博士論文

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

鮫島　大輝

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

所属：東京大学大学院　博士課程　医学系研究科　生殖・発達・加齢医学専攻

指導教官：藤井知行

申請者：鮫島大輝

目次

要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・４

序文・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５－８

研究目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・９

実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１０－１７

結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１８－５２

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５３－５８

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５９

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・６０－６４

【要旨】

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。

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。

【序文】

早産と好中球エラスターゼ

　早産とは妊娠37週未満の分娩で、過期産は42週以降の分娩である。臨床的な問題は早産であり、全分娩の5%に発症し、出生した早産児は新生児集中治療室での長期管理を要した上に後遺症を残すこともしばしばあり、医療資源・患者家族への負担も大きい。早産のスクリーニング法として、妊娠中期の超音波による子宮頸管長の測定があり、世界的に普及している。Iamsらの報告[1]によると、妊娠24週時の子宮頸管長が35mm以下では3.79倍、26mm以下では9.49倍の早産リスクがある。日本でも、妊娠中期の頸管長25mm以下の症例を早産ハイリスクとして積極的に入院管理をしている。一方で、これは早産に至る結果を捉えたスクリーニング法であり、臨床の早産の原因が多岐に渡る[2]という概念を考慮すると、原因に応じた治療介入という面では不十分である。そのため、頸管長短縮に至る前段階でのさらなる分子的なアプローチによる原因探索が必要である。日本の臨床現場では、早産予知マーカーとして子宮頸管粘液中の好中球エラスターゼ（Neutrophil elastase:NE）検査が施行されている。NEは好中球から放出されるプロテアーゼであり、異物の破壊のみならず自己組織の破壊の作用も有している。しかし、頸管粘液中のNE検査は早産や頸管熟化と関連する[3, 4]という当初の報告の後に、早産予知に有用でなかった[5]という報告もあり、未だエビデンスは確立されていない。

子宮頸管リモデリングとマウスモデルでの頸管熟化

　子宮頸管組織は、分娩前および分娩・産褥期にダイナミックに変化する。外来異物の侵入を防いで妊娠を維持するための長く硬い構造から、胎児を娩出する産道としての柔らかく広がりやすい構

造へ変化し、分娩後は再び元の構造へ戻る。この一連の変化の概念を子宮頸管のリモデリングといい、Softening、Ripening、Dilation、Postpartum　repair の四段階のステップ（図 1）に分けられる[6]。

↑頸管熟化↓

段階	時期	組織内変化
Softening	～32週	コラーゲン再構築
Ripening	32週～分娩前1週	コラーゲン分解・濃度低下 ヒアルロン酸・プロテオグリカン増加
Dilation	分娩前1週～分娩	コラーゲン分解・濃度低下 IL8・サイトカイン増加 プロテアーゼ活性化 白血球浸潤
Postpartum repair	分娩～1か月	炎症低下 コラーゲン濃度上昇

図 1、頸管リモデリングの 4 段階
子宮頸管リモデリングの 4 段階、各段階の時期、組織での変化を示した（文献[6]を一部改編）

子宮頸管熟化の正確な定義は決まっていないが、本研究では一般的な概念である、分娩前 1 か月間での子宮頸管組織の変化を“頸管熟化”と定義する[7]。頸管熟化の適切な進行は、正常分娩の達成に不可欠であるが、図 1 に示したように、多くの経路が関与していると考えられる。ヒトにおける詳細な機序は未解明であり、頸管熟化時に発現誘導される物資はマイクロアレイ解析を用いた研究[8]で報告されるのみで、単一の物質ではなく多くの遺伝子の関与が明らかにされている。一方で、マウスモデルを用いた頸管熟化の研究は多くされており、正常分娩、二種類（感染性、プロゲステロン減弱性）の早産モデルにおける頸管熟化の機序の相違点や関連遺伝子についての解析は報告されている（図 2）。先述のように、ヒトの早産は多くの原因からなる疾患である。マウス早産モデルについて、LPS モデルはヒトの感染性早産を模倣しており、RU486 モデルはヒトのプロゲステロン機能減弱性早産を模倣している。実臨床においては、感染性早産は臨床所見から明らかな

症例が多いものの、プロゲステロン機能減弱性の早産は、典型的な臨床所見や徴候が同定されておらず、その実数も不明である。しかしながら、頸管長短縮症例に対するプロゲステロン製剤投与の早産予防効果は明らかであることから[9]、相当数が存在することが推測される。

	正常	感染性早産（LPS）	プロゲステロン減弱性早産（RU486）
プロゲステロン機能	↓	→	↓
組織像でのコラーゲン密度	↓↓	↓	↓↓↓
上昇する抗炎症遺伝子	Ccl 11	PTGS1、IL1a	IL6、TNF、CxCl2、PTGS2、IL1a
上昇するプロテアーゼ遺伝子	ADAMTS1、4	MMP8、ADAMTS1、4	MMP8、ADAMTS1、4
血球	単球↑	好中球↑	ー

図 2. マウスモデルでの頸管熟化の機序の相違
正常分娩、感染性早産、プロゲステロン減弱性早産における相違を示した（文献を一部改編）。

ヒトの分娩時の頸管熟化

ヒトの分娩には、炎症反応が関与している[10, 11]。陣痛発来中には、母体末梢血で白血球由来の IL1β や IL8 などの炎症性サイトカインが上昇[12]し、子宮筋層でもこれらの炎症性サイトカインが産生される[11, 13]。子宮頸管では、分娩前に炎症性サイトカイン[11]・抗炎症性サイトカイン[14]ともに上昇しており、過度な炎症による組織障害を防ぐ機構も作用していることが推測される。我々は、この炎症・抗炎症バランスと同様、プロテアーゼ・抗プロテアーゼバランスと頸管熟化の関与に着目した。頸管熟化の進行時に、細胞外マトリクスの分解が進行することは明らかにされており、プロテアーゼである MMP によるコラーゲン分解[8, 15]や細胞外マトリクス成分のグリコサミノグリカン・ヒアルロン酸の産生増加[16, 17]が報告されている。プロテアーゼが活性化する一方で、抗プロテアーゼの変化も生じている可能性があり、実際にマイクロアレイ解析で、陣痛発来中の子宮頸管で抗プロテアーゼである PAI1（Plasminogen activator inhibitor 1）が 13 倍発現上昇している報告[18]がある。これらの抗プロテアーゼ物質も、過度な組織分解を防ぐ生体の防御因子と

して機能していると考えられる。

Secretory Leukocyte Protease inhibitor（SLPI）の物質特性と早産との関連

　Secretory Leukocyte Protease inhibitor（SLPI）は、呼吸器・腸管・生殖器など様々な臓器の粘膜表面に発現している低分子蛋白質である[19]。SLPI は、WAP ドメインという構造[20]を有しており、抗菌・抗炎症・抗プロテアーゼ・組織修復などの多機能[21]を生体内で発揮している。特に呼吸器分野では研究が進んでおり、抗プロテアーゼ作用としての NE 誘導性の炎症への防御機能[22, 23]、抗炎症作用として、LPS 誘導性の炎症に対する NFkb 活性化や IFN-ɤ 阻害作用[24, 25]が報告されている。これらの報告から SLPI は、過度な炎症において組織障害を防御し、恒常性を維持するための重要な役割を果たしていると考えられる。一方で、女性生殖器分野での報告は多くなく、ヒトでは月経周期において排卵期に頸管粘液濃度が最も高値であること[26]、子宮体部の細胞株[27]やマウスの子宮体部ではプロゲステロン[28]により制御されていることなどが報告されている。周産期分野での報告はさらに少なく、妊娠中・後期や産褥期に向けた生理的な発現上昇、切迫早産で入院中の早産ハイリスク症例で、頸管の mRNA 高発現と早産転帰のリスク[29]が唯一報告されている。妊娠頸管における SLPI の役割として、妊娠維持や頸管熟化との関連が推測されるが、その制御機構や実際の機能については未解明である。

【研究目的】

プロテアーゼと抗プロテアーゼのバランスと、頸管熟化や早産発症との関係を探索するため、下記の 3 つを研究目的とした。

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、①rSLPI 投与による抗炎症効果の解明、②SLPI の制御物質の同定をする。

【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関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）

１．ヒト妊婦の子宮頸管細胞、子宮頸管粘液採取

　患者本人より文書による同意を得た上で、外来妊婦健診時に子宮頸管細胞および子宮頸管粘液を採取した。①正期産妊婦の子宮頸管細胞、②正期産妊婦の子宮頸管粘液、③中期妊婦の子宮頸管粘液の 3 群の検体を採取した。検体採取は内診診察時に行い、腟鏡診で子宮頸部を展開し、外頸部に付着していた腟分泌物を除去後に、子宮頸管細胞は綿棒で子宮頸部を擦過し採取し、子宮頸管粘液は綿棒を子宮頸管内に 10 秒留置して採取した。対象は、産科的合併症のない妊婦で、妊娠高血圧症候群、妊娠糖尿病、切迫早産、子宮頸管縫縮術後、破水後、性器出血のある症例は含まれていない。検体採取時の週数は、正期産妊婦は妊娠 37 週以降、中期妊婦は妊娠 24～26 週であった。

　子宮頸管細胞からは mRNA を抽出した。これは我々のグループの過去の報告と同様の方法で行い、採取した細胞には約 4:1 の割合で扁平上皮細胞と円柱上皮細胞が含まれている[29]。擦過した綿棒を 2ml の RNA 抽出液（FARB buffer、FAVORGEN）内で撹拌し、mRNA 抽出操作へ移行した。子宮頸管粘液からはタンパク質を抽出した。留置した綿棒を 1ml の PBS-0.25M NaCl 溶液内で撹拌し、15000rpm で 10 分間遠心し、上清をタンパク抽出液として回収し、各種タンパク濃度測定まで-80℃で保存した。溶液中の総タンパク濃度は、Bio-Rad protein assay（BIO-RAD）でプロトコール

に従い測定した。

子宮頸管細胞は、妊娠 37 週以降から分娩までの間の時期に採取し、採取から分娩した日までの日数により、4 グループに分類した（A：0-6 日、B：7-13 日、C：14-20 日、D：21 日以上）。採取から分娩までの日数を予測できるかを目的とし、解析を行った。子宮頸管粘液は、妊娠 37 週以降から分娩までの時期の間に採取し、採取から分娩までの時期ごとに 2 群に分けた（0-7 日、8 日以上）。採取から 1 週間以内の分娩の有無を予測できるかを目的とし、解析を行った。

２．マウスの早産、分娩遅延確認実験

C57/BL6 系統のマウスを 12 時間：12 時間の明暗環境下で飼育した。交配は、8-12 週齢の雌マウスと雄マウスを一晩同一ケージで飼育して行い、翌朝に膣栓を確認した。膣栓が確認された日の朝 9 時を Day0 とした。

２．１　早産モデル

ヒトの早産を模倣した非感染性および感染性モデルの 2 種類の早産モデルを使用して、頸管熟化時の変化を解析した。次の 2 つは既に過去の研究において確立された早産誘導の機序が異なるモデルである。非感染性モデル[30, 31]は、Day14.5 にプロゲステロン受容体拮抗薬である RU486（Sigma-Aldrich Japan）500µg を 200µl エタノールに溶解させて皮下投与した。この RU486 早産モデルでは、投与 15-22 時間後に早産する。感染性モデルは、LPS（from *Escherichia coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich Japan）10µg を経頸管投与[32]した。この LPS 早産モデルでは投与 13-20 時間後に早産する。

２．２　分娩遅延モデル

　血清プロゲステロンレベルを維持するプロゲステロン分娩遅延モデルと、子宮頸管熟化を阻害して妊娠期間を延長する SRD5A 阻害剤分娩遅延モデルの 2 種類の分娩遅延モデルを使用し、このモデルにおける頸管熟化の変化を正常例と比較した。まず、分娩遅延の表現型確認の実験のために、プロゲステロン分娩遅延モデル[33]で、Day17,18 に 2mg、1mg のプロゲステロン（Wako）を 200µl ごま油に溶解させて皮下投与した。SRD5A 阻害剤分娩遅延モデルでは、Day17,18 に 75、25µg の SRD5A inhibitor である Dutasteride（Adooq Bioscience）を 200µl PBS に溶解させて頸管投与した。Day20（AM 9:00）の時点で分娩していない個体を分娩遅延ありとした。

３．マウス検体採取（子宮頸管組織、頸管洗浄液、腹腔内洗浄液）

　早産実験では Day15（LPS、RU486 投与 12 時間後）に、分娩遅延実験では Day18.5（プロゲステロン、SRD5A 阻害剤投与の 2 回目投与 12 時間後）に、マウスをイソフルランによる安楽死後に解剖し、検体を回収した。また、LPS 投与後の時系列変化確認のための実験では、投与前、投与後 2 時間、投与後 12 時間の時点で検体回収した。rSLPI 投与実験では、LPS 投与前、投与後 2 時間、投与後 4 時間の時点で検体回収した。子宮頸管組織は、子宮体部との境界および腟との境界で子宮頸管を切断し回収した。回収した頸管組織は、mRNA 抽出用には、RNA later（Life Technologies）溶液内に、Western blot 法用には、CelLytic MT reagent (Sigma-Aldrich Japan)＋1% protease inhibitor cocktail (Nacalai tesque)溶液内に、組織免疫染色用には、4% paraformaldehyde (Wako)溶液内にそれぞれ入れた。頸管洗浄液は、切断直後の子宮頸部を 1ml の PBS 内で洗浄し、頸管洗浄回収液とした。

腹腔内洗浄液は､解剖時の腹腔内に2mlのPBSを散布し､回収した｡それぞれの回収液を15000rpm､4℃で 10 分間遠心し、上清を洗浄液として-80℃で保管した。

４．細胞培養刺激実験

子宮頸部上皮細胞株である Ect1/E6E7（Ect1）細胞、子宮内膜腺癌細胞株である Ishikawa 細胞をSPI 社より入手し、それぞれ Keratinocyte serum free medium（Thermo Fisher）、E-MEM＋5%FBS（チャコール処理済）＋5%MEM 用必須アミノ酸（DS ファーマバイオメディカル）で培養した。全ての実験は、3-5 回の継代数の範囲内で、細胞数を計測した後に使用した。細胞培養実験は、①rSLPI投与による抗炎症効果の解明、②SLPI の制御物質の同定の 2 つを目的として施行した。

５．mRNA 抽出および reverse transcription（RT）法

子宮頸管細胞、マウス子宮頸管組織、培養細胞から、Total RNA を回収した。Blood/Cultured Cell Total RNA Purification Mini Kit (FAVORGEN)のプロトコール通り行った。回収した RNA の純度を、分光光度計（Epoch Micro-Volume Spectrophotometer System: Bio-Tec）での吸光度比（260nm/280nm）により評価し、1.7～2.1 の間の値の検体のみ、次の cDNA への逆転写へ用いた。cDNA への逆転写は､Rever Tra Ace qPCR RT Master Mix（TOYOBO）を使用し､反応液は､総量 50µl（5×RT Master Mix 10µl、RNA 抽出液＋Nuclease-free water 40µl）で、サーマルサイクラ―の設定は 37℃15 分→50℃5分→98℃5 分で行った。

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

mRNA から変換した cDNA を用いて、各遺伝子発現を real time PCR 法で定量比較した。各遺伝子の特異的プライマー配列を表 1 に示す。Light Cycler 480 SYBR Green Ⅰ Master（Roche）で測定した。PCR 反応液は、総量 20µl（c DNA 5µl、SYBR Green Master 10µl、PCR grade H2O 3µl、forward および reverse primer (10µM) 1µl）で、PCR プロトコールは 95℃10 分間の後、95℃10 秒→アニーリング 10 秒→72℃ 5-15 秒（プロダクトサイズ bp/25 秒）を 40 サイクルで行った。内因性コントロール遺伝子として、β-actin を用いて、各遺伝子発現を相対比較した。

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

ヒト子宮頸管粘液、マウス頸管洗浄液、マウス腹腔洗浄液の SLPI、IL-6、KC、TNF alpha 濃度を ELISA 法で測定した。凍結保存していた検体を氷上で融解し、Human SLPI Quantikine ELISA Kit、Mouse IL-6 Quantikine ELISA Kit、Mouse CXCL1/KC Quantikine ELISA Kit、Mouse TNF-alpha Quantikine ELISA Kit のプロトコールに従い測定した。各キットの測定可能範囲はそれぞれ、SLPI（62.5-4000pg/ml）、Mouse IL-6（7.8-500pg/ml）、Mouse CXCL1/KC（15.6-1000pg/ml）、TNF-alpha（10.9-700pg/ml）である。吸光度計の 450nm 波長の測定値を用いて、スタンダードサンプルから基準曲線を作成し、各検体の濃度を算出した。個々の蛋白濃度を、総蛋白濃度で補正し解析した。

８．Western blot 法

マウス子宮頸部組織 10mg をホモジェナイズし、15000rpm,4℃で 10 分間遠心し、上清を蛋白抽出液とした。細胞培養実験では、細胞表面を PBS で洗浄後、セルスクレイパー（IWAKI）で剥がした後、細胞浮遊液を 1500rpm、5 分で遠心し、上清を吸引し、ペレットへ CelLytic MT reagent

(Sigma-Aldrich Japan)を 100µl 加えた。PR、GR などの核内蛋白検出用には氷水下で超音波破砕装置を 10 分間使用した。その後、15000 rpm,4℃で 10 分間遠心し、上清を蛋白抽出液とした。

SDS-PAGE で 20µg の蛋白を各ウェルにローディングし、PVDF メンブレン（Merck Millipore）へブロッティングした。メンブレンを 5％スキムミルクもしくは 5%BSA で室温 1 時間ブロッキングし、蛋白特異的一次抗体で 4℃一晩インキュベートした。一次抗体は、Anti-annexin a1 1/2000（Thermo Fisher）、Anti-beta actin 1/1000（CST）、Anti-progesterone receptor A/B antibody 1/2000（CST）、Anti-glucocorticoid receptor 1/1000（CST）、Anti-phospho-glucocorticoid receptor Ser211 1/1000（CST）、Anti-phospho-glucocorticoid receptor Ser226 1/1000（Sigma-aldrich）、Anti-IKB alpha 1/1000（CST）を使用した。TBS-T で洗浄後、HRP 標識二次抗体　1/2000（GE healthcare）で常温 1 時間インキュベートし、再度 TBS-T で洗浄後、Western Chemiluminescent HRP substrate (Merck Millipore)で反応させ、ImageQuant LAS 4000 system (GE healthcare)で撮影した。内因性コントロール蛋白として、β-actin を用いて、相対比較した

９．免疫染色

4% paraformaldehyde で固定された検体をパラフィン処理し、5µm の厚さで薄切し、連続切片を作成した。切片はキシレンで脱パラフィンし、熱処理（Microwave、Citrate buffer、pH6.0）し抗原賦活化を行った。0.3%過酸化水素／メタノールで室温 30 分間、プロテインブロッキングバッファーで室温 10 分間反応させた。一次抗体は、Anti-SLPI（Biorad）、ネガティブコントロールには Rabbit Ig（Dako）を使用し、4℃で一晩インキュベートした。TBS-T で洗浄後、二次抗体 Anti-Rabbit IgG Biotin（Dako）で室温 30 分インキュベートした。TBS-T で再度洗浄後、PO 標識ストレプトアビジン（ニ

チレイ）で室温 5 分インキュベートした。対比染色としてヘマトキシリン染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

１０．統計解析

統計解析は JMP pro 13（SAS）を使用した。他群比較は、Kruskal‐Wallis 検定に post-hoc analysis として Steel‐Dwass 検定を行った。二群比較は、連続データは Mann-Whitney *U* 検定を行い、カテゴリーデータはカイ二乗検定を行った。ヒト頸管 mRNA 検体は全結果を主成分分析し、遺伝子間の相関性を評価し、重回帰分析で分娩までの日数の予測式を作成した。ヒト頸管 SLPI 濃度から 1 週間以内の分娩の有無を予測するためのロジスティック回帰分析を行い、カットオフ値から ROC 曲線を作成した。

