

# 博士論文

論文題目 妊娠における elafin 及び SLPI の生理的、  
病理的役割に関する検討

氏名 板岡 奈央

目次	page
目次	1
略語表	2-4
要旨	5
序文	6-10
実験方法	11-18
結果	19-25
考察	26-35
謝辞	36
引用文献	37-42
図表	43-68

## 略語表

AMPs: antimicrobial peptides

AEC: amniotic epithelial cells

AS: amniotic stromal layer

CAM: chorioamnionitis

COPD: chronic obstructive pulmonary disease

COX2: cyclooxygenase2

CRP: C-reactive protein

CS: chorionic stromal layers

CT: chorionic trophoblast cells

DAB: diaminobenzidine

DC: decidual cells

ELISA: enzyme-linked immuno-sorbent assay

FBS: fetal bovine serum

LPS: lipopolysaccharide

MMP: matrix metalloproteinase

NF- $\kappa$ B: nuclear factor- $\kappa$ B

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PG: prostaglandin

PGDH: prostaglandin dehydrogenase

PROM: preterm rupture of membrane

STAT1: signal transducers and activator of transcription1

SLPI: secretory leukocyte peptidase inhibitor

TBS: tris-buffered saline

TPB: threatened preterm birth

WAP: whey acid protein

## 要旨

子宮内感染は早産の重要なリスク因子であり、その予防は正常な妊娠を維持するための大切な課題である。妊娠子宮において子宮頸部と卵膜は胎児を感染から守る防御機構としての役割を果たしており、我々はその感染防御に関与する自然免疫、中でも **elafin** と **SLPI** という抗菌ペプチドに着目し、それらの生理的意義および早産機序との関連について検証した。

本研究では **elafin** と **SLPI** が妊娠中に子宮頸部と卵膜に恒常的に発現しており、どちらも早産や絨毛膜羊膜炎を発症した症例でその発現が増強することを示し、これらが妊娠中に胎児を感染から守るべく恒常性の維持と自然免疫機構に寄与している可能性が示唆された。

## 序文

早産は日本において妊娠全体の約 5%に発生しており、早産児では出生後の死亡のみならず、生存した場合においても神経発達、呼吸器障害、視力障害など長期的に深刻な影響を及ぼす後遺症を発生するリスクがある。そのため、早産の予防、診断、治療は周産期医学における重大な課題である。子宮内感染は早産の重要なリスク因子であり、早産の原因の約 30-50%を占めると報告されている[1] [2]。出生児の未熟性に伴う後遺症の危険性が高くなる早い妊娠週数での早産ほど子宮内感染の割合が多く、また胎児への直接的な感染の波及により更に児の予後が悪化することが指摘されている[3]。

子宮内感染における病原体侵襲の主要経路は経頸管的な上行性感染と考えられている。つまり、膣炎や子宮頸管炎が先行し子宮内へと波及することが指摘されている[4] [5]。子宮頸管は膣-子宮内腔間に介在した組織である。膣内の病原性微生物が子宮内へ侵入することを防ぐための子宮頸管における免疫防御機構が適切に機能することが安定した妊娠維持に不可欠であると考えられる。また、子宮内に侵入した病原体から胎児を守るための構造物として卵膜は重要な

存在である。胎児を包む卵膜は羊膜、絨毛膜、脱落膜からなる三層の膜で、胎児を外界から遮断し、胎児を感染から守る最後の砦の役割を担っている (Figure1)。早産に先行する病態として絨毛膜羊膜炎 (CAM: chorioamnionitis)や卵膜感染に伴う前期破水 (PROM: preterm rupture of membrane)が挙げられる。CAMは頸管内に侵襲した病原体が卵膜での感染を生じた状態であり、さらに感染が進行して卵膜構造が破綻すると PROM に至る。

子宮内感染の発症から早産に至る機序について Figure2 にまとめた[5]。子宮頸管、卵膜に感染を生じると局所的にマクロファージ、好中球などの免疫担当細胞が集簇する。TNF $\alpha$  や IL-1 $\beta$  を中心としたサイトカインの働きにより炎症が進行し、病原体の排除が行われると同時に、過度な炎症は頸管、卵膜の組織構造の破壊を生じることとなる。更に組織が活性化して産生された IL-8 によって、好中球の組織局所への遊走、浸潤が促され、好中球はセリンプロテアーゼの一種である好中球エラスターゼを分泌し、組織コラーゲンの変性を生じるために子宮頸管では頸管熟化（子宮頸部の軟化、開大）が進行する。卵膜では膜の脆弱化が起こり PROM の引き金となる。また TNF $\alpha$  や IL-1 $\beta$  のそれ自身の細胞傷害性が細胞のアポトーシスを誘導し、卵膜を脆弱化することも破水の原因とな



る。更に  $\text{TNF}\alpha$  や  $\text{IL-1}\beta$  は脱落膜細胞に作用して prostaglandin (PG)誘導酵素である  $\text{COX2}$  (cyclooxygenase2)を増加し、一方で PG を分解する PGDH (prostaglandin dehydrogenase)の活性を抑制する。これによって子宮収縮の促進因子である PG の局所的な作用が増強して陣痛を生じることが指摘されている。

抗菌ペプチド (AMPs: antimicrobial peptides)は、10-100 個程度のアミノ酸から成る短いペプチドで、細菌、真菌、ウイルス等に対して広範囲な抗微生物活性を有する [6] [7]。AMPs の産生は植物、無脊椎動物や脊椎動物など、あらゆる種類の生物で確認されており進化的に保存された自然免疫系を構成する重要な分子機構である。外来病原性微生物と対峙する皮膚および呼吸器、消化管、生殖器官における粘膜上皮、そして好中球などの炎症担当細胞が AMPs の産生の中心となる [8]。AMPs の構造的特徴として、プラス電荷のアミノ酸を多く配列する一方で、親水性と疎水性の両面を有する両親媒性という特徴を持つ。その正確な殺菌機構には未解明の部分があるが、AMPs のプラス電荷がマイナス電荷の細菌の細胞膜に結合し、膜を貫通させ孔を開けて殺菌作用を発揮し、また一部の抗菌ペプチドは病原菌内に入り込み、内部の分子と結合してその作用を阻害することで殺菌作用を示すと考えられている [8] [9] (Figure3)。

elafin と secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI)は AMPs として分類される分泌蛋白である。それらの大きな特徴として、抗菌作用に加えて強い抗プロテアーゼ作用を持つことが挙げられる[10] [11] [12] [13] [14] [15] (Table1)。elafin、SLPI はその蛋白構造から whey acid protein (WAP)ファミリーに属する。この分子群はセリンプロテアーゼの阻害作用を持つ WAP モチーフと呼ばれる構造を持ち、protease inhibitor として働く。分子構造上は elafin と SLPI は約 40%の相同性があり、elafin が一つの WAP モチーフを有するのに対し、SLPI には2つの WAP モチーフが存在する[16] [17] [18]。好中球エラスターゼは炎症が生じた際に好中球から放出されるプロテアーゼで、微生物、異物を分解し、生体を防御する。しかし基質特異性が少ないため、過剰に放出されると自己の組織障害を引き起こす。特に妊婦の子宮頸管の炎症においては、過剰な好中球エラスターゼは子宮頸管や卵膜を構築するコラーゲン繊維を分解し、頸管の熟化や破水の誘因となり、ひいては早産の原因となり得る。elafin と SLPI はその抗プロテアーゼ作用により炎症に伴う過剰なプロテアーゼによる組織傷害を防御する働きを持つことが指摘されている[17]。またこれらのタンパクは炎症関連因子の発現制御に重要な転写因子である NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B)の発現を抑制する作用があり、

炎症性サイトカインの産生とそのシグナル経路を減弱することで抗炎症作用を  
発揮する[16]。

本研究は、子宮頸管、卵膜の感染防御機構における AMPs の役割を明らかに  
することを目的とし、特に、抗菌作用、抗プロテアーゼ作用、抗炎症作用を持  
つ elafin と SLPI に着目して、それらの AMPs の生理的意義および早産機序との  
関連について検討した。

## 実験方法

本研究は東京大学医学部研究倫理委員会より承認を受けている（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）、脱落膜リンパ球と絨毛細胞が、胎盤血管系発達に果たす生理学的、病理学的役割に関する研究（承認番号：3129））。

### 1. 妊婦の子宮頸管細胞の採取

文書によるインフォームドコンセントを取得した上で、外来にて妊婦健診を行っている母児共に合併症の無い正常妊婦 144 名（初期 n=36、中期 n=41、後期 n=36、産褥期 n=31：それぞれの検体は独立した妊婦のものとした）の子宮頸管細胞を採取した。検体採取は、内診時に綿棒にて子宮頸部を擦過し、綿棒を RNA 抽出液 2ml（FARB Buffer, Blood / Cultured Cell Total RNA Purification Mini Kit: FAVOGEN）内で約 5 秒撹拌した後に頸管細胞を回収し、mRNA 発現の解析を行った。また、切迫早産の診断で入院治療を要した妊婦（n=42、妊娠週数 20-35 週）からも同様に検体を採取し、elafin と SLPI の発現について正常妊婦との比較

を行った。更に、正常妊婦 22 名（初期 n=7、中期 n=8、後期 n=7）から同様に綿棒で採取した子宮頸管擦過細胞をスライドグラスに塗抹し、細胞固定液（日本メディポート）にて固定し免疫染色に用いた。

## 2. 切迫早産の診断

下記症状の内の一つ以上に該当する場合に切迫早産と診断し、入院管理を行った。1) 妊娠 28 週以前に経膈超音波にて子宮頸管長が 25mm 以下となった場合、2) 妊娠 35 週以前において、子宮収縮を伴い子宮頸管の開大がみられる場合。本研究では PROM の症例は除外した。切迫早産に対する入院治療は症状に応じて、下記が施された; a) 腹緊計で子宮収縮が確認された場合、子宮収縮抑制薬の経静脈的投与、b) 採血データで白血球上昇または CRP の上昇を認めた場合、抗生剤の投与。

## 3. ヒト子宮頸管細胞由来株の炎症性刺激実験

内子宮口細胞株：End1 / E6E7 (End1)、外子宮口細胞株：Ect1 / E6E7 (Ect1)は SPI 社より入手し、培養液は Keratinocyte-Serum Free Medium (Gibco)を用いた。

すべての実験は 3-5 回の継代回数の範囲の End1、Ect1 を用いて行い、培養細胞が 80%コンフルエントの状態に human recombinant TNF $\alpha$  (1, 10, 50 ng/ml, Life Technologies)、IL-1 $\beta$  (1, 10, 50 ng/ml, Becton-Dickinson and Company Japan)、lipopolysaccharide (LPS (100ng/ml, Sigma)) を括弧内の濃度で添加し、24 時間後に培養上清を回収し、さらに下記の方法で細胞内の RNA を抽出した。

#### 4. ヒト卵膜の初代細胞培養と炎症性刺激実験

卵膜サンプルの採取は合併症の無い選択的帝王切開術の症例 (n=6) から文書による説明同意のもとで行った。卵膜を 10cm 角となるように採取し、前処置として phosphate buffered saline (PBS, Gibco) で洗浄し、付着していた血液などを取り除き、PBS に hyaluronidase (Sigma) を 1mg/ml の濃度となるよう添加したものに 4 $^{\circ}$ C で 30 分ほど置き、卵膜組織を分離しやすくした。その後卵膜をピンセットで羊膜、絨毛膜、脱落膜の 3 層に分離し、それぞれハサミで細断した。0.25% trypsin + EDTA (Gibco) 40ml を加え、攪拌用のフラスコに移し stirrer で攪拌した (37 $^{\circ}$ C、羊膜 60 分、脱落膜・絨毛膜 45 分)。途中 DNase (Invitrogen) を適宜入れて細胞同士が塊化しないようにした。その後細胞溶解液をそれぞれ 100 $\mu$ l

フィルターで濾過し、濾過液に fetal bovine serum (FBS (Gibco)) を少量加えてトリプシンを失活させた。続いて遠心 (400G、15 分) にかけて上清を吸引し細胞ペレットにメディウム (DMEM/F12+10%FBS、antibiotic-antimycotic 10ml/L (Gibco)) 10ml を加えてよく攪拌したものを再度遠心し細胞ペレットを  $1 \times 10^5 \sim 6$  cells/ml の細胞濃度となるように同メディウムに溶解し 12 well プレート上で培養を行った。培養細胞が 80%コンフルエントとなった所で、End1、Ect1 と同様に TNF $\alpha$  (1, 10, 50 ng/ml)、IL-1 $\beta$  (1, 10, 50 ng/ml)、LPS(100ng/ml)を括弧内の濃度で添加し、24 時間後に培養上清を回収し、さらに下記の方法で細胞内の RNA を抽出した。

#### 5. RNA の抽出と reverse transcription (RT) 法

子宮頸管細胞の検体、培養細胞からの total RNA の回収は Blood / Cultured Cell Total RNA Purification Mini Kit (FAVOGEN) を用いて行った。分光光度計 (Epoch Micro-Volume Spectrophotometer System: Bio-Tec) による RNA の純度の確認を行い、吸光度比 260nm/280nm が 1.7~2.1 となる検体を使用した。Rever Tra Ace Kit (TOYOBO) を用いて total RNA を cDNA に逆転写した。反応液は総量 40 $\mu$ l (5xRT buffer 8 $\mu$ l、deoxynucleotide triphosphate 4 $\mu$ l、10U/ $\mu$ l RNase inhibitor 4 $\mu$ l、Rever Tra

transcriptase 2 $\mu$ l、randome primer 2 $\mu$ l、サンプル RNA 22 $\mu$ l) とし、サーマルサイクラーの設定は 30°C10 分→42°C20 分→99°C5 分とした。

## 6. Real time polymerase chain reaction (real time PCR)法

培養細胞内の elafin と SLPI の発現を real time PCR 法にて比較検討した。各分子の mRNA 特異的 primer の配列を Table2 に示す。測定には Light Cycler 480 SYBR Green I (Roche) を使用した。PCR 反応液は総量 20 $\mu$ l とし内容はサンプル 5 $\mu$ l (cDNA5ng)、CYBR Green master mix 10 $\mu$ l、RNase free water 3 $\mu$ l、forward および reverse primer (10 $\mu$ M)をそれぞれ 1  $\mu$ l とした。PCR のプロトコールは 95°C10 分間の denature に続いて、95°C10 秒→annealing10 秒→72°Cproduct size/25bp 秒の PCR サイクルを 40 サイクル行った。それぞれの primer pair における annealing、extension の条件は Table2 に示す。サンプル間の mRNA 量補正のため  $\beta$ -actin mRNA の含有量を内部コントロールとした。

## 7. Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) 法



培養細胞上清中の elafin と SLPI タンパク濃度はサンドウィッチ ELISA 法を用いて測定した。elafin の測定には DuoSet ELISA Development System (R&D system) を使用し、SLPI の測定には Quantikine ELISA kit (R&D system) を使用した (測定可能濃度: elafin ~ 2000 pg/ml、SLPI ~ 1000 pg/ml)。基準曲線はスタンダードサンプルを使用して吸光度計による 450nm 波長の測定値を用いて作成した。それぞれのサンプルを測定してこの基準曲線を用いて濃度を算出した。

