

学位授与番号：甲 1 0 1 9 号

氏 名：伊藤 由紀

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 28 年 4 月 27 日

学位論文名：

Increased expression of perforin,granzyme B,and C5b-9 in villitis of unknown etiology

学位論文名（翻訳）：

Villitis of unknown etiology における perforin/granzyme pathway・C5b-9 を介した絨毛障害機序

学位審査委員長：教授 大橋十也

学位審査委員：教授 岩楯公晴 教授 井田博幸

# 論文要旨

論文提出者名	伊藤 由紀	指導教授名	岡本 愛光
--------	-------	-------	-------

主論文：

Increased expression of perforin, granzyme B, and C5b-9 in villitis of unknown etiology (慢性絨毛炎では perforin、granzymeB、C5b-9 の発現が亢進する)

Ito Yuki, Matsuoka Kentaro, Uesato Tadahide, Sago Haruhiko, Okamoto Aikou, Nakazawa Atsuko, Hata Kenichiro

Placenta、2015;36(5):531-537

## 1. 目的

Villitis of unknown etiology (VUE) は既知の感染症を認めず、絨毛にリンパ球浸潤を認める病態である。VUE は胎児・胎盤発育不全の誘引となる重要な病態だが、VUE 胎盤における絨毛細胞障害機序は不明な点が多い。VUE 胎盤における絨毛内細胞アポトーシス機序を明らかにするとともに、VUE 胎盤における絨毛内マクロファージの役割を明らかにする。

## 2. 方法

VUE 胎盤 (n=6) と control 胎盤 (n=3) を用いて、抗 CD3、CD4、CD8、CD56、CD68、CD163、perforin、granzyme B、granzyme K、C5b-9 抗体による免疫組織学的検討を行った。さらに TUNEL 法によりアポトーシス細胞を確認した。VUE 胎盤の炎症部・VUE 胎盤の非炎症部・control 胎盤で陽性細胞の割合、C5b-9 の陽性面積、apoptosis index を比較した。また、M2 マクロファージの割合を検証するために、CD163/CD68 比を算出した。

## 3. 結果

VUE 胎盤の炎症部では非炎症部や control 胎盤と比較して抗 CD3、CD4、CD8、CD68、CD163 抗体陽性細胞の割合が有意に高値だった ( $p < .05$ )。VUE 胎盤の炎症部では抗 perforin 抗体と抗 granzyme B 抗体陽性細胞の割合が有意に高値だった ( $p < .05$ )。VUE の炎症部では絨毛内の C5b-9 陽性面積が有意に高かった ( $p < .05$ )。Apoptosis index は VUE 胎盤の炎症部で有意に増加していた ( $p < .05$ )。VUE 胎盤の非炎症部は control 胎盤と比較して有意に絨毛内の CD163/CD68 比が低値だった ( $p < .05$ )。VUE 胎盤の炎症部では非炎症部と比較して有意に絨毛内の CD163/CD68 比が高値だった ( $p < .05$ )。

## 4. 結論

VUE 胎盤では絨毛内細胞のアポトーシスが増加していることが示された。アポトーシスの機序としては、perforin-granzyme pathway と C5b-9 の活性化が考えられた。また、VUE 胎盤の炎症部で M2 マクロファージが抗炎症に作用し、アポトーシス細胞を貪食している可能性が示された。さらに、VUE を起こす胎盤は CD163/CD68 比が低いために、母体由来炎症細胞の流入や組織破壊に対する防御機能が低い可能性が考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

伊藤由紀氏の学位申請論文は主論文 1 編、参考論文 1 編からなり、主論文のタイトルは「Increased expression of perforin, granzyme B, and C5b-9 in villitis of unknown etiology」、日本語では「慢性絨毛炎では perforin、granzyme B、C5b-9 の発現が亢進する」と題され、2015 年に Placenta 誌に発表された。同誌のインパクトファクターは 2014 年で 2.710 である。以下、学位申請論文の要旨と審査委員会における審査結果を記載する。

Villitis of unknown etiology (VUE) は既知の感染症を認めず、絨毛にリンパ球浸潤を認める病態である。VUE は胎児・胎盤発育不全の誘引となる重要な病態だが、VUE 胎盤における絨毛細胞障害機序は不明な点が多い。伊藤氏は VUE 胎盤における絨毛内細胞アポトーシス機序を明らかにするとともに、VUE 胎盤における絨毛内マクロファージの役割を明らかにする目的で伊藤氏は以下の研究を行った。