表 1. 使用プライマーの配列

	Forward (5' - > 3')	Reverse (5' - > 3')	Product size (base pair)
ヒト			
COX2	TCCACAGTTACCCGGAGTTTA	GCCGAGCTATCAACCGGAT	108
IL1β	TACCTGTCCTGCGTGTTGAA	TCTTTGGGTAATTTTTGGGATCT	76
ILRN	TTCAGAGACGATCTGCCGACCC	ACCAGACTTGACACAGGACAGGCA	235
TGFβ1	AGCGACTCGCCAGAGTGGTTA	GCAGTGTGTTATCCCCTGCTGTCA	131
MMP2	GCTGGCTGCCTTAGAACCTTTC	GAACCATCACTATGTGGGCTGAGA	170
MMP8	CCACTTTCAGAATGTTGAAGGGAAG	TCACGGAGGACAGGTAGAATGGA	124
SLPI	GGATGGCCAGTGCAAGCGTGA	GCCTGCTGTGTGCCAAGCCT	199
PAI1	CCCTTTGCAGGATGGAACTA	TGGCAGGCAGTACAAGAGTG	103
HAS2	TGGCATCACACCTCATCATC	ACCAATTGCGTTACGTGTTG	367
VCAN	GCAAGTGATGCGGGTCTTTAC	TTGCCGCCCTGTAGTGAAAC	109
ACTB	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT	250
DUSP1	GCTCAGCCTTCCCCTGAGTA	GATACGCACTGCCCAGGTACA	131
マウス			
SLPI	CCTTTCACGGTGCTCCTT	GGCAGACTTTCCCACATATA	361
PAI1	TCCTCATCCTGCCTAAGTTCTCT	CTGCTCTTGGTCGGAAAGACTT	126
SRD5A1	GAGTTGGATGAGTTGCGCCTA	GGACCACTGCGAGGAGTAG	123
ANXA1	AAGGTGTGGATGAAGCAACC	TGCATCAAACTGAGCTGGAG	188
COL1A1	GAGCGGAGAGTACTGGATCG	GCTTCTTTTCCTTGGGGTTC	158
COL6A1	CTGGTGAAGGAGAACTATGCAG	GTCTAGCAGGATGGTGATGTC	144
CXCL2	CCAAGGGTTGACTTCAAGAAC	AGCGAGGCACATCAGGTACG	284
KC	CAATGAGCTGCGCTGTCAGTG	CTTGGGGACACCTTTTAGCATC	205
TNFa	TCTTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGA	GTGGTTTGCTACGACGTGGGCTA	158
IL6	AACGATGATGCACTTGCAGA	GAGCATTGGAAATTGGGGTA	283
IL1β	TTGACGGACCCCAAAAGATG	AGAAGGTGCTCATGTCCTCA	204
ACTB	GCCTTCCTTCTTGGGTATGG	AGGTCTTTACGGATGTCAACG	90

【結果】

検討１．臨床サンプルを用いた頸管熟化制御因子の探索

１－１．正期産妊婦の子宮頸管細胞 PCR

　正期産妊婦の擦過頸管細胞を、妊娠 37 週以降から分娩までの間の時期に採取し、採取から分娩した日までの日数により、4 グループに分類した（A：0-6 日、B：7-13 日、C：14-20 日、D：21 日以上）。全 117 検体を、62 人から採取した。検体を 2 回採取した妊婦が 25 人、3 回採取した妊婦が 9 人、4 回採取した妊婦が 4 人であった。検体採取と同時に行った内診所見による Bishop スコアを表 2 に示す。

表 2.各グループの Bishop スコア

	A: ≤6 日 (n=42)	B: 7-13 日 (n=40)	C: 14-20 日 (n=23)	D: ≥21 日 (n=12)
子宮口開大 (cm)	1.9±1.1	1.4±0.6	1.1±0.5	0.5±0.6
Bishop スコア	4.4±2.5	3.3±1.9	1.7±1.1	0.9±1.2

平均±SD

　過去の報告[8, 18, 34-38]を参考に、既知の頸管熟化関連遺伝子 10 種類（COX2、MMP8、PAI1、HAS2、MMP2、TGFβ1、SLPI、ILRN、IL1β、VCAN）の mRNA 発現を real time PCR 法で解析した（図 3）。前述のように、採取から分娩までの時期ごとのグループ別に、各遺伝子発現変化を継時的に比較した。各遺伝子発現の継時的変化は、分娩への増減パターンごとにいくつかのパターンに

分けられた。COX2、MMP8、PAI1、HAS2、MMP2、SLPI は、分娩 4 週間前から 1 週間前まで段階的に増加していく傾向であった。この時期は、”ripening” と”Dilation”の時期であり、細胞外マトリクス成分の分解を反映していると考えられる。COX2、MMP8、PAI1、HAS2、SLPI は分娩前最後の 1 週間で低下する傾向を示した一方で、MMP2 は分娩まで段階的に上昇した。TGFβ1、ILRN、IL1β、VCAN は、分娩に向かう変化として、一定の傾向を示さなかった。

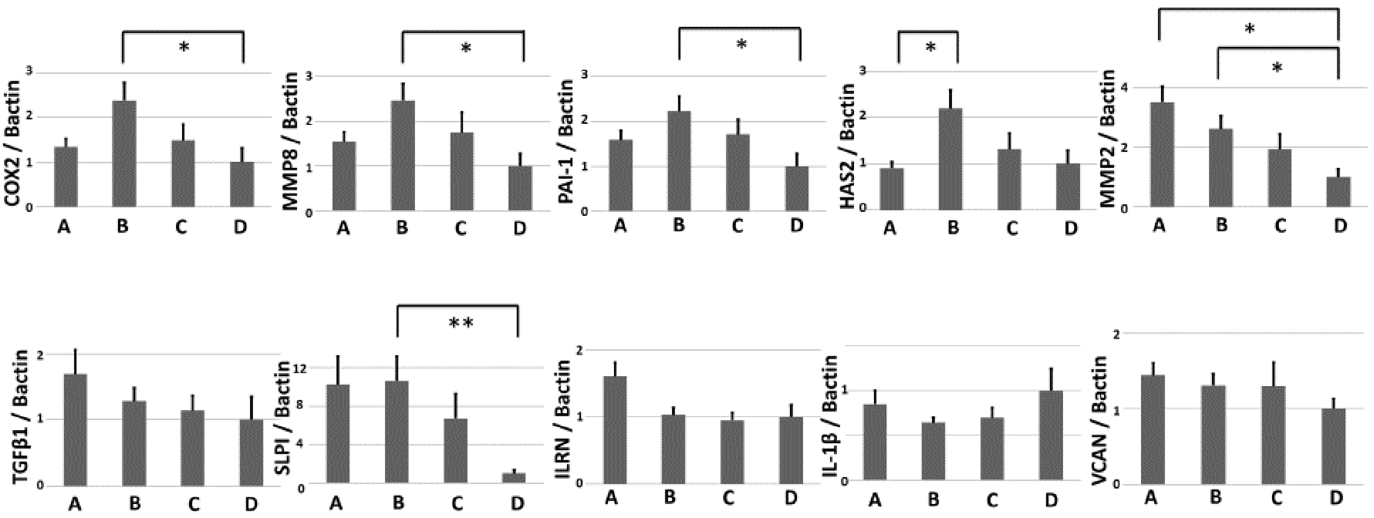


図 3. 10 種類の頸管熟化関連遺伝子の分娩までの日数別の mRNA 発現結果
正期産妊婦の擦過頸管細胞を採取し、採取から分娩した日までの日数により、4 群に分類した（A：0-6 日、B：7-13 日、C：14-20 日、D：21 日以上）。real time PCR 法で COX2、MMP8、PAI1、HAS2、MMP2、TGFβ1、SLPI、ILRN、IL1β、VCAN の発現を定量し、A（n = 42）、B（n = 40）、C（n = 23）、D（n = 15）の群間比較した。Kruskal–Wallis 検定に post-hoc analysis として Steel–Dwass 検定を行った。平均±SE で表示、*：$p < 0.05$、**：$p < 0.005$

10 種類の遺伝子の相関性が高いことを考慮し、全遺伝子発現情報を主成分分析（Principle Component Analysis：PCA）により分類した。PCA は JMP Pro13 を使用した。スクリープロットで解析したところ、エイゲンバリューが 3 以上では成分を増やしても大きな変化がないことを確認した（図 4A）。そのため、3 成分に分けて解析したところ、全遺伝子発現情報の 75.7%が PC1-3 の 3 つの成分で説明できた（PC1：44.9%、PC2：19.6%、PC3：11.2%）。バイプロットを作成し、PC1-3

と各遺伝子の相関を解析したところ、PC1 は COX2、MMP8、PAI1、HAS2、MMP2 と強い相関を認めた。同様に、PC2 は TGFβ1、SLPI、ILRN と、PC3 は IL1β、VCAN とそれぞれ強い相関を認めた（図 4B）。結果として、全 10 遺伝子が 3 つの主成分のいずれかと相関を認めた。

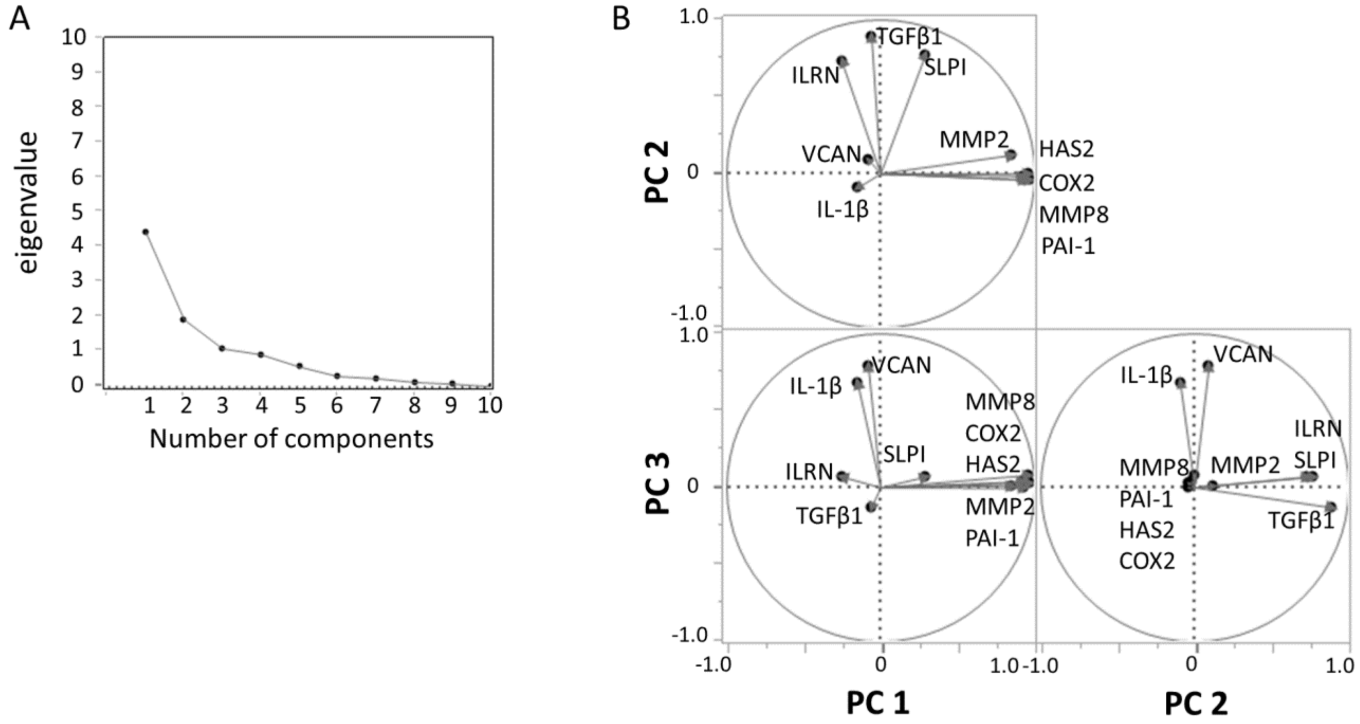


図 4. 全検体の主成分分析（PCA）結果
全 117 検体の PCR 結果を主成分分析した。（A）スクリープロット：縦軸にエイゲンバリュー、横軸に成分数を示す。（B）バイプロット：PC1～3 について、2 成分間のバイプロットを作成した。矢印の方向は各成分内での各遺伝子発現の相関を示している。左上：PC1 と 2、左下：PC1 と 3、右下：PC2 と 3。

これらの頸管熟化関連遺伝子の発現情報をまとめた PC1-3 から、分娩日を予測できるかどうかについて検討した。採取から分娩までの日数を予測するため、重回帰分析を行った。PC1-3、Bishop スコアを変数として、分娩までの予測式を作成したところ、PC2 と Bishop スコアの二つが、分娩までの日数を予測するための有意な因子として抽出された（表 3）。

表 3.各因子の分娩予測能（重回帰分析結果）

変数	Coefficient β (95% CI)	P 値
Bishop score	−1.87 (−2.33-−1.41)	<.0001*
PC1	−0.33 (−0.83-0.16)	0.18
PC2	−1.27 (−2.02-−0.52)	0.001*
PC3	−0.04 (−1.05-0.96)	0.93

*：P　< 0.05

　この2つの因子から､分娩予測のための計算式を作成した｡分娩日までの日数＝15.7－1.86*Bishop スコアー1.27*PC2 (日)、R2＝0.39、RMSE（root-mean-square error）＝5.7

この、Bishop スコアと PC2 から作成した予測式は、Bishop スコア単独から算出した予測式（R2＝0.31、RMSE＝6.0）よりも予測能が高かった。また、PC2 ではなく、PC2 に寄与する 3 遺伝子の各遺伝子発現と Bishop スコアを組み合わせて算出した予測式と比較しても、PC2 と Bishop スコアからの予測式の予測能の方が高かった｡(TGFβ1 : R2=0.36、RMSE=5.8、SLPI : R2=0.35、RMSE=5.8、ILRN : R2=0.34、RMSE=5.9)｡この結果は、PCA により、分娩予測能が高くなっていることを示唆している。この予測式から算出した分娩日数と、実際の分娩までの日数のブロットを図 5A に示す（R2=0.39、p < 0.0001）。また、PC2 と Bishop スコアの相関関係を評価したが、有意な相関を認めなかった（p = 0.33、R = －0.09）。

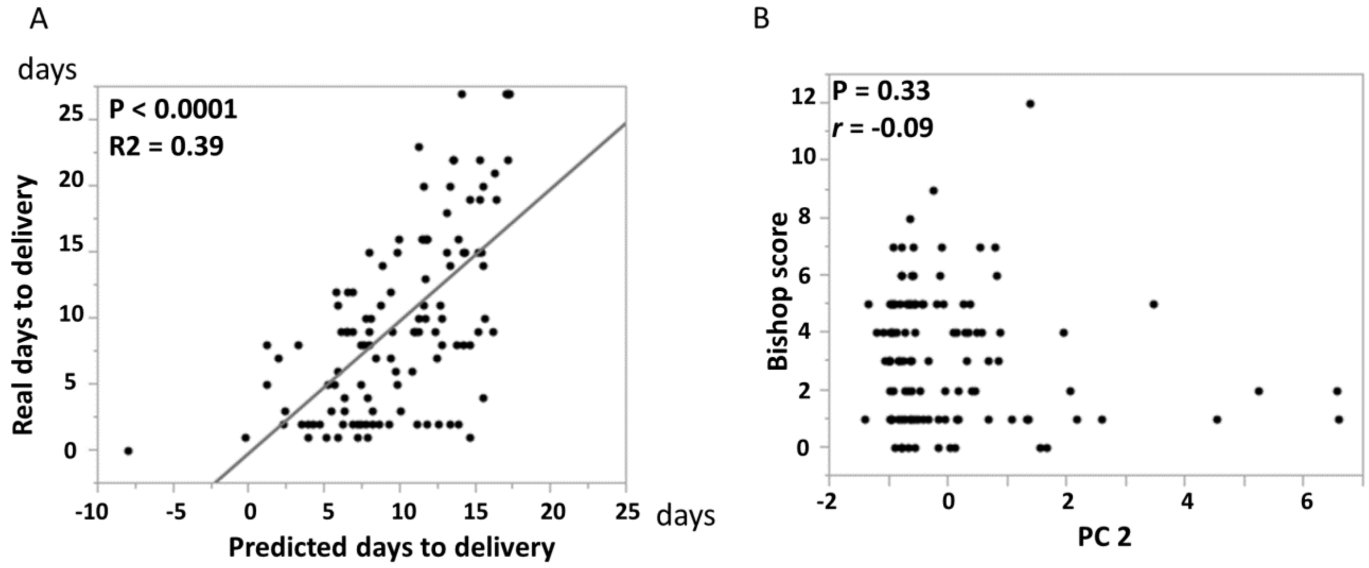


図 5. A：予測式からの分娩日数と実際の分娩日数、B：ビショップスコアと PC2 の相関
A：作成した分娩予測式（分娩日までの日数＝15.7－1.86*Bishop スコア－1.27*PC2 (日)）から導き出された分娩日を横軸に、実際の分娩日を縦軸にし、プロットした（P < 0.0001、R2 = 0.39）。B：ビショップスコアと PC2 の相関を評価した（P = 0.33、r = -0.09）。

１－２．正期産妊婦の頸管粘液

正期産妊婦の頸管粘液を、妊娠 37 週以降から分娩までの時期の間に採取し、採取から分娩までの時期ごとに 2 群に分けた。49 人の妊婦を対象とした。検体を 2 回採取した妊婦が 24 人、3 回採取した妊婦が 11 人であった。採取から分娩まで 8 日以上をグループ A（n = 46、35 人）、7 日以内のものをグループ B（n = 49、49 人）とした。グループ B は、さらに前期破水を発症して分娩に至った 10 名と、前期破水を発症せずに分娩に至った 39 名に分けた。表 4 に、対象 49 人の臨床情報を示す。前期破水群と非前期破水群で、各項目に有意差を認めなかった。

表 4. グループ B（採取から分娩まで 7 日以内）の臨床情報

	全体 （n =49）	前期破水なし （n = 39）	前期破水あり （n = 10）	P 値
初産婦の割合（%）	51 (25/49)	46.2 (18/39)	70 (7/10)	0.18
年齢（歳）	29.8±5.1	30.0 ± 5.2	28.9 ± 4.7	0.51
分娩週数（週±日）	38w6d±8.1	38w6d ± 9.0	38w6d ± 4.1	0.66
身長（cm）	159.0±5.4	158.8 ± 5.3	159.7 ± 5.6	0.65
BMI	21.1±2.5	21.2 ± 2.7	20.5 ± 1.7	0.52
オキシトシン使用（%）	22.4 (11/49)	23.1 (9/39)	20 (2/10)	0.84

平均±SD

正期産期での分娩前の頸管粘液中の SLPI 濃度の変化を観察するため、全検体における、採取から分娩までの日数と SLPI 濃度との相関のグラフを図 6 に示す。両者は、中等度の相関を認めた（r = 0.37，p = 0.0002）。

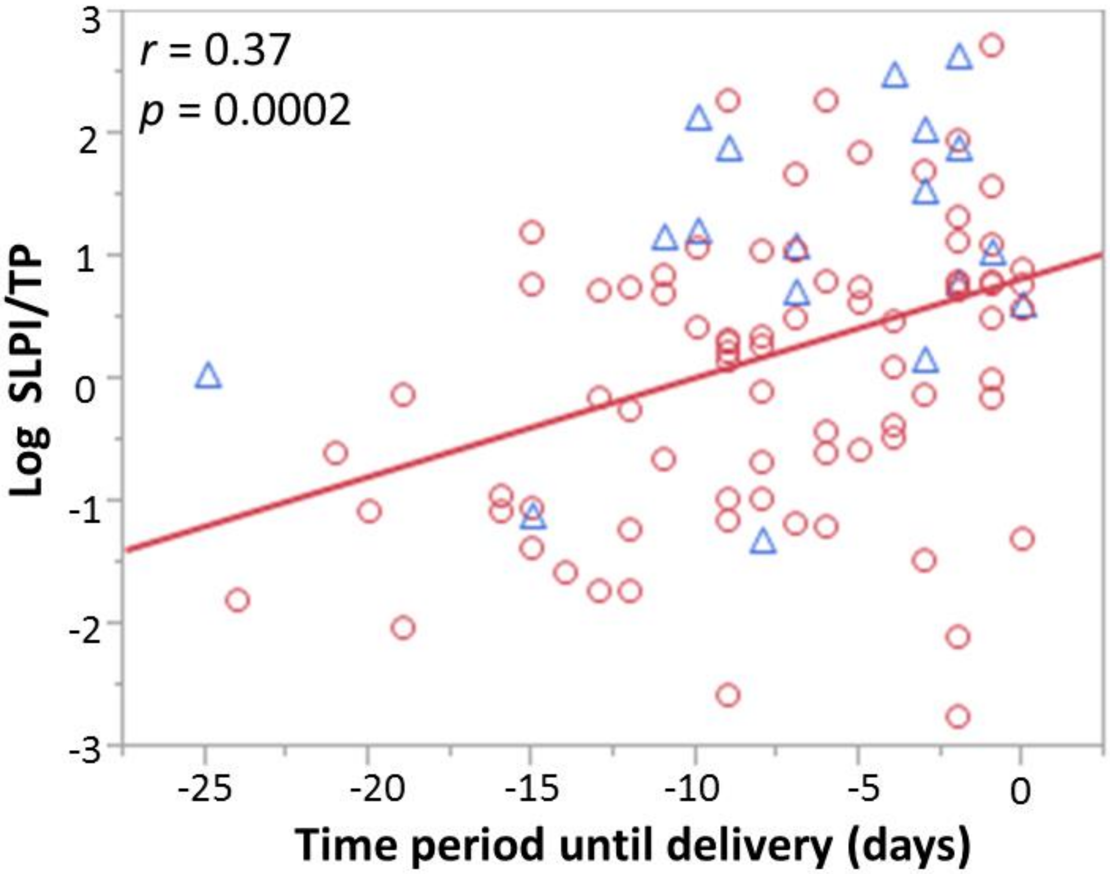


図 6. 頸管粘液中 SLPI 濃度と分娩までの日数の相関
妊娠 37 週以降の妊婦の頸管粘液を採取し、測定した SLPI 濃度を縦軸に示した。横軸に採取から分娩までの日数を示し、両者の相関について、Spearman の順位相関係数（*r*）を示した（95 検体、n = 49、*r* = 0.37、p = 0.0002）。○：前期破水なし、△：前期破水あり