## 8. 免疫染色

子宮頸管細胞は綿棒で採取後スライドグラスに塗抹し、細胞固定液 (日本メディポート) にて細胞固定した。卵膜組織はパラフィン包埋標本を作成して切片にした。パラフィン切片は前処置としてキシレン、エタノールを用いて脱パラフィン処理を行った後、10mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) による micro wave 処理を行い、抗原賦活化を行った。その後は細胞塗抹標本、組織検体ともに Envision kit (DAKO) を用いて共通の方法で免疫染色を行った。内因性 peroxidase の除去のため peroxidase blocking solution 内で 20 分浸した後 tris-buffered saline (TBS) で洗浄した。非特異的反応のブロッキングのため protein block serum free

に 20 分間浸した後 TBS で洗浄した。一次抗体には elafin (Atlas Antibodies、希釈率 1: 400) 、 SLPI (Hycult biotech、希釈率 1: 50) を、それぞれの negative control として Rabbit Immunoglobulin Fraction (Dako) と Normal Mouse IgG1 (Dako) を同様の希釈率で使用した。希釈した 1 次抗体と 4℃で一晩反応させた後 TBS で 3 回洗浄し、2 次抗体希釈液 Dako Envision Dual Link System-HRP と室温で 1 時間反応後、TBS で 2 回洗浄した。diaminobenzidine (DAB) で発色し、マイヤーヘマトキシリン溶液にて核染色を行った。脱水、透徹、封入し、光学顕微鏡下で観察した。染色の強度を比較するために、免疫染色スコアによる評価を行った (0: 染色されず、1: 弱程度染色あり、2: 中等度染色あり、3: 強度染色あり) [19]。検体に関する臨床情報を知らされていない 3 人でそれぞれスコアリングを行いその平均を各検体の染色スコアとして統計解析を行った。

## 9. 統計解析

統計解析には JMP pro9.0 (SAS) を使用した。免疫染色スコアの比較、妊婦の子宮頸部における elafin と SLPI の mRNA 発現の比較には Kruskal-Wallis 検定、培養細胞の炎症刺激実験では Bartlett 法による等分散性の検定をした上でノンパラ

メトリックな多重比較検定として Steel-Dwass 法により各群の比較を行った。p 値 $<0.05$  の場合に有意な違いがあるとした。各 figure 内のデータは平均値 $\pm$ 標準誤差 (S.E.)で表示した。

## 結果

### 1. 子宮頸管細胞における elafin と SLPI の発現

綿棒による擦過細胞標本を用いて、子宮頸管上皮細胞における elafin と SLPI の発現を免疫染色法にて確認した (n=22: 初期 n=7、中期 n=8、後期 n=7)。子宮頸管の内部の上皮は、一層の円柱上皮に覆われ、外子宮口から外側（腔側）は重層扁平上皮に覆われた構造となっている (Figure4)。頸管擦過細胞検体にはこれらの扁平上皮と円柱上皮が混在しており、その比率は妊娠時期に関わらず約 4:1 (扁平上皮：円柱上皮) 程度であった。細胞の種類判断は顕微鏡による形態的特徴により容易であり、頸管扁平上皮は直径約 20-30  $\mu\text{m}$  程で、多角形、核細胞質比が低く (Figure5 A, B, E, F)、頸管円柱上皮は円形の細胞が集塊状となって存在し、細胞の直径は約 8-10  $\mu\text{m}$  と扁平上皮に比べて小さく、核細胞質比は扁平上皮に比べて大きいのが特徴である (Figure5 C, D, G, H)。扁平上皮、円柱上皮ともに免疫染色にて elafin (Figure5 A, C)、SLPI (Figure5 E, G) の特異的染色が確認された。また、非特異的 IgG を用いた negative control では染色されなかった (Figure5 B, D, F, H)。「実験方法」で記述した免疫染色スコアによりその染色強度

の比較を行ったところ、elafin の免疫染色スコア平均値は円柱上皮に比べ扁平上皮で有意に高く（扁平上皮: $2.9 \pm 0.1$ 、円柱上皮: $2.3 \pm 0.2$  mean  $\pm$  S.E.、 $p < 0.05$ ）、一方 SLPI の方は扁平上皮より円柱上皮で有意に高かった(扁平上皮: $2.1 \pm 0.1$ 、円柱上皮: $2.9 \pm 0.1$  mean  $\pm$  S.E.、 $p < 0.05$ ) (Table3)。

## 2. 妊娠時期による elafin と SLPI の生理的発現変化

elafin と SLPI の子宮頸管上皮における発現について、妊娠中の生理的変化を評価するために、妊婦の子宮頸管上皮細胞の擦過検体を妊娠初期 (n=36)、中期 (n=41)、後期 (n=36)、産褥期 (n=31)の異なる時期の女性より採取し、real time PCR 法により mRNA 発現を比較検討した。elafin と SLPI はいずれも妊娠中、産褥期を通して子宮頸管上皮細胞で発現していた。elafin の発現量は妊娠期間中には変化が見られなかった (Figure 6 A)。一方で SLPI の mRNA 発現量は妊娠初期に比べ、妊娠中期と後期に有意な上昇が見られた (Figure 6B)。産褥期については elafin と SLPI とともに妊娠経過中に比べて顕著に発現が上昇していた (Figure 6 A, B)。

### 3. 切迫早産症例における elafin と SLPI の発現変化

早産と elafin、SLPI との関連を検討する目的で、切迫早産の診断で入院を要した症例 (threatened preterm birth: TPB 群、n=42)と正常経過の妊婦 (control 群、n=26) の子宮頸部における elafin と SLPI の mRNA 発現の比較を real time PCR 法にて行った。control 群の頸管上皮細胞の採取時期は TPB 群と一致させた。TPB 群の検体は、切迫早産の診断 (「実験方法」参照) のもとで入院となった直後に採取した。TPB 群を更に早産 (37 週未満での分娩) となった群 (preterm-TPB 群:p-TPB 群、n=19) と、正期産となった群 (term-TPB 群:t-TPB 群、n=23)に分けて比較検討した。p-TPB 群、t-TPB 群ともに同じ治療方針のもとでの管理が行われた。p-TPB 群、t-TPB 群、control 群の検体採取時期と、t-TPB 群、control 群の分娩時期に有意差は認めなかった (Table4)。

elafin と SLPI とともに、t-TPB 群、control 群と比べ、p-TPB 群で有意に高発現であった。t-TPB 群と control 群に発現の有意差は見られなかった (Figure7 A, B)。一方で elafin と SLPI との発現量の間には明らかな相関関係は認めなかった (Figure7 C)。

#### 4. 子宮頸管上皮細胞株における炎症性刺激に対する elafin と SLPI の発現の変化

子宮頸管細胞由来の2種類の細胞株 End1、Ect1 を用いて、炎症性サイトカイン TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  とグラム陰性菌の内毒素 LPS による炎症性刺激に対するそれらの細胞内での elafin と SLPI の発現変化を評価した。mRNA 発現量を real-time PCR 法、分泌蛋白量を ELISA 法によりそれぞれ測定した。elafin の mRNA は IL-1 $\beta$ 、LPS 刺激で control に比べ発現が上昇し、この結果は3回の独立した実験において同様の結果であった (Figure8 A, C)。一方で、SLPI の mRNA 発現、分泌量は End1、Ect1 ともにいずれの炎症性刺激に対しても変化を認めなかった (Figure8 B, D)。TNF $\alpha$  については明らかな変化は認められなかった。続いて elafin の分泌量について検討したところ Ect1 では mRNA 発現の結果と一致して IL-1 $\beta$ 、LPS 刺激で分泌量の上昇を認めた。一方で End1 では Ect1 よりも無刺激での分泌量が多かったが、IL-1 $\beta$ 、LPS 刺激後の分泌量の増加は明らかではなかった (Figure9 A, B)。

#### 5. CAM 症例と正常例の卵膜における elafin と SLPI の発現の比較

卵膜における elafin と SLPI の発現を免疫染色法により検討した。正常妊娠の

卵膜 (n=6)と CAM が病理学的に確認された症例の卵膜(n=6)における違いを評価した。正常卵膜では、elafin は羊膜、絨毛膜、脱落膜間質に発現を認め、一方でSLPIは主に脱落膜間質に発現していた (Figure10 A)。Figure10 Bは同一の stage 3 の CAM (最終的な絨毛膜羊膜炎の確定診断は胎盤病理組織学検査により行われ、Blanc らの分類では白血球の浸潤の程度により以下のように stage1~3 に分類される; stage1 : 母体白血球が絨毛膜下にとどまる、stage2 : 母体白血球が絨毛膜にとどまる、stage3 : 母体白血球が羊膜に達する [20]) 症例の卵膜において、炎症細胞浸潤、構造破壊の程度の異なる 2 箇所を選択して示している。炎症進行が高度な部位 (Figure10 B 下) では軽度の部位 (Figure10 B 上) に比べ、elafin では全体的に染色強度が増加しており、SLPI では脱落膜間質の染色強度が増加することに加えて、正常卵膜で染まっていなかった羊膜、絨毛膜においても発現が誘導されるという変化を認めた。免疫染色スコアに基づいて評価したところ、elafin については正常例よりも CAM 症例でスコアの平均が高かったが有意差には至らなかった。一方で SLPI においては、CAM 症例で有意にスコアが高かった (Table5)。



## 6. 卵膜培養細胞における炎症性刺激による elafin と SLPI の発現の変化

卵膜から羊膜、絨毛膜、脱落膜細胞をそれぞれ分離培養し、頸管上皮細胞株の場合と同様に、炎症性刺激を与えて elafin と SLPI の発現変化を調べた。培養細胞はその種類ごとに異なる形態を呈していた。羊膜細胞は円形に近い形状で細胞質の透明度が高かった。絨毛膜細胞は多角形で、核細胞質比は他の細胞に比べやや高く、敷石状に配列して接着した。脱落膜細胞は細長い紡錘形を呈した (Figure11)。

卵膜培養細胞の炎症性刺激に対する elafin と SLPI の mRNA の発現量の変化を real-time PCR 法により解析した。elafin の発現は羊膜細胞では刺激による変化は認めなかった。絨毛膜細胞では IL-1 $\beta$  刺激に対して有意な発現の上昇が見られたが、TNF $\alpha$  と LPS に対する有意な変化は認めなかった。脱落膜細胞では IL-1 $\beta$  刺激に対して著明な発現上昇が確認され、LPS 刺激でも発現が上昇する傾向が見られた (Figure12 A-C)。SLPI の発現については、羊膜細胞と絨毛膜細胞では3種類の刺激のいずれに対しても有意な発現変化は認めなかった。一方で脱落膜細胞では LPS 刺激に対してのみ有意な発現の上昇が確認された (Figure12 D-F)。培養上清中の elafin 分泌量について ELISA 法にて計測したところ、絨毛膜では

IL-1 $\beta$  刺激に対して有意な濃度上昇を確認し、脱落膜では IL-1 $\beta$  と LPS 刺激に対し有意な濃度上昇を認め認めた。これは mRNA の変化と一致した結果であった (Figure13 A, B)。

## 考察

本研究における重要な知見は以下である。①子宮頸管細胞と卵膜に生理的に elafin と SLPI が発現していることを示した。②妊娠子宮の頸管上皮において、これらの AMPs が早産に至った群 (p-TPB 群) では、結果的に早産とならなかった群 (t-TPB 群) や正常妊婦 (control 群) と比較して、発現が有意に高いことを示した。③CAM 症例の卵膜では正常卵膜に比べ、elafin、SLPI の発現増強が示唆された。④頸管上皮細胞、卵膜細胞構成細胞では炎症性サイトカイン、LPS に対する elafin の産生増強が確認されたが、一方で今回検討した 3 種類の炎症性刺激に対する SLPI の変化は乏しかった (Table 6)。

AMPs が女性生殖系器官における自然免疫系で重要な役割を果たしていることは報告されてきたが、それらの妊娠中の意義や早産との関連についてはまだ知見が乏しい[13]。本研究では elafin、SLPI とともに正常妊婦の子宮頸管上皮細胞に妊娠中、産褥期を通して恒常的に mRNA が発現していることを確認した。これは、Stock らの妊婦の頸管粘液に elafin が含まれるとの報告[21]や、Helming らの妊婦の頸管粘液に高濃度の SLPI が含まれているとの報告と一致していた[22]。

本研究では更に卵膜にも **elafin** と **SLPI** が発現していることを見出した。卵膜に **elafin**[23]と **SLPI**[24]が発現しているとする過去の報告と一致した結果が得られた上、本研究では更に卵膜を羊膜、絨毛膜、脱落膜に分けて炎症性刺激によるそれらの発現変化を確認し、免疫染色により **CAM** 症例でそれらの発現が増強している可能性を示した。

本研究では **elafin** と **SLPI** の妊娠時期別の発現に関して、正常妊娠では **SLPI** は妊娠初期に比べ、妊娠中期と後期で発現が上昇し、一方 **elafin** は妊娠期間中の発現が一定していることを確認した。頸管における **SLPI** の発現が妊娠進行とともに変化する原因は不明である。既報において乳腺の細胞株の培養実験で、プロゲステロンの刺激により **SLPI** の発現は上昇し、抗プロゲステロン薬によりその作用が阻害される一方、**elafin** の発現は変化がなかったということが示されている[25]。そのため、**SLPI** の発現上昇は妊娠中に分娩まで上昇するプロゲステロンのようなホルモンが関与している可能性が考えられる。アカゲザルの子宮内膜を用いた DNA マイクロアレイ実験で、**SLPI** がプロゲステロンにより調節される遺伝子であるとの報告もある[26]。本研究ではさらに **elafin** と **SLPI** の mRNA 発現が妊娠期に比べ、産褥期で有意に高くなることが示された。分娩は

一種の生理的な炎症状態であると考えられる。分娩に先駆けて子宮頸部にマクロファージや好中球が遊走し、それらの放出する炎症性シグナルが **matrix metalloproteinase (MMP)**や好中球エラスターゼ等のプロテアーゼを産生し、頸管熟化といわれる胎児が子宮頸部を通過するための組織特性変化を誘導する[27][28][29]。分娩後、子宮頸管は速やかに固く閉鎖した状態に戻り、産褥1ヶ月程度の期間に妊娠前の状態に回復する。**elafin** と **SLPI** はそれらが有する抗プロテアーゼ作用、抗炎症作用の分子特性により創傷治癒に関与していることが知られている[17]。そのため、産褥期の子宮頸部では **elafin**、**SLPI** の発現が増加することで、分娩時の炎症、各種プロテアーゼにより生じた子宮頸管細胞外マトリックスの構造破壊を修復する過程が促進されている可能性がある。また、分娩後は子宮口が開大しており容易に外来病原体が子宮内に侵入できる状態にあり、そうした時期に抗菌作用を有する **elafin**、**SLPI** の産生が亢進していることは免疫防御の観点から合目的であるとも考えられる。

また本研究では、早産症例では **elafin**、**SLPI** の頸管上皮における発現が高いことを示した。これと一致した報告として **Abbott** らは、頸管長短縮や自然早産に至った妊婦の頸管粘液に **elafin** が多く含まれていることを示している[30]。早産

