

子宮内膜症が種々の機序で妊孕性を低下させていることが判明し、同時に、子宮内膜症を治癒させるべく種々に介入していくことが、妊娠率向上に大きく寄与することが示唆されている。本年度は昨年に引き続き、子宮内膜症発症の基礎的な機序を研究するとともに、新たな薬物療法に向けての研究を行った。また、これとは別にヒト卵胞発育の機序の解明を目指した研究も施行しているため、それについても報告する。具体的に以下の項目について検討した。

(1) メトフォルミンの子宮内膜症細胞に与える影響についての検討。子宮内膜症細胞において細胞内シグナル伝達物質であるAMPKの活性化は抗炎症、抗増殖、などの効果を発揮する可能性が示唆されている。昨年度の実験で、AMPKを活性化するメトフォルミンが子宮内膜症細胞で、培養上清中のIL-8産生、細胞内でのaromataseの遺伝子発現および活性、さらに、細胞増殖能を濃度依存性に抑制することを示した。メトフォルミンは実際に古くより比較的安全性の高い糖尿病治療薬として用いられるとともに、婦人科では多嚢胞性卵巣症候群(PCO)の治療薬としても用いられるようになってきている。そのため、今回は本剤の臨床応用を考えて正所性子宮内膜に対する作用を異所性子宮内膜に対する作用と比較検討した。

(2) 子宮内膜症に対する新規治療薬ジェノゲストの子宮内膜症細胞に対する直接

作用の検討。ジェノゲストは新しいタイプの19ノルプロゲステンでプロゲステン作用とともに抗アンドロゲン作用を持つ。このため、従来のプロゲステン製剤にみられたようなアンドロゲン作用による副作用がなく、コンプライアンスの向上が期待されている。作用機序としてはプロゲステン作用としての中枢抑制を介して子宮内膜症の増殖を抑制することが考えられているが、子宮内膜症細胞に直接作用することが最近示唆されるようになってきた。このため、ここでは、培養子宮内膜間質細胞を使用して本剤の子宮内膜症への直接作用を検討した。

(3) 子宮内膜症におけるCD44の意義についての検討。CD44はヒアルロン酸に結合する膜貫通接着分子で、種々の生理・病理学的現象に関与し、近年、子宮内膜症での重要性もいわれている。このCD44には可溶性のsCD44もあるが、子宮内膜症における意義は不明な点も多い。今回の研究ではsCD44の子宮内膜症における意義を探った。

(4) 子宮内膜症におけるIL-17の意義についての検討。子宮内膜症の発症・進展に免疫が関与していることは古くから示唆されている。そのなかで、T細胞系の関与も報告されてきた。しかしながら、近年になり、Th細胞がこれまでのTh1とTh2の2元論で片付かないことが明らかとなり、大きなパラダイムシフトが強いられることとなった。すなわち、Tregの登場に引き続く、Th17の発見である。今回、

我々はTh17細胞とその主たる産生サイトカインであるIL-17の子宮内膜症における意義を明らかにしようとした。

(5) 卵胞におけるミドカインについての検討。ミドカインは血管新生作用、細胞増殖作用などを持つ成長因子のひとつで、我々は子宮内膜症に対しての作用を既に報告している。今回は、卵胞発育におけるミドカインの意義をヒト顆粒膜細胞培養系などを用いて検討した。

B. 研究方法

(1) 昨年度の研究でメトフォルミンが子宮内膜症間質細胞培養系でIL-1 β によるIL-8産生を抑制することを示していたが、今回は、正所性の子宮内膜の間質細胞と比較した。

(2) 子宮内膜症間質細胞培養系に種々の濃度のジェノゲストを添加して、BrdUの取り込みを調べた。また、フローサイトメーターをもちいて細胞周期に与える影響も同様に検討した。

(3) 子宮内膜症患者63人と非子宮内膜症患者17人の腹腔鏡手術施行時に腹腔内貯留液を採取して、遠心後に上清を保存し、sCD44濃度をELISAにより測定した。

(4) 正所性の子宮内膜、卵巣、子宮内膜症組織の切片をつくり、IL-17の免疫組織染色を施行した。子宮内膜症患者の腹腔内貯留液より、CD14ビーズをもちいてリンパ球系細胞を分離したのちに、フローサイトメーターでCD4陽性かつIL-17陽性のTh17細胞の存在を調べた。つぎに、

培養子宮内膜間質細胞を使用してIL-17のIL-8産生に対する作用、COX-2発現に対する作用などを検討した。

(5) 体外受精施行患者より卵胞液と顆粒膜細胞を採取した。卵胞液中のミドカインの存在をウエスタンブロットで調べた。また、卵胞液中のミドカイン、エストラジオール、酸素の濃度を測定した。顆粒膜細胞培養系ではミドカインのBrdU取り込みに与える作用を調べた。さらに、正常卵巣の切片を作製して、ミドカインのin situ hybridizationを施行した。

(倫理面への配慮)

研究は本施設の倫理委員会の承認をうけ、患者検体を使う場合は本人より書面によるインフォームドコンセントを得て行った。

C. 研究結果

(1) メトフォルミンは10-1000 μ Mの濃度で子宮内膜症間質細胞におけるIL-8産生を用量依存性に抑制したが、正所性子宮内膜の間質細胞ではこのような効果は認められなかった。

(2) ジェノゲストは子宮内膜症間質細胞における24時間でのBrdU取り込みを 10^{-7} Mで平均7%、 10^{-6} Mで平均16%抑制した(図1A)。48時間においても同様に抑制効果が認められた(図1B)。 10^{-6} Mのジェノゲストは24時間、48時間ともにG0/G1期の細胞を増加させる一方、S期、G2/M期の細胞を減少させた。

(3) sCD44の濃度は増殖期と分泌期では差

を認めなかった。子宮内膜症患者において腹腔内貯留液中sCD44は子宮内膜症でない患者のそれより有意に高値であった。rASRMのスコアと腹腔内貯留液中sCD44値は正の相関を認めており、臨床進行期との関係を見るとIII/IV期でI/II期より有意に高値であった(図2)。

