

**P-199** ヒト羊水および尿由来 Urinary Trypsin Inhibitor (UTI) による子宮収縮抑制機序の解明

浜松医大

内田季之, 小林 浩, 平嶋泰之, 鈴木美香, 田中賀子, 小林隆夫, 金山尚裕, 寺尾俊彦

【目的】ヒト羊水および尿由来 Urinary Trypsin Inhibitor (UTI) には子宮収縮抑制作用が認められているがその作用機序を解明するために本研究を行った。UTI はヒト子宮筋細胞膜上のリセプターに結合して作用すると考えられるため、今回ヒト子宮筋細胞より UTI リセプターの同定を試みた。【方法】1) 本研究では組織採取にあたってはすべての患者よりインフォームドコンセントを得て行った。子宮筋は12例の予定帝王切開患者より入手した(38週から41週に採取)。2) 子宮筋細胞を単離培養し実験に供した。3) UTI リセプター同定のため、放射性ラベルした UTI を作成し、培養子宮筋細胞による結合実験、阻害実験、クロスリンク実験を行った。また、UTI のリコンビナント蛋白作成および蛋白分解酵素による限定分解により UTI フラグメント蛋白質を作成し、結合、阻害実験に使用した。4) UTI 結合カラムを作成し、培養子宮筋細胞膜分画を流して UTI に特異的に結合する蛋白質を同定した。【成績】1) 妊娠子宮筋細胞膜には親和性の異なる2種類の UTI リセプターが存在し、高親和性の Kd 値は9.1 nM で細胞膜に35,000存在した。一方、低親和性の Kd 値は350 nM で細胞膜に450,000存在した。UTI リセプターの候補としてヒアルロン酸に結合するリンク蛋白が UTI リセプターの一つとして同定された。また、UTI がリセプターに結合するためには UTI の N 末端とコンドロイチン4硫酸糖鎖が重要であった。【結論】UTI による子宮筋収縮抑制作用は UTI の持つ蛋白分解酵素活性が作用するのではなく UTI の N 末端とコンドロイチン4硫酸糖鎖を介して子宮筋細胞膜に結合し、細胞表面のカルシウムを特異的にキレートしている可能性が示唆された。

**P-200** 培養ヒト子宮頸部線維芽細胞における CD44mRNA の発現に及ぼす IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  の影響について—real-time quantitative RT-PCR 法を用いた検討—

秋田大

細谷直子, 小川正樹, 小原幹隆, 田中俊誠

【目的】CD44はリンパ球活性化に関与する細胞膜貫通型の糖蛋白であり、ヒアルロン酸 (HA) の受容体であると考えられている。子宮頸部組織を用いた免疫組織染色により、子宮頸管熟化時に CD44 の染色性が亢進することが報告されてる。しかし、子宮頸管熟化における CD44 発現の調節機構に関しては、不明な点が多い。本研究では、子宮頸管熟化時の CD44 発現の調節機構を明らかにする目的で、培養ヒト子宮頸部線維芽細胞における CD44mRNA の発現に及ぼす各種炎症性サイトカインの影響を検討した。【方法】当院の倫理規定に従い informed consent を得た後、子宮全摘術を施行した患者の子宮頸部組織由来の線維芽細胞を培養した。数回の継代の後、各種濃度のサイトカイン (IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ ) を添加した。6時間後の検体中の CD44mRNA 発現を、real-time quantitative RT-PCR 法 (ABI PRISM 7700 Sequence Detector) を用いて検討した。【成績】培養ヒト子宮頸部線維芽細胞における CD44mRNA 発現は、(1) IL-1 $\beta$  (1~1000pg/ml) および TNF- $\alpha$  (1~1000pg/ml) 添加により濃度依存的に増加し ( $p < 0.05$ )、(2) IL-8 (1~100ng/ml) 添加により変化しなかった。【結論】(1) ヒト子宮頸部線維芽細胞において CD44mRNA が発現していること、(2) この発現は、IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  により増強すること、(3) IL-8 は CD44 mRNA 発現に直接的に影響しないこと、が示された。以上より、熟化時の子宮頸管における CD44 発現は、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  などのサイトカインにより調節されることが示唆された。

**P-201** 陣痛発来に関与する corticotropin-releasing hormone (CRH) およびそのリセプターの子宮筋における発現調節とその生理活性作用

浜松医大

藤城 卓, 小林 浩, 高田佳代子, 鈴木留美, 松山 薫, 小林隆夫, 金山尚裕, 寺尾俊彦

【目的】Corticotropin-releasing hormone (CRH) は本来脳に存在する神経ペプチドであるが、胎盤にも存在し、陣痛発来に関与している。今回、我々はヒト子宮筋における CRH、そのレセプターである CRH receptor type-1 (CRH-R1) および CRF-R2 の局在を免疫組織染色により検討すると共に CRF-R1 の生理作用をヒト子宮筋細胞培養系で確認した。また、陣痛発来前後における変化も比較した。【方法】本研究では組織採取にあたってはすべての患者よりインフォームドコンセントを得て行った。陣痛発来前の子宮筋は7例の予定帝王切開患者より、また陣痛発来後の組織は緊急帝王切開患者5例から入手した(38週から41週に採取)。CRH, CRH-R1, CRH-R2 に対するポリクロナル抗体は各々の合成ペプチドに対する抗家兎抗体を独自に作成した。凍結切片組織を用い、間接酵素抗体法により免疫組織染色を行った。妊娠子宮筋細胞より調整した膜分画に対する CRH の親和性を CRH 関連ペプチドを用いた阻害実験により解析した。また、妊娠子宮筋培養細胞におけるカルシウム流入が CRH で起こるかどうかが CRH-R1 特異的拮抗物質 CRA1000 を用いて検討した。【成績】各種ペプチドによる阻害実験から妊娠子宮筋には CRH-R1 特異的レセプターが確認された。陣痛発来後の子宮筋にのみ CRH-R1 が強発現し、CRH-R2 の発現は陣痛発来前後とも微量であった。CRH によるカルシウム流入は CRA1000 により完全に抑制された。【結論】CRH は細胞内 cAMP の増加をきたし子宮筋の弛緩に働くことが知られている。陣痛発来後のヒト子宮筋細胞には生理活性を有する CRH-R1 が特異的に強発現するため、CRH は下部子宮筋の弛緩、頸管開大に関与していることが推定された。