

## 論文の内容の要旨

氏名：松 田 恵里那

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：腔内細菌(*Lactobacillus crispatus* と *Gardnerella vaginalis*)による子宮頸部上皮細胞の抗菌ペプチド(SLPI・Elafin)産生への影響

【背景】早産児は出生後に深刻な後遺症を発生する可能性があるため、早産の予防が周産期において重要である。腔内細菌叢の *dysbiosis* である細菌性陰症は早産の原因の一つである。妊娠した女性は胎児を感染から守るために、腔から子宮に至るさまざまなバリア機能がはたらく。腔内では常在細菌優位種である *Lactobacillus crispatus* (*L.crispatus*) (以下 LC と略す) が主体となり酸性に保つことで病原菌の繁殖を防いでいる。また子宮頸管は抗菌ペプチドや抗体を含む粘液栓を形成し、一定の頸管長を保つことで化学的・物理的に上行性感染を防いでいる。細菌性陰症の原因菌である *Gardnerella vaginalis* (*G. vaginalis*) (以下 GV と略す) を用いた研究は少なく、抗菌ペプチドの産生への影響も不明である。また抗菌ペプチドには様々な作用があると言われているが産科領域においてははまだ不明な点が多い。

【目的】今回私は GV が、子宮頸部の炎症を促進させ、感染に対する防御反応としての抗菌ペプチドの産生に影響するという仮説を立てた。本研究では、ヒト不死化子宮頸部上皮細胞株を用い、GV による Elafin 産生に対する影響を調べた。また、子宮頸部から分泌される Elafin の作用を検討することを目的とした。

【方法】当院で切迫早産の診断で入院管理となった妊婦の、入院時における頸腔分泌物の Nugent score と好中球エラスターゼの相関を調べた。また頸腔分泌物の GV 陽性群と陰性群の好中球エラスターゼを比較した。

次に、LC と GV の培養上清を作成し、ヒト不死化子宮頸部上皮細胞（子宮頸管腺上皮細胞：EndoCx と子宮腔部重層扁平上皮細胞：EctoCx）とヒト不死化腔上皮細胞株 (MS74) に添加した。抗菌ペプチドである Secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) と Elafin の産生への影響を、リアルタイム PCR による mRNA 発現量および ELISA によるタンパク発現量で評価した。マイクロアレイ解析により mRNA 発現を網羅的に解析した。

また、LC と GV に対する Elafin の抗菌活性を検討した。

【結果】切迫早産妊婦の入院時における頸腔分泌物を Nugent score にそって正常・中間・細菌性陰症の 3 群に分け、好中球エラスターゼの濃度を比較したところ、細菌性陰症と診断された群で有意に高かった。また、GV 陽性群の妊婦は好中球エラスターゼ濃度が陰性群と比較して有意に高かった。

リアルタイム PCR では、GV 培養上清の添加により腔上皮細胞は、SLPI も Elafin も mRNA 発現に変化は認めなかった。子宮頸部上皮細胞においてはどちらも発現が上昇した。蛋白レベルでは、子宮頸部上皮細胞において GV 培養上清の添加により Elafin のみ産生が促進され、SLPI は変化を認めなかった。また GV 培養上清の添加により蛋白レベルにおいて IL-8 の産生が促進されたが、LC 培養上清の添加により IL-8 の産生に変化はみられなかった。さらに IL-8 の刺激による EndoCx からの Elafin の産生促進は認めなかった。

マイクロアレイ解析では、炎症性サイトカインである IL-8 の発現が約 5 倍に増強した。

子宮頸部上皮細胞から分泌される Elafin の生理学的濃度内では、GV および LC への有意な抗菌活性は認めなかった。

【結論】EndoCx は、GV の可溶性成分により抗菌ペプチドである Elafin と IL-8 の産生を促進した。IL-8 は好中球を活性化しエラスターゼの分泌を促進することが知られている。そのため EndoCx は Elafin を分泌し、抗菌作用ではなく抗プロテアーゼ作用により子宮頸部を保護している可能性が示唆された。他の菌に対する抗菌作用や、抗プロテアーゼ作用、別の免疫調整機序については未だ不明であり今後検討していく必要がある。Elafin は抗菌ペプチドの中でも好中球エラスターゼに特異的な抗プロテアーゼ作用を持つことが知られており、両者の関連性を今後さらに検討していく必要がある。