(4) 子宮内膜症患者中にCD4陽性、CD17陽性のTh17が存在した(図3)。Th17は、正常子宮内膜に比較し子宮内膜症病変に著明に多く存在し、腺上皮の直下に多く局在していた(図4)。培養子宮内膜間質細胞においてIL-17受容体mRNA、IL-17受容体が発現していた。子宮内膜症間質細胞は1ng/ml以上のIL-17刺激により有意にIL-8の産生を亢進した(図5)。また、IL-17受容体の中和抗体は、このIL-8産生を抑制した(図6)。IL-17刺激は、1ng/ml以上で子宮内膜症間質細胞のBrdUの取り込みを有意に増加させた(図7)。

(5) ウェスタンブロットの結果、卵胞液中に約13kDのミドカインが存在することが明らかとなった。ミドカインとその受容体の遺伝子発現が顆粒膜細胞に認められた。さらに、in situ hybridizationでは顆粒膜細胞、莢膜細胞ともにミドカインを発現していることが明らかにされた。卵胞液中のミドカイン濃度は酸素濃度と負の相関を認めたが、エストラジオール濃度とは正の相関を認めた(図8)。顆粒膜細胞培養系において100ng/mlのミドカインはBrdUの取り込みを亢進させた(図9)。

D. 考察

(1) 子宮内膜症は、子宮内膜類似の組織であるが、近年の報告によるとその遺伝子発現などは正所性の子宮内膜と同じではないことが知られている。今回の検体で、メトフォルミンが通常使用される用量で得られる血中濃度において、正所性の子宮内膜に作用せず、子宮内膜症間質細胞に作用したことは感受性の違いなどを示唆するものであり、臨床的には正所性の子宮内膜に影響を与えることなく、子宮内膜症組織に抑制効果を与え、治療として成立しうる可能性を示している。

(2) ジェノゲストに関してこれまで、視床下部脳下垂体に作用して卵巣機能を抑制することにより子宮内膜症の治療を成立させることが言われてきているが、今回の研究により、子宮内膜症間質細胞に直接作用してその増殖を抑制することが示された。これまで他家により、ジェノゲストが子宮内膜症間質細胞のサイトカイン産生を抑制することが報告されているが、今回の研究は細胞増殖の抑制効果を示しており、治療における作用機序としてより直接的にメカニズムを明らかにしている。また、細胞周期の解析により、この増殖抑制にG0/G1停止機構が関与していることが示されており、近年、子宮内膜症治療を目的とした他の薬剤でもG0/G1停止機構を介しているものが報告されていることを考え合わせると、この機構は子宮内膜症治療を考える上で重要なものとなっていくことが示唆される。

(3)本研究は初めて子宮内膜症患者腹腔内貯留液中のsCD44を明らかにしたものである。これまで、子宮内膜に発現するCD44は腹膜中皮細胞のヒアルロン酸との接着を介して子宮内膜症発症に寄与すると考えられてきた。sCD44が膜型のCD44に拮抗して働くとすれば、sCD44濃度が子宮内膜症患者の腹腔内貯留液中で上昇していた原因として子宮内膜症の進行に抗する生体の防御メカニズムと考えることもできる。実際には膜型のCD44とsCD44のバランスが重要と考えられる。さらなる研究が必要であろう。

(4)本研究によって、子宮内膜症におけるTh17細胞の存在をはじめて示した。正所性子宮内膜ではIL-17産生細胞がほとんど見られず、子宮内膜症組織でIL-17細胞が上皮近傍の間質に比較的多く認められたことは、子宮内膜症上皮近傍を場として免疫応答機構が作動していることをうかがわせる。一方、子宮内膜間質細胞はIL-17受容体を発現しており、このIL-17受容体を介した作用が子宮内膜症組織で起こっていることが推測される。培養細胞での実験の結果よりIL-17は子宮内膜症でIL-8の産生を亢進させることにより炎症反応や血管新生などを惹起して、子宮内膜症の進展を促進していることが推測される。さらに、子宮内膜間質細胞の増殖を直接刺激することより増殖因子としても子宮内膜症の進展に寄与していることが示唆された。これらのことより、Th17細胞を誘導する免疫反応が子

宮内膜症病巣でおこっており、この結果として産生が増加したIL-17が子宮内膜症の進展を促進することが推測された。

(5)ミドカインは卵胞液中に存在し卵胞発育に関係していることが示唆された。酸素濃度と負の相関を示していたことは、ミドカインの血管新生因子としての作用を考えると、卵胞が低酸素状態の場合は、急速に発育する卵胞に栄養などを供給するためにミドカインを介した血管網の構築を惹起し、低酸素状態を解除すべく反応していることが考えられた。一方、エストラジオールと正の相関を示したことはミドカインが顆粒膜細胞の増殖を促進することを考え合わせると、理にかなっており、ミドカインは卵胞発育の重要な調節因子として機能していることが示唆された。

E. 結論

子宮内膜症の発症・進展機序においてはまだまだ不明な点も多いため、治療法の開発にも決定打がないのが現状である。しかしながら、我々の研究からメトフォルミンが今後の治療法の選択肢の一つとなる可能性が示された。また、ちょうど臨床応用が始まったところであるジェノゲストに関しても、その作用機序が中枢のみにとどまらず、病巣局所に作用することがわかったため、今後は局所療法も含めた治療法の拡大が期待される。また、基礎的な部分としてCD44/sCD44システムが子宮内膜症の発症機序と関連している

可能性が確認され、今後の新たな研究課題となると考えられる。一方で、近年の免疫学のブレークスルーであるTh17細胞の発見を受け、我々ははじめて子宮内膜症でTh17細胞とその産生サイトカインであるIL-17が重要な役割を果たしている多くの実験的証左を得ることができた。これまで、免疫学的なアプローチにより子宮内膜症を治療しようとする試みがあったが、有効性においてはいまひとつの感があった。この理由の1つとしてT細胞系の免疫学的理解が古典的なものであったことが考えられる。今回の結果は、パラダイムシフト後の免疫学的理解が子宮内膜症の治療戦略にも重要であることを強く示している。最後に、ミドカインの卵胞発育における意義を示したことは、不妊症治療としての戦略に本物質を位置づけることのできる可能性を示唆しているのみならず、ミドカインが子宮内膜症の進展に関与している事実を含めて考えると、子宮内膜症合併不妊においてミドカインの産生をどのように制御していけばよいかという新たな問題を提起することにもなっている。

