

審査の結果の要旨

氏名 板岡 奈央

子宮内感染は早産の重要なリスク因子であり、子宮内感染を防ぐことは正常な妊娠を維持するために大切な課題である。子宮頸部と卵膜は妊娠子宮において胎児を子宮内感染から守る防御機構としての役割を果たしており、自然免疫系の関与が重要であると考えられている。本研究は、その感染防御に関与する自然免疫の中でも、抗菌作用、抗プロテアーゼ作用、抗炎症作用を持つペプチドである **elafin** と **SLPI** (**secretory leukocyte peptidase inhibitor**)に着目し、子宮頸部と卵膜における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、下記の結果を得ている。

1. 正常妊婦の子宮頸管擦過細胞の免疫染色を行い、子宮頸管上皮を構成する円柱上皮細胞と扁平上皮細胞ともに **elafin** と **SLPI** の染色が確認され、**elafin** と **SLPI** が子宮頸管に恒常的に発現していることが示された。
2. **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、正常妊婦の子宮頸管上皮細胞の擦過検体を妊娠初期、中期、後期、産褥期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る事が示された。**elafin** の発現量は妊娠期間中には変化が見られなかった。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。産褥期については **elafin** と **SLPI** ともに妊娠経過中に比べて顕著に発現が上昇していた。
3. 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**)と正常経過の妊婦 (**control 群**) の子宮頸管における **elafin** と **SLPI** の **mRNA** 発現の比較を **real time PCR** 法にて行った。**TPB 群**を更に早産となった群 (**preterm-TPB 群:p-TPB 群**)と、正期産となった群 (**term-TPB 群:t-TPB 群**)に分けて比較

検討したところ、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。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。

4. 子宮頸管細胞由来の2種類の細胞株 End1（内子宮口細胞株）、Ect1（外子宮口細胞株）を用いて、炎症性サイトカイン TNF α 、IL-1 β 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 β 、LPS 刺激で control に比べ発現が上昇し、TNF α については明らかな変化は認められなかった。一方で、SLPI の mRNA 発現、分泌量は End1、Ect1 と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。更に 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 β 、LPS 刺激で分泌量の上昇を認めた。一方で End1 では IL-1 β 、LPS 刺激後の分泌量の増加は明らかではなかった。
5. 正常妊娠の卵膜と、絨毛膜羊膜炎（CAM: chorioamnionitis）が病理学的に確認された症例の卵膜における elafin と SLPI の発現の違いを免疫染色法により評価した。正常卵膜では、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た。CAM の卵膜では正常卵膜と比較して、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が見られた。
6. 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、卵膜初代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 β 刺激に対して有意な発現の上昇が見られたが、TNF α 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 β 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。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。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 β 刺激に対して有意な濃度上昇を確認し、脱落膜ではIL-1 β とLPS刺激に対し有意な濃度上昇を認め認め、mRNAの変化と一致した結果が得られた。

以上、本論文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、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事が示唆された。更にelafinの発現制御にはIL-1 β 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。本研究は今まで知見の乏しかったelafinとSLPIの妊娠中の意義や早産との関連の解明に貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。