

学位論文題名

Lipopolysaccharide のヒト子宮頸部平滑筋細胞に  
対する作用について

学位論文内容の要旨

緒言

近年、細菌性膣症が早産および前期破水の原因として注目されている。細菌性膣症の原因菌となるグラム陰性桿菌、すなわち *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacteroides fragilis* (*B. frag.*) または *Fusobacterium nucleatum* (*F. nuc.*) 由来の lipopolysaccharide (LPS) を、子宮頸管熟化機構の解明を目的にヒト子宮頸部由来平滑筋細胞(cervical smooth muscle cells, CSMCs) 培養系に添加し、子宮頸部の主な構成成分のコラーゲン分解酵素、matrix metalloproteinases(MMPs)およびエラスチン分解酵素の一つである cathepsin S (CS) の発現の変化を検討した。さらに、LPS が炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ および好中球 chemoattractant である IL-8 の発現を誘導しうるかについて、また誘導された TNF- $\alpha$  が細胞外マトリックス分解酵素を誘導する autocrine loop が存在するかについても検討した。

材料と方法

良性疾患により子宮摘出された非妊娠患者の子宮頸部より分離した CSMCs を(Clonetics, San Diego, CA, USA) 購入し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下に培養した。 $\alpha$ -actin に対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色により平滑筋細胞であることを同定後、2 から 7 代以内で継代培養した細胞を以下の実験に使用した。CSMCs より抽出した total RNA を用い、それぞれに特異的な primer により RT-PCR を行い、MMP-1, -3, CS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) -1, -2 の cDNA を得た。60mm の培養皿に CSMCs を 80~90% confluent になるまで培養後、1% FBS 含有培地に交換し、24 時間培養後に 100 ng/ml~1 $\mu$ g/ml の *E. coli*, *B. frag.* または *F. nuc.* 由来の LPS を添加後 3~48 時間培養し total RNA を抽出し、ノーザンブロット解析を行った。なお、LPS により誘導されたサイトカインの mRNA 発現に対する Actinomycin D (ActD) と Cycloheximide (CHX) の影響については、2  $\mu$ g/ml ActD または 50  $\mu$ g/ml CHX を *E. coli* LPS 添加 30 分前に培養液中に加え、3 時間培養

後に total RNA を抽出しノーザンブロット解析を行った。 *E. coli* LPS 添加後の細胞内および培養液中の TNF- $\alpha$ 量を ELISA 法によって経時的に測定した。 抗 TNF- $\alpha$ モノクローナル抗体 (5  $\mu$ g/ml)を *E. coli* LPS 添加 1 時間前に培養液に加え 24 時間培養することで、LPS による CS mRNA の発現誘導を抑制しうるかについてノーザンブロット解析にて検討した。 コントロールとして抗 LDL 受容体モノクローナル抗体を添加して同様に検討した。 LPS receptor である Toll like receptor (TLR)-2 と -4 および LPS の情報伝達に必須の CD-14 の発現を RT-PCR+サザンブロット法、AP-1 転写因子複合体の 1 つである c-fos の発現をウエスタンブロット法にてそれぞれ検討した。