まとめると、本年の研究は今後の子宮内膜症治療の展開に大きく寄与するとともに、同疾患を合併する多くの不妊症患者に児を得るという目的を達成するための新たな道しるべを立てることもできたと考えられる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takemura Y., Osuga Y., Yoshino O., Hasegawa A., Hirata T., Hirota Y., Nose E., Morimoto C., Harada M., Koga K., Tajima T., Yano T., Taketani Y. Metformin suppresses interleukin (IL)-1beta-induced IL-8 production, aromatase activation, and proliferation of endometriotic stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 92: 3213-3218, 2007.
- 2) Hirota Y., Osuga Y., Nose E., Koga K., Yoshino O., Hirata T., Yano T., Tsutsumi O., Sakuma S., Muramatsu T., Taketani Y. The presence of midkine and its possible implication in human ovarian follicles. *Am J Reprod Immunol.* 58: 367-373, 2007.
- 3) Hirata T., Osuga Y., Hamasaki K., Yoshino O., Ito M., Hasegawa A., Takemura Y., Hirota Y., Nose E., Morimoto C., Harada M., Koga K., Tajima T., Saito S., Yano T., Taketani Y. Interleukin (IL)-17A Stimulates IL-8 Secretion, Cyclooxygenase-2 Expression, and Cell Proliferation of Endometriotic Stromal Cells. *Endocrinology.* 149: 1260-1267, 2008.
- 4) Fu L., Osuga Y., Morimoto C., Hirata T., Hirota Y., Yano T., Taketani Y. Dienogest inhibits BrdU uptake with G(0)/G(1) arrest in cultured endometriotic stromal cells. *Fertil Steril.* (in press)
- 5) Hasegawa A., Yoshino O., Osuga Y., Hirata T., Yano T., Taketani Y. High soluble CD44 concentration in peritoneal fluid in endometriosis. *Fertil Steril.* (in press)
- 6) Osuga Y., Koga K., Hirata T., Hiroi H., Taketani Y. A case of hydrosalpinx associated with the menstrual cycle. *Fertil Steril.* (in press)

2. 学会発表

- 1) 平田哲也, 大須賀穰, 広田泰, 吉野修, 森本千恵子, 原田美由紀, 竹村由里, 長谷川亜希子, 田島敏樹, 濱崎かほり, 矢野哲, 武谷雄二. 子宮内膜間質細胞 (ESC) における Toll-like receptor (TLR) を介するサイトカイン産生能とその IFN γ による制御についての

- 検討。第59回日本産科婦人科学会
- 2) 竹村由里, 大須賀穰, 平田哲也, 広田泰, 森本千恵子, 原田美由紀, 田島敏樹, 長谷川亜希子, 甲賀かをり, 吉野修, 矢野哲, 武谷雄二。Metforminは、子宮内膜症細胞において、IL-8産生、細胞増殖、aromatase発現を抑制する。第59回日本産科婦人科学会
- 3) 長谷川亜希子, 大須賀穰, 吉野修, 広田泰, 平田哲也, 原田美由紀, 竹村由里, 田島敏樹, 濱崎かほり, 児玉亜子, 矢野哲, 武谷雄二。子宮内膜および子宮内膜症細胞における小胞体ストレスマーカーsXBP1mRNAの発現。第12回日本生殖内分泌学会
- 4) 長谷川亜希子, 大須賀穰, 平田哲也, 濱崎かほり, 廣田泰, 森本千恵子, 原田美由紀, 竹村由里, 田島敏樹, 矢野哲, 武谷雄二。子宮内膜症患者の腹腔内貯留液中における可溶性CD44についての検討。第52回日本生殖医学会
- 5) 児玉亜子, 大須賀穰, 吉野修, 濱崎かほり, 長谷川亜希子, 田島敏樹, 森本千恵子, 平田哲也, 矢野哲, 武谷雄二。ヒト子宮内膜におけるBMP7の発現および機能に関する検討。第12回日本生殖内分泌学会
- 6) 趙琳, 矢野哲, 大須賀穰, 中川俊介, 大石元, 和田修, 久具宏司, 武谷雄二。新規 GHRH(growth hormone-releasing hormone)アンタゴニストMZ-5-156のヒト子宮内膜癌細胞株に対するアポトーシス誘導効果の検討。第59回日本産科婦人科学会
- 7) Yutaka Osuga . Implication of immunological and inflammatory mediators in the development of endometriosis. The 10th Korea-Japan Joint Conference of Obstetrics and Gynecology
- 8) Yutaka Osuga. New aspects in the pathogenesis of endometriosis . International Symposium on Translational Research in Uterine Biology

なし

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

分担研究報告書

男性不妊症感受性遺伝子の集団間、霊長類種間比較

分担研究者 井ノ上 逸朗 東海大学医学部 教授

研究要旨

Okada らにより、ADP-ribosyltransferase 3 (*ART3*) 遺伝子が男性不妊症に関連する遺伝子であることが同定された。本研究では *ART3* における、ゲノムの多様性に関する理解を深めるために、アフリカ 3 集団、ユーラシア 6 集団、東アジア 2 集団 から収集した 567 人の *ART* 遺伝領域の遺伝子型を比較した。特に、男性不妊症で有意な 11 個の遺伝子多型による遺伝子型頻度の比較を行った。また日本人で対照群に多いハプロタイプ (プロテクティブハプロタイプ) の集団間における比較を行い、プロテクティブハプロタイプが、common haplotype であるかについて検討した。

一方、自然選択圧の痕跡を発見するために、*ART3* 配列の霊長類との種間比較を行い、検定を行ったが、自然選択圧は検出限界程度であった。

A. 研究目的

不妊症の原因究明に関し、女性側要因のみでなく男性側要因へのアプローチも重要である。もとより、不妊の原因として男性要因が 25%程度を占めるといわれている。

Okadaらにより、ADP-ribosyltransferase 3 (*ART3*) 遺伝子が男性不妊症に関連する遺伝子であることが同定された。

この遺伝子について、他の地域の集団で遺伝子型頻度の比較を行い、集団間で多様化している遺伝子であるかどうかについて調べることで、また、プロテクティブハプロタイプの頻度を比較することは、プロテクティブハプロタイプが common haplotype であるかどうかを判断する上

