

主論文の要旨

**The expression of Toll-like receptor 5 in preterm  
histologic chorioamnionitis**

〔早産・組織学的絨毛羊膜炎における Toll-like レセプター5 の発現〕

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻  
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

諸井 博明

## 【緒言】

2010年には世界中で約150万の早産児が出生しており、これは全出生の11.1%に相当する。早産の割合は世界的に増加傾向であり、5歳未満児の死亡の主たる要因の一つである。早産の原因として子宮への上行性感染が挙げられ、子宮内感染が母体の免疫反応を誘導し、絨毛羊膜炎 Chorioamnionitis (CAM)が引き起こされる。子宮内の炎症反応は子宮の収縮を促すだけでなく胎児への有害事象をも招く。

Toll-like レセプター(TLR)は抗原を認識するタンパク質で、感染防御に重要な役割を果たしている。CAMにおけるTLRの役割は不明確だが、早産症例の胎盤・卵膜組織においてTLRの発現上昇が見られるという報告がある。TLR5は細菌の鞭毛を構成する蛋白質フラジェリンを認識している。近年の論文で、羊膜上皮細胞の培養実験においてTLRファミリーのなかでTLR5が最も顕著にIL-6、IL-8産生への影響を与えたことが報告されている。羊水中のIL-6、IL-8濃度上昇はCAMの存在を示唆する所見である。

今回我々は、早産となった症例の胎盤において、絨毛羊膜炎の有無によるTLR5発現の違いを確認するとともに、フラジェリンを用いたTLR5の刺激によってIL-6、IL-8産生に影響があるかを調査した。

## 【対象及び方法】

### 【免疫染色】

組織学的絨毛羊膜炎 (histologic chorioamnionitis, HCA) と診断された7例をHCA群とし、母体疾病などの要因で人工早産となった8例をコントロール群とした合計15例の早産症例を対象とした。

サンプルをホルマリン固定し、パラフィン包埋。切片をラビット抗TLR5抗体とともに4℃にてオーバーナイトインキュベートした。TLR5の染色濃度を0から3までの4段階(0:無し、1:軽度、2:中等度、3:強度)に分けて2名の観察者が独立して評価した。

蛍光免疫染色においては、各切片をラビット抗TLR5抗体およびマウス抗IL-6抗体もしくは抗IL-8抗体とともに4℃でオーバーナイトインキュベートした。

### 【卵膜組織培養によるIL-6およびIL-8産生定量】

骨盤位妊娠もしくは既往帝王切開後妊娠の適応で選択的帝王切開となった症例(n=10)から卵膜組織を採取した。各組織片をDMEM培地にて、37℃・5%CO<sub>2</sub>下で8時間培養。1時間のstarvation後にTLR1-6の各リガンド、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ を添加し、37℃・5%CO<sub>2</sub>下で24時間の組織培養を行った。培養上清を採取し、IL-6・IL-8産生量をELISAにて測定した。各IL産生量は組織重量にて標準化した。

### 【統計分析】

統計分析はSPSS24ソフトウェアを用いて行った。2群間の比較はStudentのT検定

もしくは Mann-Whitney の U 検定を用いた。検定法の選択は正規分布に従うかどうかで決定した。 $p < 0.05$  を統計的に有意差有りとした。

## 【結果】

### 【患者背景】

HCA の有無による患者背景の違いを Table 1 に示した。2 群間の患者背景に有意な差は認められなかった。

### 【胎盤における TLR5 発現】

HCA 群とコントロール群の胎盤における TLR5 発現を免疫染色によって比較した。羊膜において、TLR5 は HCA 群で有意に強く発現していた (Fig.1B および C)。絨毛膜においても HCA 群に強い発現がみられたが、有意差は認められなかった。脱落膜および絨毛では 2 群間に差は認められなかった。

### 【TLR5 活性化により卵膜からの IL-6 産生が増加する】

卵膜における TLR5 の強発現が IL-6、IL-8 産生と関連するかを確認するために、蛍光免疫二重染色を行った。IL-6 (Fig.2A) および IL-8 (Fig.2B) は HCA 群の羊膜・絨毛膜において TLR5 と同部位に局在しているのが認められた。

TLR1-6 の各リガンドによる刺激が IL-6 および IL-8 産生を増加させるか確認するために、卵膜組織培養を実施した。TLR1/2、TLR4、TLR5 及び TLR2/6 の各リガンドで刺激した卵膜では IL-6 産生が著明に増加した (Fig.3A)。TLR3 リガンド、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  による刺激では IL-6 産生は増加しなかった。IL-8 濃度は各リガンドによる刺激後も有意な上昇を認めなかった。

## 【考察】

本研究は早産・HCA の羊膜において TLR5 発現が有意に増加することを示した初の研究である。TLR5 は IL-6 および IL-8 と同部位に局在していた。羊水中の IL-6、IL-8 濃度は子宮内感染や絨毛羊膜炎を反映する。本研究でフラジェリン (TLR5 リガンド) は、卵膜における IL-6 産生を有意に増加させた。

TLR5 は炎症性腸疾患や関節リウマチ、心臓線維症、肺嚢胞性繊維症に関与していることが報告されており、TLR5 の過剰発現が炎症反応を増悪させると考えられる。本研究から子宮内感染が起こると羊膜における TLR5 の発現が増強し、絨毛羊膜炎を悪化させている可能性がある。

近年の報告では、TLR の各リガンドで羊膜上皮細胞を刺激すると、TLR5 リガンドが最も IL-6 産生を増加させたという報告があった。また満期の分娩時胎盤では TLR2 と TLR5 の発現が上昇しており、胎盤組織を TLR リガンドで刺激すると TLR5 刺激が最も IL-6 産生を増加させたという報告がある。羊水中の IL-6 レベル上昇は子宮内感染や早産、HCA、さらには新生児有害事象に関連している。これらの結果から、絨

毛羊膜炎が起こると TLR5 が IL-6 産生を増加させ、早産を引き起こしたり児の予後  
を悪化させている可能性がある。

本研究ではフラジェリン刺激による IL-8 産生増加は一定の傾向はあったものの有  
意差を認めるには至らなかった。先行研究では、羊膜上皮において TLR5 刺激が IL-8  
産生を増加させることが示されている。しかし本研究では卵膜全層の IL-8 産生を計  
測しており、組織の違いが結果に影響している可能性がある。

本研究の限界としては、症例数が少ないため、TLR5 発現レベルと新生児予後との  
関連を調査する至らないことが挙げられる。

### 【結語】

本研究から TLR5 の発現が早産の絨毛羊膜炎に関連しており、TLR5 が卵膜の IL-6  
産生に関わることが示された。今回の知見は絨毛羊膜炎及び TLR5 の機能に対する  
我々の理解を進めるものである。TLR5 と絨毛羊膜炎との関係を明らかにするために  
更なる研究が必要である。