同一症例における SLPI 濃度変化を明らかにするため、対象 49 人のうち、3 回の検体採取が可能であった 11 人の連続データを図 7 に示す。11 人のうち、9 人（82%）は分娩前の最後の外来受診時の SLPI 濃度が最も高値であった。また、5 人（45%）は分娩までの 3 回で持続的の SLPI 濃度上昇を認めた。これらは、分娩に向けて頸管 SLPI 濃度が上昇していく傾向を示している。

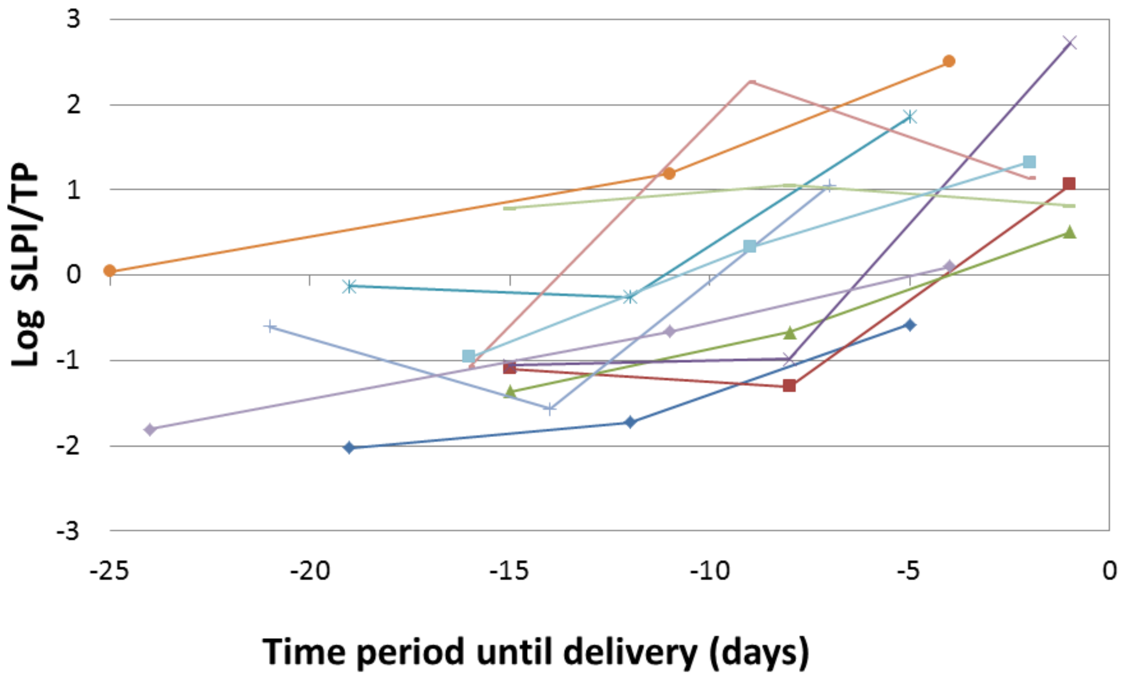


図 7. 同一症例における頸管粘液中 SLPI 濃度の推移と分娩までの日数の関係
連続 3 回の検体採取が可能であった 11 人について、分娩までの頸管粘液中 SLPI 濃度の推移を折れ線グラフで示した。それぞれの線は 1 症例を示している（n = 11）。

全 95 検体のうち、分娩までの日数が 1 週間以上のグループ A と、1 週間以内のグループ B の SLPI 濃度を比較したところ、グループ B は、グループ A と比べて有意に SLPI 濃度が高値であった（図 8，p = 0.001）。

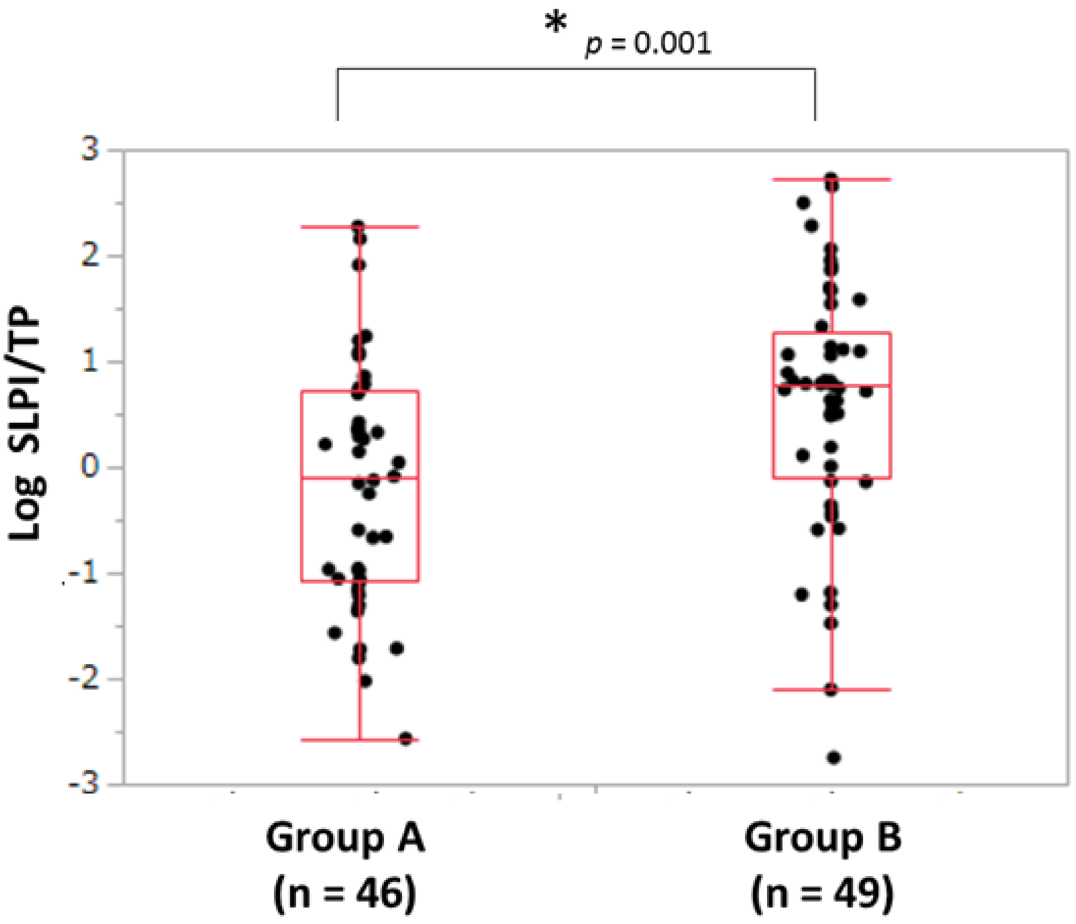


図 8. 分娩までの 8 日以上の群と 7 日以内の群の頸管粘液 SLPI 濃度の比較
全 95 検体を、採取から分娩までの日数が 8 日以上のグループ A（n = 46）と 7 日以内のグループ B（n = 49）に分け、頸管粘液 SLPI 濃度を比較した（p = 0.001、Mann–Whitney U 検定)。分位点で表示。

グループ B の中で、前期破水を発症した群（n = 10）と発症していない群（n = 39）を比較したところ、前期破水群では、SLPI 濃度が有意に高値であった（図 9、p = 0.01)。

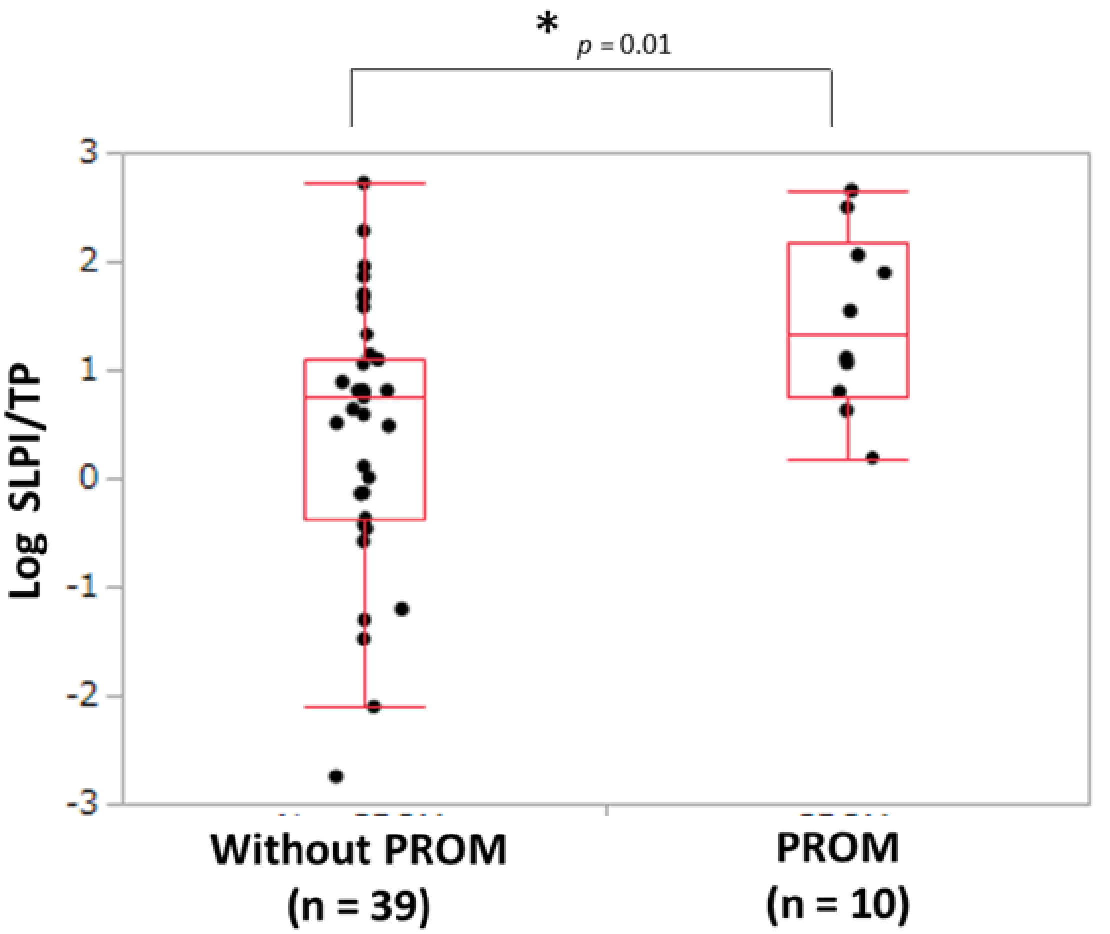


図 9. 分娩まで 7 日以内の群における前期破水発症の有無別の頸管粘液中 SLPI 濃度の比較
グループ B（分娩まで 7 日以内）を前期破水発症なし（n = 39)、前期破水発症あり（n = 10）の二群に分けて、頸管粘液中 SLPI 濃度を比較した（Mann–Whitney U 検定、p = 0.01)。分位点で表示。

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 μg/ml で、AUC 0.70 であった（図 10)。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。

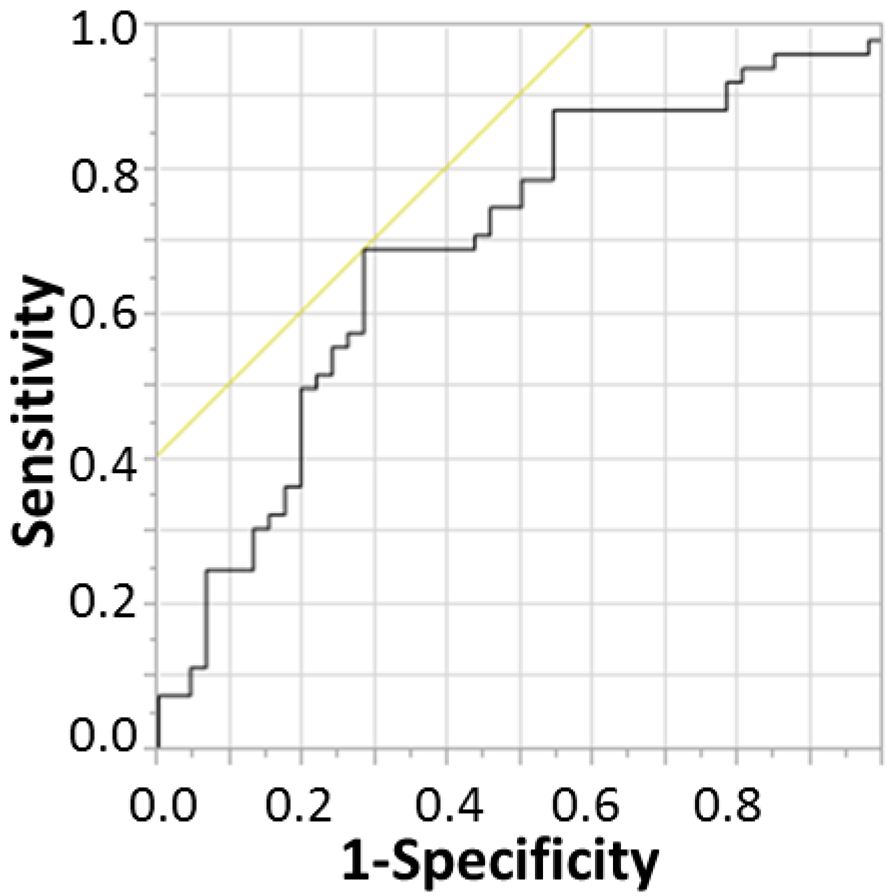


図 10. 7 日以内の分娩の有無を予測するための ROC 曲線
全 95 検体について、頸管粘液中 SLPI 濃度から、7 日以内の分娩の有無を予測するための ROC 曲線を作成した。カットオフ値の SLPI 濃度 1.62 µg/ml 、AUC 0.70。

１－３．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。また、両群における SLPI と NE の相関関係を評価した。図 11 に、検体採取時の対象 166 名の頸管長の分布を示す。また、対象 166 人の年齢、頸管長、初産婦割合、今回妊娠における早産率を表 5 に示し、頸管長正常群と短縮群で比較した。今回妊娠における早産は 166 名中 5 名であり、頸管長正常群で 1 名、頸管長短縮群で 4 名であった（$p < 0.001$）。母体年齢、初産婦割合は二群間で有意差を認めなかった。

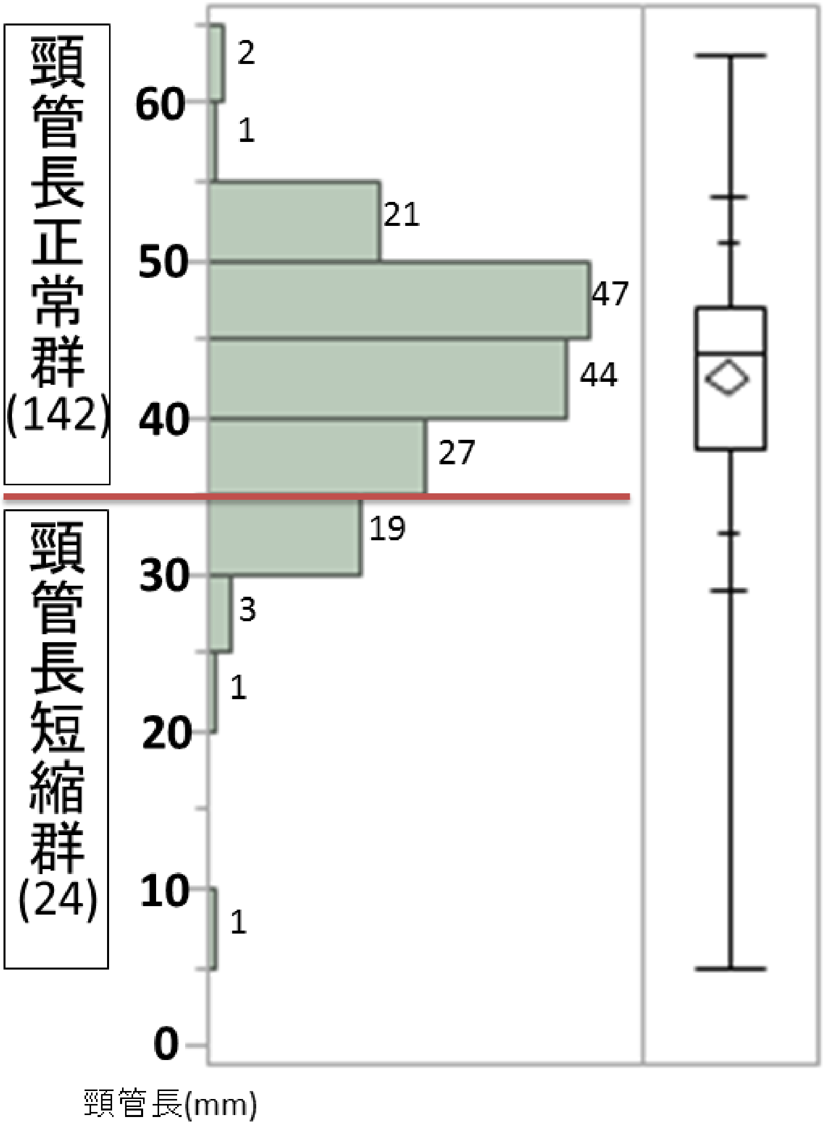


図 11. 頸管長の分布（n = 166）
今回妊娠で産科的異常を指摘されていない、妊娠 24-26 週の正常妊婦 166 名の頸管粘液採取時に同時に子宮頸管長を測定し、その分布を示した。左にヒストグラムを示し、右に箱ひげ図を示す。縦軸は頸管長を 5 ㎜毎に示し、ヒストグラム内の数字は頸管長を 5 ㎜毎に分類した際の症例数を示している。頸管長 35mm をカットオフ値とし、35mm 以上の正常群は 142 名、35mm 未満の短縮群は 24 名であった。

表 5. 対象 166 人の年齢、頚管長、初産婦割合、分娩転帰（今回妊娠における早産率）

	全体 （n = 166）	頚管長正常群 （n = 142）	頚管長短縮群 （n = 24）	p
年齢	31.1 ± 4.1	31.1 ± 4.2	31.1 ± 3.9	0.50
頚管長	44 [5-63]	44.5 [35-63]	31.5 [5-34]	< 0.0001*
初産婦割合	55.4%（92）	56.3%（80）	50%（12）	0.66
早産率	3.0% (5)	0.7% (1)	16.7% (4)	< 0.001*

年齢は平均±SD、頚管長は中央値で表示。*：P　< 0.05

頚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（図 12)。SLPI の抗プロテアーゼとしての機能を評価するため、NE との相関を検討した。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。頚管長正常群、頚管長短縮群の二群に分けて比較したところ、頚管長正常群では r = −0.14（p = 0.10）で有意ではなかったが、頚管長短縮群では r = −0.82（p < 0.0001）であり、強い逆相関を認めた（図 13)。頚管長短縮群でのみ SLPI と NE が強い逆相関の関係にあるという結果は、頚管熟化の進行過程では SLPI と NE が互いに拮抗的な関係で作用している可能性を示している。

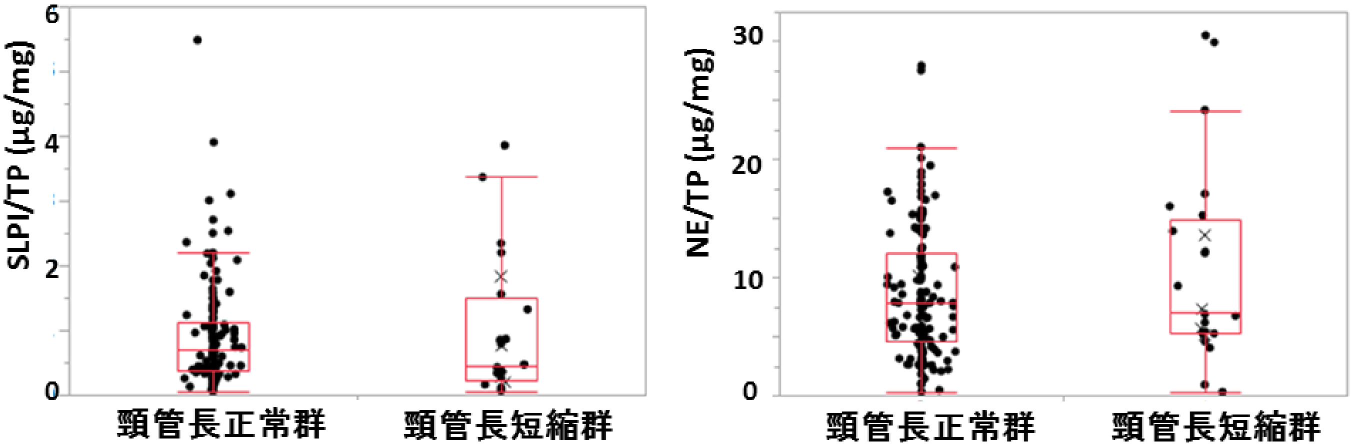


図 12. 頸管長正常群（n = 142）と短縮群（n = 24）の頸管粘液中 SLPI、NE 濃度の比較
頸管粘液採取時の頸管長から、35mm 以上の正常群と 35mm 未満の短縮群の 2 群に分類し、SLPI・NE 濃度を比較した。●：正期産症例、×：早産症例。Mann–Whitney U 検定、p = 0.36（SLPI：左グラフ）、0.47（NE：右グラフ）

