

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791688

研究課題名(和文) 早産の予知、治療法の開発のための抗菌ペプチドによる子宮頸管免疫防御機構の研究

研究課題名(英文) Immunological system mediated by antimicropeptide at the uterine cervix

研究代表者

永松 健(Nagamatsu, Takeshi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60463858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では抗菌ペプチドであるSLPIおよびElafinと正常妊娠および分娩、さらに早産との関連について研究を行った。正常妊娠では妊娠経過に伴いSLPIは発現が上昇し、早産分娩では頸管細胞におけるSLPI、ElafinのmRNA発現の上昇があるが、とくに羊膜絨毛膜炎などの感染を伴う場合は特にElafinの上昇が著しいことを確認した。さらにElafin、SLPIについて頸管熟化のマーカーとしての有用性について検討を進めた。正常妊娠では分娩前の7日以内に採取した頸管細胞ではSLPIのmRNAおよび蛋白レベルでの発現が増強しており、一方でElafinではこの変化は明らかではなかった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the involvement of antimicropeptides, SLPI and elafin in normal pregnancy and preterm labor. SLPI expression level at the uterine cervix elevated gradually in the course of pregnancy and the SLPI concentration in cervical mucus especially increased within 7 days prior to delivery. In women with preterm labor, the expression level of elafin and SLPI was higher in women who ended in preterm birth than in women who extended pregnancy until term. These findings implied that those antimicropeptides are involved in the cervical remodeling process at delivery and immune protection during pregnancy.

研究分野：産婦人科学

キーワード：抗菌ペプチド

1. 研究開始当初の背景

早産は全妊娠の約 5% に生じ、早産児では脳性麻痺、視力障害、呼吸機能障害、学習障害など重大な長期的障害を生じるリスクが高い。近年の医療技術進歩に伴い早産児の救命率は改善しているものの、早産率自体は低下しておらず早産の予知、予防は周産期医療における重要課題となっている。羊膜・絨毛膜など子宮内妊娠組織への感染とそれに続発する子宮収縮、頸管熟化が主要な早産病理機序として認識されている。そして子宮内への感染への契機として経子宮頸管的に腔内の病原体が上行性に侵入することが中心的な感染経路として指摘されている。

免疫学的観点からすると、胎児は母体にとって半同種移殖片としての性質を持っており妊娠期間中には胎児由来の非自己抗原に対して母体側の免疫寛容が誘導されており胎児への拒絶反応が回避される。申請者の先行研究の結果においては、脱落膜内の間質細胞や絨毛細胞が T 細胞と共刺激分子を介した抗炎症性のシグナル応答を行うことにより母児間の免疫寛容に関わっていることを報告してきた。しかし、こうしたメカニズムは外来病原体への子宮内での免疫防御の脆弱性という側面をもっており、一旦子宮内に病原体が侵入した場合は適切な免疫応答が発動せず感染が拡大して早産へとつながるリスクを伴っている。そうした意味で子宮頸管での感染防御機構が適切に機能していることが早産抑止の鍵となっていると考えられる。

粘膜上皮細胞と局所の血球細胞(好中球、リンパ球)は種々の Antimicrobial peptides(以下 AMPs と表記)と呼ばれる抗菌性物質を産生し、それらの働きが外来病原体の侵入を阻止する第一のバリアとなっている。本研究におけるターゲットであるエラフィンと Secretory Leukocyte Protease Inhibitor(以下 SLPI と表記)はグラム陽性菌、グラム陰性菌の両者を含む幅広い抗菌作用を発揮し、AMPs の 1 種として分類される。さらにそうした抗菌作用に加えてプロテアーゼ阻害作用、抗炎症性作用を有していることが知られている。非妊娠時に子宮頸管内で SLPI が産生され排卵期に増加することが知られていたが妊娠中の変化や機能については不明であった。

2. 研究の目的

頸管粘液中に産生されているエラフィン、Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) という 2 種類の抗菌ペプチドに着目し、それらの分子の子宮頸管における感染防御および子宮頸管熟化への関与を明らかにすることを目的とする。そして、それらの抗菌ペプチドの早産の予知マーカーあるいは早産予防の治療薬としての可能性について模索する。

