

学位論文審査結果の要旨

氏名	甲谷 秀子
審査委員	主査 雑賀 隆史
	副査 山下 政克
	副査 阿部 雅則
	副査 村上 正基
	副査 越智 史博

論文名 膣内細菌環境におけるヒト β -デフェンシン2の重要性について
審査結果の要旨

膣細菌叢は女性生殖器における最初の防御機構であり、特に乳酸桿菌は重要な役割を担うことが知られている。以前より、細菌性膣炎の臨床診断には Nugent score (NS) が広く使われているが、必ずしも症状や程度を正確に反映するとは言えないことから、細菌性膣炎の診断への新しいアプローチが求められている。HBD1 は上皮細胞で恒常的に発現しているが、HBD2・3 は。本研究では膣内環境を評価するための生化学的マーカーとして、NS と主要な抗菌ペプチドのうち、膣上皮に発現し微生物の感染や炎症反応によって誘導されるヒト β -defensin (HBD) 2 を女性 98 人で測定し、種々の微生物感染との関連性について検討した。この研究は愛媛大学医学部臨床研究倫理審査委員会によって承認されている (No. 1206212)。

適切な方法をもちいて臨床検体の NS 評価、膣 HBD2・IL-6 濃度測定、膣洗浄液の t-RFLP および PCR による微生物解析を行った。さらに HBD2 とカンジダの関連性を検討するため、ヒト膣上皮細胞株 (VK2/E6E7) を培養し、カンジダ抗原刺激と HBD2 濃度の変化について ELISA 法によって測定した。さらにカンジダによる HBD2 刺激には Dectin-1 受容体が関与することが知られていることから Dectin-1 の受容体発現解析をおこなった。

<結果> NS の増加にともなって HBD2 が低値をとる傾向があったが統計学的に有意ではなかったが、膣分泌液中に lactobacillus が存在すると HBD2 濃度は有意に高値を示した ($p < 0.01$)。IL-6 については有意な変化を認めなかった。t-RFLP および PCR による微生物解析では発現バンド数と NS との間に高い相関を示した (kappa 係数 0.76)。さらに Candida の存在下で HBD2 は有意に高い濃度を示し、Candida 陽性例に対して治療を行うと HBD2 濃度は治療前に比べ有

意に低下した。培養腔上皮細胞を HKCA (heat-killed *Candida albicans*) で刺激することで HBD2 濃度は有意な高値を示した。同様に HKCA 刺激によって、Dectin-2・Mincle・Mannose・Dectin-1 受容体のうち Dectin-1 mRNA 発現のみが増強され、免疫蛍光染色でも確認することができた。さらに、ルシフェラーゼアッセイにより、HKCA 存在下では NF- κ B シグナル活性の誘導を認めた。

以上のことから、HBD2 は IL-6 や NS とは無関係に *Lactobacillus* の菌数と相関することが明らかになった。一方で、NS と t-RFLP が強い相関を示したことから NS は実際の細菌全体を反映するが、HBD2 は *Lactobacillus* の増加を強く反映する。また、HBD2 は腔内の *Candida* 存在下で増加するが、今回検討を行った他の微生物の影響を受けないことを示した。本研究において腔内の *Candida* 陽性例の 69% は NS 正常であったように、*Candida* は *Lactobacillus* と共存し、HBD2 はこれら二つの因子の影響を腔分泌液中で受けていると考えられた。真菌は Toll 受容体や C 型レクチン受容体などのパターン認識受容体を介して認識され、Dectin-1 および Dectin-2 は、上皮細胞（肺上皮細胞、角膜上皮細胞、腸上皮細胞など）に発現していると報告されているが、今回初めて腔上皮細胞での Dectin-1 の発現を証明した。また、HBD2 は腔上皮細胞を *Candida* で刺激することによってその産生が有意に増加することを示した。また、その signaling pathway には NF- κ B が重要な役割を果たしていることが考えられた。これらの結果から、HBD2 は腔内の微生物による感染を防御する重要な因子であると考えられた。

公開審査会は、令和 2 年 11 月 9 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表した後に、審査員から本研究に関する以下のように

- ・被検者の年齢や Estrogen 量と HBD2 発現の関連性について
- ・抗菌剤投与と腔環境、細菌叢の関連について
- ・細菌性腔炎と IL6 の関連に注目した根拠
- ・Dectin-1 と一般的感染症の関連について
- ・HBD2 を誘導させることの臨床応用について
- ・HBD3 と腔炎症、腔内環境との関連性についての解析予定について
- ・培養液組成など *in vitro* の実験デザインについて
- ・妊娠状態と細菌性腔炎における HBD2 の発現量の違いに対する解釈
- ・他臓器炎症における HBD2 の役割について
- ・乳酸桿菌と抗菌作用、局所免疫のメカニズムについて
- ・妊娠状態とサイトカインの関連についてなど多数の質問がなされた。

これらの質問に対し申請者は的確に応答した。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。