

から G への点変異 (以下 T8993G), また deletion では ATPase6 領域の 4977bp の deletion が報告されている。T8993G 点変異にはミトコンドリア病の NARP (neurogenic weakness ataxia and retinitis pigmentosa syndrome) や Leigh 脳症の疾患原因遺伝子として知られている。4977bp deletion は虚血性心疾患をはじめとする老化における様々な臓器で頻回に認められ, “common deletion” として知られている。mtDNA の Nucleotide position の 8470-8482 から 13447-13459 までの 4977 塩基の deletion である。卵巣においても加齢と mtDNA 変異の蓄積に関する検討がなされ, 加齢に伴う受精卵, 顆粒膜細胞における T8993G 点変異, 4977bp deletion の蓄積を説明している。

我々は酸化的リン酸化代謝機能に不可欠であるミトコンドリアに着目し, 妊孕性の中で受精・胚発生に関わる卵子, および卵子に強い関わりを有する顆粒膜細胞について mtDNA の量的・質的分析を介して, 妊孕性改善等に有用な基礎データを集積することを目的とした。また加齢卵子に特異的に生じる変化を卵子の大きさから検討した。

B. 研究方法

(1) 対象

2005 年 8 月から 2011 年 2 月まで当院当科で行われた IVF で廃棄される未受精卵, 分割異常胚, 顆粒膜細胞についてインフォームド・コンセントを得て検体とした。

① 未受精卵および未分割胚: ($n=29$, 31~44 歳; 受精後 48 時間で分割に至らない卵子または前核期胚)

② 顆粒膜細胞: $n=22$, 31~45 歳; 卵に付着していた顆粒膜細胞をヒアルロニダーゼ処理し, 回収した卵丘細胞

③ 変性卵: $n=9$, 33~41 歳; 7~8

cell の分割胚 ($n=4$) (36 歳) 受精後 72 時間で Veeck 分類 Grade I, III)

7~8 cell 分割胚からは割球を摘出した ($n=29$)

ICSI 時に倒立顕微鏡で撮影された受精卵 ($n=108$) について, 細胞質の長径 D , 短径 d を倒立顕微鏡を用いて測定し, 体積 ($\pi ddD \div 6$) を算出した ($\pi = 3.14$)

(2) 顆粒膜細胞, 卵子の preparation

未受精卵, 異常分割胚割球, 顆粒膜細胞それぞれ, セルバンカーに入った状態で一時凍結保存し, PBS で遠心, 洗浄した。顆粒膜細胞は PBS で遠心, 洗浄後, カウンティングチェンバー (Burker-Turk 式血球計算板) を用いて濃度計算を行った。卵子との mtDNA レベルに合わせるため, 顆粒膜細胞 100 個分を基準として用いた。サンプルを cell lysis buffer (0.2 % sarcosyl + 10mM の EDTA 添加 TE buffer) $4 \mu l$ の入ったマイクロチューブに注入し, 100 細胞/ μl となるように希釈した。これに反応液を加え $24 \mu l$ とし real-time PCR で分析を行った。

(3) 受精卵・未分割胚, 分割胚割球, 顆粒膜細胞における mtDNA 量的評価

卵子, 顆粒膜細胞の量的評価は, mtDNA を 1 細胞中に 9100 copy 含むヒトリンパ球由来の細胞株 (ATCC, 143B; bone, osteocarcinoma: CRL-8393) を PBS で洗浄した後, 顕微鏡下でカウンティングチェンバーを用いて細胞濃度を測定し, 精製水で希釈して, 各 copy 数の異なる希釈系を作成した。これらを $1 \mu l$ ずつマイクロチューブにとり, 反応液を加えて real-time PCR で増幅させた。対応するプライマーと TaqMan® 蛍光プローブを作成し, ABI PRISM 7000 を用いて TaqMan® real-time PCR を施行した。

データの解析には縦軸にサイクル数

での蛍光強度と base line での蛍光強度の差、横軸にそのサイクル数を示すグラフを作成した。このグラフの指数関数的に増幅する領域の中央に threshold line を定め、検量線を作成した。その検量線もとに顆粒膜細胞、卵子の mtDNA copy 数を定量した。

(4) mtDNA の点変異検出

T8993G 点変異 mtDNA の検出法は、45% の heteroplasmy 率をもつ Leigh 脳症保因者由来の B 細胞株を作製し、この株化リンパ球より抽出した DNA を使用し、mtDNA を単一細胞 DNA レベルの $1\text{pg}/\mu\text{l}$ に濃度調整を行い、mutation 比率が 0~100% の希釈系を作製した。対応するプライマーと TaqMan® 蛍光 Probe を作成し、real-time PCR を施行し、検量線を作成した。その検量線もとに顆粒膜細胞、卵子の T8993G 点変異 mtDNA の検出を行った。

