

[別紙1]

子宮内膜における Toll-like receptor の発現とその意義に関する検討

指導教員 武谷雄二教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 平田 哲也

要約

産婦人科感染症で問題となる感染経路は特異的であり、多くは下部生殖器である膣より上行性に病原微生物が伝播する。通常、子宮内感染、子宮付属器炎、骨盤腹膜炎の順に進行し、女性の保健に大きな悪影響を与え、不妊症や子宮外妊娠を引き起こす。よって、子宮内膜における感染防御機構は非常に重要であると考えられる。

子宮内膜は、月経期、増殖期、分泌期とダイナミックな変化を遂げる。子宮内

膜における周期的な増殖・分化の過程は、主に卵巣性ステロイドホルモンにより巧妙に調節されている。免疫担当細胞の質的量的構成も、この月経周期に伴い周期的な変化を遂げ、卵巣性ステロイドホルモンによって直接的、間接的に調節されていると考えられている。子宮内膜細胞（腺上皮細胞・間質細胞）および免疫担当細胞の相互作用により、子宮内膜の生理機能の維持、感染防御が可能となっていると想定される。

近年、lipopolysaccharide(LPS)、ペプチドグリカン(PGN)といった細菌、真菌、ウィルスの構成成分を認識する受容体である Toll-like receptor(TLR)の存在が報告され、免疫担当細胞による貪食のみと考えられていた自然免疫の概念が大きく変わった。また、この TLR を介しての自然免疫系の活性化が、獲得免疫の誘導にも必須であることが明らかになった。現在、ヒトにおける TLR は 10 のファミリーメンバーから構成されている。例えば、TLR2 はグラム陽性菌の構成成分である PGN を、TLR4 はグラム陰性菌の構成成分である LPS を認識する。また、TLR3 は、ウィルスが細胞内で増殖する際に形成する 2 本鎖 RNA を認識し、TLR9 は、細菌 DNA に多く存在する非メチル化 CpGDNA を認識する。その中でも、LPS を認識する TLR4 は、非常に良く検討されている。TLR4 は、MD2 と複合体を形成することにより LPS の認識が可能となり、また、CD14 も LPS の認識に必須の蛋白質であるとされている。

子宮内膜において、LPS、PGN といった病原体の構成成分が、様々な生理活性物質の発現を亢進させることが報告されており、子宮内膜において TLR が何らかの役割を担っているであろうと考えた。しかし、子宮内膜における TLR の発現および機能についての報告はきわめて少数である。そこで、今回子宮内膜における TLR の発現、月経周期に伴う変化につき検討した。その中でも、特に子宮内膜における TLR4 の発現、機能についてはさらに検討を行い、また、感染防御に重要なサイトカインである interferon(IFN)- γ が TLR4 による LPS 認識機構にどのような影響を与えるかについても検討した。

患者より同意を得た上で、子宮筋腫等の良性疾患を理由に摘出した子宮より子宮内膜を一部採取し、以下の検討に供した。

- ① 採取した子宮内膜より mRNA を抽出し、定量的 PCR により TLR 2、TLR3、TLR4、TLR9 の発現の変化につき、月経期、増殖期中期、増殖期後期、分泌期前期、分泌期中期、分泌期後期の各月経周期に分類し検討した。TLR2、TLR3、TLR4、TLR9mRNA の発現は月経周期を通して観察された。TLR 2、TLR9mRNA は月経期にその発現が高く、増殖期後期、分泌期初期にかけてその発現は減少し、その後、分泌期後期にかけて変動は少なかった。TLR3、TLR4 は、月経期にその発現が高く、増殖期後期、分泌期初期にかけてその発現は減少し、その後分泌期後期にむけて発現は増加した。

② また、各 TLRmRNA の局在につき、子宮内膜組織切片を用いて、in situ hybridization 法 (ISH) にて調べた。月経周期を通して TLR2, TLR9 では上皮と間質に明らかな発現の差はみられなかったが、TLR3 の発現は上皮に強く、TLR4 の発現は間質に強かった。

③ 採取した子宮内膜より子宮内膜上皮細胞(EEC)、子宮内膜間質細胞(ESC)に分離培養し、mRNA を抽出した。定量的 PCR により、EEC と ESC における TLR 2、TLR3、TLR4、TLR9mRNA の発現の差異につき検討した。すると、TLR 2、TLR9 では NEE と NES の間に有意な差がみられなかったが、TLR3 では NEE に発現が有意に強く、TLR4 では ESC に発現が強かった。

(小括 1) TLR2、TLR3、TLR4、TLR9mRNA は月経周期を通して発現がみられた。TLR の種類によって発現の局在ならびに月経周期における変動に差異がみられ、病原体の種類によって異なる感染防御機構が存在する可能性が示唆された。一方、いずれの TLR においても共通して、子宮内膜炎が起りやすい月経期に合目的的と考えられる発現の増強が認められた。

これらの TLR の中でも、女性生殖器における感染の起炎菌であるグラム陰性菌、淋菌などに対する感染防御に重要と考えられている TLR 4、CD14 の子宮内膜における発現につき検討した。