でも重要である。

また、精巣に発現する遺伝子には自然選択圧が働いているものが多い。本研究では、*ART3* が精巣に発現していることから、の霊長類間での比較を行い自然選択圧の有無について検定をすることも目的とした。

B. 研究方法

- 1) 対象 世界の 11 集団 (アフリカ 3 集団、ユーラシア 6 集団、東アジア 2 集団) から収集した 567 人のゲノム DNA。
- 2) ヒト *ART3* 遺伝子を含む 48kb にわたる領域の SNP のタイピング。データベース上のヒトのこの領域の塩基配列を基に、必要な PCR および

シーケンスプライマーを作成した。ゲノム DNA を PCR で増幅し、自動シーケンス解析装置 (ABI PRISM 3700) を用いたダイレクトシーケンス法、または、TaqMan® SNP Genotyping Assays にて、SNP のタイピングを行った。

3) 霊長類 ART3 遺伝子における自然選択圧の検討

霊長類 ART3 遺伝子のシーケンシング。

データベース上のチンパンジーのこの領域の塩基配列を基に、必要な PCR およびシーケンスプライマーを作成した。ゲノム DNA を PCR で増幅し、自動シーケンス解析装置 (ABI PRISM 3730x1) を用いたダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

東海大学医学部「医の倫理委員会」において、「精巣組織における遺伝子発現および DNA 相関解析による乏精子症の解明」の研究申請で倫理承認を受けている (2006 年 12 月 27 日付)。

ヒト DNA サンプル、については、購入元 (Coriell Institute for Medical Research) に、医学部長の承認を得たことを証明する許諾書を提出済み。

C. 研究結果

各々の集団に特異的な遺伝子頻度の変化も多数存在することが確認された。ハプロタイプ推定を、Bayesian algorithm

for phasing haplotype with PHASE v2.1 (PHASE) と、expectation-maximization (EM) algorithm で行った。アジアの集団では、プロテクティブハプロタイプが 30% 程度の頻度で、ユーラシアの集団でも 6% から 15% 程度推定された。アフリカンアメリカン集団では、PHASE による推定ではプロテクティブハプロタイプは推定されなかった。EM による推定では 3% 程度推定された。

また、対数尤度比検定で種間比較により正の選択があるかどうかについての検定を行った。その結果、正の選択が働いているというモデルが最尤であるという結果は得られなかった。

D. 考察

遺伝子型頻度が各々の集団に特異的であるため、プロテクティブハプロタイプの頻度も集団ごとに異なった。そのため、アフリカンアメリカン集団においては、推定法によってはプロテクティブハプロタイプが、5% を下回るか観測されず、common haplotype であるという結果は得られなかった。疾患感受性遺伝子の同定には世界の多様な集団を対象とした詳細なハプロタイプ解析が不可欠であると考えられる。そこで、現在の common variant、common haplotype を中心とした common disease 感受性遺伝子の同定戦略にも今後更に留意する必要があると考えられる。

E. 結論

本研究では、男性不妊症の疾患感受性遺伝子として同定された、*ART3* 遺伝子領域における世界の多様な集団における詳細な遺伝子多型の検討を行った。今後、この見地をもとにプロテクティブハプロタイプと男性不妊症の関連を効率よく進めていくことが可能であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

井ノ上 逸朗, 最新医学 2007 年 9 月号 (別冊) 臨床医工学'07 - ゲノム科学の臨床へのインパクト - 多因子病の遺伝要因をどのように考えるべきか

2. 学会発表

A. Tajima, H. Okada, M. Sekine, K. Shichiri, A. Tanaka, K. Tanaka, I. Inoue, Candidate-gene association study of non-obstructive azoospermia (NOA): *ART3* as a genetic susceptibility to NOA, ASHG meeting, 2007, October, San Diego

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

子宮内膜症を合併する不妊症患者の合理的な生殖補助医療の治療体系に関する研究—

分担研究者 柳田 薫 国際医療福祉大学臨床医学研究センター 教授

研究要旨 子宮内膜症は生殖年齢層に頻度が高いため、不妊症女性に高頻度に併発する。そして、子宮内膜症は卵管・卵巣・子宮に障害を与えることで妊孕能を低下させ、根治的治療が不可能であるため、不妊症女性に合併した場合、難度の高い治療が必要となる。一般的な不妊症例の治療法として体外受精や顕微授精は最後の砦として重要な位置にあるが、子宮内膜症ではそれらの治療成績も低下させる。よってこの研究では、論文によるエビデンスから子宮内膜症を合併する不妊症患者の合理的な生殖補助医療の治療体系を確立することを目的とする。卵管因子の子宮内膜症例では原則として腹腔鏡検査(手術)をまず行う。卵管水腫、チョコレート嚢胞を認めれば卵管再建術、チョコレート嚢胞核出術、癒着剥離術、子宮内膜症病巣に対しては焼灼を行う。手術所見により適応があれば IVF を実施する。ただしその前に少なくとも 2 ヶ月間 GnRH agonist の投与を行うことが望ましい。男性因子例および受精障害例では ICSI の適応となる。この場合は、まず腹腔鏡検査を選択することは同様である。腹腔鏡手術後に ICSI を行うが、その実施の前に GnRH agonist の投与を少なくとも 2 ヶ月間実施してから、ICSI を計画する。

●研究協力者
片寄治男 国際医療福祉大学病院リ
プロダクションセンター

A. 研究目的

子宮内膜症のおおよその頻度は生殖年齢層の女性では 10%¹⁾、開腹手術時に偶発的に発見される場合も含め 5%、不妊症の女性では 30~50%と報告されている。不妊因子を検出する通常の基礎検査で原因が同定されない場合を原因不明不妊というが、この場合、不妊原因を検索するために腹腔鏡検査を行うことがある。その場合、60%の症例に腹腔内に子宮内膜症病変が認められる。特に 25 歳から 34 歳まで