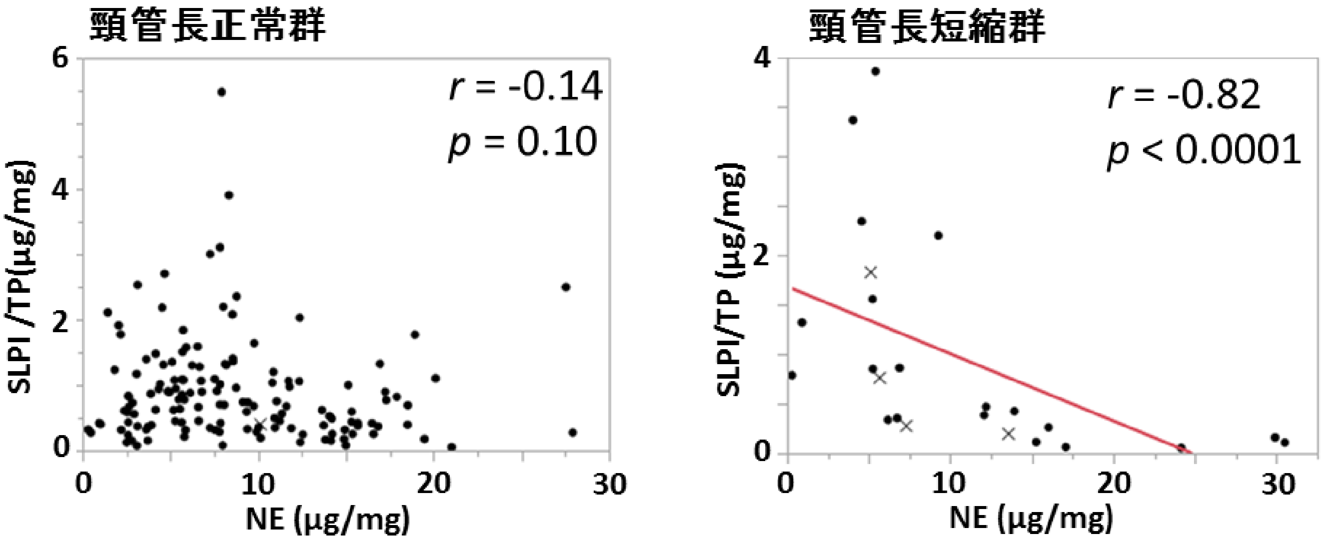


図 13. 頸管長短縮の有無別の SLPI と NE の相関
頸管長正常群（n = 142）、短縮群（n = 24）別に、横軸に NE 濃度、縦軸の SLPI 濃度で両者の相関関係をドットグラフで示し、Spearman の順位相関係数（*r*）を比較した。●：正期産症例、×：早産症例。左グラフ：頸管長正常群（*r* = -0.14、p = 0.10）、右グラフ：頸管長短縮群（*r* = -0.82、p < 0.0001）

検討２．マウスモデルを用いた SLPI の頸管熟化への関与

２－１．マウス分娩遅延確認実験

Day17、18 に 2mg（n = 4）、1mg（n = 4）のプロゲステロン（Wako）を皮下投与したところ、全

例が分娩遅延した。一方、200µl ごま油を投与したコントロール群（n = 4）では全例が正常分娩した。同様に Day17、18 に SRD5A inhibitor である Dutasteride を頸管投与したところ、75µg 投与では 63%（5/8）、25µg 投与では 80%（4/5）が分娩遅延した。コントロールの 200µl PBS 投与では、全例が正常分娩した（n = 5）。（図 14）

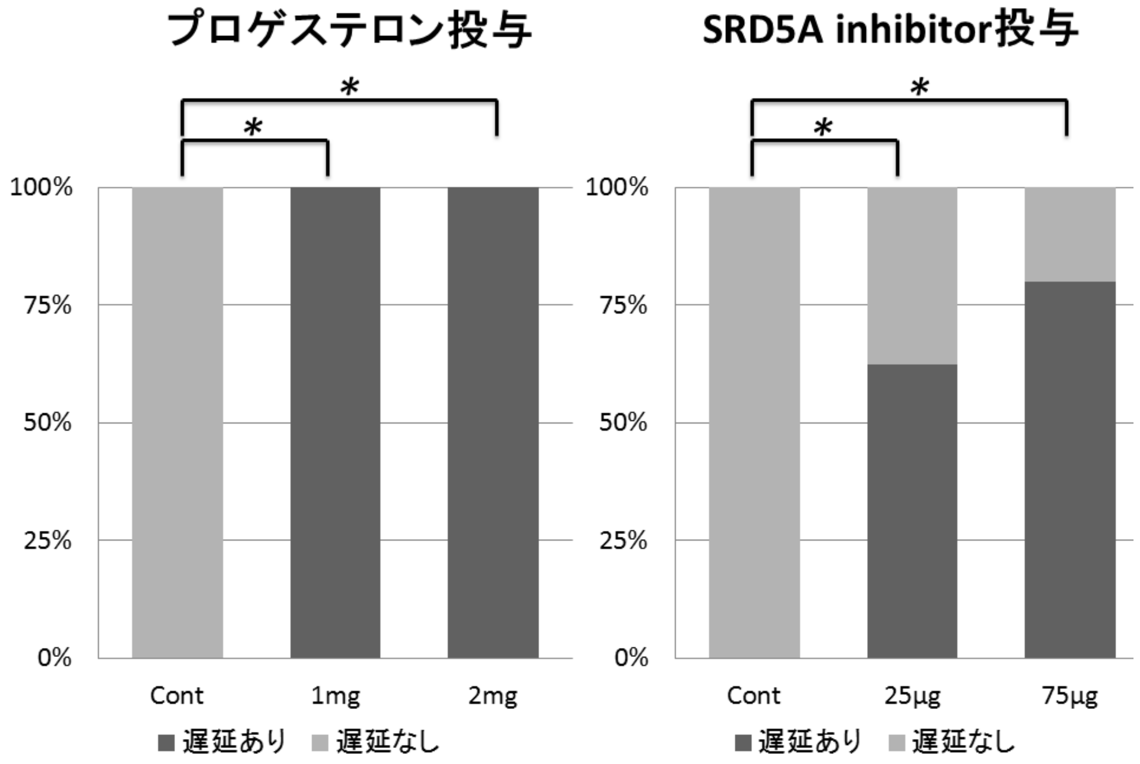


図 14. プロゲステロン投与、SRD5A 阻害剤投与分娩遅延モデルでの表現型
C57/BL6 マウスの妊娠 17、18 日目の AM9 時にプロゲステロン 1mg（n = 4）、2mg（n = 4）もしくはごま油（コントロール、n = 4）を皮下投与し、妊娠 20 日目の AM9 時の時点で分娩していない個体を分娩遅延ありとし、分娩遅延の個体の確率を左グラフに示した。同様に、妊娠 17、18 日目の AM9 時に SRD5A 阻害剤（Dutasteride）75µg（n = 8）、25µg（n = 5）もしくは PBS（コントロール、n = 5）を頸管投与し、分娩遅延率を右グラフに示した。*：$p < 0.05$、カイ二乗検定

２－２．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、PAI1、ANXA1、COL1A1、COL6A1 遺伝子発現を real time PCR 法で解析した（図 15）。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。PAI1 発現は、3 種類全てのモデルで上昇した。ANXA1 は、LPS モデルでのみ上昇した。COL1A1 は、3 種類全てで低下し、COL6A1 は、RU486、LPS 早産モデルで低下した。

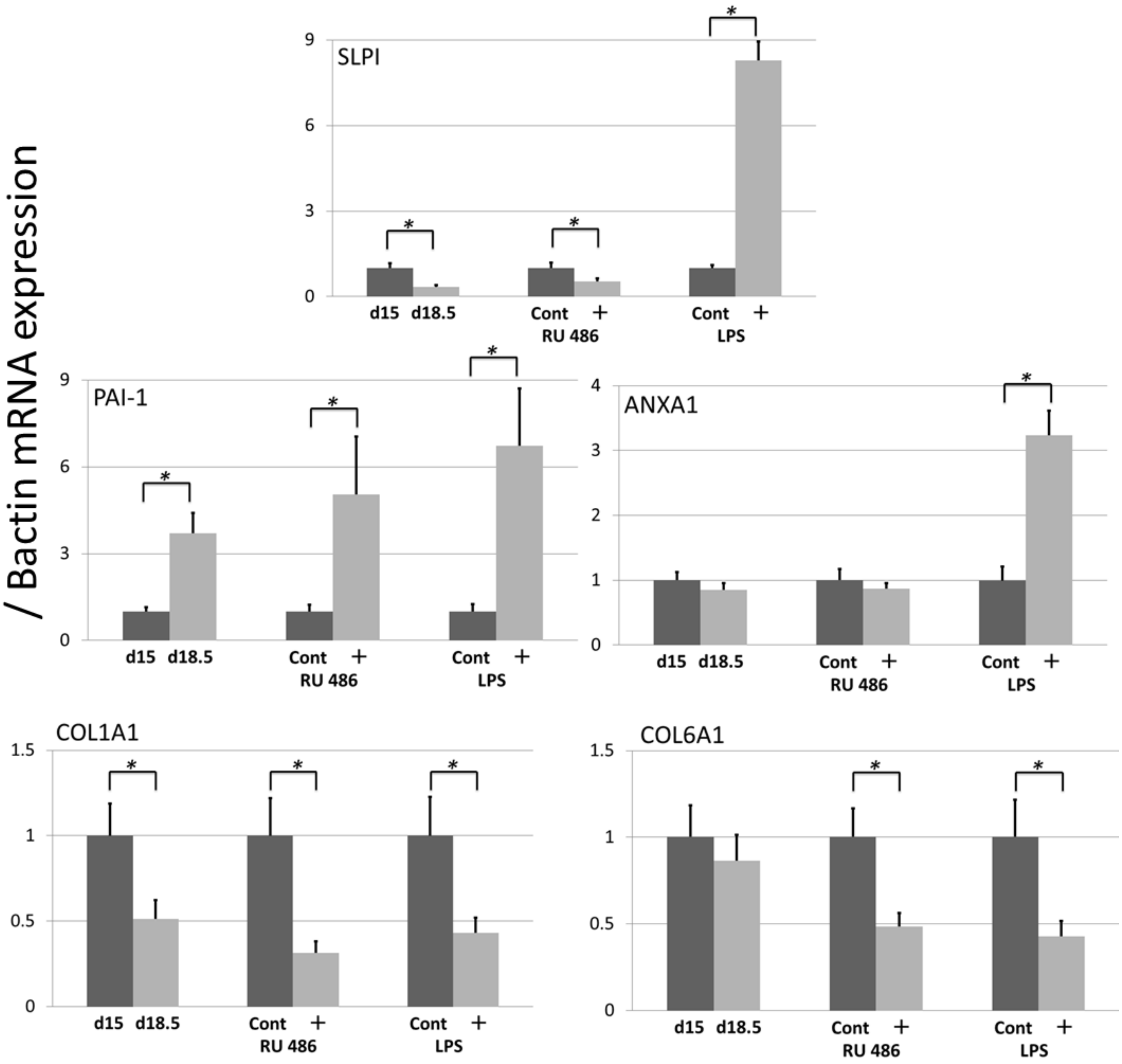


図 15.　正常分娩、RU486、LPS 早産モデルにおける子宮頸管 mRNA 発現
SLPI、PAI1、ANXA1、COL1A1、COL6A1 の子宮頸管組織中の mRNA 発現を real time PCR 法で解析しグラフに示した。妊娠 15 日目（n = 8）と妊娠 18.5 日目（n = 8）、妊娠 14.5 日目に皮下投与に

よりエタノールを投与したコントロール群（n = 8）と RU486 500μg 投与した群（n = 8）、妊娠 14.5 日目に頸管投与により PBS を投与したコントロール群（n = 8）と LPS 10μg 投与した群（n = 8）とでそれぞれ比較した（Mann–Whitney U 検定、*：p　< 0.05）。検体採取は薬剤もしくはコントロール投与 12 時間後に施行。平均±SE で表示。

プロゲステロンとの関連を明らかにするため、正常分娩もしくは RU486 モデルで発現低下をした遺伝子群（SLPI、COL1A1、COL6A1）について、分娩遅延モデルにおける発現変化を real time PCR 法で解析した（図 16）。SRD5A 阻害剤投与（vs control）、プロゲステロン投与時（vs control）に、発現低下がキャンセルされるかについて検討した（各群 n = 8）。SLPI 発現は、SRD5A 阻害剤投与、プロゲステロン投与により上昇した。COL1A1、COL6A1 発現は、プロゲステロン投与により上昇し、SRD5A 阻害剤投与では変化を認めなかった。

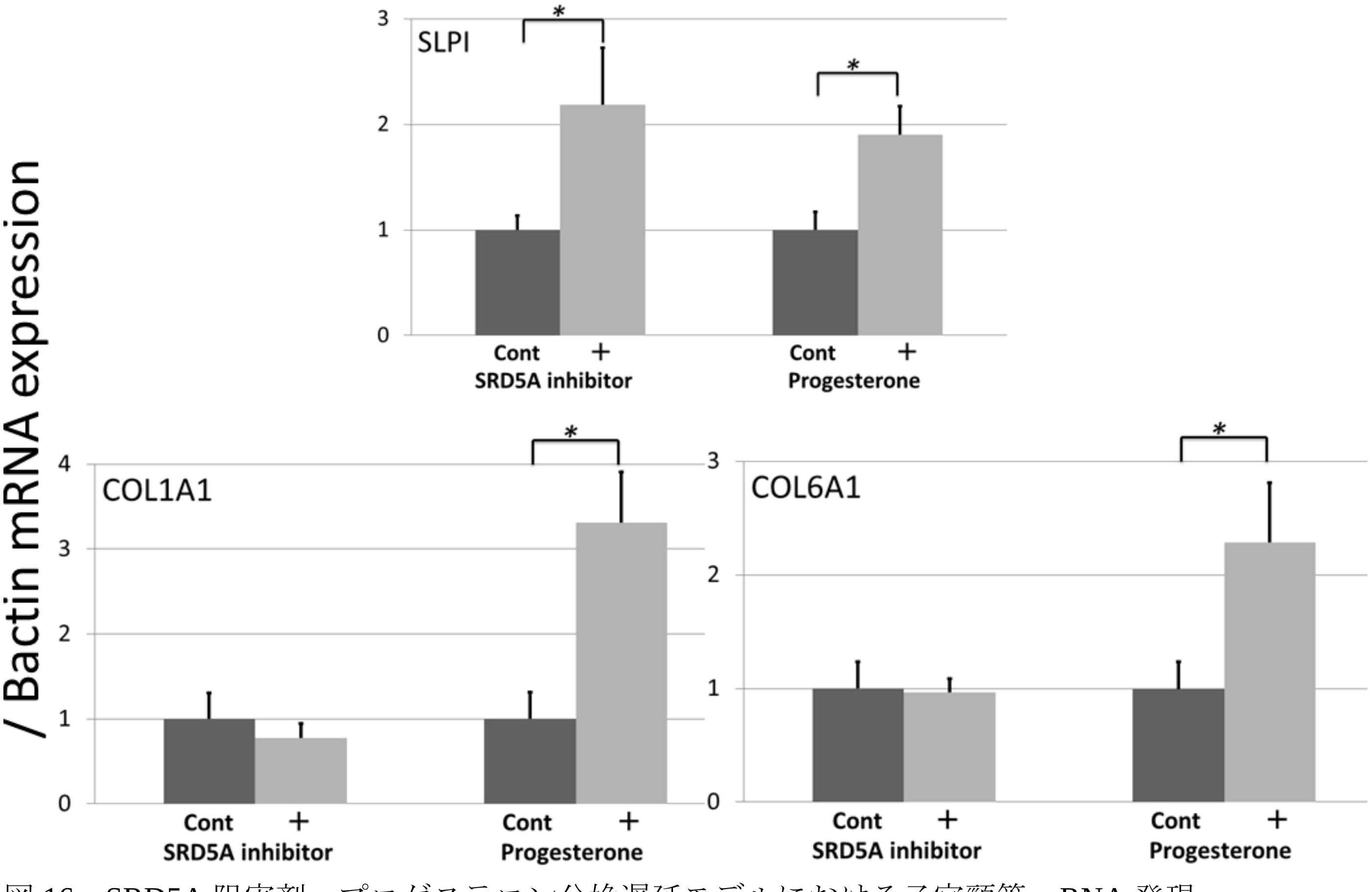


図 16.　SRD5A 阻害剤、プロゲステロン分娩遅延モデルにおける子宮頸管 mRNA 発現
SLPI、COL1A1、COL6A1 の子宮頸管組織中の mRNA 発現を real time PCR 法で解析しグラフに示した。妊娠 17、18 日目に頸管投与により PBS を投与したコントロール群（n = 8）と SRD5A 阻害剤 Dutasteride 25μg 投与した群（n = 8）、妊娠 17、18 日目に皮下投与によりごま油を投与したコン

トロール群（n = 8）とプロゲステロン 1mg 投与した群（n = 8）とでそれぞれ比較した（Mann–Whitney U 検定、*：$p < 0.05$）。検体採取は妊娠 18.5 日に施行。平均±SE で表示。

２－２．免疫組織学的検査

マッソントリクローム染色

　マウス子宮頸部の組織検体を用いて、コラーゲン繊維の変化を区別するためのマッソントリクローム染色を行った（図 17）。同染色では、コラーゲン繊維は青、繊維素は赤紫、核は黒紫に染まる。正常コントロール（A：Day15）と比較して、LPS 早産モデル（B）ではコラーゲン繊維の量は大きな相違がない一方で、RU486 早産モデル（C）ではコラーゲン繊維間の空洞が目立ち、組織の浮腫化が示唆される。正常分娩前（D : Day18.5）でも、RU486 と同様の変化を認めた。正常分娩前（D）と比較して、プロゲステロン分娩遅延モデル（E）では、コラーゲン繊維の量が非常に多く、SRD5A 阻害剤投与モデル（F）では、コラーゲン繊維間の空洞は認めるものの、量は多く、繊維素の増生を認めた。各検体間の組織像の相違は、頸管熟化の機序別のコラーゲン繊維の変化の相違を示している。

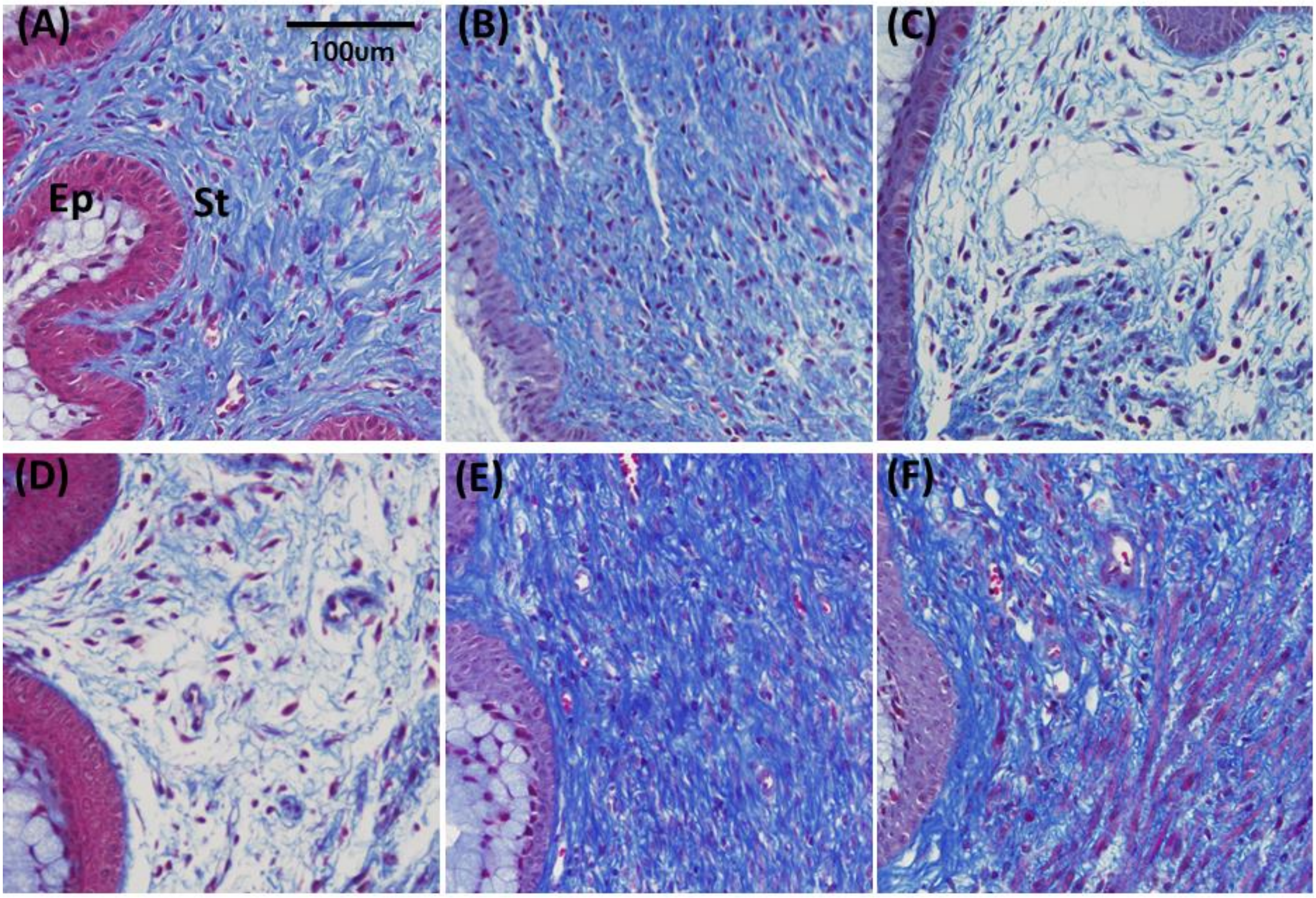


図 17. 子宮頸部マッソントリクローム染色
マウス子宮頸部切片をマッソントリクローム染色した。上段は妊娠 15 日目の検体で A：正常、B：LPS 早産モデル、C：RU486 早産モデル、下段は妊娠 18.5 日目の検体で D：正常、E：プロゲステロン投与分娩遅延モデル、F：SRD5A 阻害剤分娩遅延モデル。Ep：上皮、St：間質。コラーゲン繊維は青、繊維素は赤紫、核は黒紫に染まる。