## 成 績

*E. coli* LPS(100 ng/ml)により TNF- $\alpha$ の mRNA レベルは、LPS 添加 3 時間後に最大となり、5 時間後には検出不能となった。 MMP-1, -3 mRNA レベルは添加 12 時間後に 2.9, 3.5 倍に、CS mRNA は 24 時間後に 12.5 倍に増加した。 *B. frag.* および *F. nuc.* より抽出した LPS(1 $\mu$ g/ml)も TNF- $\alpha$ mRNA レベルを急速かつ一過性に誘導し、CS mRNA を時間依存性に誘導した。 *E. coli* LPS 添加により IL-8mRNA レベルは添加 3 時間後に 12.3 倍と最大となり、24 時間後まで漸減しながら持続的に誘導された。 なお、LPS 添加により TIMP-1, -2 の mRNA の発現量に有意な変化はなかった。 転写阻害剤である ActD は、*E. coli* LPS により誘導された TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  および IL-8 の mRNA の発現を control レベルまで阻害した。 蛋白合成阻害剤である CHX はこれらの mRNA 発現を抑制せず、むしろ TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  および IL-8 の mRNA 発現量を増加させた。 LPS 添加後 30 分で急速な 64kDa の c-Fos 蛋白の発現増加を認めた。 *E. coli* LPS 添加後の培養上清・細胞抽出液中の TNF- $\alpha$ 量は 5~8 時間後に一過性に約 7 倍に増加した。 . CSMCs において LPS の情報伝達に関与する TLR-2, -4 および CD-14. が発現していることが確認された。 抗 TNF- $\alpha$ モノクローナル抗体を予め培養液に加えることで、*E. coli* LPS により 32 倍誘導された CS の mRNA レベルは、27.4%有意( $p < 0.05$ )に減少し、約 3 倍誘導された MMP-1mRNA は約 14%に減少したが有意差を認めなかった。

## 考 察

早産の主たる病因である絨毛羊膜炎の原因として細菌性膿症があげられ、その原因菌になりうるグラム陰性桿菌の菌体成分である LPS は動物モデルにおいて早産を誘発することが報告されている。 細菌感染およびそこから生ずる LPS は妊娠中期・後期に抑制されている炎症性サイトカイン系を作動させうる強力なサイトカイン誘導物質であるが、その早産および正期産での頸管熟化における役割、CSMCs に対する作用については未だ十分に解明されていない。

本研究では、CSMCs において LPS 受容体である TLR が発現し、LPS が CSMCs に作用

して MMPs および CS の発現を誘導すること、LPS が TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  および IL-8 の発現を転写レベルで誘導し、誘導された TNF- $\alpha$  が CS の発現を誘導する autocrine loop が存在することを初めて明らかにした。また、炎症性サイトカインおよび IL-8 の濃度は、早産症例の頸管粘液、頸管組織、羊水中で高値であるが、本研究により CSMCs がこれらの産生源となり子宮頸部組織内への細胞外マトリックス分解酵素の誘導・好中球浸潤に寄与していることが初めて推察された。CSMCs において LPS はサイトカインネットワークを起動させる trigger であり、細菌性膣症ならびに頸管炎の予知・診断とその治療の重要性が早産の防止のために再認識される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 橋 輝 雄  
副 査 教 授 吉 木 敬  
副 査 教 授 皆 川 知 紀

学 位 論 文 題 名

## Lipopolysaccharide のヒト子宮頸部平滑筋細胞に 対する作用について

近年、細菌性膣症が早産および前期破水の原因として注目されている。

非妊娠患者の子宮頸部より分離したヒト子宮頸部平滑筋細胞 (CSMCs) を、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下に培養し、2 から 7 代以内で継代培養した細胞を使用した。CSMCs より抽出した total RNA を用い、それぞれに特異的な primer により RT-PCR を行い、MMP-1, -3, cathepsin S (CS), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1, -2 の cDNA を得た。60mm の培養皿に CSMCs を 80~90% confluent になるまで培養後、1% FBS 含有培地に交換し、24 時間培養後に 100 ng/ml~1 $\mu$ g/ml の *Escherichia coli* (*E.coli*), *Bacteroides fragilis* (*B. frag.*) または *Fusobacterium nucleatum* (*F. nuc.*) 由来の LPS を添加後 3~48 時間培養し total RNA を抽出し、ノーザンブロット解析を行った。なお、LPS により誘導されたサイトカインの mRNA 発現に対する Actinomycin D (ActD) と Cycloheximide (CHX) の影響については、2  $\mu$ g/ml ActD または 50  $\mu$ g/ml CHX を *E.coli* LPS 添加 30 分前に培養液中添加し、3 時間培養後に total RNA を抽出しノーザンブロット解析を行った。*E.coli* LPS 添加後の細胞内および培養液中の TNF- $\alpha$  量を ELISA 法によって経時的に測定した。抗 TNF- $\alpha$  モノクローナル抗体 (5  $\mu$ g/ml) を *E.coli* LPS 添加 1 時間前に培養液中添加し 24 時間培養することで、LPS による CS mRNA の発現誘導を抑制するかどうかについてノーザンブロット解析にて検討した。コントロールとして抗 LDL 受容体モノクローナル抗体を添加して同様に検討した。LPS receptor である Toll like receptor (TLR)-2 と -4 および LPS の情報伝達に必須の CD-14 の発現を RT-PCR+サザンブロット法、AP-1 転写因子複合体の 1 つである c-fos の発現をウエスタンブロット法にてそれぞれ検討した。