(5) 卵細胞質体積に関する検討

卵細胞質内精子注入 (ICSI) 時に Hoffmann 微分干渉装置を用いて鏡検し、OCTAX システムで計測した。受精卵 ($n=108$, 31~47 歳) の細胞質を長径 D 、短径 d を測定し、体積 ($\pi ddD \div 6$) を算出した ($\pi=3.14$)。

C. 研究結果

(1) mtDNA copy 数と加齢に関する検体

1) 未受精卵, 未分割胚 :

卵巣において 40 歳以上で deletion が増加する報告から、40 歳未満の群と 40 歳以上群とに分け、比較した。

未受精卵・未分割胚について 40 歳未満群 (31~39 歳, $n=15$) の mt DNA copy 数は $784,307 \pm 48,379$ 、40 歳以上群 (40~44 歳, $n=14$) は $603,822 \pm 46,153$ であり、有意差 ($p=0.012$) をもって 40 歳以上群での copy 数の減少を認めた。

(表 1)

2) 顆粒膜細胞

顆粒膜細胞も加齢にて質の低下がみ

られるという報告があり、顆粒膜細胞の 100 個あたりの mtDNA copy 数を 40 歳未満の群と 40 歳以上の群の 2 群の結果は以下の通りであった。

40 歳未満 ($n=3$) 平均 \pm SE
 652745 ± 128431

40 歳以上 ($n=19$) 平均 \pm SE
 490279 ± 33297

2 群に有意差は認めないものの、40 歳以上の群で減少傾向を認めた。(表 2)

3) 変性卵

変性卵 ($n=9$) の平均は $330,513 \pm 78,002$ copy であった。未受精卵、未分割胚に比較し、著しい mtDNA copy 数の減少を認めた ($p<0.01$)。(表 3)

4) 分割胚割球

7~8 cell 分割胚割球の平均 mtDNA copy 数は $673,722 \pm 12,952$ であった。それぞれの割球の長径 D 、短径 d を倒立顕微鏡を用いて測定し、体積 ($\pi ddD \div 6$) を算出した ($\pi=3.14$)。

割球体積と mtDNA copy 数との関連性を確認したところ、強い正の相関 ($r=0.76$, $p<0.01$) を認めた。(表 4)

(2) 加齢と mtDNA の変異に関する検討

点変異の卵子における mtDNA 変異の発生状況を検討するために代表的な変異である 8993 T>G の変異を検出したが、全ての検体において T8993G 点変異は今回検出されなかった。

(3) 加齢と卵子細胞質体積に関する検討

卵子細胞質体積は 40 歳未満 (31~39 歳, $n=55$) は $305085 \pm 4329 \mu\text{m}^3$ 、40 歳以上 (40~47 歳, $n=53$) は $419263 \pm 19362 \mu\text{m}^3$ であり、40 歳以上において卵子細胞質体積は有意に大きい傾向を示した ($p<0.01$)。(表 5)

D. 考察

ミトコンドリアの機能は卵子の quality に強く関わっており、受精や

胚の成長に重要な役割を果たしているといわれている。特にミトコンドリアは、細胞内小器官としてヒトの着床前の胚の 23%を占めているといわれている。ミトコンドリアは adenosine diphosphate が adenosine triphosphate に変化させる酸化的リン酸化に重要な器官である。卵細胞内の ATP 活性の状況が着床や胚の発育の障害の原因になると考えられている。mtDNA に deletion や点変異が存在すると、free radicals clearance が低下し、mtDNA の酸化的損傷の結果である 8-hydroxyguanosine の蓄積を認める。mtDNA の酸化的損傷は呼吸鎖蛋白の合成障害を引き起こし、結果的に活性酸素の産生増大や新たな mtDNA の変異を引き起こす悪循環が生まれる原因となる。それにより細胞が障害され、着床障害の原因となると考えられている。また mtDNA が変異すると ATP の産生が低下し、減数分裂時の紡錘体の形成異常をきたし、aneuploidy の原因となり着床障害の原因となると考えられている。

また、mtDNA の変異に限らず、量的な問題も同様と考えられ、mtDNA の量が減少によって ATP の産生が低下し、着床障害の原因となることが予測される。

未受精卵、未分割胚において、mtDNA copy 数は、40 歳未満群と比較し、40 歳以上群において有意に減少を認めしたが、その原因として加齢とともに生じる mtDNA の量の減少によって ATP の産生が低下し、着床を含めた妊孕性低下の原因となると考えられる。