免疫染色（SLPI）

マウス子宮頸部検体への SLPI 免疫染色施行を目的とし、抗体の至適濃度検討のための染色を、マウス肺組織を用いて行った。抗 SLPI 抗体を 10ug/ml、2ug/ml、0.4ug/ml の各濃度に割り振り、Rabbit Ig のネガティブコントロールの染色をしたところ、0.4ug/ml のみでネガティブコントロールで発色を認めなかった。0.4ug/ml で抗原特異的な発色を得られると評価し、次の子宮頸部組織検体の染色を同濃度で施行した。Day15 の 3 検体について、SLPI 免疫染色の結果を図 18 に示す。Day15 の正

常検体（A）で上皮内に発色を認め、マウス子宮頸管組織に SLPI が発現していることを確認した。A と比較すると、LPS 早産モデル（B）、RU486 早産モデル（C）ともに上皮内の発色を認め、SLPI の局在は同じであったが、B でのみ発色増強を認めた。A、B、C 各検体のネガティブコントロールは D、E、F に示し、発色は認められなかった。

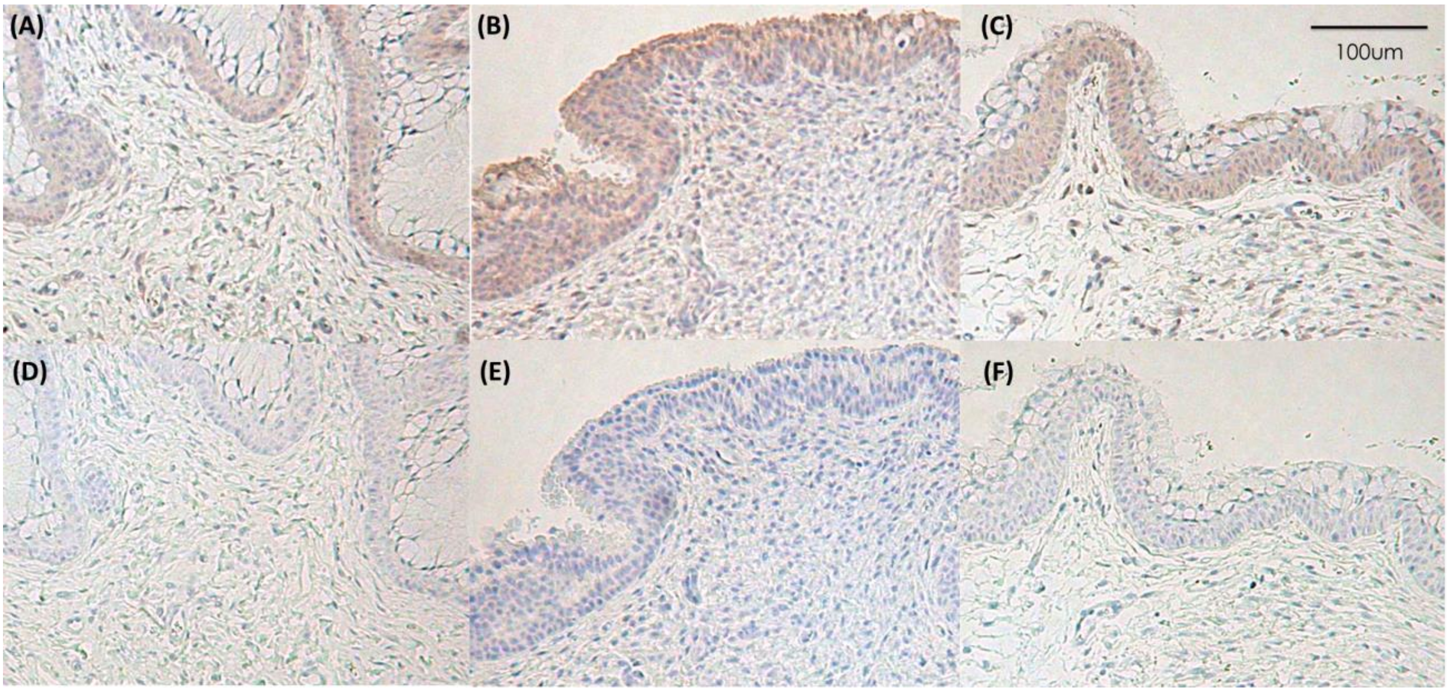


図 18. 子宮頸部 SLPI 免疫染色（妊娠 15 日目正常検体、LPS、RU486 早産モデル）
妊娠 15 日目のマウス子宮頸部切片を SLPI 免疫染色した。上段に SLPI 抗体で染色した切片、下段にネガティブコントロール（Rabbit Ig）で染色した切片を示す（A・D、B・E、C・F がそれぞれ対比）。A・D：正常、B・E：LPS 早産モデル、C・F：RU486 早産モデル。

Day18.5 の 3 検体について、SLPI 免疫染色の結果を図 19 に示す。正常分娩前の検体（A）、プロゲステロン分娩遅延モデル（B）ではほぼ上皮内にのみ発色を認めたが、SRD5A 阻害剤分娩遅延モデル（C）では、上皮内だけでなく、間質内の細胞でも発色を認めた。A、B、C 各検体のネガティブコントロールはそれぞれ D、E、F に示し、発色は認められなかった。

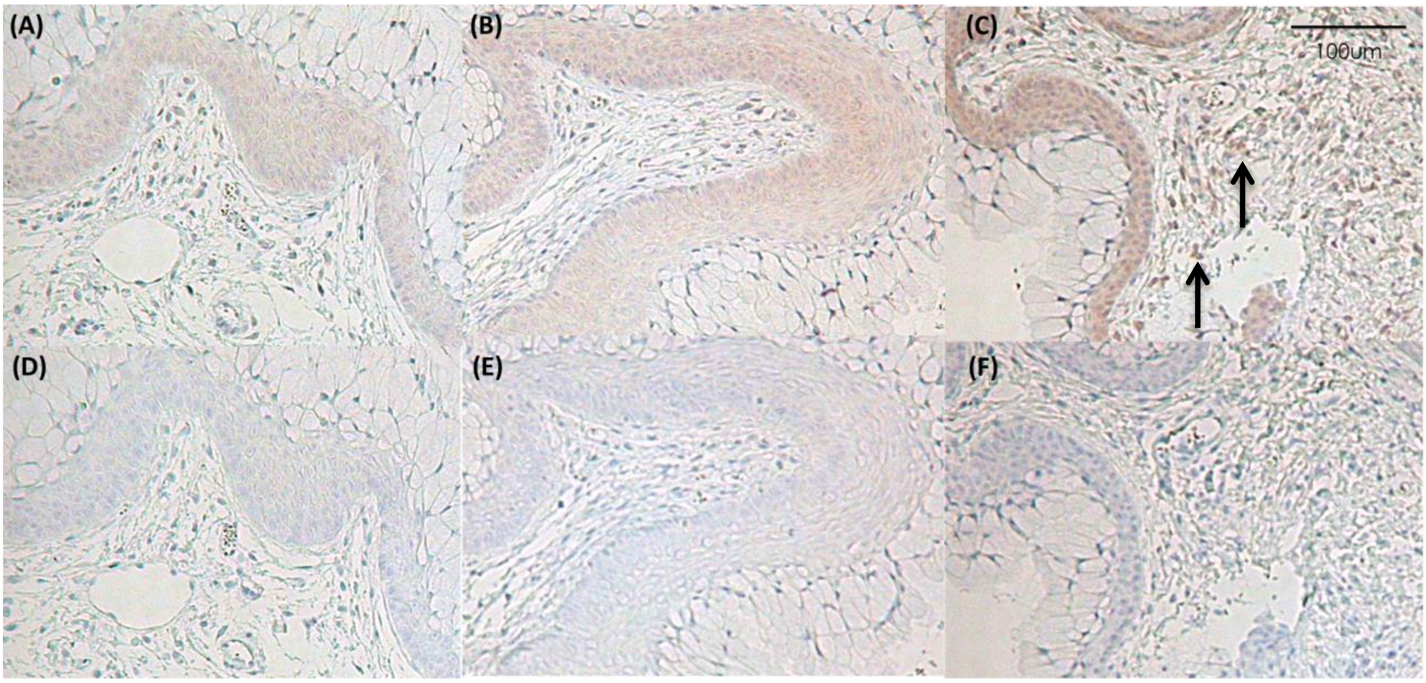


図 19. 子宮頸部 SLPI 免疫染色（妊娠 18.5 日目正常検体、プロゲステロン分娩遅延モデル、SRD5A 阻害剤分娩遅延モデル）
妊娠 18.5 日目のマウス子宮頸部切片を SLPI 免疫染色した。上段に SLPI 抗体で染色した切片、下段にネガティブコントロール（Rabbit Ig）で染色した切片を示す（A・D、B・E、C・F がそれぞれ対比）。A・D：正常、B・E：プロゲステロン分娩遅延モデル、C・F：SRD5A 阻害剤分娩遅延モデル。矢印：染色が確認された間質内の細胞

２－３．LPS 早産モデルでの投与後の時系列変化

LPS 早産モデルにおいて、頸管投与後の継時的変化を観察するため、投与前（Day14.5）、投与後 2 時間、12 時間後の頸管組織での SLPI、ANXA1 の mRNA 発現および ANXA1 の蛋白質である Annexin a1 を Western blot 法で解析した（各群 n = 3）。ANXA1 の遺伝子産物は、Glucocorticoid receptor に調節されている抗炎症蛋白で、呼吸器分野では、SLPI の抗炎症・NE に対する抗プロテアーゼ作用を調節していると報告されている。SLPI の mRNA 発現は、投与前と比較して、2 時間後ではほぼ変化を認めず、12 時間後では 10 倍近く上昇した。ANXA1 の mRNA 発現は、投与前と比較して、2 時間後ではほぼ変わらず、12 時間後でも約 1.9 倍と軽度上昇した（図 20）。頸管組織の Annexin a1 は、投与 2 時間後に分解され、12 時間後には投与前と同等であった（図 21）。

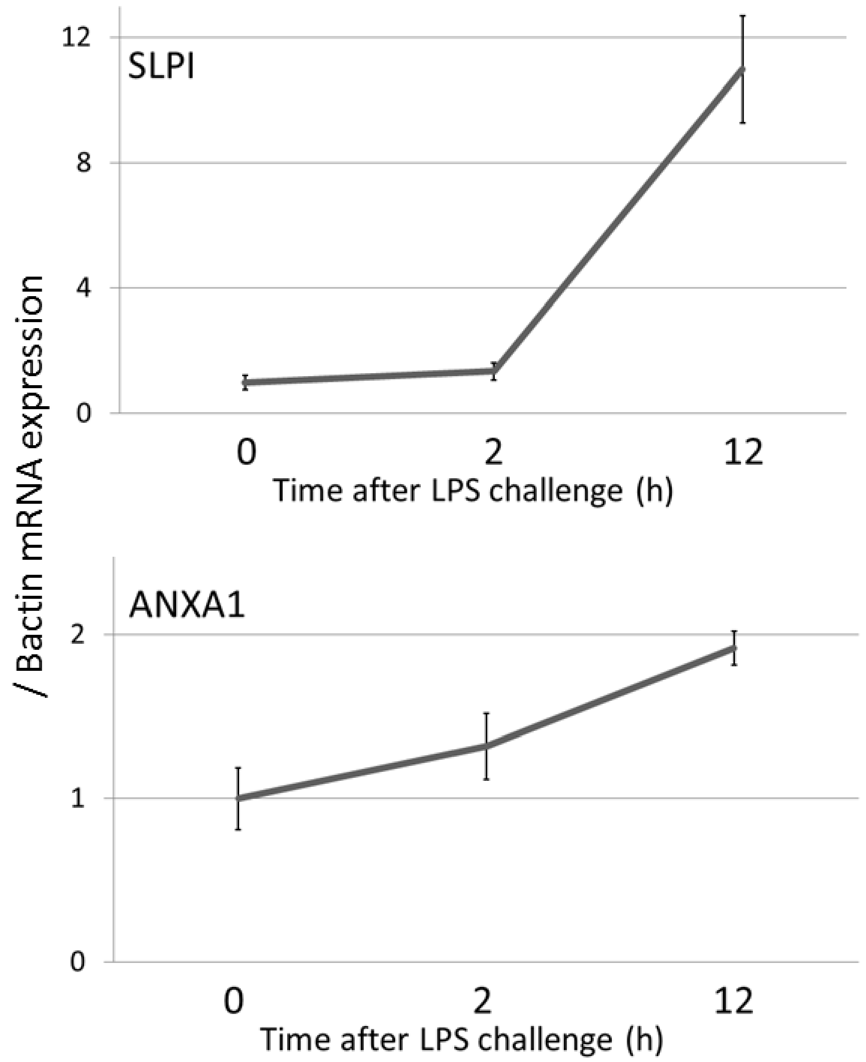


図 20. LPS 早産モデルでの子宮頸管 mRNA 発現時系列変化
妊娠 14.5 日目のマウスへ LPS 10 μ g 頸管投与した。投与前、投与 2 時間後、12 時間後の検体の子宮頸管組織の mRNA 発現を real time PCR 法で解析した（各群 n = 3)。上グラフ : SLPI、下グラフ : ANXA1。平均±SE で表示。

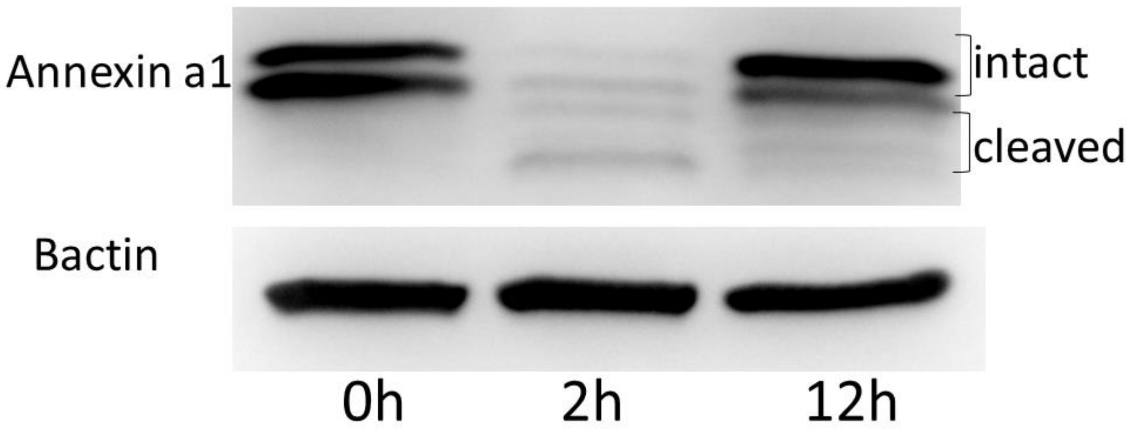


図 21．LPS 早産モデルでの子宮頸管 Annexin a1 蛋白時系列発現
妊娠 14.5 日目のマウスへ LPS 10μg 頸管投与した。投与前、投与 2 時間後、12 時間後の検体の子宮頸管組織の蛋白発現を Western blot 法で解析した（各群 n = 3 で代表的な結果を表示）。Annexin a1 分子量は Intact 約 37、Cleaved 約 33。

２－４．NE－LPS 早産モデルでの表現型、rSLPI 投与による変化

マウスの LPS 早産モデルにおける NE 前投与の意義を検討するために、微量の LPS（3 μg）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（図 22）。Day 14.5 日目に LPS 3μg 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 0.5μg 投与した B 群（n = 9）、NE 5μg 投与した C 群（n = 9）と、LPS を投与せずに NE 5μｇ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（図 22）。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（図 23）。Day 15 に NE 5μg・LPS 10μg 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 10μg 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（図 23)。この NE－LPS 早産モデルにおいて、rSLPI 投与は早産を抑制した。

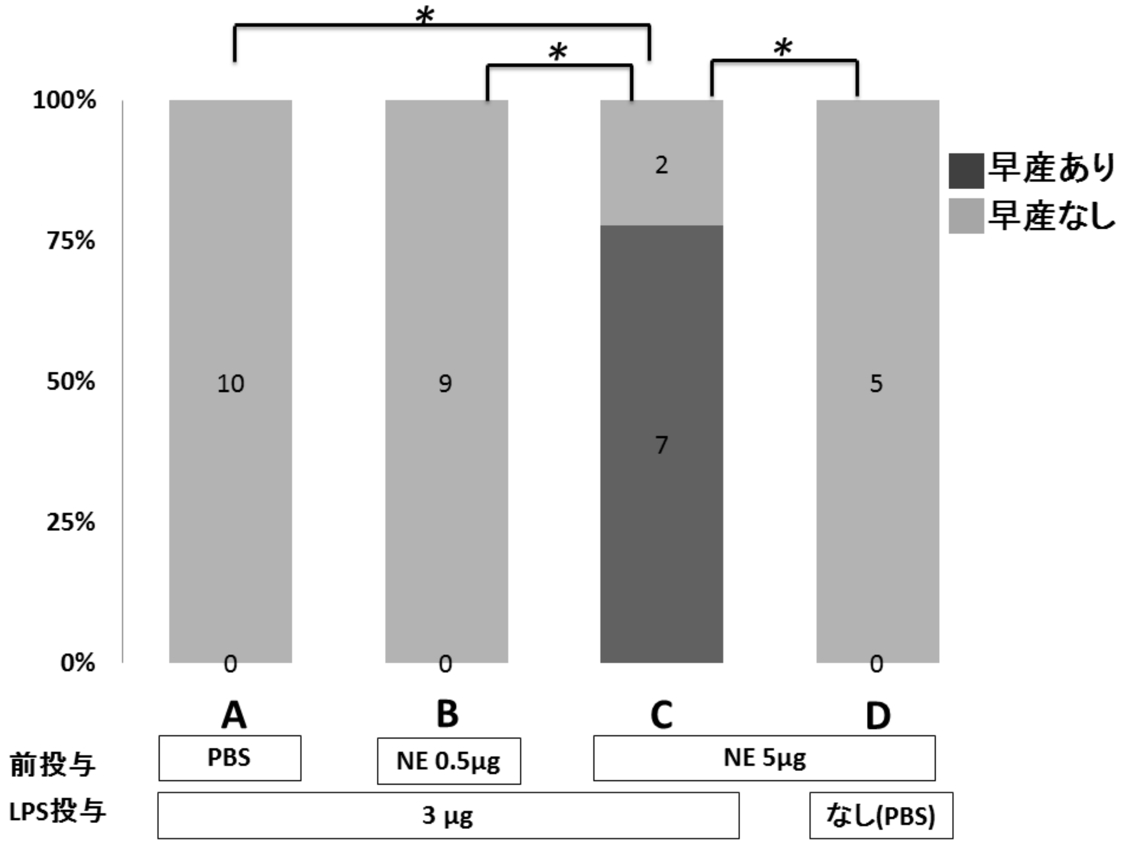


図 22. 微量 LPS 早産モデルにおける、NE 投与による早産率の比較
C57/BL6 マウスの妊娠 14.5 日目に、LPS 3μg を頸管投与して早産率をグラフに示した。A 群（n = 10）: PBS 投与→6 時間後に LPS 3μg 投与、B 群（n = 9）: NE 0.5μg 投与→6 時間後に LPS 3μg 投与、C 群（n = 9）: NE 5μg 投与→6 時間後に LPS 3μg 投与、D 群（n = 5）: NE 5μg 投与→6 時間後に PBS 投与。*：p　< 0.05

