



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	第 1035 号
氏名	後藤 志信
授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位論文の題名	Role of cathepsin E in decidual macrophage of patients with recurrent miscarriage (反復流産病態における妊娠初期脱落膜中マクロファージのカテプシン E の役割)  Molecular Human Reproduction. 2014;20(5):454-462
論文審査担当者	主査： 中西 真 副査： 岡本 尚, 杉浦 真弓

## 論文内容の要旨

### 【目的】

不育症とは、妊娠はするものの流産や死産を繰り返し挙児を得られない状態と定義され、厚生労働省研究班の調査では妊娠経験者の4.2%で発生し、140万人いると推計されると報告されている。検査によって抗リン脂質抗体症候群、夫婦の染色体異常、内分泌学的異常、子宮奇形などがみつかることがあるが、約70%には夫婦それぞれには原因が見つからず、その多くが胎児の染色体異常であることを我々は報告してきたが、残りの25%は今なお原因不明である。我々はこれまでの検討で、様々な cathepsin 群とそのインヒビターである cystatin が不育症病態において重要な役割を果たしていることを報告してきた。一方、アスパラギン酸プロテアーゼである cathepsin E はアレルギーなどの免疫反応や腫瘍の増殖・転移に関与しており、癌病態において cathepsin E は血管新生抑制因子である endostatin や癌細胞特異的アポトーシス誘導因子である TRAIL を産生し、腫瘍の増殖、転移を抑制している。今回我々は生殖免疫と腫瘍免疫との類似性を考慮し、不育症病態における cathepsin E の役割を検討した。

### 【方法】

- (1) Cathepsin E ノックアウトマウスの産仔数を検討し、非妊娠時の子宮の病理学的検討を行った。
- (2) KYS-1 (cathepsin E 特異的消光性蛍光基質) を用いたプロテアーゼ活性測定法を確立し、反復流産患者 (n = 21) の妊娠初期頸管粘液中の cathepsin E 活性とその後の妊娠帰結とを比較検討した。
- (3) 流産手術時に得られた子宮内容組織における cathepsin E の存在をウェスタンブロット法で検討し、不育症患者 (n = 49) と対照群 (n = 24) とで半定量比較した。
- (4) 共焦点レーザー顕微鏡、蛍光顕微鏡を用いた蛍光多重免疫組織染色法で子宮内容組織における cathepsin E の局在を検討した。
- (5) 不育症患者の流産手術時に得られた脱落膜組織よりマクロファージを抽出し、IFN- $\gamma$  (100U/ml)、LPS (1 $\mu$ g/ml) と共に培養し、cathepsin E の発現をウェスタンブロット法にて検討した。

上記、臨床検体は全て患者同意のもとに実験に供した。

### 【成績】

- (1) Cathepsin E ノックアウトマウスの平均産仔数は wild type と比較して有意に減少がみられた ( $p < 0.001$ )。また非妊娠時子宮には腫瘍が形成されており、病理学的には子宮内膜間質に形成された肉芽腫であった。
- (2) 不育症患者の妊娠初期頸管粘液中に cathepsin E 活性が検出された。頸管粘液中の cathepsin E 活性は生児獲得群 ( $0.2040 \pm 0.22$ , n = 10) に対し流産群 ( $0.0995 \pm 0.06$ , n = 11) で有意に低値であった ( $p < 0.01$ )。
- (3) 流産手術時に得られた脱落膜組織中の cathepsin E の発現量は対照群 ( $84.51 \pm 8.69$ ) に対し反復流産患者 ( $97.86 \pm 18.42$ ) では有意に低値であった ( $p < 0.05$ )。
- (4) 蛍光多重免疫組織染色法では脱落膜細胞に染色性を認め、CD14 陽性細胞、CD68 陽性細胞との染色性の一致が観察された。cathepsin E は CD14 陽性細胞の細胞質に顆粒状に局在が見られた。
- (5) 脱落膜より抽出したマクロファージにおいて cathepsin E 発現が検出され、IFN- $\gamma$ 、LPS 刺激にて発現量は有意に減少がみられた。