*E.coli* LPS(100 ng/ml)により TNF- $\alpha$  の mRNA レベルは、LPS 添加 3 時間後に最大となり、5 時間後には検出不能となった。MMP-1, -3 mRNA レベルは添加 12 時間後に 2.9, 3.5 倍に、CS mRNA は 24 時間後に 12.5 倍に増加した。*B.frag.* および *F. nuc.* より抽出した LPS(1 $\mu$ g/ml) も TNF- $\alpha$  mRNA レベルを急速かつ一過性に誘導し、CS mRNA を時間依存性に誘導した。*E.coli* LPS 添加により IL-8 mRNA レベルは添加 3 時間後に 12.3 倍と最大となり、24 時間後まで漸減しながら持続的に誘導された。なお、LPS 添加により TIMP-1, -2 の mRNA の

発現量に有意な変化はなかった。転写阻害剤である ActD は、*E.coli* LPS により誘導された TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ および IL-8 の mRNA の発現を control レベルまで阻害した。蛋白合成阻害剤である CHX はこれらの mRNA 発現を抑制せず、むしろ TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ および IL-8 の mRNA 発現量を増加させた。LPS 添加後 30 分で急速な 64kDa の c-Fos 蛋白の発現増加を認めた。*E.coli* LPS 添加後の培養上清・細胞抽出液中の TNF- $\alpha$ 量は 5~8 時間後に一過性に約 7 倍に増加した。CSMCs において LPS の情報伝達に参与する TLR-2、-4 および CD-14 が発現していることが確認された。抗 TNF- $\alpha$ モノクローナル抗体を予め培養液に加えることで、*E.coli* LPS により 32 倍誘導された CS の mRNA レベルは、27.4%有意( $p < 0.05$ )に減少し、約 3 倍誘導された MMP-1mRNA は約 14%に減少したが有意差を認めなかった。

本研究では、CSMCs において LPS 受容体である TLR が発現し、LPS が CSMCs に作用して MMPs および CS の発現を誘導すること、LPS が TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ および IL-8 の発現を転写レベルで誘導し、誘導された TNF- $\alpha$ が CS の発現を誘導する autocrine loop が存在することを初めて明らかにした。また、炎症性サイトカインおよび IL-8 の濃度は、早産症例の頸管粘液、頸管組織、羊水中で高値であるが、本研究により CSMCs がこれらの産生源となり子宮頸部組織内への細胞外マトリックス分解酵素の誘導・好中球浸潤に寄与していることが初めて推察された。

公開発表に際し、副査の吉木教授より、サイトカインの発現持続時間と炎症の持続性との関係、子宮頸管の平滑筋細胞と血管のそれとの相異についての質問と TIMP の重要性、臨床検体の利用の重要性についてのコメントがあった。副査の皆川教授からは、ペプチドグリカンなどのグラム陰性桿菌以外からの物質が LPS やサイトカインの作用を調節する可能性について、サイトカインをブロックして分娩を抑制する可能性などについての質問があった。主査の石橋教授からは、LPS の均一性について、とくに *E. coli* 由来の LPS とそれ以外の LPS との相違について質問があった。また、出席の藤本教授から LPS による phospholipase A2 活性の亢進に関する質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は、実験成績の解析結果、過去の文献情報、自身の過去の研究経験をもとに概ね妥当な回答をなした。

審査員一同は、本研究の成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。