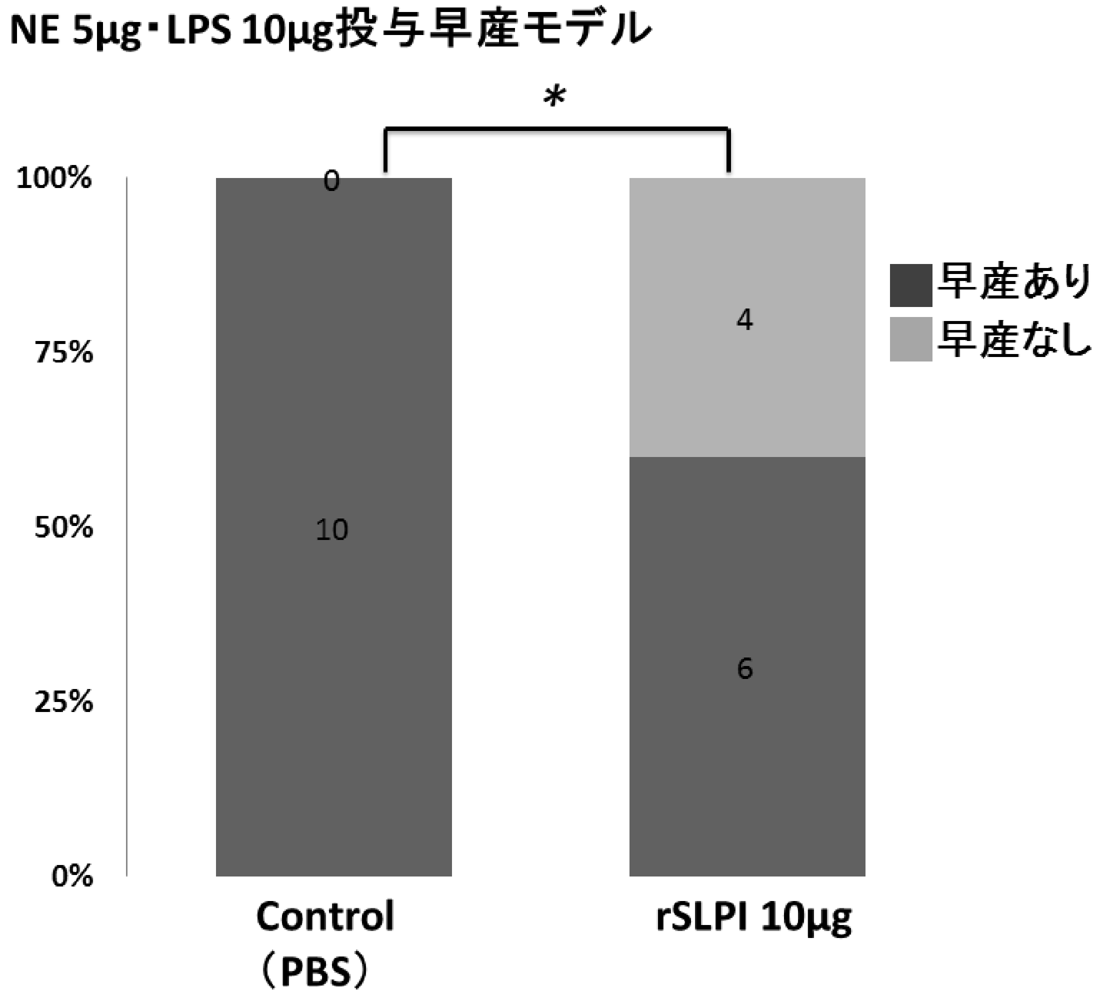


図 23. NE-LPS 早産モデルにおける、rSLPI 投与による早産率の比較
C57/BL6 マウスの妊娠 15 日目に、NE5µg /LPS 10µg を頸管投与した。その 1 時間後に PBS を投与した群（n = 10）と、rSLPI を投与した群（n = 10）での早産率をグラフに示した。*：p　< 0.05

２－５．NE－LPS 早産モデルでの rSLPI 投与による子宮頸管・腹腔内での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（図 24、25)。子宮頸管組織での CXCL2、KC、TNFa、IL6、IL1b の mRNA 発現を real time PCR 法で解析した（図 24)。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。TNFa、IL6 は、SLPI 投与群で

低い傾向を認めた。IL1b 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、TNFa、IL6 分泌を ELISA 法で解析した（図 25）。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、TNFa 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、TNFa、IL6 全てで SLPI 投与群と PBS 投与群は同等であった。

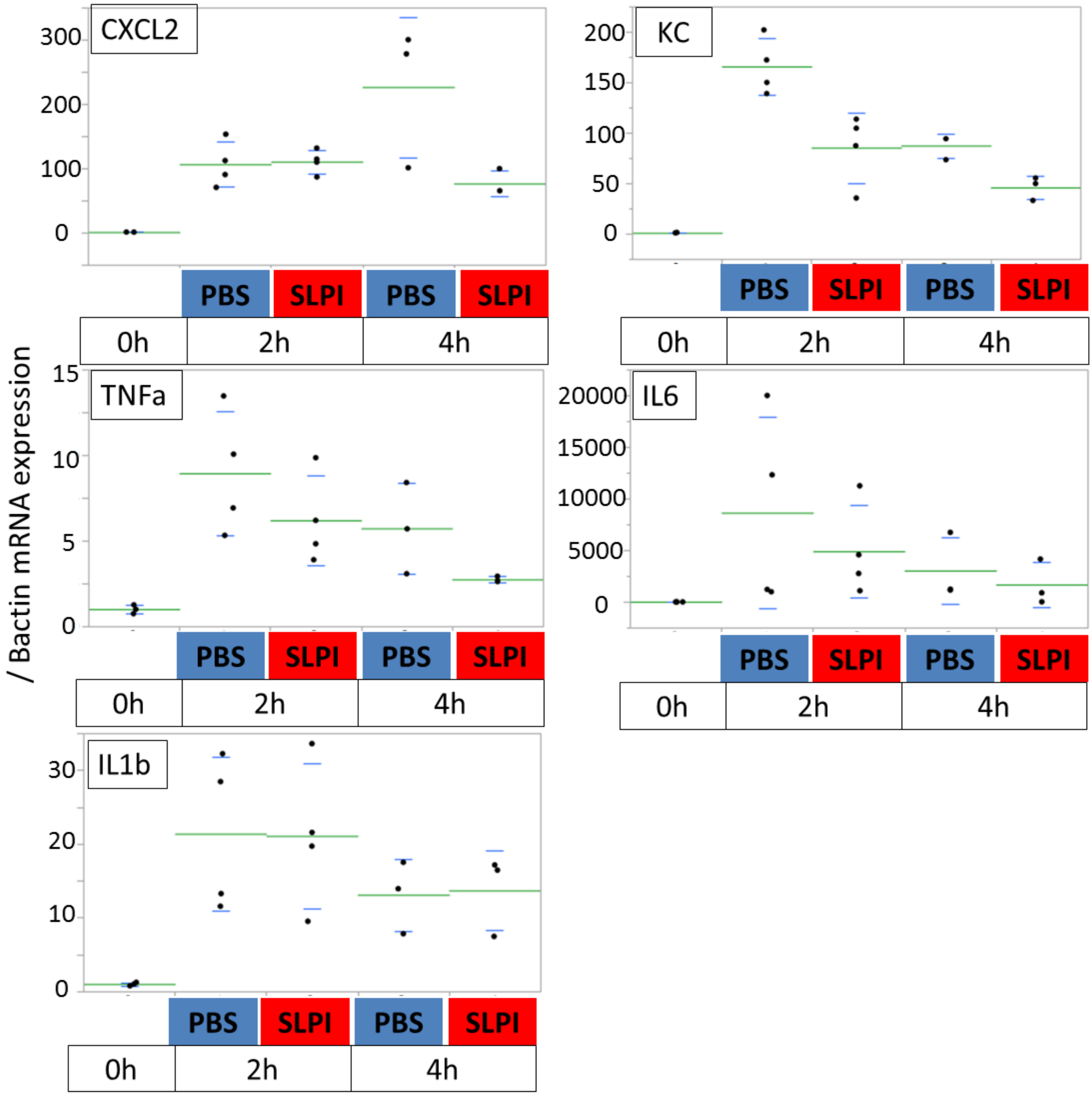


図 24. NE/LPS 早産モデルにおける rSLPI 投与後の炎症性サイトカイン子宮頸管 mRNA 発現
C57/BL6 マウスの妊娠 15 日目に NE5μg /LPS 10μg を頸管投与した。その 1 時間後に PBS を頸管投与した群（青）と、rSLPI 10μg を頸管投与した群（赤）で、NE/LPS 投与前（n = 3)、投与後 2 時間 PBS 群（n = 4)、SLPI 群（n = 4)、投与後 4 時間 PBS 群（n = 3)、SLPI 群（n = 3）の子宮頸管組織の CXCL2、KC、TNFa、IL6、IL1b の mRNA 発現を real time PCR 法で解析した。長いバー（緑）：平均、短いバー（青）：SD で表示。

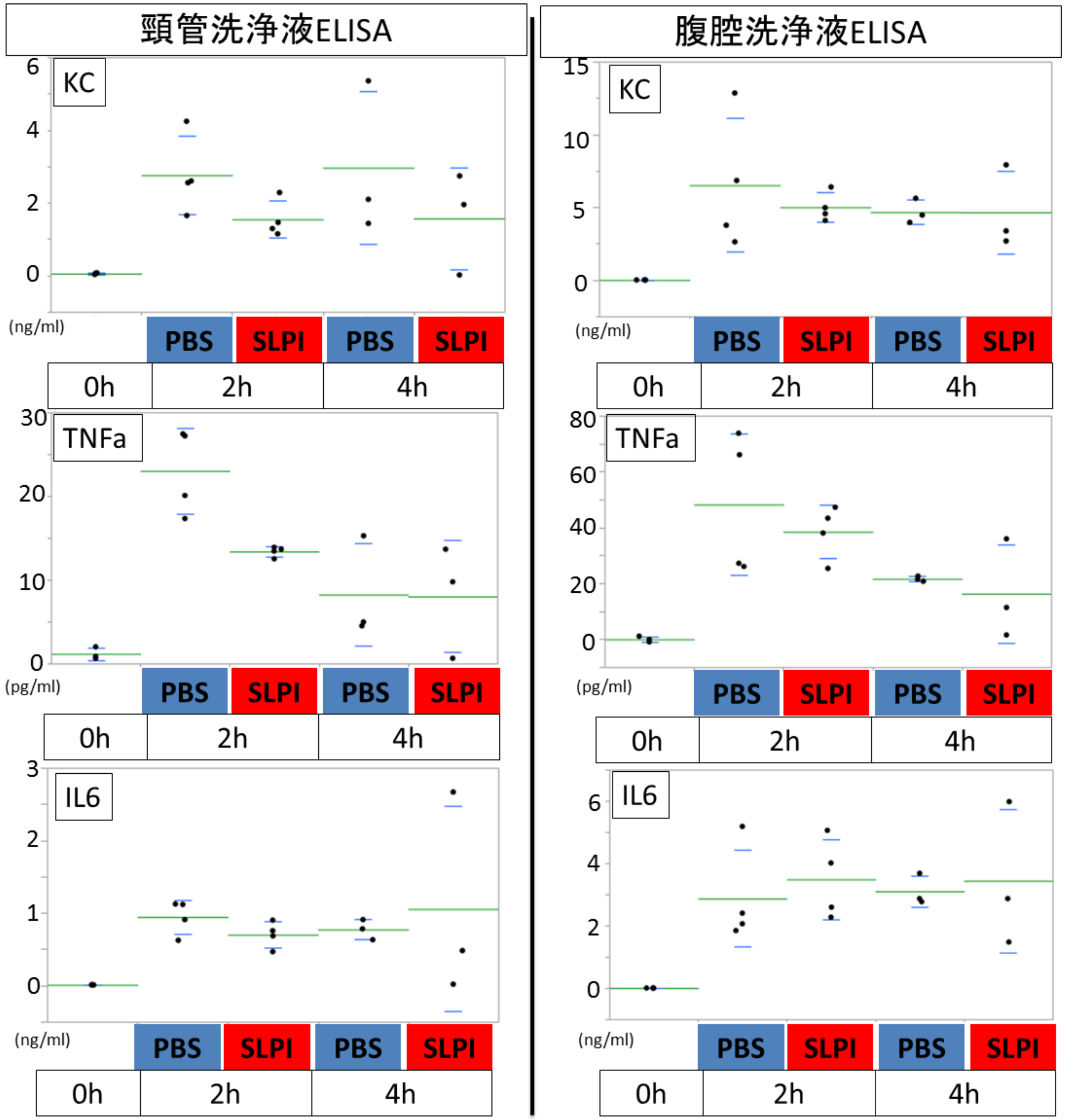
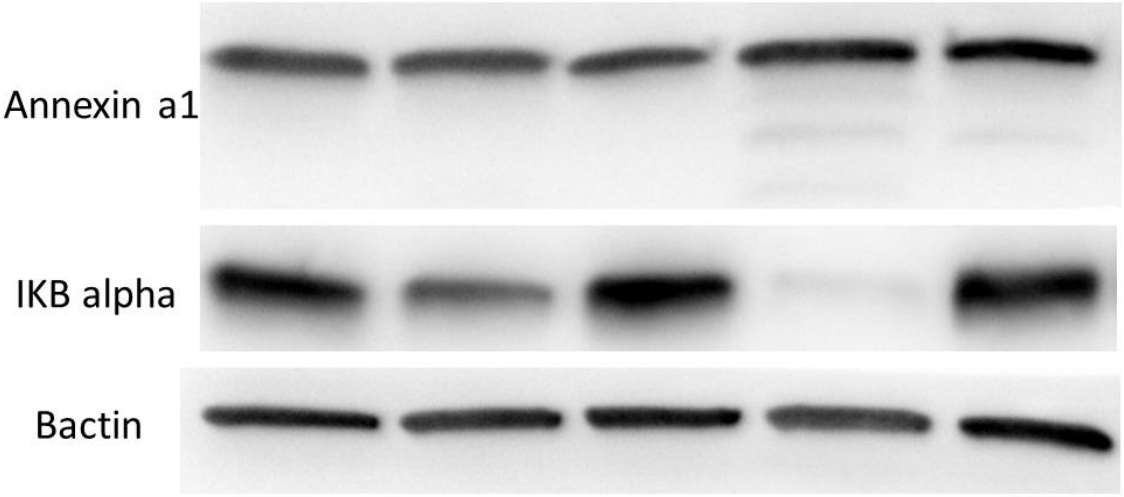


図 25. NE/LPS 早産モデルにおける rSLPI 投与後の子宮頸管、腹腔内炎症性サイトカイン分泌
C57/BL6 マウスの妊娠 15 日目に NE5μg /LPS 10μg を頸管投与した。その 1 時間後に PBS を頸管投与した群（青）と、rSLPI 10μg を頸管投与した群（赤）で、NE/LPS 投与前（n = 3）、投与後 2 時間 PBS 群（n = 4）、SLPI 群（n = 4）、投与後 4 時間 PBS 群（n = 3）、SLPI 群（n = 3）の子宮頸管洗浄液（左グラフ）・腹腔内洗浄液（右グラフ）の KC、TNFa、IL6 の分泌量を ELISA 法で測定した。長いバー（緑）：平均、短いバー（青）：SD で表示。

検討３．細胞培養実験による SLPI 発現制御機構の解明

３－１．Ect1 細胞への NE、LPS 刺激下での rSLPI 投与

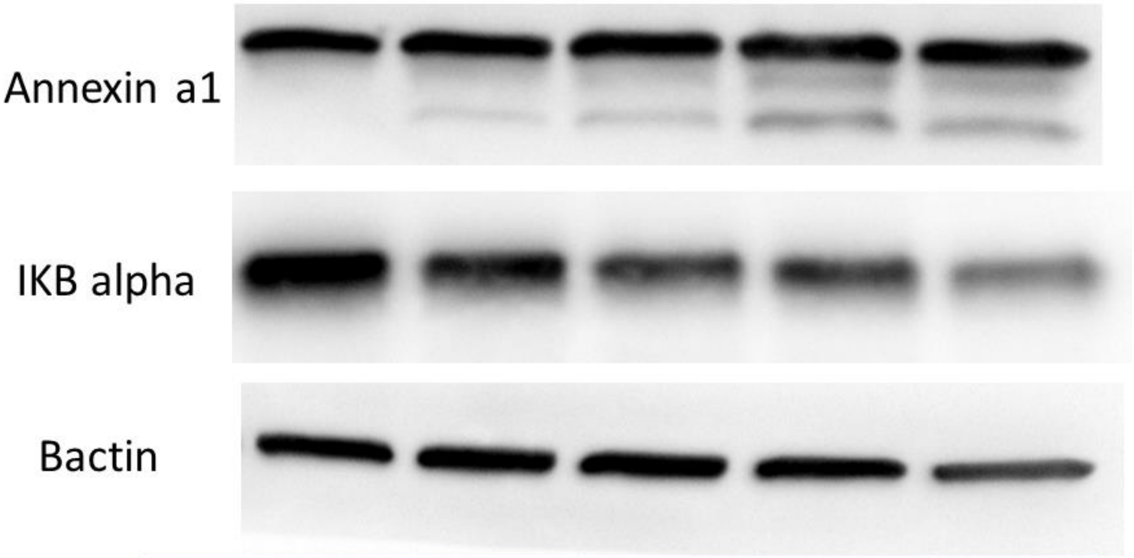
4×10 5 個の Ect1 細胞を 6well ディッシュで培養し、NE、LPS 刺激を加え、Annexin a1、IKB alpha の分解の有無を評価し、また、刺激 1 時間前に rSLPI 2.5μg/ml を投与し、これらがキャンセルされるかどうか、Annexin a1、IKB alpha 発現変化を Western blot 法で評価した（図 26、27）。NE 0.5、2.0μg/ml で刺激すると、コントロールと比べて、IKB alpha は NE 濃度依存性に発現が低下した。Annexin a1 は NE 2.0μg/ml の濃度で分解された。これに対して rSLPI を投与しておくと、IKB alpha の発現低下はキャンセルされた。NE 2.0μg/ml での Annexin a1 の分解もわずかに抑制されていた（図 26）。LPS 5、10μg/ml で刺激すると、コントロールと比べて、IKB alpha 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、10μg/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 alpha、Annexin a1 ともに変化を認めなかった（図 27）。



NE	ー	0.5	0.5	2.0	2.0
SLPI	ー	ー	2.5	ー	2.5

（μg/ml）

図 26. Ect1 細胞への NE 刺激および rSLPI 投与による Annexin a1、IKB alpha 発現変化
4×10[5] 個の Ect1 細胞を 6well ディッシュで培養し、NE 0.5µg/ml 、2.0µg/ml で刺激 1 時間後の細胞を回収し、Annexin a1、IKB alpha を Western blot 法で評価した。rSLPI 2.5µg/ml 投与は NE 刺激 1 時間前に添加。



LPS	—	5	5	10	10
SLPI	—	—	2.5	—	2.5

(µg/ml)

図 27. Ect1 細胞への LPS 刺激および rSLPI 投与による Annexin a1、IKB alpha 発現変化
4×10[5] 個の Ect1 細胞を 6well ディッシュで培養し、LPS 5µg/ml 、10µg/ml で刺激 1 時間後の細胞を回収し、Annexin a1、IKB alpha を Western blot 法で評価した。rSLPI 2.5µg/ml 投与は NE 刺激 1 時間前に添加。

３－２．Ect1 細胞での PR、GR 発現と GR 刺激実験

Ect1 細胞での PR 発現

Ect1 細胞での PR 発現の有無を確認するため、PR が発現している Ishikawa 細胞をコントロールとして、エストロゲン刺激後の PR 蛋白発現を確認した（図 28）。1×10 5 個の細胞を 6well ディッシュで培養し、E2 1µM の刺激を 48 時間加えて、Western blot 法で細胞の蛋白発現の有無を評価した。既報[39]通り、E2 刺激により、Ishikawa 細胞では PRA、B の発現が誘導された。一方、Ect1

細胞は、E2 刺激後も PR は誘導されなかった。既報と同様[40]、Ect1 細胞では蛋白質レベルでは PR が機能していないことを確認した。後述するように、Ect1 細胞には GR は発現しており、GR の発現調節変化に着目し実験を行った。

