

論文の内容の要旨

論文題目 プロテアーゼ・抗プロテアーゼバランスが頸管熟化および妊娠維持に及ぼす影響に関する検討

氏名 鮫島大輝

【序文】

子宮頸管熟化は、妊娠維持および分娩において重要な役割を果たしている。頸管熟化の異常は早産を引き起こし、その機序の解明は大切な課題である。我々は、抗プロテアーゼである SLPI とプロテアーゼである好中球エラスターゼ (NE) に着目し、ヒトの臨床検体およびマウス早産モデルでの頸管熟化・早産との関連について検証した。

【研究目的】

1. ヒト臨床検体サンプルを用いて、子宮頸管熟化進行時のプロテアーゼ・抗プロテアーゼバランス変化の解析、およびその他の頸管熟化関連因子を探索する。
2. マウス早産モデルを用いて、子宮頸管 SLPI 発現の制御因子を探索する。また、rSLPI 投与による早産率減少効果の検討および機序の解明をする。
3. ヒト子宮頸管上皮細胞を用いて、SLPI の制御物質を探索する。

【実験方法及び結果】

本研究は、東京大学医学部研究倫理委員会より承認のもと行われた。(承認課題名：妊婦の子宮頸部における感染症・早産に対する粘膜免疫応答に関する研究(承認番号：3434)、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)) 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) ヒト臨床検体サンプルは、患者から書面による同意をとって採取した。

検討1. 臨床サンプルを用いた頸管熟化制御因子の探索

1. 正期産妊婦の子宮頸管細胞 PCR

妊娠 37 週以降の妊婦 (n = 62、117 検体) の子宮頸管細胞で 10 種類の遺伝子の発現を PCR で解析し、主成分分析をしたところ、SLPI、TGF β 1、ILRN の抗炎症遺伝子群の成分が Bishop スコアとともに分娩までの日数と有意に相関した。

2. 正期産妊婦の頸管粘液

妊娠 37 週以降の妊婦 (n = 49、95 検体) の子宮頸管粘液中の SLPI 濃度を測定した。測定から 1 週間以内に分娩になった群と 1 週間以上の群を比較したところ、1 週間以内の群では SLPI 濃度が有意に高値であった。全 95 検体を対象に、SLPI 濃度の結果から 7 日以内に分娩するかどうかを予測するために、ロジスティック回帰分析を行った。ROC 曲線を作成し、カットオフ値を算出したところ、SLPI 濃度が 1.62 μ g/ml で、AUC 0.70 であった。この値から、7 日以内

の分娩の有無を予測した場合、感度 69%、特異度 72%であった。

3. 妊娠中期妊婦の頸管粘液

妊娠 24–26 週の正常妊婦 (n = 166) の頸管粘液を採取し、SLPI、NE 濃度を測定した。採取時の頸管長から、対象を頸管長 35mm 以上の正常群 (n = 142) と 35mm 未満 (n = 24) の短縮群の二群に分け、SLPI、NE 濃度を比較した。頸管長正常群と短縮群の SLPI、NE 濃度を比較したところ、有意差を認めなかった。対象 166 人全体での SLPI と NE との相関係数は $r = -0.26$ ($p = 0.0009$) であり、弱い逆相関を認めた。頸管長正常群、頸管長短縮群の二群に分けて比較したところ、頸管長正常群では $r = -0.14$ ($p = 0.10$) で有意ではなかったが、頸管長短縮群では $r = -0.82$ ($p < 0.0001$) であり、強い逆相関を認めた。

検討 2. マウスモデルを用いた SLPI の頸管熟化への関与

1. マウス子宮頸管組織 mRNA 発現解析

正常分娩、早産モデルにおける子宮頸管組織の SLPI 発現を real time PCR 法で解析した。正常分娩時 (Day15 vs Day 18.5)、RU486 早産モデル (vs control)、LPS 早産モデル (vs control) の 3 種類の頸管熟化時の各遺伝子発現変化を検討した (各群 n = 8)。SLPI 発現は、正常分娩前、RU486 モデルにおいて低下し、LPS モデルでは上昇した。次にプロゲステロン投与分娩遅延モデルにおいて、コントロールと比較して発現低下がキャンセルされるかについて検討したところ (各群 n = 8)。SLPI 発現は、プロゲステロン投与により上昇した。またこれらのモデルにおいて、SLPI 免疫染色を施行し、SLPI がマウス頸管上皮に発現していることを確認した。

2. NE-LPS 早産モデルでの表現型、rSLPI 投与による変化

微量の LPS (3 μ g) 早産モデルにおいて、NE の前投与を行い、早産率を解析した。Day 14.5 日目に LPS 3 μ g を頸管投与した群のうち、LPS 投与 6 時間前に PBS のみ投与した A 群 (n = 10)、NE 0.5 μ g 投与した B 群 (n = 9)、NE 5 μ g 投与した C 群 (n = 9) と、LPS を投与せずに NE 5 μ g と PBS のみを投与した D 群 (n = 5) での早産率を比較した。A、B、D 群では早産率 0% であったのに対して、C 群では 77.8% の早産率であった。NE の前投与後は、通常では早産しない量の微量の LPS でも早産しやすく、NE の前投与は LPS 感受性を上げることが示唆された。この NE-LPS 早産モデルにおいて、rSLPI 投与の有無での早産率を解析した。Day 15 に NE 5 μ g・LPS 10 μ g を頸管投与した 1 時間後に、PBS を投与したコントロール群 (n = 10) と、rSLPI 10 μ g を投与した群 (n = 10) での早産率は、コントロール群で 100% であったのに対して、rSLPI 投与群では 60% であった。この NE-LPS 早産モデルにおいて、rSLPI 投与は早産を抑制した。