症例でこれらの AMPs の発現が上昇する機序は本研究では未解明である。しかし早産の主要な原因である子宮内感染が膣炎や子宮頸管炎から上行性に起こると考えられていることと[4] [5]、elafin と SLPI が抗菌作用、抗プロテアーゼ作用と抗炎症作用を持つこと[16] [17] [18]を考慮すると、早産となった群 (p-TPB 群) では子宮頸部に局所的な感染が生じ、炎症性サイトカインや好中球エラスターゼが誘導され (Figure2)、反応性にこれら AMPs の発現が増強されたと推察される。そして本研究ではこれら AMPs が上昇しても結果的に早産となった事より、elafin と SLPI の上昇は早産の予防としては十分な効果を示さないかもしれないが、早産予知マーカーとして有用である可能性が考えられる。他科領域ではelafin が乳癌の予後評価のバイオマーカーになり得るという研究もある[31]。一方で妊娠 20 週未満の妊婦の頸管粘液を調べた実験で、正常妊婦に比べて細菌性膣炎がある妊婦では、頸管粘液中の elafin と SLPI のタンパク濃度が減少していたという報告がある[21]。細菌性膣炎は早産に先行する上行性感染のリスクファクターであることを考慮すると一見するとこの報告は本研究の結果と矛盾するように見える。しかし、これらの AMPs の生理的な発現が減少していることが細菌性膣炎自体の誘因であり、頸管炎、CAM などの子宮内に病原菌が侵入した場合に

生じる elafin、SLPI の産生変化を見ているわけではないという解釈も成り立つ。事実その報告では妊婦の早産の罹患率は検討されておらず、早産との直接的な関連は不明である。

更に、早産の中心的な先行病態である CAM において、その卵膜では elafin の発現上昇が生じているという過去の報告がある[32]。本研究でも、CAM 症例の卵膜では elafin、SLPI の発現増加が示唆され、一致した結果であった。本研究では、過去に病理検査により CAM が確認された検体を用いて elafin と SLPI の CAM における発現変化を免疫染色法により評価したが、その結果に染色条件等による影響が生じている可能性は否定できず、より定量的な評価を行うことが更なる課題である。また、本研究の卵膜細胞の培養実験において、IL-1 $\beta$ 、LPS はこれらの AMPs の発現誘導因子であることが示された。子宮内に侵入した病原菌の菌体成分やそれに反応して産生される炎症性サイトカインにより抗菌ペプチドである elafin、SLPI の産生増加が生じることは生体の防御反応であると推定される。CAM はその病理学的診断基準にも含まれるように好中球の卵膜組織浸潤が生じる。活性化した好中球からは各種のセリンプロテアーゼが分泌されるが、それに伴い卵膜構造の破壊が進行して PROM に至ることが指摘されている[5]。

この点に関して、早産の卵膜中でセリンプロテアーゼに拮抗する elafin と SLPI が好中球浸潤と並行して産生増加が生じていたことは、卵膜機能を維持しようとする生体反応の結果とも考えられる。

本研究では、早産群で確認された子宮頸部の elafin と SLPI の発現上昇の背景機序を探索する目的で、子宮頸管上皮細胞株を用いた検討を行った。elafin では IL-1 $\beta$  と LPS 刺激で発現が上昇したが、SLPI については有意な発現変化は認めなかった。elafin が炎症性刺激により発現変化を生じるという結果は Stock らの頸管上皮細胞に関する過去の報告と一致していた[21]。更に本研究では CAM 症例の卵膜における elafin、SLPI の発現増強の機序の解明のため、卵膜の初代培養細胞を用いた炎症刺激実験を行った。絨毛膜・脱落膜細胞では頸管上皮細胞の場合と同様に elafin の発現が IL-1 $\beta$ 、LPS の刺激に対して上昇していた。一方で SLPI の発現は脱落膜細胞においてのみ LPS 刺激に対する反応が認められるにとどまった。さらに本研究の頸管上皮細胞検体中の elafin と SLPI の mRNA 発現に互いの相関関係が認められなかったことも考慮すると、elafin と SLPI が異なる機序のもとで発現が制御されていることが推定される。急性肺疾患においても気管支肺胞洗浄液中の elafin と SLPI の濃度上昇が報告されており[33]、また肺



胞上皮細胞で IL-1 $\beta$  刺激に対して elafin は発現が上昇したが、SLPI の発現変化は乏しかったという報告がある[34] [35]。これは日常的に外来病原体の曝露を受ける、肺胞上皮細胞、頸管上皮細胞において共通した elafin と SLPI の発現制御に関する性質が存在していることを示唆している。

転写因子に関する過去の研究では、炎症性サイトカインに対する elafin の転写調節には NF- $\kappa$ B が関与していることが明らかになっている[36]。SLPI の発現については喫煙者の鼻粘膜細胞において STAT1 (signal transducers and activator of transcription1)の活性化により促進されることが近年報告された[37]。こうした発現制御に関わる転写因子の違いが頸管上皮細胞や卵膜細胞における elafin、SLPI の発現状況にどのように関係しているのかについては将来の検討課題である。

その他に、elafin と SLPI の実用性としてそれらの治療的役割も注目されている[17] [38]。例えばそれらの AMPs の投与が慢性閉塞性肺疾患(COPD: chronic obstructive pulmonary disease)の治療となり得るという報告がある[39]。COPD の成因には、気道粘膜におけるプロテアーゼとそれに対する生体側の防御因子の不均衡が関与していると言われており、具体的には喫煙等による長期的な気道の炎症により気道粘膜上皮が障害され、elafin や SLPI 等のプロテアーゼ阻害物

質の産生が減少し、炎症細胞から放出されるプロテアーゼが相対的に過剰な状態となり、気道における炎症や組織傷害をさらに増悪させることで換気障害の症状が進行すると考えられている[30]。そのため、それら AMPs の補充が COPD の治療となり得ると推論され、実際に肺気腫や肺線維症の患者において、SLPI エアロゾル投与が有効であったという報告もある[40]。この事は産科領域にも応用出来る可能性がある。例えば、若年女性の子宮頸部の腫瘍性病変に対し、その診断または治療のために病変部を含めて子宮頸部を円錐状に切除する子宮頸部円錐切除術という方法があるが (Figure14)、円錐切除術後の妊婦は早産のリスクが高くなることが知られている[41]。その原因として、頸管上皮が欠損する事による AMPs の減少が関与していると仮定すると、その補充により早産のリスクを軽減出来るという仮説が考えられ、この可能性についても今後検討される価値があると思われる。

早産の抑止は周産期臨床において重要な課題であるが、有効性の高い予知マーカーや、予防手段が乏しい現状にある。細菌性膣炎に代表される膣内細菌叢の悪化は経頸管的な上行性感染のリスクファクターになることが知られているが[42]、膣炎自体は正常妊婦において比較的頻度の高い現象である。さらに、早

産予防策として妊娠中の膣炎の検査やその積極的な治療を行うことの有効性は低いとされている[43]。一方で子宮内に病原体が侵入した場合に臨床症状に基づいて判断することは困難であり、母体発熱や炎症反応などの臨床症状の出現に至った時点（臨床的 CAM：Table 7 参照）では、抗生物質投与などの治療によって早産を回避することは不可能でありかつ新生児予後も極めて不良となる[44]。一方で臨床症状が乏しい場合であっても分娩後の病理学的検討において組織学的に CAM が診断されることも多い。こうした初期 CAM の診断の難しさが早産の予防、治療における障害となっている。このような臨床における現状を踏まえると、本研究により示された頸管上皮細胞や卵膜における elafin、SLPI の発現上昇と早産の関係性は、それらの AMPs 自体やその発現制御に関わる因子に着目した早産予知マーカーや治療法の開発の可能性を示唆している。今後その有用性の評価のために、本研究で示された SLPI の発現が妊娠中に時期的な変化を示す機序の解明や、同一人物における妊娠中の経時的な変化についての検討を行うことは更なる課題である。

まとめると、本研究では妊婦の子宮頸部と卵膜には elafin と SLPI が恒常的に発現しており、どちらも早産や CAM を発症した症例でその発現が増強すること

を証明した。更に elafin の発現制御には IL-1 $\beta$  と LPS が関与し、SLPI はそれとは異なる機序で発現が調整されている可能性を示した (Figure 15)。elafin と SLPI は妊娠中に胎児を感染から守るべく恒常性の維持と自然免疫機構に寄与していると考えられる。また、これらの AMPs は早産抑止のための新たな予防、治療戦略構築のための有望なターゲットとなり得る。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、検体の採取にご協力頂いた各関連病院の先生方と手厚くご指導いただいた東京大学医学産婦人科学教室の藤井知行教授、大須賀教授、山下隆博准教授、川名敬准教授、直接の指導教官である永松健講師と、本研究における病理学的診断にご協力頂いた、佐山晴亮先生、市川麻祐子先生、保谷茉莉先生に深い感謝の意を表します。

## 引用文献

- [1] J. R. G. Challis, S. G. Matthews, W. Gibb, and S. J. Lye, "Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm," *Endocr Rev*, vol. 21, pp. 514-50, Oct 2000.
- [2] C. J. Lockwood, "Predicting premature delivery--no easy task," *N Engl J Med*, vol. 346, pp. 282-4, Jan 24 2002.
- [3] D. H. Watts, M. A. Krohn, S. L. Hillier, and D. A. Eschenbach, "The association of occult amniotic fluid infection with gestational age and neonatal outcome among women in preterm labor," *Obstet Gynecol*, vol. 79, pp. 351-7, Mar 1992.
- [4] N. P. Yost and S. M. Cox, "Infection and preterm labor," *Clin Obstet Gynecol*, vol. 43, pp. 759-67, Dec 2000.
- [5] R. L. Goldenberg, J. C. Hauth, and W. W. Andrews, "Intrauterine Infection and Preterm Delivery," *New England Journal of Medicine*, vol. 342, pp. 1500-1507, 2000/05/18 2000.
- [6] R. E. Hancock and G. Diamond, "The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences," *Trends Microbiol*, vol. 8, pp. 402-10, Sep 2000.
- [7] T. Ganz, "The role of antimicrobial peptides in innate immunity," *Integr Comp Biol*, vol. 43, pp. 300-4, Apr 2003.
- [8] B. M. Peters, M. E. Shirtliff, and M. A. Jabra-Rizk, "Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs?," *PLoS Pathog*, vol. 6, p. e1001067, 2010.
- [9] K. A. Brogden, "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?," *Nat Rev Microbiol*, vol. 3, pp. 238-50, Mar 2005.
- [10] S. van Wetering, A. C. van der Linden, M. A. van Sterkenburg, W. I. de Boer, A. L. Kuijpers, J. Schalkwijk, and P. S. Hiemstra, "Regulation of SLPI and elafin release from bronchial epithelial cells by neutrophil defensins," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 278, pp. L51-8, Jan 2000.

- [11] M. Schmid, K. Fellermann, P. Fritz, O. Wiedow, E. F. Stange, and J. Wehkamp, "Attenuated induction of epithelial and leukocyte serine antiproteases elafin and secretory leukocyte protease inhibitor in Crohn's disease," *J Leukoc Biol*, vol. 81, pp. 907-15, Apr 2007.
- [12] A. Mihaila and G. M. Tremblay, "Human alveolar macrophages express elafin and secretory leukocyte protease inhibitor," *Z Naturforsch C*, vol. 56, pp. 291-7, Mar-Apr 2001.
- [13] A. W. Horne, S. J. Stock, and A. E. King, "Innate immunity and disorders of the female reproductive tract," *Reproduction*, vol. 135, pp. 739-49, Jun 2008.
- [14] J. M. Sallenave, M. Si Tahar, G. Cox, M. Chignard, and J. Gauldie, "Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils," *J Leukoc Biol*, vol. 61, pp. 695-702, Jun 1997.
- [15] L. Frew and S. J. Stock, "Antimicrobial peptides and pregnancy," *Reproduction*, vol. 141, pp. 725-35, Jun 2011.
- [16] S. E. Williams, T. I. Brown, A. Roghanian, and J. M. Sallenave, "SLPI and elafin: one glove, many fingers," *Clin Sci (Lond)*, vol. 110, pp. 21-35, Jan 2006.
- [17] A. Scott, S. Weldon, and C. C. Taggart, "SLPI and elafin: multifunctional antiproteases of the WFDC family," *Biochem Soc Trans*, vol. 39, pp. 1437-40, Oct 2011.
- [18] T. S. Wilkinson, A. Roghanian, A. J. Simpson, and J. M. Sallenave, "WAP domain proteins as modulators of mucosal immunity," *Biochem Soc Trans*, vol. 39, pp. 1409-15, Oct 2011.
- [19] S. Detre, G. Saclani Jotti, and M. Dowsett, "A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas," *J Clin Pathol*, vol. 48, pp. 876-8, Sep 1995.
- [20] W. A. Blanc, "Pathology of the placenta and cord in ascending and in haematogenous infection," *Ciba Found Symp*, pp. 17-38, 1979.
- [21] S. J. Stock, L. Duthie, T. Tremaine, A. A. Calder, R. W. Kelly, and S. C. Riley, "Elafin (SKALP/Trappin-2/proteinase inhibitor-3) is produced

- by the cervix in pregnancy and cervicovaginal levels are diminished in bacterial vaginosis," *Reprod Sci*, vol. 16, pp. 1125-34, Dec 2009.
- [22] R. Helmig, N. Ulbjerg, and K. Ohlsson, "Secretory leukocyte protease inhibitor in the cervical mucus and in the fetal membranes," *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, vol. 59, pp. 95-101, Mar 1995.
- [23] A. E. King, A. Paltoo, R. W. Kelly, J. M. Sallenave, A. D. Bocking, and J. R. Challis, "Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes," *Placenta*, vol. 28, pp. 161-9, Feb-Mar 2007.
- [24] F. C. Denison, R. W. Kelly, A. A. Calder, and S. C. Riley, "Secretory leukocyte protease inhibitor concentration increases in amniotic fluid with the onset of labour in women: characterization of sites of release within the uterus," *J Endocrinol*, vol. 161, pp. 299-306, May 1999.
- [25] A. E. King, K. Morgan, J. M. Sallenave, and R. W. Kelly, "Differential regulation of secretory leukocyte protease inhibitor and elafin by progesterone," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 310, pp. 594-9, Oct 17 2003.
- [26] C. I. Ace and W. C. Okulicz, "Microarray profiling of progesterone-regulated endometrial genes during the rhesus monkey secretory phase," *Reprod Biol Endocrinol*, vol. 2, p. 54, Jul 7 2004.
- [27] J. M. Gonzalez, Z. Dong, R. Romero, and G. Girardi, "Cervical remodeling/ripening at term and preterm delivery: the same mechanism initiated by different mediators and different effector cells," *PLoS One*, vol. 6, p. e26877, 2011.
- [28] A. Nakai, Y. Taniuchi, H. Miyake, M. Nakai, A. Yokota, and T. Takeshita, "Increased level of granulocyte elastase in cervical secretion is an independent predictive factor for preterm delivery," *Gynecol Obstet Invest*, vol. 60, pp. 87-91, 2005.
- [29] M. Mahendroo, "Cervical remodeling in term and preterm birth: insights from an animal model," *Reproduction*, vol. 143, pp. 429-38, Apr 2012.
- [30] D. S. Abbott, E. C. Chin-Smith, P. T. Seed, M. Chandiramani, A. H. Shennan, and R. M. Tribe, "Raised trappin2/elafin protein in



- cervico-vaginal fluid is a potential predictor of cervical shortening and spontaneous preterm birth," *PLoS One*, vol. 9, p. e100771, 2014.
- [31] K. K. Hunt, H. Wingate, T. Yokota, Y. Liu, G. B. Mills, F. Zhang, B. Fang, C. H. Su, M. Zhang, M. Yi, and K. Keyomarsi, "Elafin, an inhibitor of elastase, is a prognostic indicator in breast cancer," *Breast Cancer Res*, vol. 15, p. R3, 2013.
- [32] G. Tromp, H. Kuivaniemi, R. Romero, T. Chaiworapongsa, Y. M. Kim, M. R. Kim, E. Maymon, and S. Edwin, "Genome-wide expression profiling of fetal membranes reveals a deficient expression of proteinase inhibitor 3 in premature rupture of membranes," *Am J Obstet Gynecol*, vol. 191, pp. 1331-8, Oct 2004.
- [33] J. M. Sallenave, "Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2: versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 42, pp. 635-43, Jun 2010.
- [34] J. M. Sallenave, J. Shulmann, J. Crossley, M. Jordana, and J. Gauldie, "Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 11, pp. 733-41, Dec 1994.
- [35] J. M. Abbinante-Nissen, L. G. Simpson, and G. D. Leikauf, "Neutrophil elastase increases secretory leukocyte protease inhibitor transcript levels in airway epithelial cells," *Am J Physiol*, vol. 265, pp. L286-92, Sep 1993.
- [36] L. Bingle, T. D. Tetley, and C. D. Bingle, "Cytokine-mediated induction of the human elafin gene in pulmonary epithelial cells is regulated by nuclear factor-kappaB," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 25, pp. 84-91, Jul 2001.
- [37] M. Meyer, R. N. Bauer, B. D. Letang, L. Brighton, E. Thompson, R. C. Simmen, J. Bonner, and I. Jaspers, "Regulation and activity of secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) is altered in smokers," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 306, pp. L269-76, Feb 2014.
- [38] L. Shaw and O. Wiedow, "Therapeutic potential of human elafin," *Biochem Soc Trans*, vol. 39, pp. 1450-4, Oct 2011.