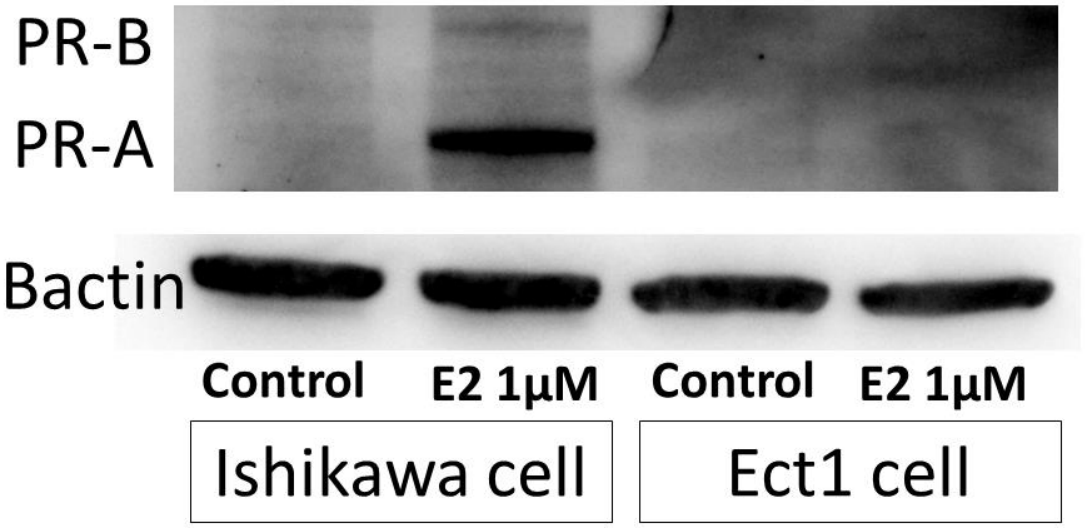


図 28. Ishikawa 細胞、Ect1 細胞におけるエストロゲン添加の有無での PR 発現
1×10^5 個の Ishikawa 細胞、Ect1 細胞を 6well ディッシュで培養し、E2 1μM で 48 時間刺激後に細胞を回収し、Western blot 法で細胞の PRA、B 発現の有無を評価した。コントロールはエタノールのみで刺激したもので、実験は 2well ずつの独立した実験を 4 回繰り返し、代表的なものを示した。

Ect1 細胞へのクロベタゾール刺激

　2×10 5 個の Ect1 細胞を 6well ディッシュで培養し、クロベタゾール 5μM、デキサメタゾン 5μM の刺激を 24 時間した後、SLPI の mRNA 発現を real time PCR 法で比較した。SLPI 発現は、クロベタゾールの刺激で有意に上昇したが、デキサメタゾン刺激では変化を認めなかった（図 29）。

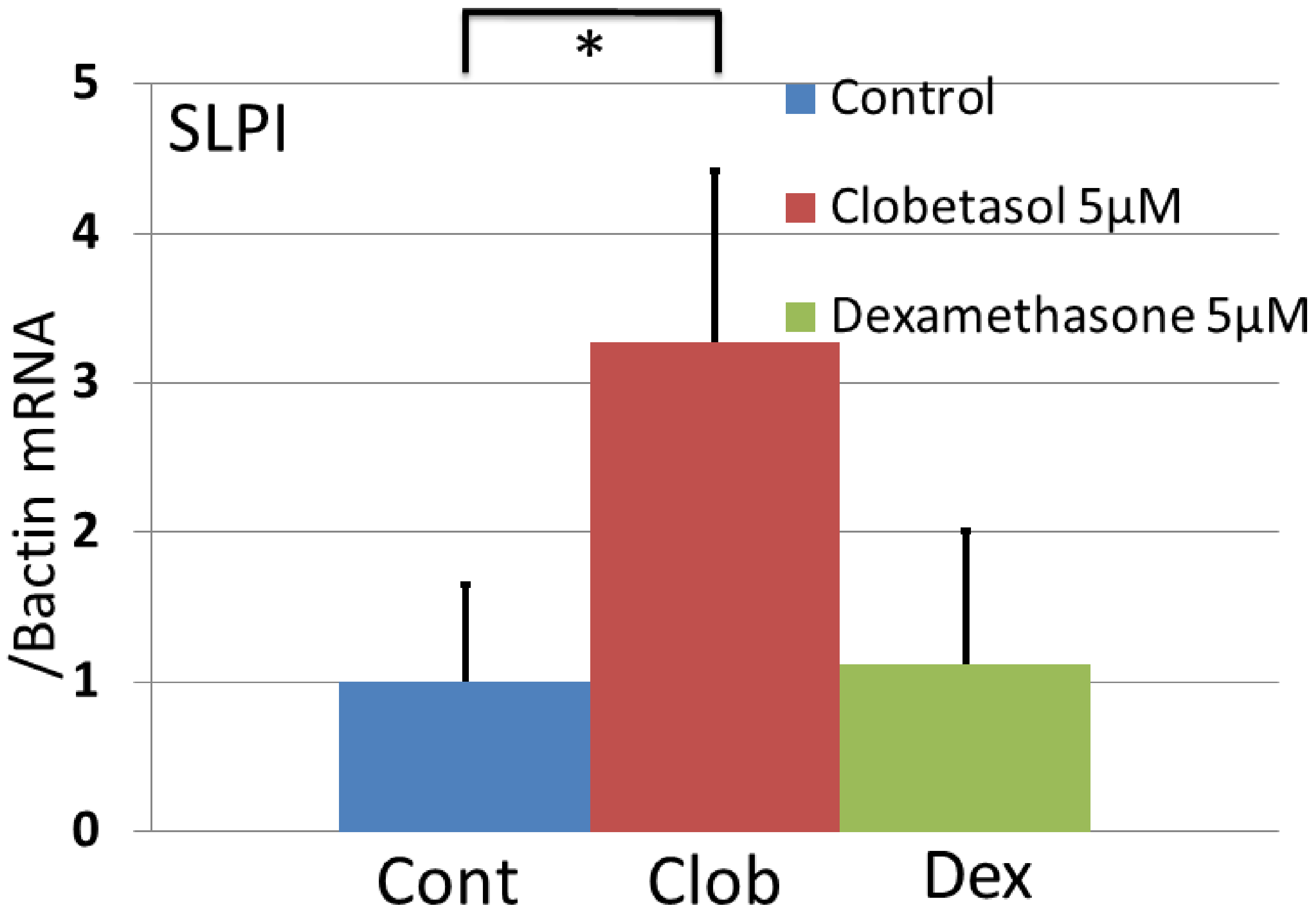


図 29. Ect1 細胞へのグルココルチコイド刺激による SLPI mRNA 発現
2×10^5 個の Ect1 細胞を 6well ディッシュで培養し、クロベタゾール 5μM、デキサメタゾン 5μM で 24 時間刺激後に、細胞を回収し、real time PCR 法で SLPI の mRNA 発現をコントロール群と比較した（Dunnet 検定、*：p ＜0.05)。実験は 2well ずつの独立した実験を 4 回繰り返し、平均+-SD で表示した。

Ect1 細胞へのクロベタゾール刺激

2×10 5 個の Ect1 細胞を 6well ディッシュで培養し、クロベタゾール 0.5μM、5μM 刺激を 24 時間した後、SLPI、DUSP1 の mRNA 発現を real time PCR 法で比較した。SLPI、DUSP1 発現は、5μM の刺激で有意に上昇した（図 30)。

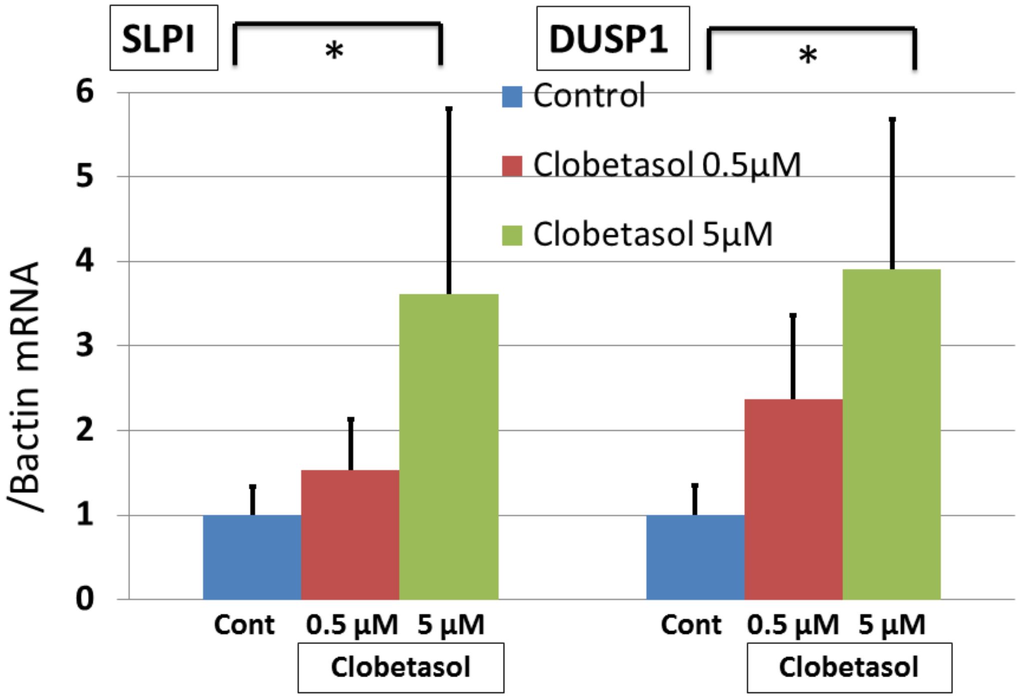


図 30. Ect1 細胞へのクロベタゾール刺激（濃度別）による SLPI 、DUSP1 mRNA 発現
2×10^5 個の Ect1 細胞を 6well ディッシュで培養し、クロベタゾール 0.5µM、5µM で 24 時間刺激後に、細胞を回収し、real time PCR 法で SLPI（左グラフ）、DUSP1（右グラフ）の mRNA 発現をコントロール群と比較した（Dunnet 検定、*：$p < 0.05$）。実験は 2well ずつの独立した実験を 4 回繰り返し、平均+-SD で表示した。

クロベタゾール刺激後の GR のリン酸化変化（時間、濃度別、デキサメタゾン刺激との比較）

2×10 5 個の Ect1 細胞を 6well ディッシュで培養し、クロベタゾールによる刺激を時間・濃度別に行い、GR、GR ser211、GR ser226 の蛋白発現変化を Western blot 法で評価した（図 31、32）。クロベタゾール 5µM で 60、120、180、240 分刺激後の GR ser211、ser226 発現は刺激 180 分後にもっとも高発現であった（図 31）。クロベタゾール 50nM、500nM、5µM で 180 分刺激後の発現変化は、コントロールと比較して、ser211 は、50nM の刺激から発現誘導され、高濃度にしても大きな変化を認めなかった。一方で ser226 は、クロベタゾールの濃度依存性に発現誘導を認めた（図 32）。

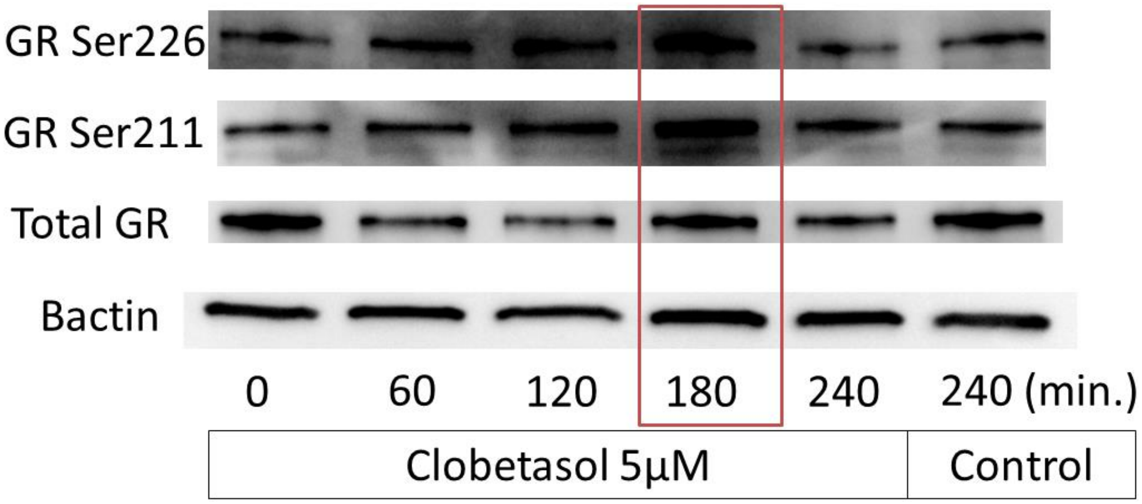


図 31. クロベタゾール刺激による GR リン酸化継時的変化
2×10[5] 個の Ect1 細胞を 6well ディッシュで培養し、クロベタゾール 5μM で刺激し、GR、GR ser211、GR ser226 の蛋白発現変化を Western blot 法で評価した。クロベタゾール 5μM 投与前 (0)、60 分後、120 分後、180 分後、240 分後、エタノールのみ添加したコントロールの 240 分後の順に表示。上段より、GR ser226、GR ser211、GR（Total）、Bactin の順。実験は 2well ずつの独立した実験を 4 回繰り返し、代表的なものを表示。

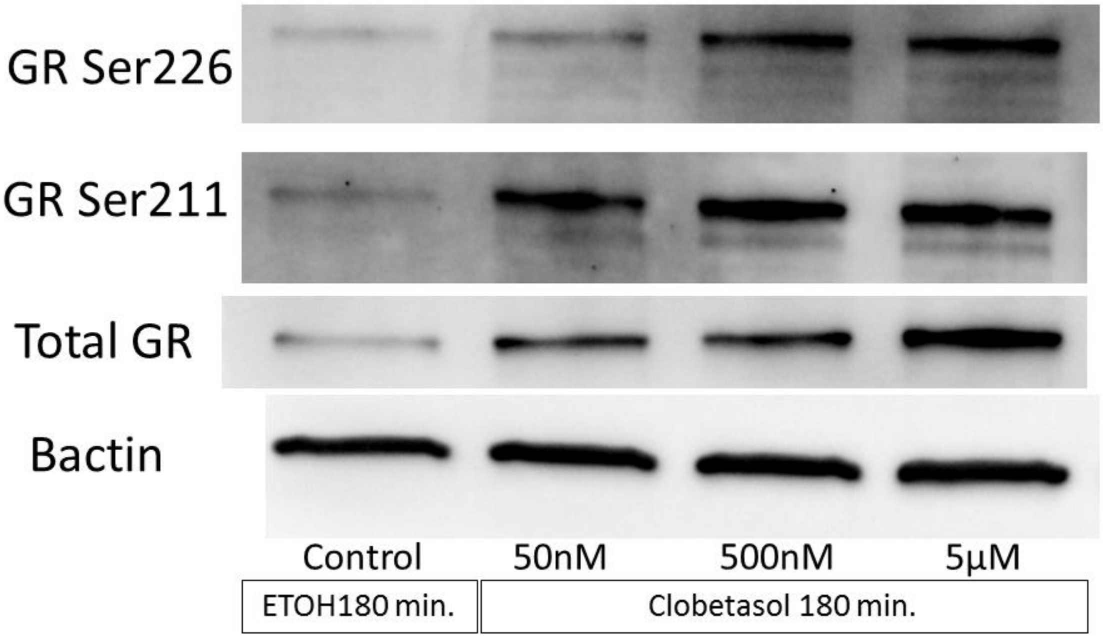


図 32. クロベタゾール刺激による GR リン酸化濃度別変化
2×10[5] 個の Ect1 細胞を 6well ディッシュで培養し、クロベタゾール 50nM、500nM、5μM で刺激し、180 分後に回収し、GR、GR ser211、GR ser226 の蛋白発現変化を Western blot 法で評価した。エタノールのみ添加したコントロール、クロベタゾール 50nM、500nM、5μM の順に表示。上段より、GR ser226、GR ser211、GR（Total）、Bactin の順。実験は 2well ずつの独立した実験を 4 回繰り返し、代表的なものを表示。

【考察】

本研究における主要な知見は以下である。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、TGFβ1、ILRN）が、Bishop スコアとともに、分娩までの日数と相関した。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性の制御と 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 NFkb 系の活性化に対して、NE の刺激に対してのみ、rSLPI 投与で NFkb 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。

ヒトの頸管熟化は複数の分子生物学的機構の制御のもとで進行することが推定されており、その全体像を把握するために単一の遺伝子の発現変化で説明することは困難である。本研究では過去に頸管熟化との関係が深いことが知られている 10 種類の遺伝子に着目してそれらの発現を PCA によって解析した。その結果において全体の遺伝子発現状態の 76%が 3 つの主成分を用いて説明可能となり、かつ個々の遺伝子の発現は 3 つの主成分のいずれかと強い相関を示した。分娩前の子宮頸管熟化の進行は多くの遺伝子の複合的な機能によって制御されることが推定されてきたが[6, 8, 18]、

本研究結果は、子宮頸管熟化の制御には少なくとも 3 種類の異なる遺伝子群の発現が関与する分子機構が関わっていることを示唆している。それぞれの成分に含まれる遺伝子の機能について考察し、表 6 に示す。PC1 に含まれる遺伝子 COX2、HAS2、MMP2、MMP8、PAI1 は全て NFkb が活性化された炎症下で発現増強される遺伝子であり[41-45]、細胞外マトリクスの分解やヒアルロン酸合成の遺伝子が含まれる。そうしたことから、PC1 は NFkb の活性化に伴う細胞外マトリクスの変化に関連する機構を示していると推測される。PC2 に含まれる遺伝子群 SLPI、TGFβ1、ILRN はいずれも抗炎症機構[25, 46-50]に関わることが知られており、過度な炎症とのバランスを調節する機能を反映することが推測される。PC3 の遺伝子群 VCAN、IL1β について、VCAN は、Versican という子宮頸部の細胞外マトリクスの主要な構成成分で、ヒトやマウスで分娩前の子宮頸管で分解される[8, 34]。皮膚の Fibloblast で IL1β が VCAN を分解するという過去の報告[51]から、IL1β が VCAN の制御に関与することが考えられる。PC3 は、PC1 とは独立した細胞外マトリクスの分解機構を反映している可能性がある。

表６．PCA の各成分遺伝子と発現上昇の意義

成分	遺伝子名	意義
PC1	COX2、HAS2、MMP2、MMP8、PAI1	NFkb 関連性炎症およびヒアルロン酸合成
PC2	SLPI、TGFβ1、ILRN	抗炎症
PC3	VCAN、IL1β	細胞外マトリクスの分解

次に、本研究の個々の遺伝子発現変化に着目すると、ヒアルロン酸合成酵素の HAS2 は分娩前 1

週間で低下した。マウスの子宮頸管での分娩直前の HAS2 の低下の報告[16]と一致し、これは、分娩直前のプロゲステロンの機能減弱と関連していると考えられている。対して、10 遺伝子の中で MMP2 のみ、分娩まで段階的な上昇を認めた。ウシの子宮頸管でも同様の報告があり[36]、分娩前の最後の 1 週間は"Dilation"の時期であり、MMP2 が Dilation の進行と関わっていることが示唆される。3 つの主成分の中で PC2 は、Bishop スコアとともに、分娩までの日数と強く関連することが示された。

さらに PC2 の中心的因子である SLPI について頸管粘液中の濃度が分娩予測マーカーとなり得ることを明らかにした（図 10）。PC2 の遺伝子の中で SLPI に着目した理由として、頸管 SLPI は mRNA レベルで、妊娠中に発現が上昇していき、産後にはさらに上昇することが既に報告[29]されており、今回我々は分娩直前の上昇の有無を確認した。SLPI は多機能蛋白であり、分娩前の頸管粘液中濃度上昇の意義に関しては、前述の抗炎症機能の他にも、組織修復機能[52-54]などが関連していることが考えられる。実際に、組織修復を要する時期である産後の子宮頸管では、SLPI の発現が上昇している[29]。また、本研究での前期破水から分娩に至った症例での SLPI 濃度上昇については、卵膜の分解が生じる前に、子宮頸管でも炎症やプロテアーゼ活性が高まっていることを反映していると考えられる。

妊娠中期のヒト子宮頸管において、頸管長短縮している症例で SLPI と NE が強い逆相関関係にあり、頸管長短縮していない症例では相関関係にないことを示した（図 12）。この結果には二つの意義がある。一つは、頸管長短縮している症例では、プロテアーゼ・抗プロテアーゼのバランスが拮抗状態にあることであり、もう一つは、SLPI の機能として NE の阻害が実際に子宮頸管で確認されたことである。頸管粘液中の NE は日本の産科臨床で広く測定されてきたが、陽性であること

の医学的な意義が未だ確立されていない。今回、NE のみでなく拮抗物質の SLPI も同時に評価したことで、単独の値よりも両者（プロテアーゼ・抗プロテアーゼ）のバランスが、子宮頸管短縮の発症自体に関与している可能性を示した。また SLPI は頸管での発現上昇と早産発症のリスク[29]が報告されていたが、多機能蛋白であり、妊婦頸管における機能は不明であった。頸管長短縮例で SLPI と NE が逆相関し、非短縮例では有意な相関を認めなかったことは、前者では NE に対する抗プロテアーゼとして機能しており、後者では NE と関係のない他の因子による制御で値のばらつきが生じているとも考えられる。後述のように、SLPI は炎症もしくはホルモンによる制御で、少なくとも二つ以上の制御機構があり、この観点からも今回の結果と合致する。頸管長の短縮は、実臨床において、最も基本的で広く普及した早産スクリーニング法であり、一般的に 25mm 未満は早産ハイリスクの状態である。本研究では、ローリスク妊婦を対象としているため、35mm をカットオフ値として二群に分類したが、やはり頸管長短縮群では有意に早産率が高かった（表 5）。今後の課題として、早産ハイリスク症例での NE・SLPI バランスと早産発症の有無を検討が必要である。まとめると、早産に至る前段階の子宮頸管長短縮の状態で、NE のプロテアーゼ機能による頸管組織の破壊に対抗して、SLPI が抗プロテアーゼ機能を果たしており、早産への進行を防ぐための内因性の防御因子として SLPI が機能している。この機能は、SLPI が正常分娩前に抗炎症機能に関連して上昇する機序とは異なる可能性がある。