の女性においてはその受療率は人口 10 万対約 600 人と他の疾患と比べて著明に高い数値となっている。このように子宮内膜症は不妊症の大きな原因として位置づけられる。さらに、不妊症の治療には卵巣機能の活動性が重要であるが、卵巣の活動性は子宮内膜症の増悪を助長することと関連する。ここに子宮内膜症を合併する不妊症患者の治療法の選択が困難な理由の一つがある。また、子宮内膜症を合併した不妊症例では、その不妊原因のために生殖補助医療の適応となることがおおいにしてある。日本産科婦人学会の調査では IVF 症例の 8%に子宮内膜症が

では1999年から2003年の間、1739治療周期の採卵を実施したが、その5.8%に子宮内膜症を合併していた。しかし、子宮内膜症例での体外受精の成績は低下することが知られている。ここでは、子宮内膜症を合併する不妊症患者の合理的な生殖補助医療の治療体系について考察した。

B. 研究方法

検索論文によるエビデンスから子宮内膜症を合併する不妊症患者の合理的な治療指針を検討した。

C. 研究結果

1. 子宮内膜症を合併する不妊症例の生殖補助医療の適応

子宮内膜症が妊孕能に及ぼす影響としては以下の事項が考えられる。

- ① 卵管周囲間の病巣による機能低下
- ② 具体的には卵子の捕獲障害や輸送障害
- ③ 卵巣機能への影響(黄体化未破裂卵胞症候群による排卵障害や内膜症性卵巣嚢胞による卵胞発育障害)
- ④ 腹腔内の炎症に関与するサイトカインによる受精、着床障害

これらの事項以外に、免疫系の異常による場合には流産や着床不全が起こることもあると考えられる。

一方、生殖補助医療(ここでいう生殖補助医療とは体外受精(IVF)と顕微授精

(卵細胞質内精子注入、ICSI)を指す)を実施する適応となるのは卵管因子の場合と男性因子の場合である。前者は子宮内膜症のために卵管周囲癒着や卵管閉塞による。

2. 不妊を伴う子宮内膜症の治療の概要

薬物療法にはピル、ダナゾール、GnRH agonist の投与がある。排卵の抑制や子宮内膜症の諸症状の改善、そして病巣の縮小や進行の予防には有効であるが、妊孕性の回復ができるかについては困難なことが多々ある。手術療法としては、腹腔鏡手術や開腹手術による付属器の癒着剥離・卵管疎通性の回復、そしてチョコレート嚢胞の除去、腹膜病変に対するレーザーや電気凝固による治療がある。これらの手術療法は解剖学的な異常を伴う症例に対しては不妊症治療として意味がある。

3. 不妊症例の子宮内膜症治療の考え方

子宮内膜症は経時的に増悪するものである。薬物療法は子宮内膜症への直接作用もあるが、どちらかというところを進行を一時停止するもの、または再発までの時間延長するものと捉えられる。実際に、進行した子宮内膜症に対しては手術療法でさえ有効でないことが多い。したがって、手術療法は最後の手段ということではなく、手術が有効な初期の子宮内膜症に積極的に実施するものと考えられる。したがって、積極的に腹腔鏡による診断・治療のための手術を行うべきと考えられる。

卵巣予備能が保たれている患者であれば、待機的に治療を行う。経時的に子宮内膜症は増悪するので、テンポよく治療を計画する。初めはタイミング法を行うが、4-5 周期で妊娠に至らなければ調節卵周期を併用した人工授精(AIH)を実施する³⁾。それでも妊娠に至らなければ、腹腔鏡手術にて病巣の確認を行い、卵管機能を評価する。チョコレート嚢胞が存在すれば核出を、内膜症の腹膜病変があれば焼灼術を、卵管周囲などに癒着があれば癒着剥離術を実施する。腹腔鏡検査で、卵管因子例と評価されたならば IVF の適応とする。

以下、子宮内膜症に関して、卵巣子宮内膜症性嚢胞の IVF に及ぼす影響、IVF を実施する前の薬物治療の影響、卵巣刺激プロトコールへの影響、腹腔鏡検査(手術)が IVF に及ぼす影響、卵・胚の質への影響についての現在のエビデンスを述べる。

4. 卵巣子宮内膜症性嚢胞(endometrioma)について

卵巣子宮内膜症性嚢胞の妊孕能への影響としては、以下の事項がある。

- 卵管のピックアップ障害
- 卵巣実質の血流障害による卵胞、排卵への障害
- 産生されるサイトカインによる配偶子、胚への障害

また、注意すべきは悪性変化が報告されていることである。卵巣子宮内膜症性嚢

胞の 1%に癌化が起こる。嚢胞のサイズが大きくなるとそのリスクが増加し、直径が 6cm 以上ではハイリスクと考える。また、40 歳以上では 4cm 以上をハイリスクとする⁴⁾。

手術としての核出術後の問題点は卵巣周囲の再癒着、卵巣予備能の低下、卵巣刺激への低反応がある。

5. IVF を実施する前の薬物治療の影響について

子宮内膜症の不妊症例が IVF/ICSI を受ける場合の IVF の成績は不良で、卵管因子例と比較しても妊娠率が低値である。そこで、IVF/ICSI の実施前に GnRH agonist を投与して、子宮内膜症を治療することが IVF/ICSI の成績向上に寄与するのではないかと考えられている。Marano らも IVF 実施前に GnRH agonist を 2 ヶ月から 3 ヶ月間投与して下垂体の down regulation を行うと、その後の IVF の成績が良好となったと報告した⁵⁾。特に 2 ヶ月間の投与は 3 ヶ月間の投与より良好であった。採取された卵子の数や良好胚数も 2 ヶ月間の投与群がもっとも良好であった⁵⁾。Cochrane Library の報告によれば、3 つの RCT について検討が加えられ、GnRH agonist による 3 ヶ月から 6 ヶ月間の前治療を行った群が、臨床的妊娠率、生産率が有意に高いと評価された⁶⁾。