- [39] M. L. Zani, A. Tanga, A. Saidi, H. Serrano, S. Dallet-Choisy, K. Baranger, and T. Moreau, "SLPI and trappin-2 as therapeutic agents to target airway serine proteases in inflammatory lung diseases: current and future directions," *Biochem Soc Trans*, vol. 39, pp. 1441-6, Oct 2011.
- [40] J. Stolck, J. Camps, H. I. Feitsma, J. Hermans, J. H. Dijkman, and E. K. Pauwels, "Pulmonary deposition and disappearance of aerosolised secretory leucocyte protease inhibitor," *Thorax*, vol. 50, pp. 645-50, Jun 1995.
- [41] M. Kyrgiou, G. Koliopoulos, P. Martin-Hirsch, M. Arbyn, W. Prendiville, and E. Paraskevaidis, "Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis," *Lancet*, vol. 367, pp. 489-98, Feb 11 2006.
- [42] H. Leitich, B. Bodner-Adler, M. Brunbauer, A. Kaider, C. Egarter, and P. Husslein, "Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis," *Am J Obstet Gynecol*, vol. 189, pp. 139-47, Jul 2003.
- [43] P. Brocklehurst, A. Gordon, E. Heatley, and S. J. Milan, "Antibiotics for treating bacterial vaginosis in pregnancy," *Cochrane Database Syst Rev*, vol. 1, p. CD000262, 2013.
- [44] E. Lieberman, J. Lang, D. K. Richardson, F. D. Frigoletto, L. J. Heffner, and A. Cohen, "Intrapartum maternal fever and neonatal outcome," *Pediatrics*, vol. 105, pp. 8-13, Jan 2000.
- [45] S. G. Lencki, M. B. Maciulla, and G. S. Eglinton, "Maternal and umbilical cord serum interleukin levels in preterm labor with clinical chorioamnionitis," *Am J Obstet Gynecol*, vol. 170, pp. 1345-51, May 1994.
- [46] S. Ilancheran, Y. Moodley, and U. Manuelpillai, "Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair?," *Placenta*, vol. 30, pp. 2-10, Jan 2009.

- [47] Johns Hopkins Medicine. Health Library. “External and Internal Heart Rate Monitoring of the Fetus”.  
[http://www.hopkinsmedicine.org/healthlibrary/test\\_procedures/gynecology/external\\_and\\_internal\\_heart\\_rate\\_monitoring\\_of\\_the\\_fetus\\_92,P07776/](http://www.hopkinsmedicine.org/healthlibrary/test_procedures/gynecology/external_and_internal_heart_rate_monitoring_of_the_fetus_92,P07776/). (2015 年 1 月 20 日)

図表

	産生源	主な機能
Elafin	上皮系細胞:呼吸器、腸、皮膚 卵管、子宮内膜、子宮 頸管、膣、胎盤、卵膜  好中球、マクロファージ	広域スペクトルを持つ抗菌作用  好中球エラスターゼなどに対する 抗プロテアーゼ作用  好中球の遊走促進
SLPI (secretory leukocyte peptidase inhibitor)	上皮系細胞:呼吸器、腸、生殖器、 口腔粘膜 卵管、子宮内膜、卵膜  好中球、マクロファージ、肥満細胞	広域スペクトルを持つ抗菌作用  好中球エラスターゼなどに対する 抗プロテアーゼ作用  HIVに対する抗ウイルス作用

Table1 Elafin、SLPI の機能  
(文献 [15] より引用、一部改変)

	primer		product size	annealing	extension
	forward	reverse			
Elafin	CGTGGTGGTGTTCCTCATC	GACCTTTGACTGGCTCCTTGC	179bp	63°C 10sec.	72°C 7sec.
SLPI	GGATGGCCAGTGCAAGCGTGA	GCCTGCTGTGTGCCAAGCCT	199bp	65°C 10sec.	72°C 10sec.
βactin	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT	250bp	63°C 10sec.	72°C 7sec.

Table2 real time PCR で使用した primer

		Score(mean) ±S.E.	p値
Elafin	扁平上皮	2.9±0.1	<0.05
	円柱上皮	2.3±0.2	
SLPI	扁平上皮	2.1±0.1	<0.05
	円柱上皮	2.9±0.1	

Table3

子宮頸管細胞における elafin、SLPI の発現の免疫染色スコア

免疫染色スコア(0: 染色されず、1: 弱程度染色あり、2: 中等度染色あり、3: 強度染色あり)を用い、子宮頸部の扁平上皮と円柱上皮における elafin と SLPI の染色強度を扁平上皮と円柱上皮で比較した。統計解析には検体に関する臨床情報を知らされていない3人でそれぞれスコアリングを行いその平均を各検体の染色スコアとして用いた。

正常妊婦 n=22 (初期 n=7、中期 n=8、後期 n=7)

	control	t-TPB	p-TPB	p値
検体採取時期	29w6d±33d	29w4d±32d	29w3d±25d	n.s.
分娩時期	38w6d±7d	38w1d±7d	32w1d±28d	<0.001 *
n	26	23	19	

Table4 検体採取時期と分娩時期

切迫早産の診断で入院を要した症例(threatened preterm birth: TPB 群)を 37 週未満の早産となった群 (preterm-TPB 群: p-TPB 群、n=19) と、37 週以降に分娩 (正期産) となった群 (term-TPB 群: t-TPB 群、n=23)に分け、それらと妊娠週数を釣り合わせた正常経過の妊婦(n=26) を control 群とし、検体採取時期と分娩時期を比較した。

n.s. : no statistical significance

\*: p-TPB 群と t-TPB 群、また p-TPB 群と control 群に  $p<0.001$  の有意差を認めた。

		Score ± S.E.		
		正常卵膜	CAM	p値
Elafin	羊膜	1.8 ± 0.5	2.3 ± 0.3	0.5
	絨毛膜	1.8 ± 0.3	2.7 ± 0.2	0.07
	脱落膜	1 ± 0.5	2.2 ± 0.4	0.1
SLPI	羊膜	0.3 ± 0.3	1.8 ± 0.5	<0.05
	絨毛膜	0.3 ± 0.2	1.8 ± 0.5	<0.05
	脱落膜	0.7 ± 0.3	2.0 ± 0.4	<0.05

Table5

正常卵膜とCAM症例の卵膜におけるelafinとSLPIの免疫染色スコア

免疫染色スコアを用いて、正常卵膜 (n=6)とCAM症例の卵膜 (n=6)のelafinとSLPIの発現強度を羊膜、絨毛膜、脱落膜に分けて比較した。

		子宮頸管細胞由来株		卵膜初代培養細胞		
		End1	Ect1	羊膜細胞	絨毛膜細胞	脱落膜細胞
elafin	TNF $\alpha$	→	→	→	→	→
	IL-1 $\beta$	↑	↑	→	↑	↑
	LPS	↑	↑	→	→	↑
SLPI	TNF $\alpha$	→	→	→	→	→
	IL-1 $\beta$	→	→	→	→	→
	LPS	→	→	→	→	↑

Table6 elafin、SLPI の炎症性刺激による発現変化のまとめ



- |   |
|---|
| <p>1)母体の発熱(38.0℃以上)がある場合、以下のうち一項目以上あること</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• 母体の頻脈(100bpm以上)</li><li>• 子宮の圧痛</li><li>• 膣分泌物・羊水の悪臭</li><li>• 白血球増多(15000/<math>\mu</math>l以上)</li></ul> <p>2)母体の発熱が無い場合、上記の4項目すべてを満たすこと</p> |
|---|

Table7 臨床的絨毛膜羊膜炎の診断基準  
(文献[45]より引用、一部改変)

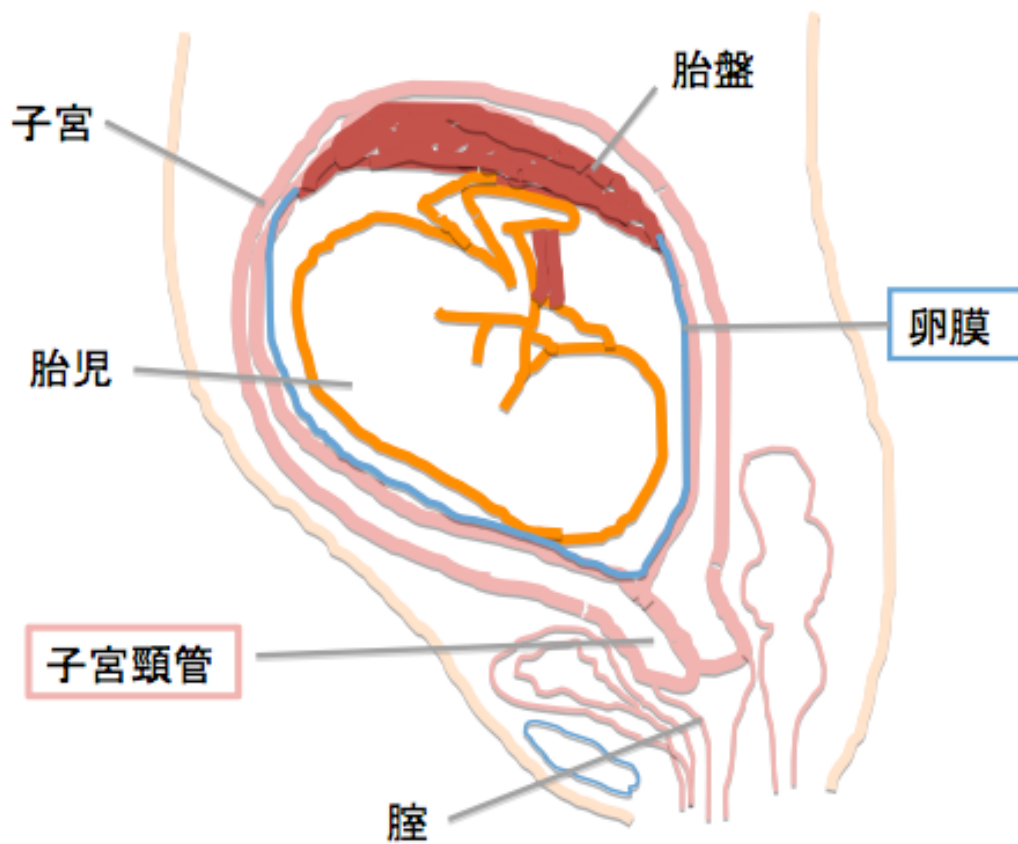


Figure1 妊娠子宮の構造

妊娠子宮において、子宮頸管及び卵膜は胎児を外来微生物から守る防御機構としての役割を果たしている。子宮頸管は外界に向かって閉鎖した適度な長さを持ち、卵膜は胎児と羊水を包む構造をとり、それぞれ物理的なバリアとして機能し、さらにそれらの自然免疫機構は化学的バリアとして感染防御に貢献している。

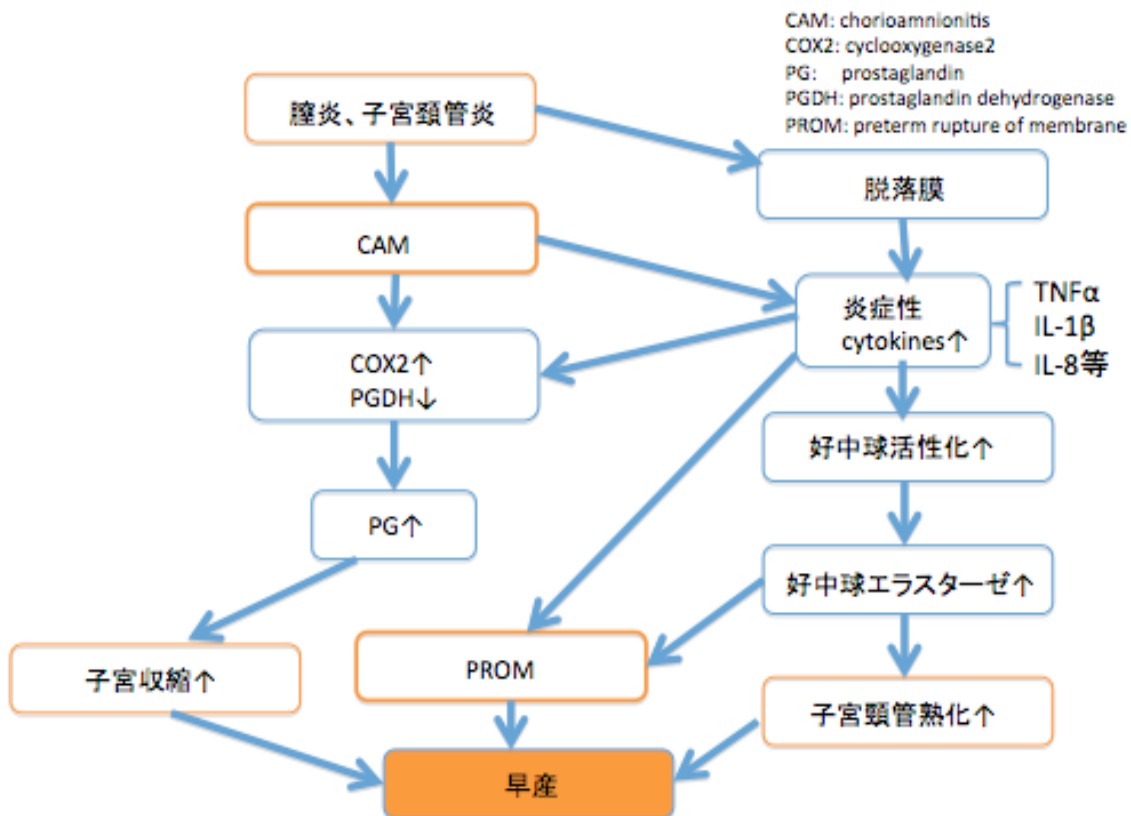
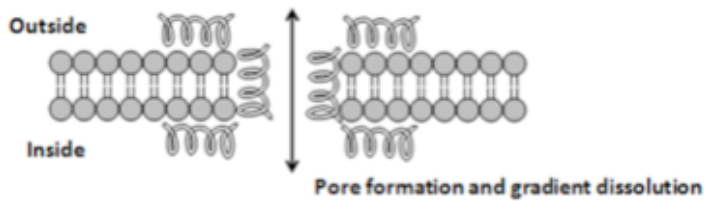