VUE 胎盤 (n=6) と control 胎盤 (n=3) を用いて、抗 CD3、CD4、CD8、CD56、CD68、CD163、perforin、granzyme B、granzyme K、C5b-9 抗体による免疫組織学的検討を行った。さらに TUNEL 法によりアポトーシス細胞を確認した。VUE 胎盤の炎症部・VUE 胎盤の非炎症部・control 胎盤で陽性細胞の割合、C5b-9 の陽性面積、apoptosis index を比較した。また、M2 マクロファージの割合を検証するために、CD163/CD68 比を算出した。

結果として以下の事を明らかにした。(1) VUE 胎盤の炎症部では非炎症部や control 胎盤と比較して抗 CD3、CD4、CD8、CD68、CD163 抗体陽性細胞の割合が有意に高値であった ( $p < .05$ )。 (2) VUE 胎盤の炎症部では抗 perforin 抗体と抗 granzyme B 抗体陽性細胞の割合が有意に高値であった ( $p < .05$ )。 (3) VUE の炎症部では絨毛内の C5b-9 陽性面積が有意に高値であった ( $p < .05$ )。

(4) Apoptosis index は VUE 胎盤の炎症部で有意に増加していた ( $p < .05$ )。 (5) VUE 胎盤の非炎症部は control 胎盤と比較して有意に絨毛内の CD163/CD68 比が低値であった ( $p < .05$ )。

(6) VUE 胎盤の炎症部では非炎症部と比較して有意に絨毛内の CD163/CD68 比が高値であった ( $p < .05$ )。

以上より、伊藤氏は、VUE 胎盤では絨毛内細胞のアポトーシスが増加していることが示され、アポトーシスの機序としては、perforin-granzyme pathway と C5b-9 の活性化が考えられると結論した。また、VUE 胎盤の炎症部で M2 マクロファージが抗炎症に作用し、アポトーシス細胞を貪食している可能性、さらに、VUE を起こす胎盤は CD163/CD68 比が低いために、母体由来炎症細胞の流入や組織破壊に対する防御機能が低い可能性を明らかにした。

平成 28 年 4 月 6 日、岩楯公晴、井田博幸両審査委員出席のもとに公開学位審査会を開催し、伊藤氏による研究概要の発表に続いて、口頭試験を実施した。試験では以下のような質問があった。

1. 成育医療研究センターでの胎盤の管理方法は？
2. 胎盤の切り出しは誰がしたのか？
3. 既存試料のインフォームドコンセントはどの様にとったのか？
4. VUE+、VUE-、FGR+、FGR-のグループがあり組み合わせとしては 4 通りあり、全ての組み合わせを比較する必要はないのか？
5. FGR- に関する検討がないが、FGR+ に絞って検討した理由は何か？
6. 病理学的検討を 4 箇所しているが、4 箇所行った根拠は何か？
7. 対象グループで出生体重、胎盤重量の標準偏差が大きい理由は何か？
8. FGR+ 群、一群で統計学的有意差がありそうだが、用いた統計手法は何か？同様に villous fibrosis は統計学的有意差はなさそうだが、これも用いた統計学的手法は何か？
9. VUE を認めた胎盤は 40 例があるが、病理学的に検討したのは 6 例だけと少数である。理由は何か？
10. アポトーシスに関連した解析は TUNEL 法のみだが、アポトーシス関連分子の検討は

行ったか？

11. 今回の研究結果を踏まえて、VUE の治療法としては何が考えられるか？
12. 最近本邦で FGR が増加している理由は何か？
13. 胎盤に進入している T 細胞は母由来のものがあると述べたが、児由来の T 細胞との比率はどうか？
14. CD4 陽性 T 細胞の胎盤への侵入はないのか？
15. 今回の結果からでは VUE が母子免疫寛容の破綻とは結論できないのではないか？

上記質問に対して伊藤氏は適切に回答した。

その後、岩楯、井田両教授と慎重に審議した結果、今回の研究は VUE の発生機序を免疫学的側面より明らかにした重要な研究であり、学位を授与するに値する研究であると結論した。