3. 研究の方法

施設研究倫理委員会承認のもと研究を行った。文書による説明同意の後、臨床検体の収集は行われた。

頸管細胞、粘液におけるエラフィン、SLPI の発現、産生についての検討

妊娠女性の子宮頸管粘液、頸管細胞の検体収集を行い、エラフィン・SLPI を含めた抗菌ペプチドの分泌量の測定を ELISA 法により行った。細胞内の特異的 mRNA 発現量について real-time PCR 法による半定量的測定を行った。また、分泌源となっている細胞の特定を免疫染色法にて行った。異なる妊娠時期、産褥におけるエラフィン・SLPI の正常妊娠での分泌量の変化および早産例における違いについて解析し、早産マーカーとしての有用性を検討した。

卵膜組織におけるエラフィン、SLPI の発現部位、発現誘導についての検討

正常妊娠および早産の症例における分娩時の胎盤より卵膜組織を採取して、エラフィン、SLPI の発現を免疫染色法にて調べた。また、卵膜組織から羊膜、絨毛膜、脱落膜の 3 層の細胞をそれぞれ分離培養し、炎症性サイトカイン、LPS の刺激に対するエラフィン、SLPI の発現変化について real-time PCR 法および ELISA 法による解析を行った。

4. 研究成果

正常妊娠において妊娠経過に伴い SLPI は発現が上昇すること。早産分娩では頸管細胞における SLPI、エラフィンの mRNA 発現の上昇があるが、とくに羊膜絨毛膜炎などの感染を伴う場合は特にエラフィンの上昇が著しいことを確認した。またエラフィン、SLPI について頸管熟化のマーカーとしての有用性について検討を進めた。正常妊娠では分娩前の 7 日以内に採取した頸管細胞では SLPI の mRNA および蛋白レベルでの発現が増強しており、一方でエラフィンではこの変化は明らかではなかった。また、臨床的に内診所見に基づいて行われる Bishop スコアリングと陣痛発来予測に関する比較を行ったところ、Bishop スコアに相当する感度、特異度を示すことが明らかになった。また、切迫早産例の頸管細胞中の mRNA 発現について、最終的に早産に至った症例では早産に至らず満期まで妊娠延長ができた症例よりも有意に SLPI の発現量が高いことが確認できた。(図 1) エラフィンでは同様の傾向であったが有意な違いは認めなかった。(図 2)

頸管細胞において上皮細胞、腺細胞のいずれにおいても SLPI、エラフィンが発現していることを免疫染色で確認した。早産症例において、頸管粘液中のエラフィン、SLPI の mRNA レベルでの発現が上昇しており、かつ羊膜絨毛膜炎の症例では感染・炎症部位においてそれらの抗菌ペプチドの発現が蛋白レベルで顕著に上昇しているという所見を得た。エラフィン、SLPI の発現・産生変化を制御する機構についての解析を行う目的で、ヒト卵膜検

体を用いた培養実験を開始した。卵膜を構成する3層の細胞を抽出して炎症性サイトカインIL-1、TNF-、グラム陰性菌内毒素LPSによる刺激に対する反応を見た。エラフィンに関しては卵膜細胞はいずれの刺激に対しても発現上昇することが明らかとなった。一方SLPIについては炎症性サイトカインに対する反応は乏しく、LPSのみで誘導された。本研究によりこれらの抗菌ペプチドが子宮内感染に際して産生が上昇し、早産発症、進展の病理機序に深く関わる事が明らかとなった。