今回、変性卵の mtDNA copy 数が未受精卵、未分割胚と比較し、著しい減少を確認した。このことは、変性を起こしている卵においては mtDNA copy 数が低下することが示唆している。Teresa Almeida らは、変性卵は卵のミトコンドリアの欠如を表していると考えたと

述べている。卵の質の低下は mtDNA copy 数減少と関連があることが示唆された。

顆粒膜細胞も加齢にて質の低下がみられるという報告があり、顆粒膜細胞の 100 個あたりの mtDNA copy 数を 40 歳未満の群と 40 歳以上の群の 2 群間を比較したところ、有意差は認めないものの、40 歳以上の群において減少傾向を認めた。

また、顆粒膜細胞の存在は重要であり、卵胞閉鎖は顆粒膜細胞のアポトーシスが関連しているといわれている。また顆粒膜細胞のアポトーシスは卵巣予備能や IVF の結果に関連がある可能性が指摘されている。

顆粒膜細胞と卵には密接な関係があることが以前から指摘されている。未熟な卵子自身は解糖系を有していないため、卵子はグルコースを栄養源として利用できず、Gap junction を介し、卵丘細胞から送られる代謝産物にエネルギー産生を依存している。また、この Gap junction を介して、栄養源のみでなく卵子の減数分裂を第一減数分裂前期で停止させる cyclic map AMP も卵子へと供給されている。

多くの研究で顆粒膜細胞は卵子の成熟、初期胚発生に寄与し、受精率、妊娠率に影響を及ぼすことが示されているが、この事実は一連の寄与に mtDNA が関わる可能性を示唆している。

未受精卵、顆粒膜細胞における、年齢と mtDNA の変異の中で大きな、deletion との関連性について過去に報告が存在する。未受精卵では加齢により mtDNA deletion が増加し、未受精卵の mtDNA deletion は卵子の老化のマーカーとして有用であるとの報告や、顆粒膜細胞の mtDNA 4977bp deletion は 34 歳以下の群と 38 歳以上の群の 2 群間を比較したとき、38 歳以上の群に検出された報告がある。今回、我々の研究において T8993G 点変異は検出さ

れず、また、本研究での結果には示していないが common deletion での検討でも卵子から検出はされなかった。mtDNA の多様な変異の存在も考えられるが、加齢による卵子の機能低下は、主として質的变化よりも正常な mtDNA copy 数の減少が主病態であることが示唆された。加齢による卵子体積の増加は、mtDNA の減少との間で相乗的に mtDNA 密度が減少する関係にあることを示し、加齢変化に関して胚発生に及ぼすミトコンドリア機能が重要な鍵となることを示唆した。

E. 結論

今回使用した分割胚は 36 歳の同一患者の同一時期に採卵されたものであり、この度、我々は分割胚の mtDNA copy 数を計測し、割球体積と mtDNA copy 数との間に強い正の相関を認め ($r=0.76$)、有意性のある関係であることが示された ($p < 0.01$)。

そして卵細胞質体積は 40 歳以上において卵子細胞質体積は有意に大きい傾向を示した ($p < 0.01$) が、mtDNA 量は有意に減少していた。40 歳未満 (36 歳) のデータから考えれば本来体積が増加すれば mtDNA copy 数は増加することが予測されたが、実際の結果は予測に反し、40 歳以上においては、卵子細胞質体積は有意に大きい傾向を示した ($p < 0.01$) にも関わらず、mtDNA 量は有意に減少していた。従って、mtDNA copy 数減少つまり mtDNA の細胞質内の低密度化が妊孕性に影響を及ぼすという可能性が示唆された。

F. 研究発表

【学会発表】

1) 第 54 回日本生殖医学会.
村越行高, 末岡 浩, 高橋香織,
佐藤 卓, 櫻井友義, 渡邊広是,
田島博人, 佐藤健二, 中林 章,
大澤淑子, 橋場剛士, 久慈直昭,

吉村泰典: 卵子ミトコンドリア DNA copy 数が受精能・胚発生能へ与える影響. 2009. 11, 石川県.