Figure2 子宮内感染から早産へ至る機序

子宮頸管炎やCAMを生じると局所的にマクロファージ、好中球などの免疫担当細胞が集簇する。TNF $\alpha$ やIL-1 $\beta$ を中心としたサイトカインの働きにより炎症が進行し、病原体の排除が行われると同時に、過度な炎症は頸管、卵膜の組織構造の破壊を生じることとなる。更に組織が活性化して産生されたIL-8によって、好中球の組織局所への遊走、浸潤が促され、好中球エラスターゼが分泌され、組織コラーゲンの変性を引き起こすために子宮頸管では頸管熟化が進行する。卵膜では膜の脆弱化が起こりPROMの引き金となる。またTNF $\alpha$ やIL-1 $\beta$ のそれ自身の細胞傷害性が細胞のアポトーシスを誘導し、卵膜を脆弱化することも破水の原因となる。更にTNF $\alpha$ やIL-1 $\beta$ は脱落膜細胞に作用してPG誘導酵素であるCOX2を増加し、一方でPGを分解するPGDHの活性を抑制する。これによって子宮収縮の促進因子であるPGの局所的な作用が増強して陣痛を生じることが指摘されている。

(図は文献 [5] より引用、一部改変)

### Transmembrane pore-forming



### Modes of intracellular killing

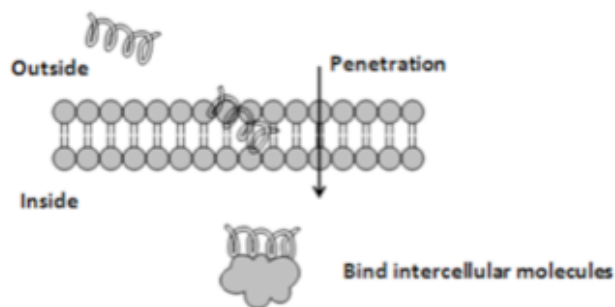


Figure3 Antimicrobial peptides 構造と抗菌活性

抗菌ペプチドの構造的特徴として、プラス電荷のアミノ酸を多く配列する一方で、親水性と疎水性の両面を有する両親媒性という特徴がある。AMPsの多くは、陰性荷電、酸性脂質に富んだ細菌細胞膜に直接的に作用し、細菌の細胞膜電位を消失させることで抗菌作用を発揮すると言われている。

(図は文献 [9] より引用)

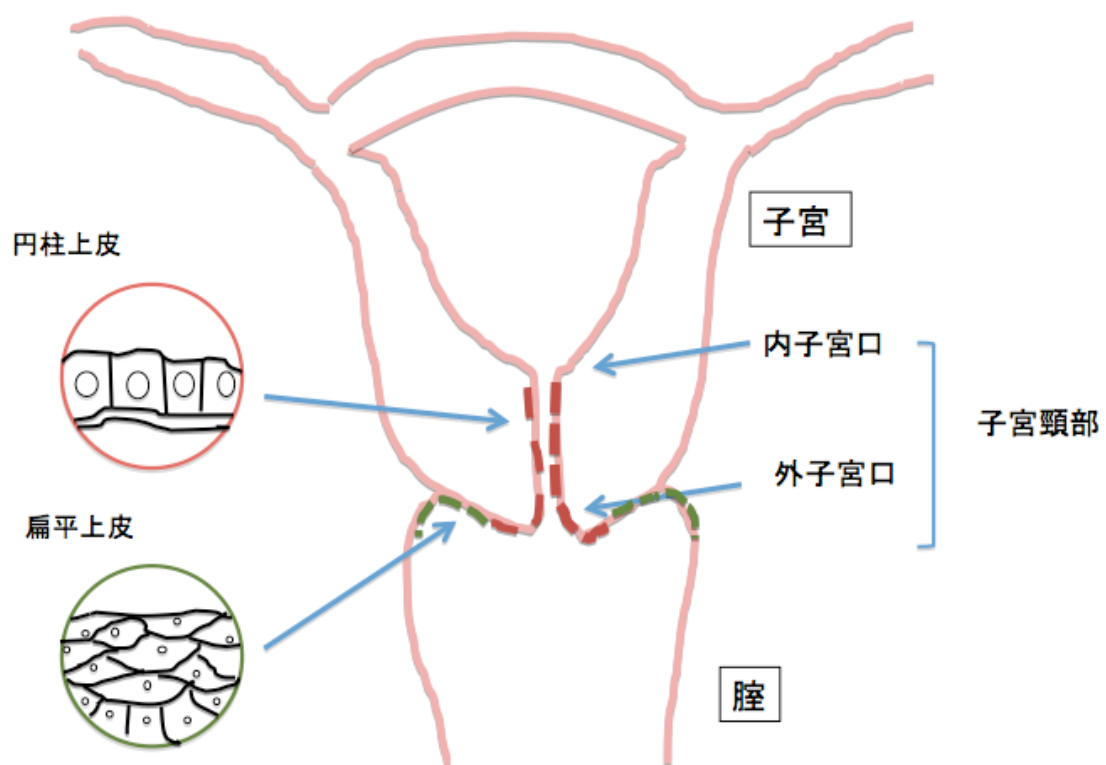


Figure4 子宮頸部の構造

子宮頸管の内部の上皮は、一層の円柱上皮に覆われ、外子宮口から外側（腔側）は重層扁平上皮に覆われた構造となっている。

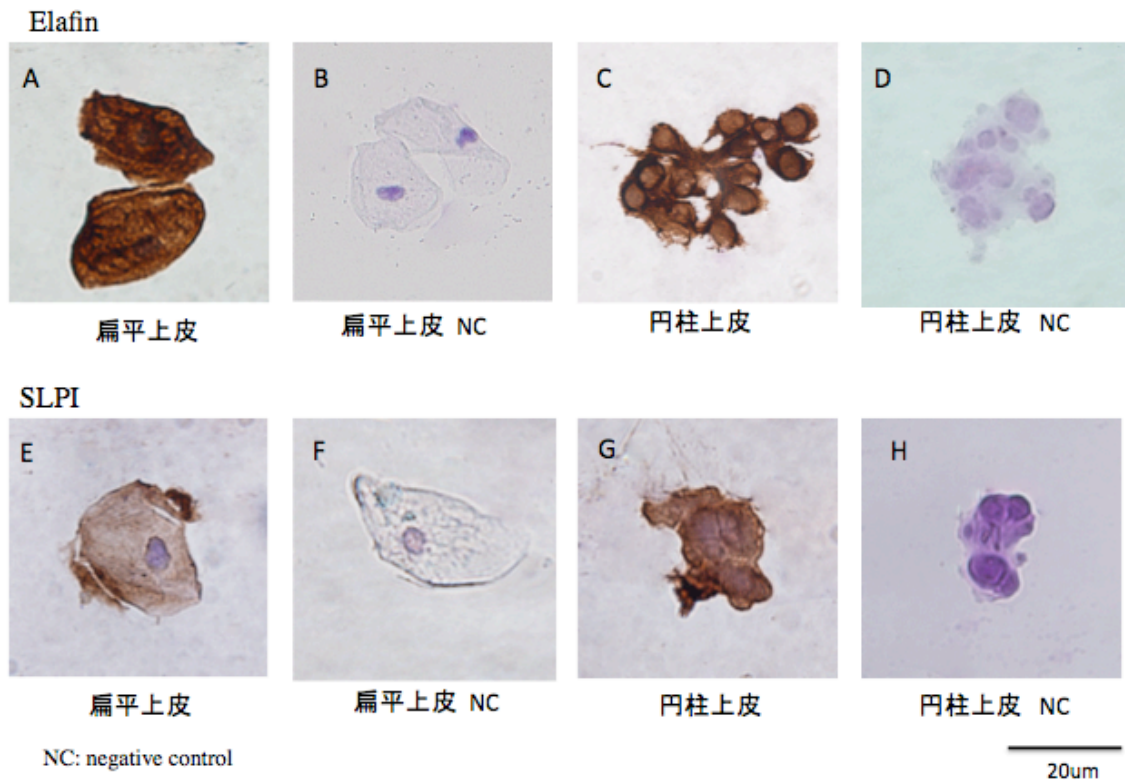


Figure5 子宮頸管細胞免疫染色

合併症の無い正常妊婦 22 名（初期 n=7、中期 n=8、後期 n=7）から綿棒で子宮頸管細胞を採取し、免疫染色法にて妊婦の子宮頸管細胞における elafin、SLPI の発現を調べた。

扁平上皮: A)elafin、B) elafin NC、E)SLPI、F) SLPI NC、円柱上皮: C)elafin、D) elafin NC、G)SLPI、H) SLPI NC

NC: negative control

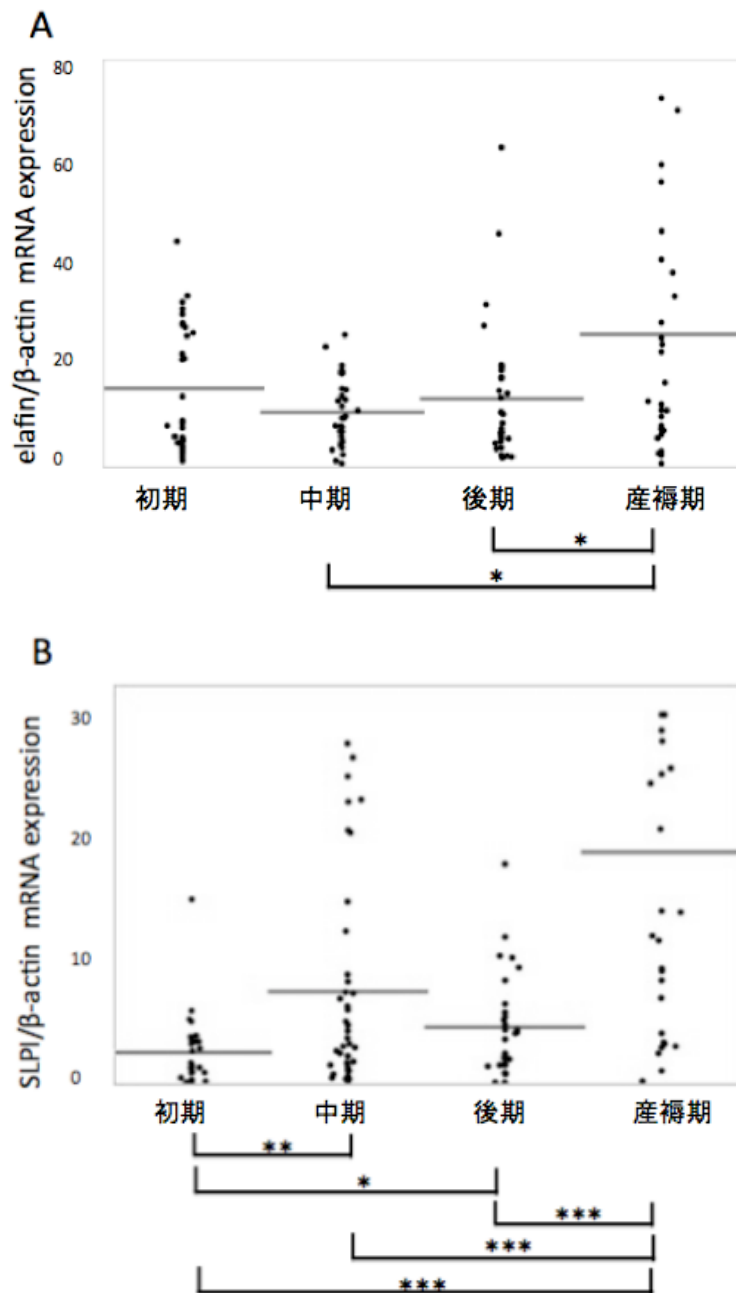


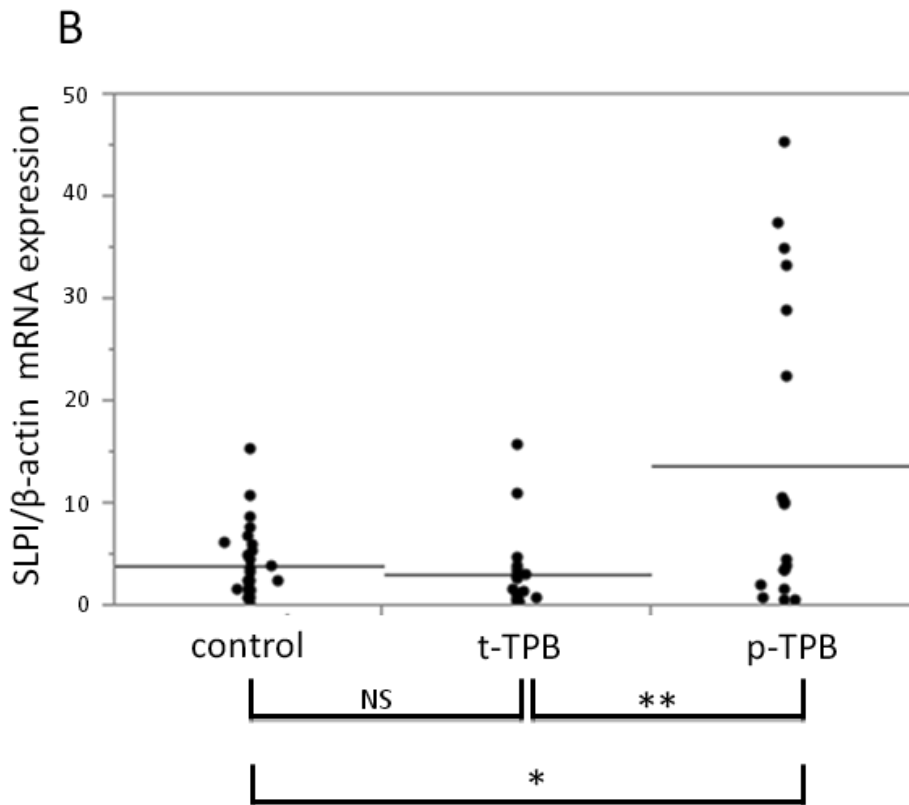
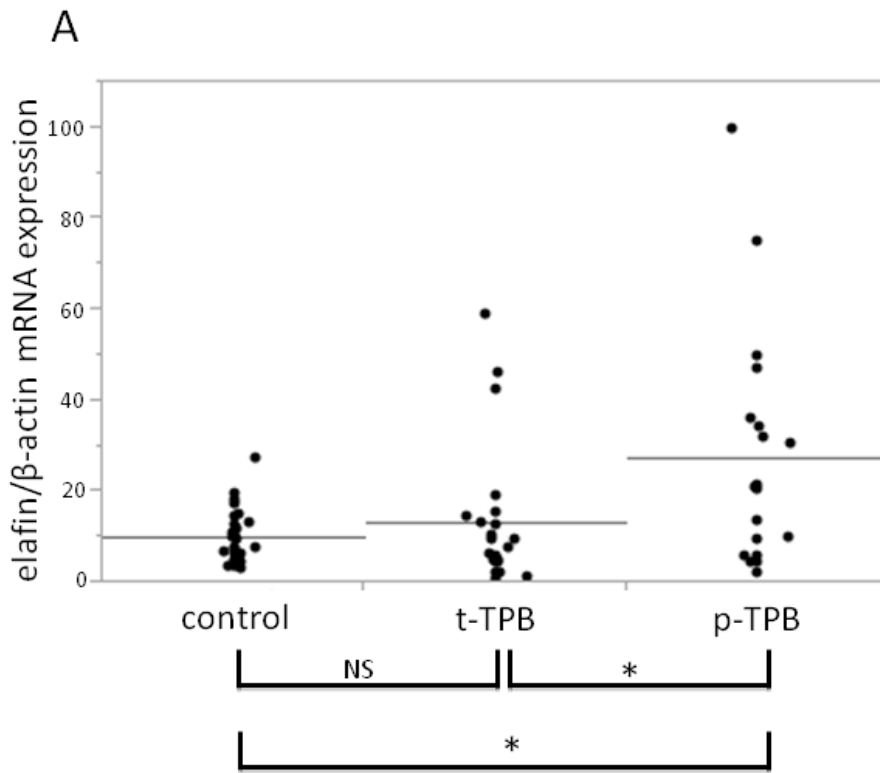
Figure6