6. 卵巣刺激プロトコールへの影響について

Yanushpolsky らは 45 例のチョコレート嚢胞を持った IVF 例(コントロールは

57 例)について検討し、チョコレート嚢胞が存在すると、採卵数、媒精後 48 時間での 4 細胞期胚数が少なくなり、また初期流産が増える(47% VS 14%)ことを報告した⁷⁾。これらの影響は腫瘤としての物理的な影響も考えられるが、疾患としての子宮内膜症そのものの影響も考えなければならぬ。Kumbak らは単純性卵巣嚢腫(直径が 1cm から 3.5cm)を合併した IVF 例と子宮内膜症性卵巣嚢胞(直径が 1cm から 5cm)を認める IVF 例の成績を比較した⁸⁾。投与ゴナドトロピン量は子宮内膜症性嚢胞群の方が有意に多かった(約 20%増)。採取卵数は子宮内膜症性嚢胞群の方が有意に少なかったが(13.9 vs. 16.4)、卵子の成熟率は同じであった。単純性卵巣嚢腫群で良好胚獲得率が有意に高く、着床率も有意に高値であった(28% vs. 19%)。子宮内膜症性卵巣嚢胞の存在は、妊娠率まで観察すると差がないが、胚の質の低下を招き、着床率も低下する⁸⁾。

子宮内膜症は IVF の結果に影響を与えないが、卵巣刺激法でより多くのゴナドトロピンを必要とする。また、IV 期の子宮内膜症では採卵数が少なくなる⁹⁾。

手術療法の既往がある重症子宮内膜症例での卵巣刺激法では、反応の低下が認められる。しかし、受精率、卵割率、着床率、分娩率については有意差を認めなかった。卵巣の予備能は低下するが、胚の質や着床能は保たれていることを示している¹⁰⁾。

7. 腹腔鏡検査(手術)について

腹腔鏡検査は子宮内膜症治療の gold standard と考えられている。また、子宮内膜症を合併している不妊症例は体外受精を受けることもある。腹腔鏡手術を体外受精の前に行ったときの体外受精の成績への影響を検討した Coccia らは 107 例の体外受精を行う前に子宮内膜症の診断で腹腔鏡手術を受けた例について調査を行った¹¹⁾。腹腔鏡後に IVF を行った例での妊娠率は 56.1%で、腹腔鏡手術だけの場合の 37.4%と比較して有意に高い妊娠率であった。腹腔鏡手術後の 6 ヶ月間の妊娠率は 23.2%であり、6 ヶ月以後での妊娠率と比べると有意に高値であった。また、35 歳以上の例では、それ未満の例より有意に低値となった。したがって、子宮内膜症例では腹腔鏡手術後に IVF を行う場合がもっとも妊娠率が高い。腹腔鏡手術後に妊娠が得られなければ、最長 1 年以内に IVF を計画すべきと思われる¹¹⁾。

Nakagawa らは子宮内膜症性卵巣嚢胞の腹腔鏡下核出術を行った症例について、術後 12 ヶ月まで妊娠の有無を観察した¹²⁾。術後に IVF を実施した場合の妊娠率は 50.0%、IVF が不要と判断され通常の不妊治療を行った場合の妊娠率は 60.9%であった。これらは、腹腔鏡を行っていない IVF 例(コントロール)の妊娠率(41.4%)と比べるといずれも有意に高値であった。したがって、IVF の前に行う腹腔鏡検査は治療方針の決定に役立つのみならず、

妊娠に適した骨盤内環境の改善にも有益であることがわかった¹²⁾。

8) 卵の質への影響

子宮内膜症を有する女性から採取される卵子の質は不良であることも報告されているが¹³⁾、卵子の質には影響がないとの報告もあり一定の見解に達していない¹⁴⁾。子宮内膜症例では腹水が貯留し病巣から産生された cytokine が含まれる、あるいは蓄積されており、interleukin-1 β 、interleukin-6、interleukin-8、TNF alpha などについてその影響が調査されているが、子宮内膜症例でそれらの cytokine が卵子や受精、胚の初期発生に悪影響を及ぼしているとの明らかな結果を得るに至っていない¹⁵⁾。

Bergendal らは受精率に関しては、子宮内膜症例で有意に低値となるが、胚発生率、着床率については差を認めないことを報告した¹⁶⁾。したがって、子宮内膜症例では受精率が低下するが、受精した卵子についてはコントロールと変わらない成績となる¹⁶⁾。しかし、着床率、妊娠率の検討では子宮内膜症例はコントロール(卵管因子例、原因不明不妊例)に比べて有意に低値であった¹⁴⁾¹⁷⁾。子宮内膜症の進行期の影響については、minimal-mild と moderate-severe 例での IVF の妊娠率を比較した場合、有意の差を認めない¹⁴⁾。子宮内膜症は胚の質を低下させる。そして、着床率の低下にも関与している。しかし、egg donation を受ける子宮内膜症

例での妊娠率はコントロールと変わりなく良好である。このことは、まさしく子宮内膜症が卵子の質に影響を与えていることを示唆する。

D. 考察

以上のことをふまえて、子宮内膜症を合併する不妊症患者の合理的な生殖補助医療の治療について述べる。

まず、卵管因子例について述べる。子宮内膜症例では妊孕能が低下する。時間経過とともに子宮内膜症が増悪すること、また卵巣(卵子)が ageing することから、よりテンポの早い治療計画が必要である。子宮内膜症の低下している妊孕能は腹腔鏡検査(手術)によって改善が期待できることから、まず腹腔鏡検査を計画することが望ましい。このことによって、IVF の成績を低下させる卵管水腫の発見と対処(卵管開口術や卵管切除術)、卵巣子宮内膜症性嚢胞の発見と対処(チョコレート嚢胞核出術)が行えて合理的である。発見された卵巣子宮内膜症性嚢胞はサイズにかかわらず、腹腔鏡下の核出術を行う。腹腔鏡手術後は、IVF の適応としないのであれば、6 ヶ月間タイミング法および人工授精(AIH)を主とした治療を行う。それによって妊娠が得られない場合には、体外受精の適応とする。体外受精の適応と考えられた場合には、子宮内膜症例では卵子や胚の質の低下が起きている可能性が強いので、妊孕能向上の効果が認められている GnRHagonist の前治療

を実施することが望ましい。この場合少なくとも 2 ヶ月間(～6 ヶ月まで)の GnRHagonist の投与を行い IVF を実施する。この場合、ゴナドトロピンへの卵巢の反応性が低下しているため、投与するゴナドトロピンを増量するなど注意する(図 1)。

男性因子例および受精障害例では ICSI の適応となる。この場合は、まず腹腔鏡検査を選択することは同様である。腹腔鏡手術後に ICSI を行うが、その実施の前に GnRHagonist の投与を少なくとも 2 ヶ月間実施してから、ICSI を計画する(図 2)。

