

## 審査の結果の要旨

氏名 秋葉 直也

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

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、子宮頸管組織の向炎症性因子 (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。

以上、本論文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、ヒト臨床検体とマウスモデルと細胞培養実験を用いて解析から、PGRN が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り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

明らかにした。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。