正常妊婦の子宮頸管における elafin、SLPI の mRNA 発現の比較

正常妊婦の子宮頸管細胞の検体を、妊娠初期(n=36)、中期(n=41)、後期(n=36)、産褥期(n=31)に分け、real time PCR 法により mRNA 発現を比較検討した。

(A)elafin の mRNA 発現、(B)SLPI の mRNA 発現

バー:平均値、\*: p<0.05、\*\*: p<0.01、\*\*\*: p<0.001





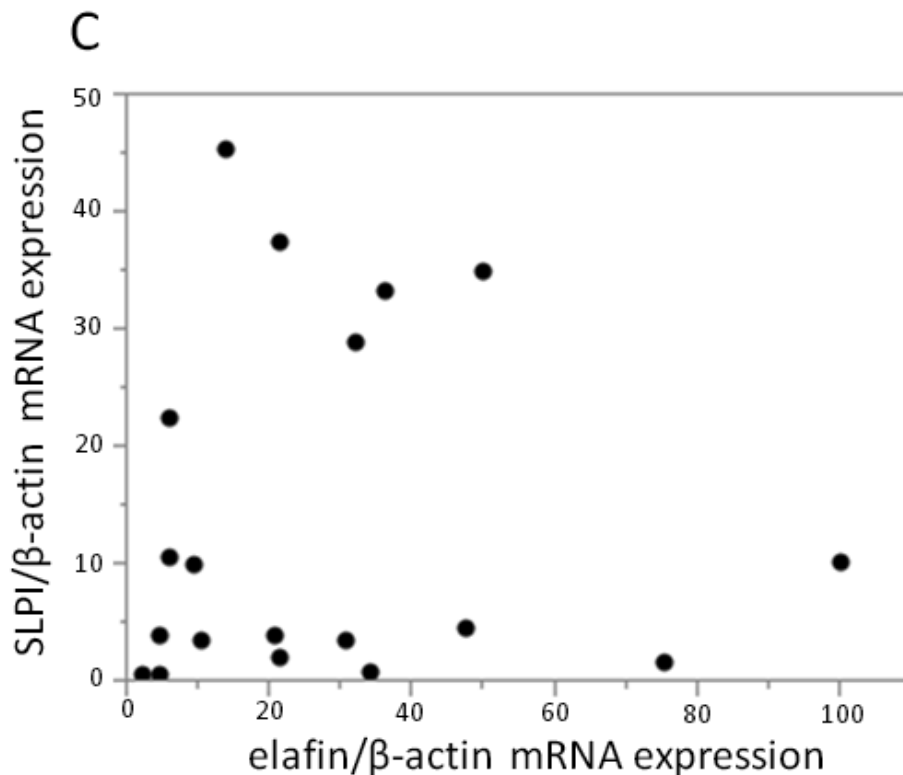
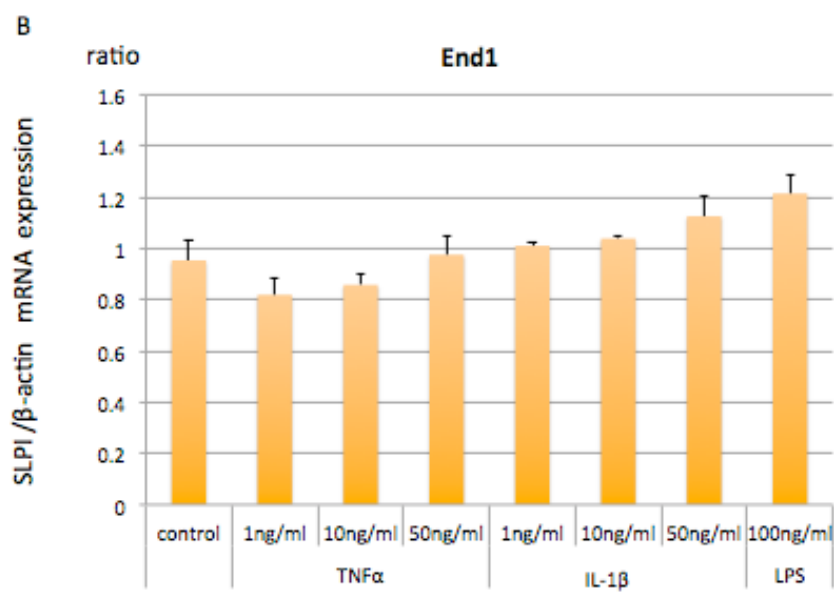
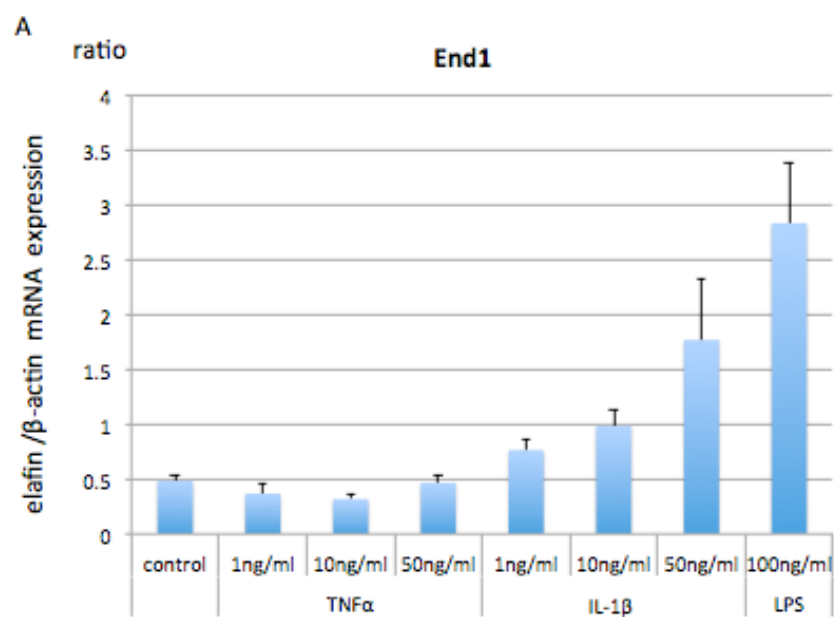


Figure7

子宮頸部における elafin、SLPI の mRNA 発現の切迫早産群と正常妊娠群との比較

切迫早産の診断で入院を要した症例(threatened preterm birth: TPB 群 n=42)を更に分娩時期に応じて、37 週未満の早産となった群 (preterm-TPB 群: p-TPB 群、n=19) と、37 週以降に分娩 (正常産) となった群(term-TPB 群: t-TPB 群、n=23) に分け、それらと妊娠週数を釣り合わせた正常経過の妊婦(n=26) を control 群とし、real-time PCR 法で子宮頸部における elafin と SLPI の mRNA 発現の比較を行った。

A)elafin mRNA の発現、B)SLPI mRNA の発現、C)elafin、SLPI mRNA 発現の相関図: p-TPB 群における elafin、SLPI の mRNA 発現を dot plot で表記。 $r^2=0.0003$ 。  
 ー: 平均値、\*:  $p<0.05$ 、\*\*:  $p<0.01$ 、NS: no statistical significance



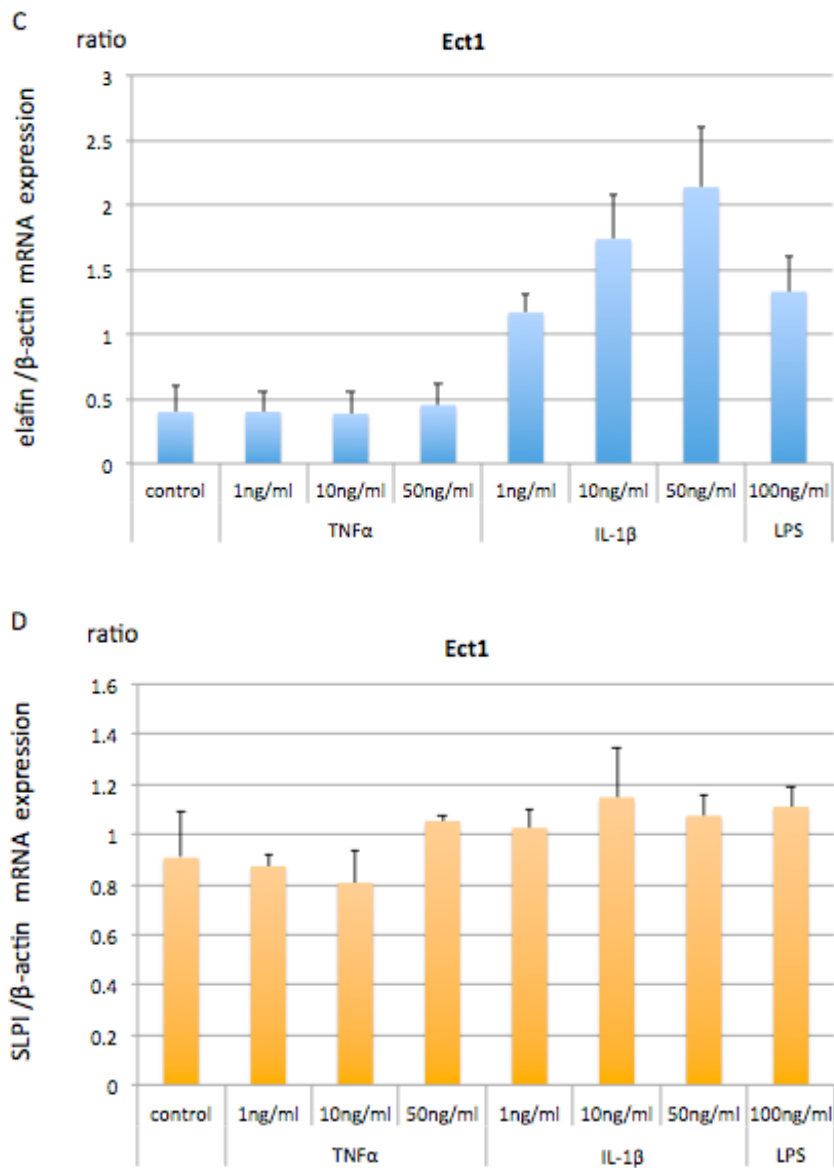


Figure 8 End1、Ect1 における elafin、SLPI の発現変化

End1、Ect1 の培養細胞 (n=3) に TNF $\alpha$  (1, 10, 50 ng/ml)、IL1 $\beta$  (1, 10, 50 ng/ml) 、LPS (100ng/ml) による炎症性刺激を 24 時間与えた後、real time PCR 法を用い mRNA の発現変化を比較した。この結果は 3 回の独立した実験において同様の結果であった。データは平均値 $\pm$ S.E.で表示。

A) End1 における elafin の mRNA の発現、B) End1 における SLPI の mRNA の発現、C) Ect1 における elafin の mRNA の発現、D) Ect1 における SLPI の mRNA の発現