ART の適応と判断されるまでに、すでに腹腔鏡などにより 2 年以内に腹腔内所見が確認されている場合には、図 1、図 2 での腹腔鏡以後のフローチャートに従う。

以上が子宮内膜症を合併する不妊症患者の合理的な治療体系である。

E. 結論

子宮内膜症合併の不妊症女性は時間経過と共に卵子の妊孕能が低下するだけでなく、子宮内膜症も増悪し、不妊の原因として大きく関わるようになる。したがって、このような症例での生殖補助医療では無駄のない治療計画が必要であり、腹腔鏡検査(手術)の子宮内膜症の状態把握と妊孕能改善できるという利点を生かした治療戦略が必要である。また、GnRH agonist の IVF 前投与もその有効性が認め

られているので、併用すべきである。

(参考文献)

- 1) Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1997; 24:235-258.
- 2) 日本産婦人科学会・生殖内分泌委員会報告 平成 11 年度生殖医学登録報告(第 11 報). *日産婦誌* 53:665-682, 2001
- 3) 吉村泰典: 配偶子・胚提供を含む統合的生殖補助技術のシステム構築に関する研究、各種不妊原因に応じた最適な不妊治療の選択指針の確立に関する研究、平成 15 年度厚生科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)研究報告書; pp63-106, 2004.
- 4) 武内裕之、他. : 子宮内膜症、産婦人科診療 Data Book、産婦人科の実際、56:1686-1693、2007.
- 5) Ma C, Qiao J, Liu P, Chen G.: Ovarian suppression treatment prior to in vitro fertilization and embryo transfer in Chinese women with stage III or IV endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2008, 100: 167-170.
- 6) Hart R, Hickey M, Maouris P, Buckett W, Garry R. : Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomas: a Cochrane Review. *Hum Reprod.* 2005, 20:3000-3007.
- 7) Yanushpolsky EH, Best CL, Jackson KV, Clarke RN, Barbieri RL, Hornstein MD. : Effects of endometriomas on oocyte quality, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization cycles: a prospective, case-controlled study. *J Assist Reprod Genet.* 1998, 15:193-197.
- 8) Kumbak B, Kahraman S, Karlikaya G, Lacin S, Guney A. : In vitro Fertilization in Normoresponder Patients with Endometriomas: Comparison with Basal Simple Ovarian Cysts. *Gynecol Obstet Invest.* 2007, 10:65:212-216.

- 9) Al-Fadhli R, Kelly SM, Tulandi T, Tanr SL. :Effects of different stages of endometriosis on the outcome of in vitro fertilization. J Obstet Gynaecol Can. 2006, 28:888-891.
- 10) Matalliotakis IM, Cakmak H, Mahutte N, Fragouli Y, Arici A, Sakkas D. :Women with advanced-stage endometriosis and previous surgery respond less well to gonadotropin stimulation, but have similar IVF implantation and delivery rates compared with women with tubal factor infertility. Fertil Steril. 2007, 88:1568-1572.
- 11) Coccia ME, Rizzello F, Cammilli F, Bracco GL, Scarselli G. Endometriosis and infertility Surgery and ART: An integrated approach for successful management. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2008 Feb.
- 12) Nakagawa K, Ohgi S, Kojima R, Sugawara K, Ito M, Horikawa T, Irahara M, Saito H. :Impact of laparoscopic cystectomy on fecundity of infertility patients with ovarian endometrioma. J Obstet Gynaecol Res. 2007, 33:671-676.
- 13) Garrido N, Navarro J, Remohí J, Simón C, Pellicer A. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. Hum Reprod Update. 2000, 6:67-74.
- 14) Arici A, Oral E, Bukulmez O, Duleba A, Olive DL, Jones EE. The effect of endometriosis on implantation: results from the Yale University in vitro fertilization and embryo transfer program. Fertil Steril. 1996, 65:603-607.
- 15) Carlberg M, Nejaty J, Fröysa B, Guan Y, Söder O, Bergqvist A. Elevated expression of tumour necrosis factor alpha in cultured granulosa cells from women with endometriosis. Hum Reprod. 2000, 15:1250-1255.
- 16) Bergendal A, Naffah S, Nagy C, Bergqvist A, Sjöblom P, Hillensjö T. Outcome of IVF in patients with endometriosis in comparison with tubal-factor infertility. J Assist Reprod Genet. 1998, 15:530-534.
- 17) Olivennes F, Feldberg D, Liu HC, Cohen J, Moy F, Rosenwaks Z. Endometriosis: a stage by stage analysis--the role of in vitro fertilization. Fertil Steril. 1995, 64:392-398.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

(倫理面への配慮)

マウスを使用する実験であるので倫理面での配慮は動物実験を適正に行っていることに限定することができる。本研究では大阪大学に動物実験計画書を提出し、その審査を経たうえで実験を行っており、倫理的な問題をクリアしている。

C. 研究結果

本研究で用いたXY^{tdym1}雌マウスはC3H系統の雌とB6系統のコンジュニックのX^{GFP} Y^{tdym1} Sryトランスジェニックマウスから誕生させた。このXY^{tdym1}雌マウスはこれまでの報告と同様にX0型、XXY型、XYY型の性染色体の組合せを持つ仔を生み、産仔数も約半数であった (図2)。

