子の発現量に生じる変化を解析した。プロゲステロン作用減弱による早産誘導マウスに PGRN を経頸管投与した場合、早産自体の発生を抑制することはなかったが、子宮頸管組織の炎症性因子(IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、COX-2、CXCL2)の発現を低下させて分娩前の子宮頸管の組織変化の抑制作用を有することが示された。また、細胞培養実験の検討において、TNF- $\alpha$  刺激のない control 群に対して、TNF- $\alpha$  刺激により 3 種類の頸管熟化因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8)はいずれも有意な mRNA 発現上昇が確認された。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。さらに、培養上清中の IL-6、IL-1 $\beta$  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- $\alpha$  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。

これらの検討結果から、グルココルチコイド受容体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。本研究の細胞培養実験で、PGRN は TNF- $\alpha$  刺激に対して End1 細胞に生じた IL-6 および IL-1 $\beta$  の発現上昇を抑制する効果を示した。この結果から子宮頸管において PGRN は TNF- $\alpha$  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考えられる。PGRN は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魅力的な候補分子である。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。