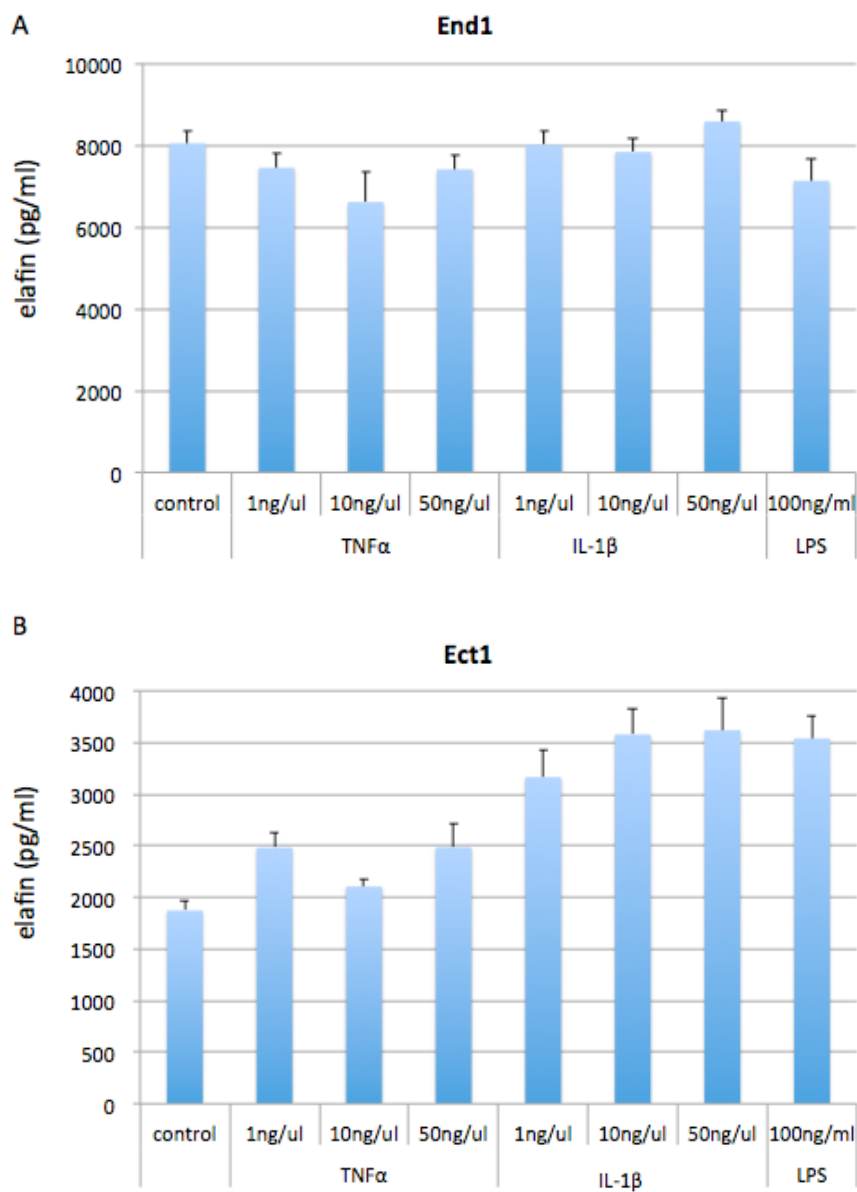
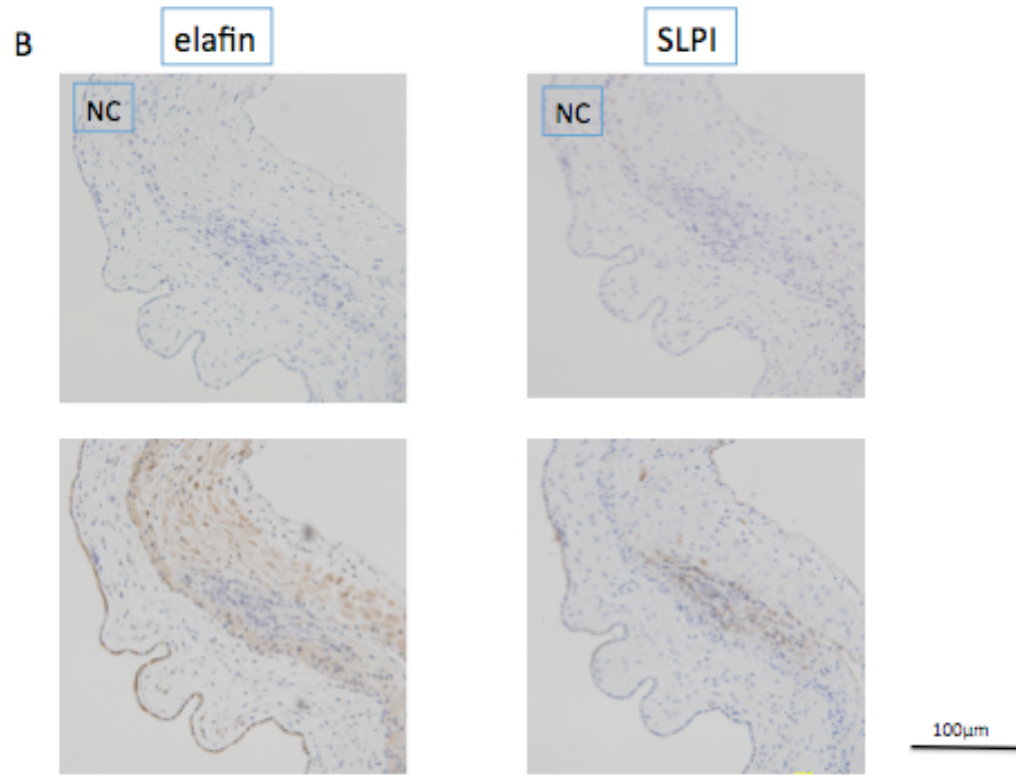
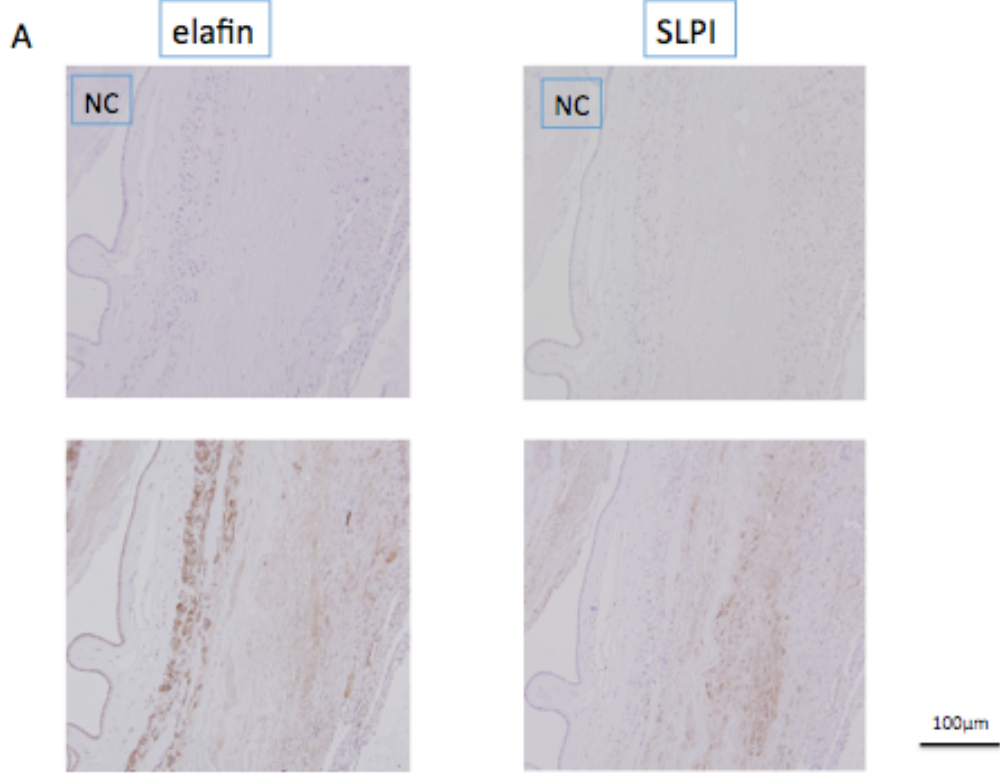


Figure 9 End1、Ect1 の培養細胞上清における elafin の発現変化

End1、Ect1 の培養上清中 (n=3)における elafin のタンパク濃度を ELISA 法により比較した。データは平均値±S.E.で表示。

A)End1 における elafin のタンパク濃度、B)Ect1 における elafin のタンパク濃度



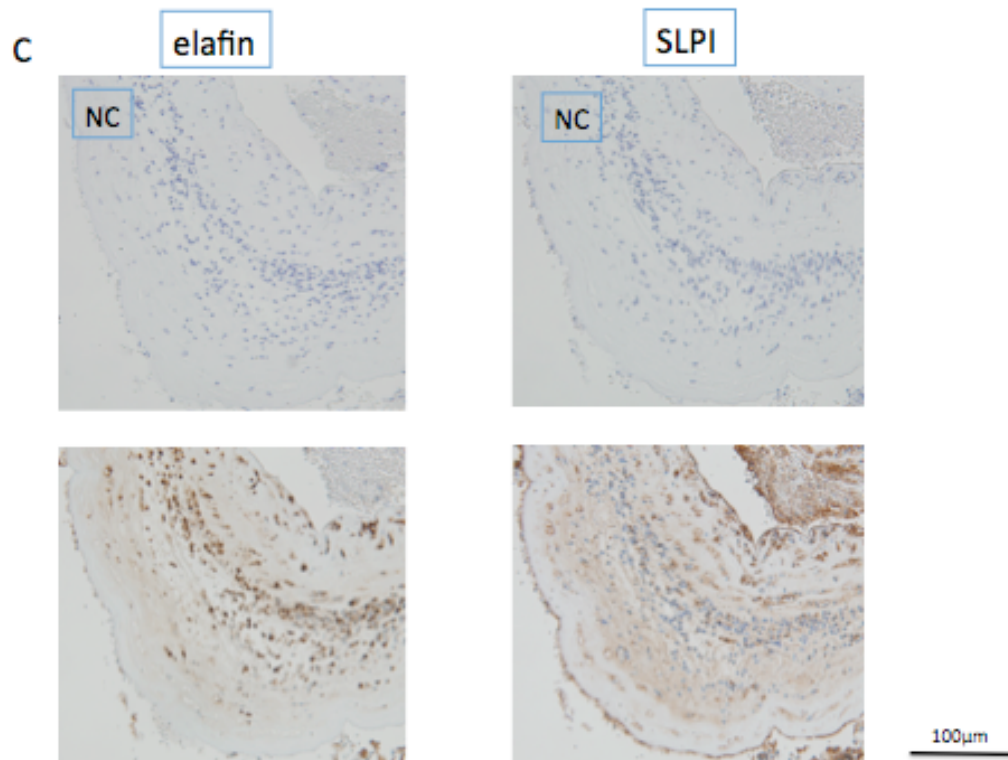


Figure10 卵膜における elafin、SLPI の免疫染色

卵膜組織に elafin、SLPI の免疫染色を行いその発現を調べた(それぞれ n=6、代表的な写真を提示した)。

A)正常卵膜：elafin は羊膜、絨毛膜、脱落膜に発現を認め、一方で SLPI は主に脱落膜に発現していることが確認できた。

B)、C)CAM 症例の卵膜：同一の stage 3 の CAM 症例の卵膜において、炎症の程度の異なる 2 箇所を選択して示した。炎症進行が高度な部位 (C) では軽度の部位 (B) に比べ、elafin では全体的に染色強度が増加しており、SLPI では脱落膜の染色強度が増加することに加えて、正常卵膜で染まっていなかった羊膜、絨毛膜においても発現が誘導されるという変化を認めた。

NC: negative control

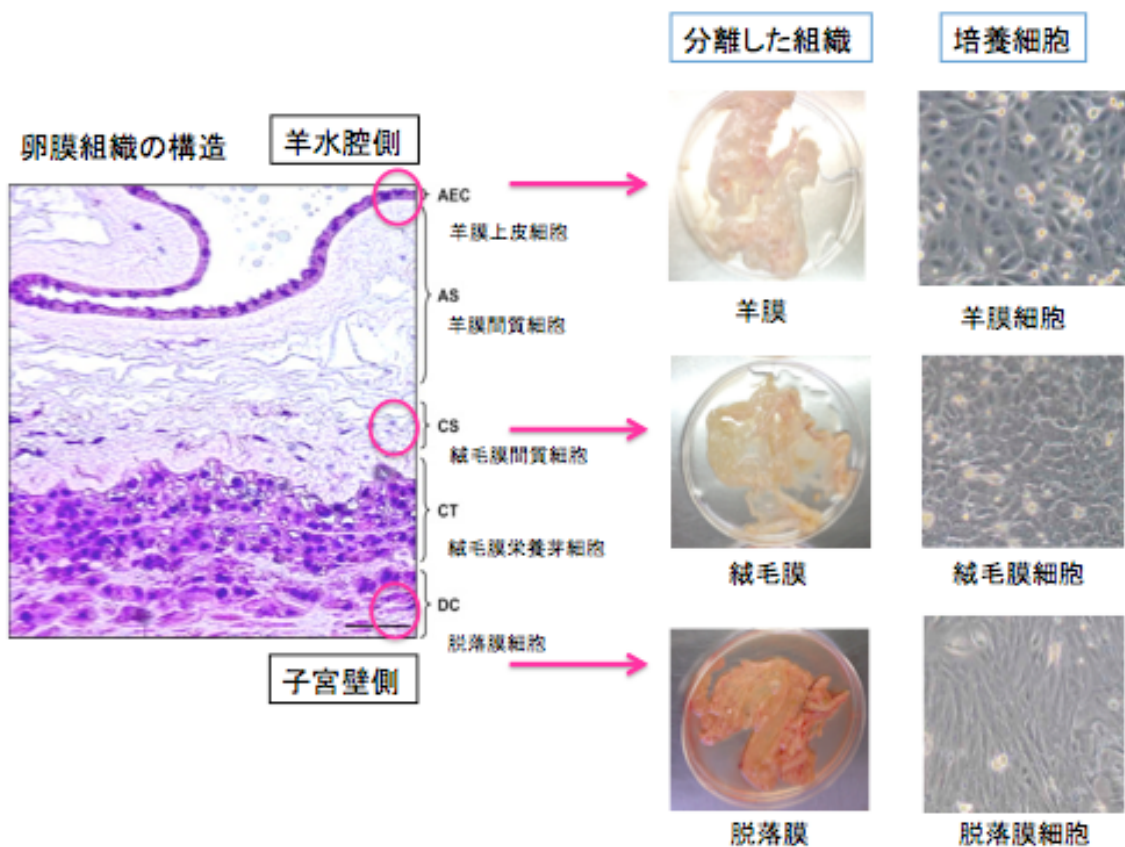


Figure11 卵膜初代培養細胞

卵膜組織を羊膜、絨毛膜、脱落膜に分離した際の組織の写真と、卵膜初代培養細胞の写真を示した。左側の「卵膜組織の構造」の写真は文献[46]より引用。

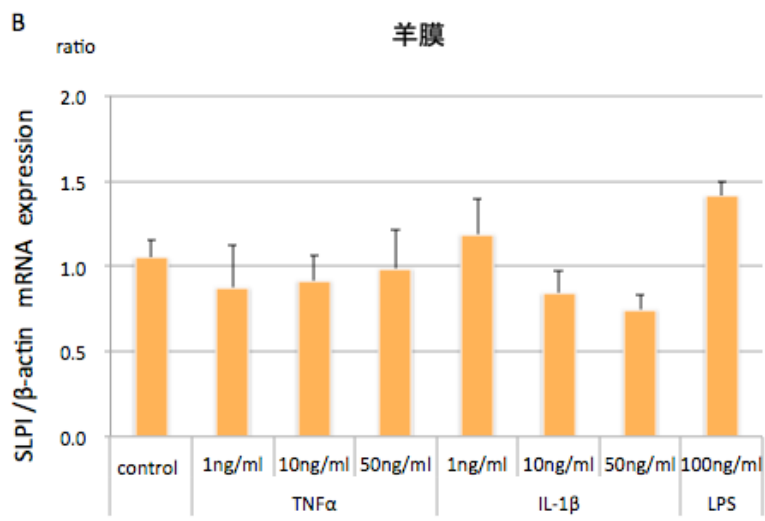
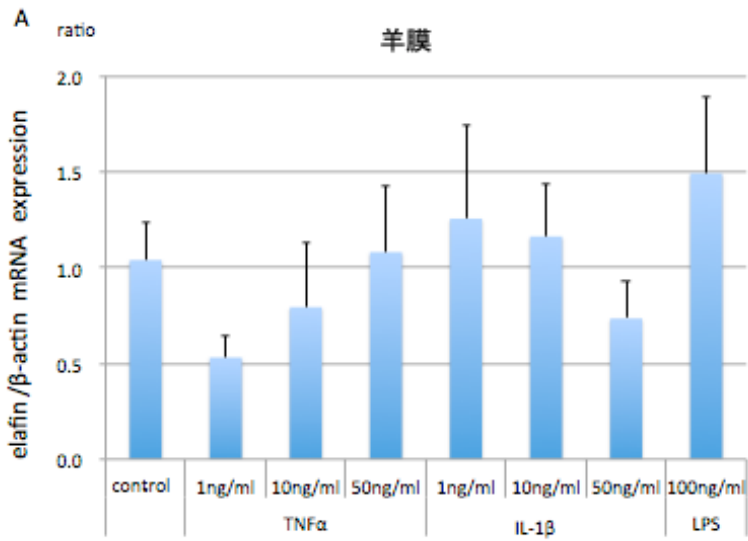
AEC: amniotic epithelial cells 羊膜上皮細胞