- ④ 採取した子宮内膜より EEC と ESC に分離培養し、それぞれ PCR 法、flow cytometry 法、Western Blot 法にて TLR4、CD14、MD2 の発現を調べた。これらの LPS 認識関連分子は NEE、NES にみられるが、注目すべき差として NEE には細胞表面上に CD14 の発現はみられなかったが、ESC には細胞表面上に CD14 の発現がみられた。
- ⑤ EEC、ESC に対して LPS を添加することにより、培養上清中の IL-8 産生を ELISA 法で測定した。すると、EEC では、LPS を 10ng/ml から 1000ng/ml 添加しても IL-8 の有意な上昇はみられないが、ESC では、LPS1ng/ml 添加より IL-8 産生の有意な上昇がみられ、LPS100ng/ml まで用量依存的に IL-8 産生は増加した。
- ⑥ そこで EEC の細胞表面上に CD14 を発現しないことに着目し、可溶性 CD14(sCD14)を LPS と同時添加した。すると EEC においても IL-8 産生の有意な上昇がみられた。
- ⑦ また、TLR4、CD14 の中和抗体を添加することにより、LPS 刺激による ESC の IL-8 産生を抑制することがわかった。また、細胞免疫染色法により、これらの中和抗体が NF κ B の核内移行も抑制することがわかった。
- ⑧ さらに子宮内膜組織切片の免疫染色法を用いて CD14 の発現を調べたところ、上皮細胞に CD14 の発現はみられず、間質に CD14 の発現がみられることが

わかった。

⑨ さらに LPS 刺激による ESC の IL-8 産生が IFN- γ によってどのような影響を受けるかにつき検討した。ESC を IFN- γ によって 0 時間から 72 時間前処理し、その後上清を交換した上で LPS 刺激 (100ng/ml) をし、上清中への IL-8 産生について ELISA 法を用いて調べた。すると、IFN- γ による前処理時間依存的に上清中への IL-8 産生の亢進が観察された。

⑩ さらに、ESC に対して IFN- γ を添加し、TLR4、CD 14、MD 2、MyD88 の mRNA 発現量の変化について定量的 PCR 法を用いて検討した。これらの LPS 認識関連分子は、IFN- γ 添加により有意に発現が亢進し、特に TLR4 については IFN- γ 添加 48 時間まで観察したが、発現は増加を続けた。

(小括 2) EEC と ESC では、LPS 刺激による IL-8 産生に差異が見られた。これは、細胞表面上に CD14 を発現するかないかに依存している可能性が示唆された。また、sCD14 の添加により、EEC においても、LPS 刺激による IL-8 産生の亢進が観察された。また、IFN- γ 添加が、TLR4、CD 14、MD 2、MyD88 の発現を上昇させることで、ESC における LPS 刺激による IL-8 産生を亢進させることがわかった。

(総括) TLR2、TLR3、TLR4、TLR9mRNA は月経周期を通して発現がみられた。TLR の種類によって発現の局在ならびに月経周期における変動に差異がみ

られ、病原体の種類によって異なる感染防御機構が存在する可能性が示唆された。一方、いずれの TLR においても共通して、子宮内膜炎が起こりやすい月経期に合目的的と考えられる発現の増強が認められた。TLR4 と TLR3 は上皮と間質の発現パターンに差がみられ、子宮内膜における感染防御機構を調節している可能性がある。この中でも、グラム陰性菌、淋菌、クラミジアに対する感染防御に重要であると考えられる TLR4 は、子宮内膜における感染防御において重要であると考えられたため、子宮内膜における TLR4 の発現と機能につき検討した。EEC と ESC では、LPS 刺激による IL-8 産生に差異が見られた。これは、細胞表面上に CD14 を発現するかしないかに依存している可能性が示唆された。EEC と ESC における膜型 CD14 の発現有無は、生理学的な意義を持っていると考えられる。これより、EEC において、膜型 CD14 を持たないことにより、病原体に対する過剰な炎症反応を惹起しないようになっていると考えられる。しかしながら、EEC も TLR4 を発現しており、sCD14 の存在下では細菌の侵入を認識する能力を持つと思われる。

そこで、次に様なメカニズムを想定した。子宮内膜において、EEC による一層のバリアーによって物理的に病原体の侵入を防いでいるが、EEC が一旦破綻し、間質に病原体が侵入すると ESC によって TLR4 を介した炎症反応が惹起される。それと同時に遊走してきた免疫担当細胞由来の sCD14 が、EEC での TLR4 を

介する反応を引き起こし、ESC でもより一層の炎症反応を惹起する。このような多段階の感染防御機構により効果的に病原体を排除する。

今回の検討ではさらに、IFN- γ が LPS 刺激による IL-8 産生を亢進させることを示した。IFN- γ が TLR4 を介した反応を亢進させ、病原体にたいする宿主防御機構を増強すると考えられた。

このように、子宮内膜において巧妙な多段階の感染防御機構が存在する可能性が示唆された。