**【結論】** 今回我々は妊娠初期のヒト子宮における **cathepsin E** の存在及び活性化状態を初めて明らかにした。妊娠初期脱落膜中のマクロファージなどの免疫担当細胞が産生する **cathepsin E** の活性低下が反復流産病態において重要な役割をしていると考えられた。妊娠初期の頸管粘液中のプロテアーゼ活性は脱落膜中の状態を反映していると考えられ、頸管粘液中の **cathepsin E** 活性がその後の妊娠の予後因子になりうる。また、流産病態における **cathepsin E** に関連するマクロファージの活性化機構に対して、抗炎症反応に関連する治療法が応用される可能性がある。

## 論文審査の結果の要旨

### 【目的】

不育症とは、妊娠はするものの流産や死産を繰り返し、挙児を得られない状態と定義され、抗リン脂質抗体症候群、夫婦の染色体異常、内分泌学的異常、子宮奇形などが原因である。論文著者らは原因不明の約 70%が胎児染色体異常によることを報告したが、残りの 25%は今なお原因不明である。著者らはこれまでの検討で、様々な cathepsin 群とそのインヒビターである cystatin が不育症病態において重要な役割を果たしていることを報告してきた。一方、アスパラギン酸プロテアーゼである cathepsin E はアレルギーなどの免疫反応や腫瘍の増殖・転移に関与しており、癌病態において cathepsin E は血管新生抑制因子である endostatin や癌細胞特異的アポトーシス誘導因子である TRAIL を産生し、腫瘍の増殖、転移を抑制している。そこで、今回の論文では生殖免疫と腫瘍免疫との類似性を考慮し、不育症病態における cathepsin E の役割が検討された。

### 【方法と成績】

- (1) Cathepsin E ノックアウトマウスの平均産仔数は wild type と比較して有意に減少がみられた ( $p < 0.001$ )。また非妊娠時子宮には腫瘍が形成されており、病理学的には子宮内膜間質に形成された肉芽腫であった。
- (2) KYS-1 (cathepsin E 特異的消光性蛍光基質) を用いたプロテアーゼ活性測定法を確立した。不育症患者の妊娠初期頸管粘液中の cathepsin E 活性は生児獲得群 ( $0.2040 \pm 0.22$ ,  $n = 10$ ) に対し流産群 ( $0.0995 \pm 0.06$ ,  $n = 11$ ) で有意に低値であった ( $p < 0.01$ )。
- (3) 流産手術時に得られた脱落膜組織中の cathepsin E の発現量をウェスタンブロット法で調べたところ、対照群 ( $84.51 \pm 8.69$ ) に対し反復流産患者 ( $97.86 \pm 18.42$ ) では有意に低値であった ( $p < 0.05$ )。
- (4) 共焦点レーザー顕微鏡、蛍光顕微鏡を用いた蛍光多重免疫組織染色法では脱落膜細胞に染色性を認め、CD14 陽性細胞、CD68 陽性細胞との染色性の一致が観察された。cathepsin E は CD14 陽性細胞の細胞質に顆粒状に局在が見られた。
- (5) 脱落膜より抽出したマクロファージにおいて cathepsin E 発現が検出され、IFN- $\gamma$ 、LPS 刺激にて発現量は有意に減少がみられた。

### 【結論】

今回の研究で、著者らは妊娠初期のヒト子宮における cathepsin E の存在及び活性化状態を初めて明らかにした。その際に妊娠初期脱落膜中のマクロファージなどの免疫担当細胞が産生する cathepsin E の活性低下が反復流産病態において重要な役割をしていると考えられた。妊娠初期の頸管粘液中のプロテアーゼ活性は脱落膜中の状態を反映していると考えられ、頸管粘液中の cathepsin E 活性がその後の妊娠の予後因子になりうる。また、流産病態における cathepsin E に関連するマクロファージの活性化機構に対して、抗炎症反応に関連する治療法が応用される可能性がある。

### 【審査の内容】

主査の中西教授から、脱落膜における cathepsin E の活性はどうなっているのか等 9 項目、第一副査の岡本教授から、原因不明の不育症の何%が cathepsin 異常で説明できるのか等 10 項目、第二副査の杉浦教授から骨盤位の分娩様式について等 2 項目の質問があり、これらに対して適切な回答が得られた。従って、学位申請者は学位論文の内容について十分理解しているとともに、産婦人科学に関する知識を有していると考えられた。本研究は、流産病態における cathepsin E の関与を初めて明らかにしたもので、意義のある研究と言える。以上を持って、本論文の著者は博士 (医学) の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 中西 真 副査 岡本 尚 杉浦真弓