図 1

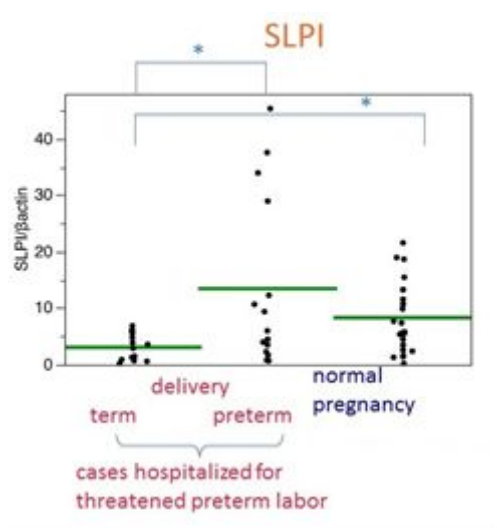
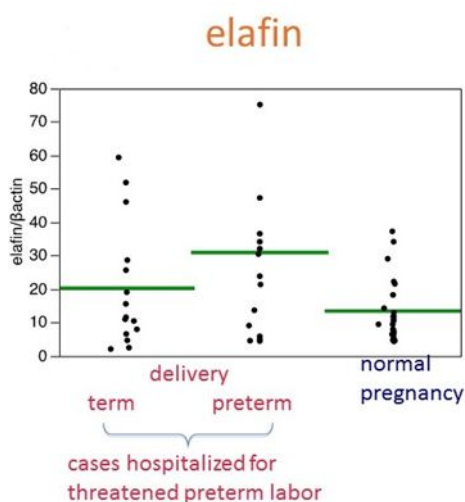


図 2



本研究の結果からエラフィン、SLPI が正常な妊娠および早産における頸管熟化の機序に関与することが示唆された。また、これらの分子は分娩・早産の予知マーカーとして臨床的に有用である可能性が見いだされた。将来的には後方視的検討のみならず円錐切除、頸管短縮例などの早産ハイリスク症例に対する前方視的な検討を加えてゆきたい。これ

らの抗菌ペプチドの有する機能として抗菌作用以外に抗プロテアーゼがあることが知られている。本研究の細胞培養実験ではLPSの炎症刺激に対して、エラフィン、SLPIが誘導されることを見出した。これは、感染や組織炎症に際して誘導される好中球エラスターゼやマトリックスメタロプロテイナーゼなどのプロテアーゼに拮抗する生体防御機構としてエラフィン、SLPIが機能していることを示唆している。将来の研究課題として、早産動物モデルを組み合わせ分子機能の解析を進めてゆきたいと考えている。

産科臨床では多くの場合子宮内感染は母体の全身的炎症性変化を生じることなく潜伏性に進行し、子宮収縮や破水といった早産徴候として顕在化した場合は分娩の進行を抑制することは困難となる。そのため、子宮内感染あるいはその前段階である頸管炎を早期に検知することは早産の治療戦略上重要である。本研究の結果はエラフィンとSLPIの分娩、早産の予知マーカーとしての応用可能性を強く示唆するものである。本研究の発展により今後、新たな早産予知・予防法の開発に結実する成果が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Itaoka N1, Nagamatsu T, Schust DJ, Ichikawa M, Sayama S, Iwasawa-Kawai Y, Kawana K, Yamashita T, Osuga Y, Fujii T. Cervical Expression of Elafin and SLPI in Pregnancy and Their Association With Preterm Labor. *Am J Reprod Immunol.* 2015 Jan 5.

〔学会発表〕(計6件)

1. The 20th FIGO World congress of Gynecology and Obstetrics. Nao ITAOKA, Takeshi NAGAMATSU, et al. Expression and biological functions of Elafin and SLPI at the uterine cervix in the fetal membrane during pregnancy.

2. 第64回日本産科婦人科学会. 森田一輝、永松健 et al. 切迫早産の予後予測における顆粒球エラスターゼ検査の意義

3. 第65回日本産科婦人科学会. 板岡奈央、永松健 et al. 妊娠中の子宮頸管におけるelafinとSLPIの生理的発現および切迫早産症例での変化についての検討

4. 第28回日本生殖免疫学会. 板岡奈央、永松健 et al. 羊膜絨毛膜炎におけるelafinとSLPIの発現および発現誘導因子について

5. The 14th International Symposium for

Immunology of Reproduction. Nao ITAOKA, Takeshi NAGAMATSU, et al. Elafin and SLPI at the uterine cervix during human pregnancy as candidate molecular markers for preterm birth.

6. 第 66 回日本産科婦人科学会. 鮫島大輝、永松健 et al. 頸管粘液中の 1MG、SLPI 濃度上昇は陣痛発来予測因子となり得る 正期産妊婦における検討

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永松 健 (NAGAMATSU Takeshi)

東京大学 医学部附属病院 講師

研究者番号：60463858

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし