

主論文の要旨

**Possible Association between CathepsinV
and the Development of Placenta
Accreta Spectrum Disorders**

〔 カテプシンVと癒着胎盤発症との関連 〕

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

(指導：吉川 史隆 教授)

松川 哲

【緒言】

癒着胎盤(Placenta accrete spectrum disorders,以下 PAS)とは胎盤絨毛が脱落膜を介さず異常に子宮筋層に癒着・浸潤した病態である。リスク要因として子宮手術の既往、前置胎盤、子宮内膜炎の既往などが知られ、帝王切開既往歴の増加と共に PAS 発症率は増加を示す。発症メカニズムとして、子宮内膜の損傷による脱落膜の欠損部により絨毛浸潤などが推定されているが解明はされていない。また、正常胎盤形成の過程に関わる様々な分子が報告されているが、PAS 発症に関わる分子は同定されていない。

PAS は浸潤の深さに応じ楔入胎盤、嵌入胎盤、穿通胎盤に、広がりに応じ焦点、部分、全 PAS に分類されるがこの事実は PAS 発症の過程において絨毛浸潤が一様でないことを示している。

絨毛の遺伝子発現が位置、周囲の環境によって影響を受け絨毛の浸潤性の違いを引き起こすという仮説のもと、本研究では分子レベルの視点により PAS 発症のメカニズムの解明を目的とした。

【対象及び方法】

2010 年～2011 年の当院分娩例で術前に PAS を疑った症例において術中診断で PAS と診断し子宮全摘を施行した症例において全摘直後に肉眼的癒着部と非癒着部から絨毛を採取、絨毛採取部の隣接部分を同時に採取・ホルマリン固定し後日病理学的に癒着・非癒着であることを確認した。

絨毛浸潤に関連する可能性のある遺伝子をスクリーニングするため全遺伝子を対象に CodeLink Human Whole Genome Bioarray を用いマイクロアレイを施行、3 倍以上の発現亢進がみられた遺伝子から Microarray Data Analysis Tool を用い Gene ontology にて絨毛浸潤に関連する遺伝子を抽出した。これら遺伝子の mRNA 発現を 3 症例の PAS から抽出した total RNA から realtime RT-PCR で検討した。非癒着部に対し癒着部における遺伝子の相対的 mRNA 発現量を定量した。検定には Wilcoxon signed-rank test を用いた。

2003～2013 年の間に当院で病理学的に診断された 26 症例の PAS のうち、妊娠第 3 半期の分娩例、パラフィン切片に絨毛の癒着部・非癒着部をともに有する例を選択、動脈塞栓術・メトトレキサート使用例・帝王切開同日以外での子宮摘出例・胎児異常例を除外し、10 症例を対象に免疫組織染色を行い遺伝子の発現を検討した。サイトケラチン 7(CK7)は VT、EVT、ビメンチン(VIM)は脱落膜細胞のマーカーである。染色強度をスコアリングして比較した。H スコア= $\sum P(i) \times i$ 、 i は強度(0～3)を、 $P(i)$ は細胞数(0～100)を表し、染色強度は 0 陰性、1 弱陽性、2 中等度陽性、3 強陽性とし最大 H スコアは 300 と定義した。

H スコアは Wilcoxon (matched-pairs) signed-rank test 検定を用い比較検討した。

【結果】

PAS の非癒着部と比較し癒着部から採取された絨毛組織においてマイクロアレイで

3倍以上の発現亢進がみられた遺伝子は157あった。Gene ontology解析にて浸潤に関与するADAM28、カテプシンV(CTSV)、カテプシンS(CTSS)、MMP19の4遺伝子を抽出した(Table1,2. Case4)。

これら遺伝子のmRNA発現をマイクロアレイを行った症例であるCase4を含んだ3症例においてrealtime RT-PCRにて確認したところCase8におけるADAM28m以外すべて1倍以上の発現亢進が確認されマイクロアレイの結果を裏付けた(Fig.1)。

免疫組織染色によるCTSV発現を示す(Fig.2)。

絨毛外栄養膜細胞(Extra-villous trophoblast、以下EVT)では癒着部において中程度から高度の陽性を認めたのに対し非癒着部では弱陽性～陰性であった。Hスコアにて癒着部と非癒着部を比較すると中央値184.8(56.4-179.9)vs115.6(37.6-153.6)であり癒着部で有意に高かった(P=0.017)(Fig.5)。絨毛栄養膜細胞(Villous trophoblast、以下VT)においては癒着部で弱陽性、非癒着部では弱陽性～陰性であった。Hスコアは癒着部と非癒着部の比較で中央値112(56.6-179.9)vs80.0(37.4-150.9)で有意差を認めなかった(P=0.059)。

Fig3は蛍光免疫染色を示す。非癒着部は脱落膜層内にあるEVTではCTSVの発現は弱陽性～陰性だった。癒着部ではCTSVの強発現が、子宮筋層を浸潤しているEVTにおけるCK7の発現と一致して検出された。

免疫染色においてADAM28とCTSSは、EVT、VTとも陰性あるいは弱い発現のみであった。

MMP19はEVTでは中～高度陽性、VTは弱～中度陽性であった(Fig.4)。

ADAM28,CTSS,MMP19いずれにおいても癒着部と非癒着部の間で染色レベルに差は見られなかった。

【考察】

この研究は妊娠後期のPAS摘出子宮標本を用い、(1)VT、EVTともにCTSV、MMP19を発現すること、(2)CTSVについてはEVTでの発現が癒着部では非癒着部より有意に亢進することを示した。

正常の胎盤形成過程において、MMP、カテプシンなどのプロテアーゼが、細胞外マトリックス成分を分解し絨毛の脱落膜への浸潤を促進することが報告されている。疾病との関連では、絨毛の低浸潤による胎盤形成不全が発症原因とされる妊娠高血圧腎症において正常群よりカテプシンF,L,V発現が低下することが報告されている。

本研究では同一PAS症例内での癒着部位と非癒着部位の比較によりEVTにおけるCTSV発現が亢進することを示した。これはEVTでの遺伝子発現が脱落膜の有無など周囲の環境によって影響を受け絨毛の局所的な浸潤性の違いを引き起こしPAS発症に関与している可能性があることを示している。

この研究はまたVT、EVTでのMMP19発現を示した。MMP19が肺癌、卵巣癌の発症との関連性が示唆されているが、胎盤におけるMMP19の関係や発現についての研究は検討されていない。絨毛におけるMMP19発現を示した初めての報告になるが、

癒着部と非癒着部、VT、EVT での発現・分布に差は見られずその機能は不明である。

【結論】

妊娠後期の VT、EVT において CTSV、MMP19 が発現することを初めて示した。

癒着部分での EVT において CTSV 発現が亢進し PAS 発症に関与する可能性がある。