図. 2 XX と XY^{tdym1} 雌マウスの産仔数の比較

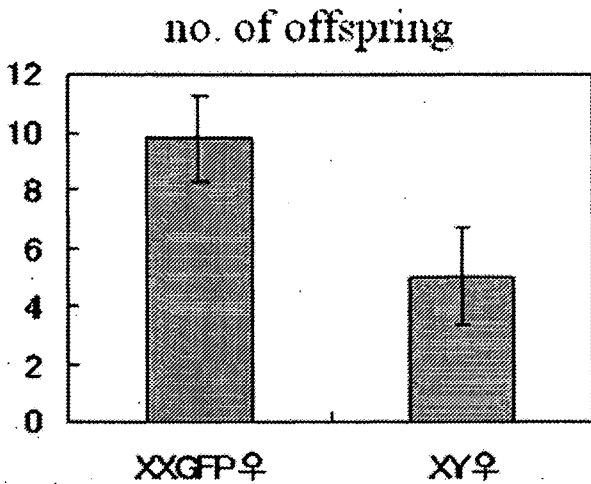
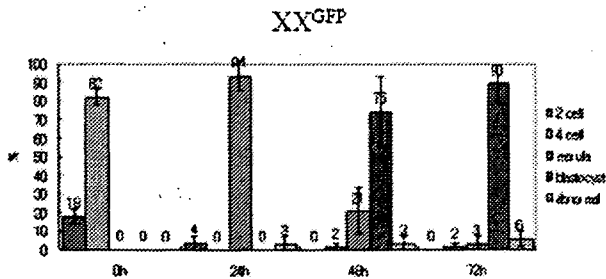
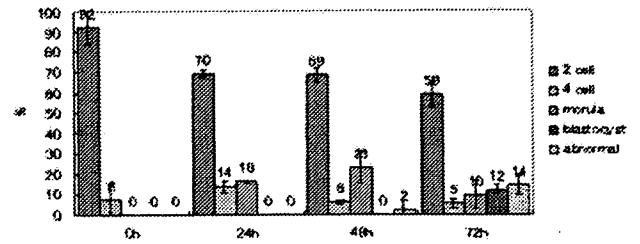


図. 3 XX と XY^{tdym1} 雌マウス由来胚の初期発生における発生率の比較



XY^{tdym1}



3週齢で過排卵処理を行った場合の排卵数はXY^{tdym1}雌とXX雌マウスで著しい違いは認められなかった。しかしながら、XX雌由来の胚では80%以上が胚盤胞になる培養条件下でXY^{tdym1}雌由来の胚は55%以上が2細胞期で発生を停止し、胚盤胞期まで発生したのは15%未満と低率になることがわかった(図3)。

D. 考察

これまで、XY^{AKR}やXY^{TIR}などY染色体以外をB6のコンジュニックにするとXY型性転換になり、雌性不妊になるという報告があるが、本研究によりXY^{tdym1}雌マウスにおける、少ない産仔数や産仔の染色体異常といった表現形は遺伝的なバックグラウンドに依存せず、より直接的に性染色体に依存していることが示された。

また、本研究ではXY^{tdym1}雌由来の胚の発生率が著しく悪いということだけでなく、その差が産仔数の差よりも大きいことが示された。このことは過排卵処理によって、強制的に成熟させたXY^{tdym1}卵子のほとんどが個体として発生する能力を有していなかったことを示唆する。このような差が真に卵子細胞質の差によるものなのか否かは、今後、核交換などの胚操作を行うことにより明らかにして行けると考えている。

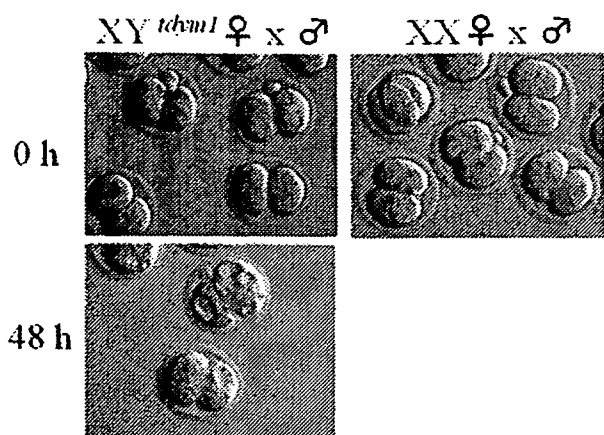
E. 結論

XY^{tdym1}雌マウス由来の卵子について、これまでの報告と同様に系統に関係なくX0型やXXY型、XYY型の産仔が得られることを確認した。また、過排卵処置をしたXY^{tdym1}卵子は受精もでき、2細胞期胚までは野生型と一見、区別できない(図4)が、ほとんどは胚盤胞にまで発生できず、卵細胞そのものの「質」は見た目だけの判断では難しいことが分かった。

今後は性染色体及び、性染色体上に位置する遺伝子が卵細胞の「質」にどのように関わってくるのかをトランスジェニックマウスの作製やXY^{tdym1}雌マウスより生まれるX0型やXXY型雌の卵子を用いた核移植等の方法によって、卵細胞質その

ものの発生・分化への影響を検討していきたい。

図.4 XY^{tdym1} 雌マウス由来胚の脆弱性



F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

T. Sato, M. Kurokawa, Y. Nakashima, T. Ida, T. Takahashi, Y. Fukue, M. Ikawa, M. Okabe, K. Kangawa and M. Kojima, Ghrelin deficiency does not influence feeding performance, **Regul Pept**, 2008, 145(1-3), (7-11)

Y. Ueda, R. Yamaguchi, M. Ikawa, M. Okabe, E. Morii, Y. Maeda and T. Kinoshita, PGAP1 knock-out mice show otocephaly and male infertility, **J Biol Chem**, 2007, 282(42),

(30373-80)

H. Umehara, T. Kimura, S. Ohtsuka, T. Nakamura, K. Kitajima, M. Ikawa, M. Okabe, H. Niwa and T. Nakano, Efficient derivation of embryonic stem cells by inhibition of glycogen synthase kinase-3, **Stem Cells**, 2007, 25(11), (2705-11)

M. Okabe and J. M. Cummins, Mechanisms of sperm-egg interactions emerging from gene-manipulated animals, **Cell Mol Life Sci**, 2007, 64(15), (1945-58)

磯谷綾子, 岡部勝, X-linked GFPマウスを用いた雌雄分別と生殖細胞の動態, **蛋白質 核酸 酵素**, 2007, 52 (16), (2060-66)

2. 学会発表

○磯谷綾子、中西友子、小林慎、李知英、中馬新一郎、中辻憲夫、石野史敏、岡部勝 第54回日本実験動物学会総会 雌雄キメラマウス用いた生殖細胞における性分化の解析 横浜(2007)

Masaru Okabe, Factors Involved in Sperm-Egg Interactions Examined by Gene-manipulated Animals. The 32nd ASA Annual Meeting Tampa, Florida, USA (2007)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

該当事項なし

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

Ⅲ 研究成果に関する一欄表