3. NE-LPS 早産モデルでの rSLPI 投与による炎症性サイトカインの変化

このモデルにおいて、NE・LPS 投与前 (n = 3)、2 時間後 (n = 4 vs 4)、4 時間後 (n = 3 vs 3) の炎症性サイトカインの変化を子宮・腹腔内で評価し、rSLPI 投与による早産抑制の機序について検討した。子宮頸管組織での CXCL2、KC (CXCL1)、TNF α 、IL6、IL1 β の mRNA 発現を real time PCR 法で解析した。CXCL2 発現は、SLPI 投与群では PBS 投与群と比較して、4 時間後に低かった。KC 発現は、SLPI 投与群で 2 時間、4 時間後に低かった。TNF α 、IL6 は、

SLPI 投与群で低い傾向を認めた。IL1 β は SLPI 投与群と PBS 群で同等であった。子宮頸管洗浄液、腹腔洗浄液での KC、TNF α 、IL6 分泌を ELISA 法で解析した。頸管洗浄液において、SLPI 投与群では、PBS 投与群と比較して、2 時間後で KC、TNF α の分泌が低値であった。KC は 4 時間後でも SLPI 投与群で低値の傾向を認めた。IL6 は同等であった。腹腔洗浄液では、KC、TNF α 、IL6 全てで SLPI 投与群と PBS 投与群は同等であった。

検討 3. 細胞培養実験による SLPI 発現制御機構の解明

1. Ect1 細胞への NE、LPS 刺激下での rSLPI 投与

4 $\times 10^5$ 個の Ect1 細胞（ヒト子宮頸管上皮細胞）を 6well ディッシュで培養し、NE、LPS 刺激を加え、Annexin a1、IKB α の分解の有無を評価し、また、刺激 1 時間前に rSLPI 2.5 μ g/ml を投与し、これらがキャンセルされるかどうか、Annexin a1、IKB α 発現変化を Western blot 法で評価した。NE 0.5、2.0 μ g/ml で刺激すると、コントロールと比べて、IKB α は NE 濃度依存性に発現が低下した。Annexin a1 は NE 2.0 μ g/ml の濃度で分解された。これに対して rSLPI を投与しておく、IKB α の発現低下はキャンセルされた。NE 2.0 μ g/ml での Annexin a1 の分解もわずかに抑制されていた。LPS 5、10 μ g/ml で刺激すると、コントロールと比べて、IKB α は発現が低下したが、2 つの濃度での差はあまり認められなかった。Annexin a1 の分解も認め、10 μ g/ml でより多く分解された。これに対して rSLPI を投与しても、IKB α 、Annexin a1 ともに変化を認めなかった。

2. Ect1 細胞への GR 刺激

2 $\times 10^5$ 個の Ect1 細胞を 6well ディッシュで培養し、クロバタゾール 0.5 μ M、5 μ M 刺激を 24 時間した後、SLPI、DUSP1 (Dual Specificity Protein Phosphatase 1) の mRNA 発現を real time PCR 法で比較した。SLPI、DUSP1 発現は、5 μ M の刺激で有意に上昇した。

【実験結果まとめ】

検討 1 では、正常妊婦の分娩前の子宮頸管熟化進行時の頸管細胞の mRNA 発現を、相同性の高い 3 種類の遺伝子群に分類した。その 3 種類の遺伝子群のうち、抗炎症遺伝子群 (SLPI、TGF β 1、ILRN) が、Bishop スコアとともに、分娩までの日数と関連した。抗炎症遺伝子群のうちの 1 つ、SLPI の頸管粘液の蛋白濃度を測定した結果、分娩予測マーカーとなり得ることを示した。妊娠中期では、頸管粘液中の SLPI 蛋白は、特に頸管熟化の進行過程で NE と拮抗状態にあることを示した。検討 2 では、SLPI がマウスの子宮頸管では、プロゲステロンによるホルモンの制御と LPS などの炎症性の制御の 2 種類を受けていることを示した。また、マウス LPS 早産モデルでは、NE の添加により LPS 感受性が増強され、早産率が上昇した。NE/LPS 早産モデルにおいて、rSLPI 投与が早産率を減少させ、子宮頸管局所での炎症性サイトカイン産生を抑制する傾向を認めた。細胞培養実験で、NE と LPS により誘導した NF κ b 系の活性化に対して、NE の刺激に対してのみ、rSLPI 投与で NF κ b 活性の抑制が示唆された。検討 3 では、ヒト子宮頸管細胞を用いた細胞培養実験で、GR 刺激により SLPI が誘導されることを明らかにし

た。

【考察】

本研究では、ヒト頸管粘液中 SLPI が分娩前に上昇すること、頸管短縮症例で SLPI と NE が拮抗関係にあることを示した。マウスでは SLPI はホルモンと炎症の二つの制御を受けており、NE 誘導性の感染性早産モデルで rSLPI 投与が早産を抑制することを示し、これらが妊娠維持および頸管熟化において重要な役割を果たしている可能性を明らかにした。これらの結果は、SLPI と NE のバランスの崩れが、頸管熟化や早産発症と関与している可能性を示唆し、今後の新たな治療ターゲットとしての可能性を示唆した。