　マウスの子宮頸管では、SLPI はプロゲステロンによる制御と、炎症による制御の 2 種類の制御を受けていることを明らかにした。過去の研究で、切迫早産例を対象として、頸管の SLPI 発現が早産に至った症例で有意に高値だったもの[29]があるが、これは SLPI が高発現なほど早産しやすいというよりも、早産例の中に SLPI 高値の症例が含まれているという結果である。また、子宮

頸部における SLPI 上流の制御因子は今まで明らかではなかった。本研究結果のマウスモデルから得た知見を総合すると、SLPI は炎症で誘導され、プロゲステロン作用の減弱で低下することが示された。本研究の細胞培養実験では、SLPI はヒト頸管上皮細胞で、GR 刺激で誘導された。SLPI は子宮内膜ではプロゲステロンで誘導され[27]、ステロイドホルモンレセプターとの関連は既に報告されている。GR との関連の報告はなかったが、GR 関連蛋白の抗炎症物質 Annexin a1 が、SLPI の NE への阻害機能を制御している因子である[55]という報告はあり、今回 SLPI が GR 刺激で誘導されたこととも矛盾しない。古くから胎児由来のステロイドホルモンと陣痛発来の関係は報告されている[56]。また、最近の研究では、ヒトの陣痛発来の主要な制御因子として、卵膜・胎盤での GR 経路の活性化が注目されており[57, 58]、本研究での臨床検体での分娩前の頸管 SLPI 発現および蛋白上昇の上流にも、GR が関与している可能性がある。しかしながら、本研究の細胞培養実験では、GR 刺激の後の転写因子の同定はされておらず、SLPI がクロベタゾールで誘導されデキサメタゾンで誘導されない機序についても未解明のため、さらなる検討が必要である。

マウス早産モデルでは、NE 投与により LPS 感受性が上昇することを明らかにした。また、NE/LPS 早産モデルにおいて、rSLPI 投与により早産率が減少し、KC や TNF alpha などの炎症性サイトカインの頸管局所での産生を抑制した。その rSLPI 投与による炎症抑制部位の確認を目的とした細胞培養実験では、NE 添加により誘導された NFkb 系の活性化が rSLPI 投与によりキャンセルされ、LPS 添加による場合はキャンセルされなかった。NE と LPS の混合炎症モデルは、呼吸器の分野では多く研究されているが[55, 59, 60] 、早産分野での報告はなかった。実臨床のヒト早産でも NE のみでは早産に至らず、二次的な感染を合併した症例で早産リスクが高い印象があり、本研究の NE/LPS 早産モデルは、より実際のヒト早産に近いモデルともいえる。その NE/LPS 早産モデルにおいて、

rSLPI 投与により早産率減少し、一部の炎症性サイトカインの低下を認めたことは、rSLPI 投与を新たな早産治療として応用できる可能性も示唆する。SLPI と NE の拮抗状態がヒトの妊娠中期の頸管熟化でも関与していることは前述の実験でも確認できており、今後は、この SLPI と NE の相互作用のさらなる解明が必要である。SLPI の NE 阻害効果については物質の特性や本研究結果からも明らかであるが、それ以上の詳細な分子機序については報告がほとんどない。NE が、抗炎症物資プログラニュリンが炎症物質グラニュリンへ変換する作用を持ち、SLPI がその変換作用を抑制する[61]ことが唯一報告されており、今後はこの両物質も含めた検討が必要である。

SLPI のマーカーとしての有用性について、まず正期産の分娩マーカーとしては、過去にも腟分泌や頸管粘液中の濃度をターゲットに分娩予測をされてきた物質[62-66]があり、海外で最も普及しているものは Fetal fibronectin[62, 64]である。本研究結果の SLPI 濃度を用いた 1 週間以内の分娩予測能は、陽性的中率 73%、陰性的中率 67%で、Fetal fibronectin の 81%、63%と大きな差異がない結果であった。実臨床での分娩時期の予測は、内診所見である Bishop スコアにより評価されているが、客観性に欠け、検者間誤差が生じている問題もあり、SLPI 濃度は客観的な指標の一つとなり得る。分娩予測が可能になれば、計画分娩の時期決定等に応用でき、医療資源の削減が期待できる。今後の課題として、頸管 SLPI 濃度が個人によりばらつきが大きいため、Fetal fibronectin など他のマーカーと組み合わせてさらに精度が上がるか検討を要する。次に早産に関して、ヒトの早産が、単一の疾患ではなく、多数の要因が関与している一連の症候群であることは、世界的に受け入れられている仮説である[2]。最近では、一部の早産ハイリスク症例に対してプロゲステロン製剤の投与が早産率減少に有効であるというエビデンス[67, 68]がある一方で、どのようなハイリスク症例に対して有効かということに関しての知見は乏しい。前述のように、本研究のマウスモデルの

結果からは、SLPI は炎症で誘導され、プロゲステロン作用の減弱で低下する。今後、ヒトの頸管SLPI 濃度から、早産ハイリスク症例に対する治療決定の際に応用できる可能性があり、他の炎症関連マーカーやホルモン関連マーカーと合わせた検討が必要である。

本研究結果をまとめると、ヒトの頸管熟化に関与する 3 種類の機構を明らかにし、その中の抗炎症機構が頸管熟化と深く関与していることが示唆された。抗炎症機構の中の SLPI 蛋白の頸管粘液濃度が、分娩予測マーカーとなり得ることを明らかにした。マウスモデルで、頸管 SLPI は炎症で誘導され、プロゲステロンの作用減弱で低下し、この結果は臨床の早産の原因鑑別に応用できる可能性を示した。NE 誘導性の LPS 早産モデルで、rSLPI 投与が早産を抑制し、その機序として NE の抑制および結果としての NFkb 活性化抑制が細胞培養実験で確認された。実際のヒトの妊娠中期の頸管熟化進行過程では、SLPI と NE が拮抗状態にあることを示した。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。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、研究計画の立案、実験、論文の執筆まで手厚くご指導頂いた直接の指導教官である東京大学医学部産婦人科の永松健准教授に深く感謝の意を表します。また、東京大学医学部産婦人科の藤井知行教授、大須賀穣教授にも、研究の御指導を頂き感謝の意を表します。

【引用文献】

(1) Iams JD, Goldenberg RL, Meis PJ, Mercer BM, Moawad A, Das A, et al. The length of the cervix and the risk of spontaneous premature delivery. National Institute of Child Health and Human Development Maternal Fetal Medicine Unit Network. The New England journal of medicine. 1996;334:567-72.

(2) Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. Science (New York, NY). 2014;345:760-5.

(3) Kanayama N, Terao T. [The relationship between granulocyte elastase activity in intra cervical fluid and prognosis of threatened premature delivery]. Nihon Sanka Fujinka Gakkai zasshi. 1988;40:917-8.

(4) Kanayama N, Terao T. The relationship between granulocyte elastase-like activity of cervical mucus and cervical maturation. Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica. 1991;70:29-34.

(5) Sunagawa S, Takagi K, Ono K, Miyachi K, Kikuchi A. Comparison of biochemical markers and cervical length for predicting preterm delivery. The journal of obstetrics and gynaecology research. 2008;34:812-9.

(6) Word RA, Li XH, Hnat M, Carrick K. Dynamics of cervical remodeling during pregnancy and parturition: mechanisms and current concepts. Seminars in reproductive medicine. 2007;25:69-79.

(7) Limvarapuss C, Kanayama N, Terao T. Elastase activity of endocervical mucus in normal pregnancy. Asia-Oceania journal of obstetrics and gynaecology. 1992;18:147-53.

(8) Hassan SS, Romero R, Tarca AL, Nhan-Chang CL, Vaisbuch E, Erez O, et al. The transcriptome of cervical ripening in human pregnancy before the onset of labor at term: identification of novel molecular functions involved in this process. The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet. 2009;22:1183-93.

(9) Romero R, Conde-Agudelo A, Da Fonseca E, O'Brien JM, Cetingoz E, Creasy GW, et al. Vaginal Progesterone for Preventing Preterm Birth and Adverse Perinatal Outcomes in Singleton Gestations with a Short Cervix: A Meta-Analysis of Individual Patient Data. American journal of obstetrics and gynecology. 2017.

(10) Golightly E, Jabbour HN, Norman JE. Endocrine immune interactions in human parturition. Molecular and cellular endocrinology. 2011;335:52-9.

(11) Osman I, Young A, Ledingham MA, Thomson AJ, Jordan F, Greer IA, et al. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. Molecular human reproduction. 2003;9:41-5.

(12) Yuan M, Jordan F, McInnes IB, Harnett MM, Norman JE. Leukocytes are primed in peripheral blood for activation during term and preterm labour. Molecular human reproduction. 2009;15:713-24.

(13) Elliott CL, Slater DM, Dennes W, Poston L, Bennett PR. Interleukin 8 expression in human myometrium: changes in relation to labor onset and with gestational age. American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989). 2000;43:272-7.

(14) Dubicke A, Fransson E, Centini G, Andersson E, Bystrom B, Malmstrom A, et al. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in human preterm and term cervical ripening. Journal of reproductive immunology. 2010;84:176-85.

(15) Leppert PC. Anatomy and physiology of cervical ripening. Clinical obstetrics and gynecology. 1995;38:267-79.

(16) Straach KJ, Shelton JM, Richardson JA, Hascall VC, Mahendroo MS. Regulation of hyaluronan expression

during cervical ripening. Glycobiology. 2005;15:55-65.
(17) Uchiyama T, Sakuta T, Kanayama T. Regulation of hyaluronan synthases in mouse uterine cervix. Biochemical and biophysical research communications. 2005;327:927-32.
(18) Hassan SS, Romero R, Haddad R, Hendler I, Khalek N, Tromp G, et al. The transcriptome of the uterine cervix before and after spontaneous term parturition. American journal of obstetrics and gynecology. 2006;195:778-86.
(19) Wilkinson TS, Roghanian A, Simpson AJ, Sallenave JM. WAP domain proteins as modulators of mucosal immunity. Biochemical Society transactions. 2011;39:1409-15.
(20) Grutter MG, Fendrich G, Huber R, Bode W. The 2.5 A X-ray crystal structure of the acid-stable proteinase inhibitor from human mucous secretions analysed in its complex with bovine alpha-chymotrypsin. The EMBO journal. 1988;7:345-51.
(21) Moreau T, Baranger K, Dade S, Dallet-Choisy S, Guyot N, Zani ML. Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family. Biochimie. 2008;90:284-95.
(22) Vogelmeier C, Gillissen A, Buhl R. Use of secretory leukoprotease inhibitor to augment lung antineutrophil elastase activity. Chest. 1996;110:261s-6s.
(23) Bingle L, Richards RJ, Fox B, Masek L, Guz A, Tetley TD. Susceptibility of lung epithelium to neutrophil elastase: protection by native inhibitors. Mediators of inflammation. 1997;6:345-54.
(24) Taggart CC, Greene CM, McElvaney NG, O'Neill S. Secretory leucoprotease inhibitor prevents lipopolysaccharide-induced IkappaBalpha degradation without affecting phosphorylation or ubiquitination. The Journal of biological chemistry. 2002;277:33648-53.
(25) Jin FY, Nathan C, Radzioch D, Ding A. Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. Cell. 1997;88:417-26.
(26) Moriyama A, Shimoya K, Ogata I, Kimura T, Nakamura T, Wada H, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) concentrations in cervical mucus of women with normal menstrual cycle. Molecular human reproduction. 1999;5:656-61.
(27) Velarde MC, Iruthayanathan M, Eason RR, Zhang D, Simmen FA, Simmen RC. Progesterone receptor transactivation of the secretory leukocyte protease inhibitor gene in Ishikawa endometrial epithelial cells involves recruitment of Kruppel-like factor 9/basic transcription element binding protein-1. Endocrinology. 2006;147:1969-78.
(28) Simmen RC, Eason RR, McQuown JR, Linz AL, Kang TJ, Chatman L, Jr., et al. Subfertility, uterine hypoplasia, and partial progesterone resistance in mice lacking the Kruppel-like factor 9/basic transcription element-binding protein-1 (Bteb1) gene. The Journal of biological chemistry. 2004;279:29286-94.
(29) Itaoka N, Nagamatsu T, Schust DJ, Ichikawa M, Sayama S, Iwasawa-Kawai Y, et al. Cervical Expression of Elafin and SLPI in Pregnancy and Their Association With Preterm Labor. American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989). 2015;73:536-44.
(30) Dudley DJ, Branch DW, Edwin SS, Mitchell MD. Induction of preterm birth in mice by RU486. Biology of reproduction. 1996;55:992-5.
(31) Holt R, Timmons BC, Akgul Y, Akins ML, Mahendroo M. The molecular mechanisms of cervical ripening differ between term and preterm birth. Endocrinology. 2011;152:1036-46.

(32) Yamashita A, Kawana K, Tomio K, Taguchi A, Isobe Y, Iwamoto R, et al. Increased tissue levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids prevents pathological preterm birth. Scientific reports. 2013;3:3113.

(33) Hashimoto H, Eto T, Endo K, Itai G, Kamisako T, Suemizu H, et al. Comparative study of doses of exogenous progesterone administration needed to delay parturition in Jcl:MCH(ICR) mice. Experimental animals. 2010;59:521-4.

(34) Timmons B, Akins M, Mahendroo M. Cervical remodeling during pregnancy and parturition. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 2010;21:353-61.

(35) Samejima T, Nagamatsu T, Schust DJ, Itaoka N, Iriyama T, Nakayama T, et al. Elevated concentration of secretory leukocyte protease inhibitor in the cervical mucus before delivery. American journal of obstetrics and gynecology. 2016;214:741.e1-7.

(36) van Engelen E, Breeveld-Dwarkasing VN, Taverne MA, Everts ME, van der Weijden GC, Rutten VP. MMP-2 expression precedes the final ripening process of the bovine cervix. Molecular reproduction and development. 2008;75:1669-77.

(37) Akgul Y, Holt R, Mummert M, Word A, Mahendroo M. Dynamic changes in cervical glycosaminoglycan composition during normal pregnancy and preterm birth. Endocrinology. 2012;153:3493-503.

(38) Liong S, Di Quinzio MK, Fleming G, Permezel M, Rice GE, Georgiou HM. New biomarkers for the prediction of spontaneous preterm labour in symptomatic pregnant women: a comparison with fetal fibronectin. BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology. 2015;122:370-9.

(39) Velarde MC, Zeng Z, McQuown JR, Simmen FA, Simmen RC. Kruppel-like factor 9 is a negative regulator of ligand-dependent estrogen receptor alpha signaling in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. Molecular endocrinology (Baltimore, Md). 2007;21:2988-3001.

(40) Africander D, Louw R, Verhoog N, Noeth D, Hapgood JP. Differential regulation of endogenous pro-inflammatory cytokine genes by medroxyprogesterone acetate and norethisterone acetate in cell lines of the female genital tract. Contraception. 2011;84:423-35.

(41) Hao CM, Yull F, Blackwell T, Komhoff M, Davis LS, Breyer MD. Dehydration activates an NF-kappaB-driven, COX2-dependent survival mechanism in renal medullary interstitial cells. The Journal of clinical investigation. 2000;106:973-82.

(42) Saavalainen K, Tammi MI, Bowen T, Schmitz ML, Carlberg C. Integration of the activation of the human hyaluronan synthase 2 gene promoter by common cofactors of the transcription factors retinoic acid receptor and nuclear factor kappaB. The Journal of biological chemistry. 2007;282:11530-9.

(43) Dechend R, Maass M, Gieffers J, Dietz R, Scheidereit C, Leutz A, et al. Chlamydia pneumoniae infection of vascular smooth muscle and endothelial cells activates NF-kappaB and induces tissue factor and PAI-1 expression: a potential link to accelerated arteriosclerosis. Circulation. 1999;100:1369-73.

(44) Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M, Garner WL. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. Journal of cell science. 2001;114:131-9.

(45) Lee EJ, Han JE, Woo MS, Shin JA, Park EM, Kang JL, et al. Matrix metalloproteinase-8 plays a pivotal role in neuroinflammation by modulating TNF-alpha activation. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2014;193:2384-93.

(46) Vannier E, Miller LC, Dinarello CA. Coordinated antiinflammatory effects of interleukin 4: interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor

antagonist. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1992;89:4076-80.
(47) Tilg H, Vannier E, Vachino G, Dinarello CA, Mier JW. Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 beta synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. The Journal of experimental medicine. 1993;178:1629-36.
(48) Wahl SM. Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure. Journal of clinical immunology. 1992;12:61-74.
(49) Merly F, Huard C, Asselin I, Robbins PD, Tremblay JP. Anti-inflammatory effect of transforming growth factor-beta1 in myoblast transplantation. Transplantation. 1998;65:793-9.
(50) Henriksen PA, Hitt M, Xing Z, Wang J, Haslett C, Riemersma RA, et al. Adenoviral gene delivery of elafin and secretory leukocyte protease inhibitor attenuates NF-kappa B-dependent inflammatory responses of human endothelial cells and macrophages to atherogenic stimuli. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2004;172:4535-44.
(51) Yagi Y, Muroga E, Naitoh M, Isogai Z, Matsui S, Ikehara S, et al. An ex vivo model employing keloid-derived cell-seeded collagen sponges for therapy development. The Journal of investigative dermatology. 2013;133:386-93.
(52) Mueller AM, Pedre X, Stempfl T, Kleiter I, Couillard-Despres S, Aigner L, et al. Novel role for SLPI in MOG-induced EAE revealed by spinal cord expression analysis. Journal of neuroinflammation. 2008;5:20.
(53) Ashcroft GS, Jeong MJ, Ashworth JJ, Hardman M, Jin W, Moutsopoulos N, et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 2012;20:38-49.
(54) Ashcroft GS, Lei K, Jin W, Longenecker G, Kulkarni AB, Greenwell-Wild T, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. Nature medicine. 2000;6:1147-53.
(55) Vago JP, Tavares LP, Sugimoto MA, Lima GL, Galvao I, de Caux TR, et al. Proresolving Actions of Synthetic and Natural Protease Inhibitors Are Mediated by Annexin A1. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2016;196:1922-32.
(56) Leong MK, Murphy BE. Cortisol levels in maternal venous and umbilical cord arterial and venous serum at vaginal delivery. American journal of obstetrics and gynecology. 1976;124:471-3.
(57) Zannas AS, Chrousos GP. Glucocorticoid signaling drives epigenetic and transcription factors to induce key regulators of human parturition. Science signaling. 2015;8:fs19.
(58) Wang W, Guo C, Zhu P, Lu J, Li W, Liu C, et al. Phosphorylation of STAT3 mediates the induction of cyclooxygenase-2 by cortisol in the human amnion at parturition. Science signaling. 2015;8:ra106.
(59) Ganesan S, Faris AN, Comstock AT, Sonstein J, Curtis JL, Sajjan US. Elastase/LPS-exposed mice exhibit impaired innate immune responses to bacterial challenge: role of scavenger receptor A. The American journal of pathology. 2012;180:61-72.
(60) Tsai YF, Yu HP, Chang WY, Liu FC, Huang ZC, Hwang TL. Sirtinol inhibits neutrophil elastase activity and attenuates lipopolysaccharide-mediated acute lung injury in mice. Scientific reports. 2015;5:8347.
(61) Zhu J, Nathan C, Jin W, Sim D, Ashcroft GS, Wahl SM, et al. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. Cell. 2002;111:867-78.
(62) Lockwood CJ, Moscarelli RD, Wein R, Lynch L, Lapinski RH, Ghidini A. Low concentrations of vaginal fetal fibronectin as a predictor of deliveries occurring after 41 weeks. American journal of obstetrics and gynecology.

1994;171:1-4.
(63) Lee SM, Lee J, Seong HS, Lee SE, Park JS, Romero R, et al. The clinical significance of a positive Amnisure test in women with term labor with intact membranes. The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet. 2009;22:305-10.
(64) Ahner R, Kiss H, Egarter C, Zeillinger R, Eppel W, Karas H, et al. Fetal fibronectin as a marker to predict the onset of term labor and delivery. American journal of obstetrics and gynecology. 1995;172:134-7.
(65) Heng YJ, Di Quinzio MK, Permezel M, Rice GE, Georgiou HM. Interleukin-1 receptor antagonist in human cervicovaginal fluid in term pregnancy and labor. American journal of obstetrics and gynecology. 2008;199:656.e1-7.
(66) Liong S, Di Quinzio MK, Fleming G, Permezel M, Georgiou HM. Is vitamin D binding protein a novel predictor of labour? PloS one. 2013;8:e76490.
(67) Fonseca EB, Celik E, Parra M, Singh M, Nicolaides KH. Progesterone and the risk of preterm birth among women with a short cervix. The New England journal of medicine. 2007;357:462-9.
(68) Hassan SS, Romero R, Vidyadhari D, Fusey S, Baxter JK, Khandelwal M, et al. Vaginal progesterone reduces the rate of preterm birth in women with a sonographic short cervix: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. 2011;38:18-31.