AS: amniotic stromal layer 羊膜間質細胞

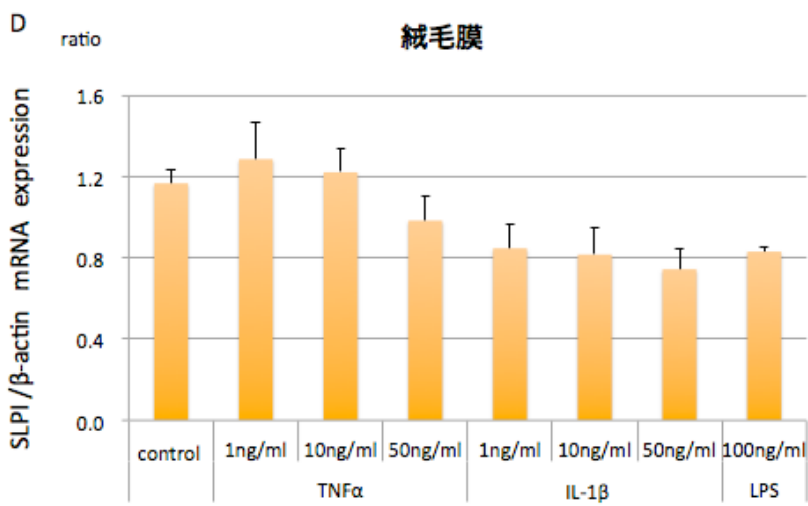
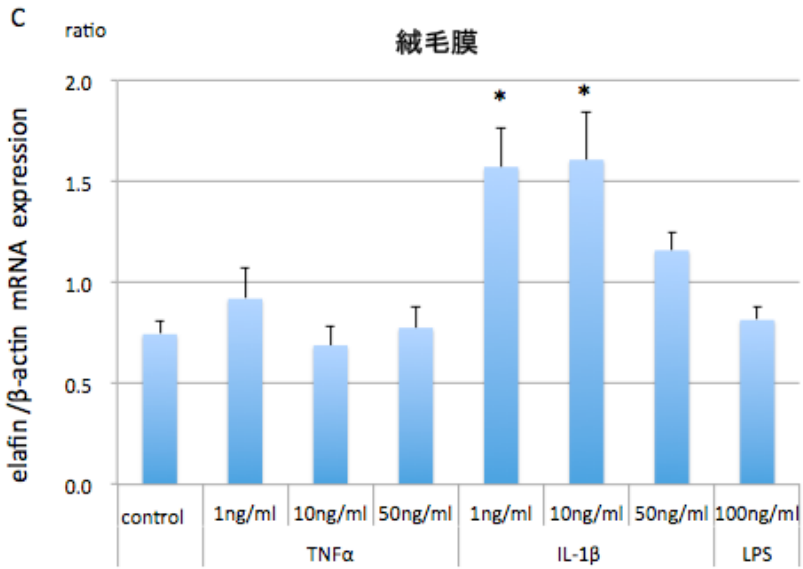
CS: chorionic stromal layers 絨毛膜間質細胞

CT: chorionic trophoblast cells 絨毛膜栄養芽細胞

DC: decidual cells 脱落膜細胞







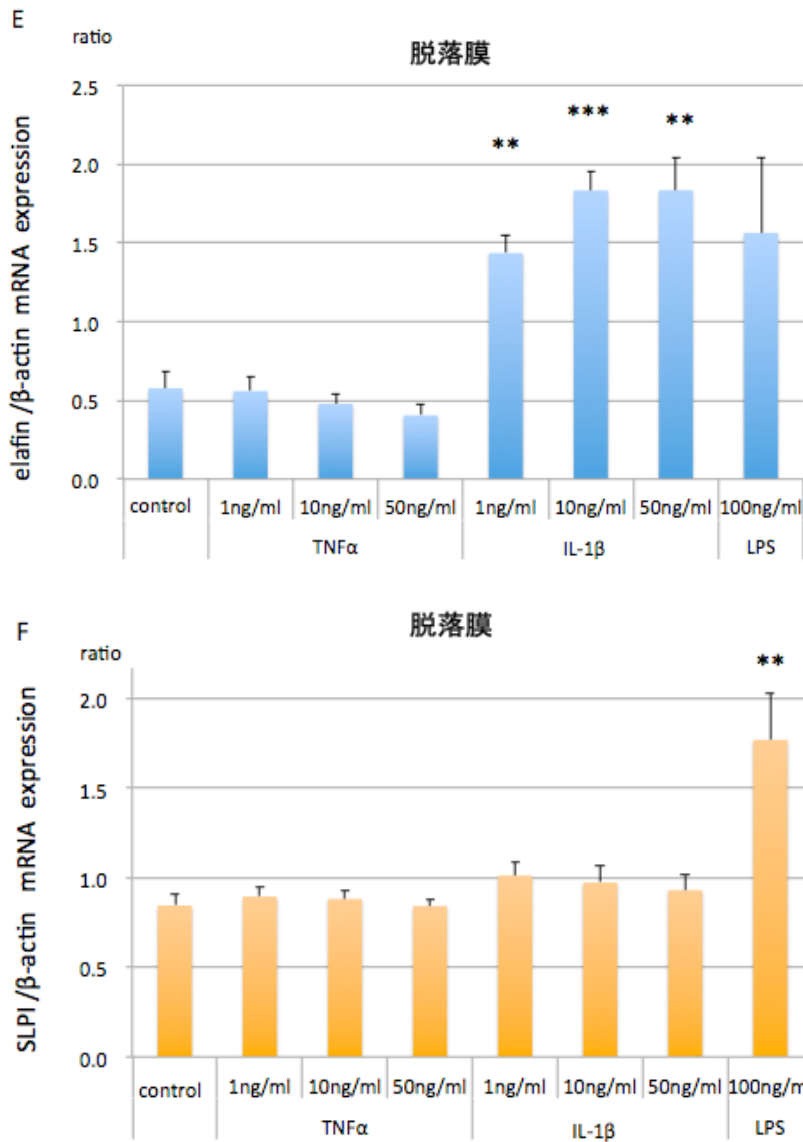


Figure 12 卵膜の初代培養細胞における mRNA 発現の変化

羊膜、絨毛膜、脱落膜細胞に分けて培養した初代卵膜培養細胞を TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、LPS で 24 時間刺激し、mRNA 発現の変化を real time PCR 法を用いて観察した(n=12)。データは平均値 $\pm$ S.E.で表示。

A) 羊膜培養細胞における elafin mRNA の発現変化、B) 羊膜培養細胞における SLPI mRNA の発現変化、C) 絨毛膜培養細胞における elafin mRNA の発現変化、D) 絨毛膜培養細胞における SLPI mRNA の発現変化、E) 脱落膜培養細胞における elafin mRNA の発現変化、F) 脱落膜培養細胞における SLPI mRNA の発現変化 \* : p<0.05、\*\* : p<0.01、\*\*\* : p<0.005

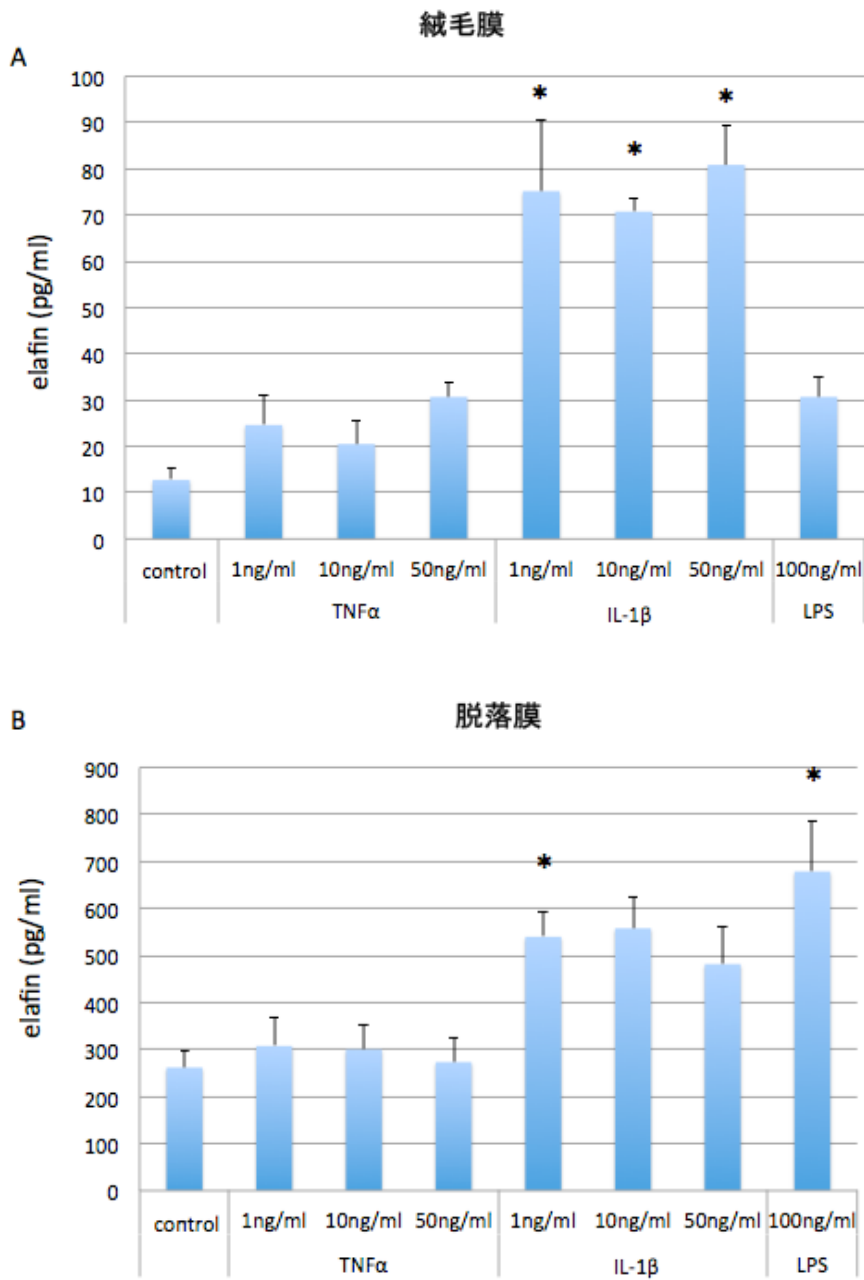


Figure13 卵膜細胞培養上清中の elafin タンパク濃度の変化

卵膜培養細胞刺激による mRNA の発現変化が見られた elafin について、培養上清中のタンパク量を ELISA 法にて比較検討した(n=12)。羊膜上清には elafin は検出されなかった。データは平均値±S.E.で表示。

A)絨毛膜細胞培養上清中の elafin タンパク濃度の変化、B)脱落膜細胞培養上清中の elafin タンパク濃度の変化 \*: p<0.05

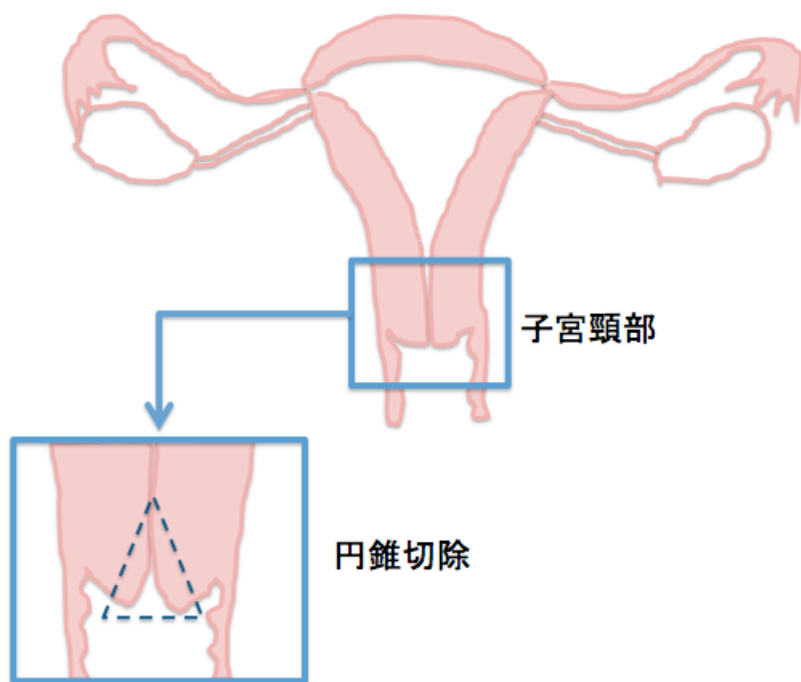


Figure14 子宮頸部円錐切除術について

子宮頸部円錐切除術とは、子宮頸癌等の子宮頸部の腫瘍性病変に対し、診断または治療のために病変部を含めて子宮頸部をレーザーメスまたは超音波メスにて図のように円錐状に切除する方法を指す。

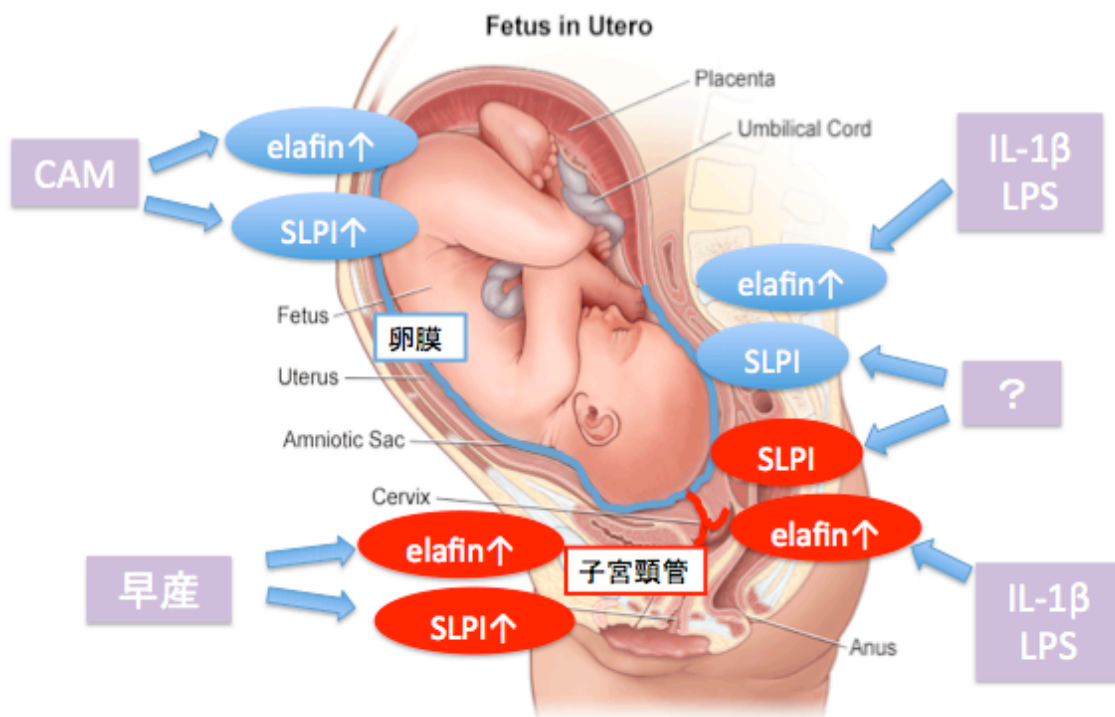


Figure15 本研究のまとめ

本研究では妊婦の子宮頸部と卵膜には elafin と SLPI が恒常的に発現しており、どちらも早産や CAM を発症した症例でその発現が増強することを証明した。更に elafin の発現制御には IL-1 $\beta$  と LPS が関与し、SLPI はそれとは異なる機序で発現が調整されている可能性を示した。

(図は文献 [47] より引用、一部改変)