2) 第 50 回 日本哺乳動物卵子学会.
村越行高, 末岡 浩, 佐藤 卓,
櫻井友義, 渡邊広是, 田島博人,
中林 章, 橋場剛士, 浅田弘法,
久慈直昭, 吉村泰典: 卵子, 顆粒膜細胞のミトコンドリア DNA copy 数・変異が受精能・胚発生能へ及ぼす影響. 2009. 5. 8 東京

3) 第 27 回 日本受精着床学会.
村越行高, 末岡 浩, 高橋香織,
佐藤 卓, 櫻井友義, 渡邊広是,
田島博人, 佐藤健二, 中林 章,
橋場剛士, 久慈直昭, 吉村泰典: 卵子, 顆粒膜細胞におけるミトコンドリア DNA が受精能・胚発生能へ及ぼす影響. 2009. 8. 6, 京都

4) 第 55 回日本生殖医学会総会.
櫻井友義, 末岡 浩, 高橋香織,
佐藤 卓, 佐藤健二, 渡邊広是,
大澤淑子, 橋場剛士, 吉村泰典: Whole Genome Amplification (WGA) 法による triplet repeats の診断は着床前遺伝子診断 (PGD) に適応できるか? 2010. 11. 11-12, 徳島

5) 第 143 回日本生殖医学会関東地方部会. 櫻井友義, 末岡 浩, 高橋香織,
佐藤 卓, 村越行高, 渡邊広是,
田島博人, 佐藤健二, 中林 章,
吉村泰典, 大澤淑子, 橋場剛士: DM1 (筋強直性ジストロフィー) の PGD (着床前遺伝子診断) に WGA (Whole Genome Amplification) を用いた臨床応用の可能性について. 2011. 2. 19, 東京

6) 第 63 回日本産科婦人科学会総会.
佐藤 卓, 末岡 浩, 中林 章,
高橋香織, 櫻井友義, 渡邊広是,
村越行高, 佐藤健二, 大澤淑子,
橋場剛士, 青木大輔,
吉村泰典: 次世代着床前診断に最適な全ゲノム増幅法は何か—遺伝子型に対応する新たな戦略. 2011. 8. 29-31,

大阪

7)第56回日本生殖医学会. 村越行高,
末岡 浩, 高橋香織, 佐藤 卓,
櫻井友義, 渡邊広是, 田島博人,
佐藤健二, 中林 章, 久慈直昭,
吉村泰典:年齢における卵子ミトコン
ドリア DNA copy 数の重要性. 2011.
12. 8-9, 神奈川

G. 知的財産権

特になし

表1

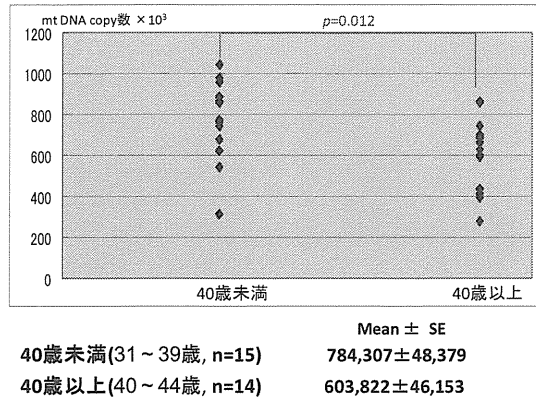


表1. 年齢別未受精卵・未分化胚 mtDNA copy 数

表3

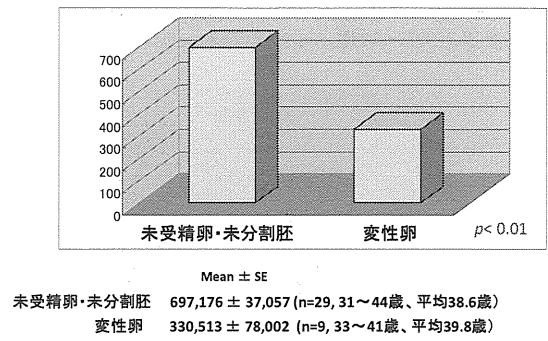


表3. 未受精卵・未分割胚と変性卵の mtDNA copy 数

表2

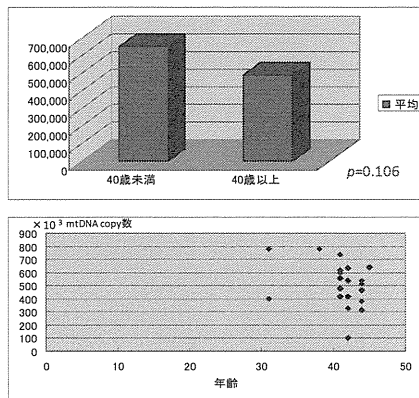


表2. 年齢別 顆粒膜細胞の mtDNA copy 数

表4

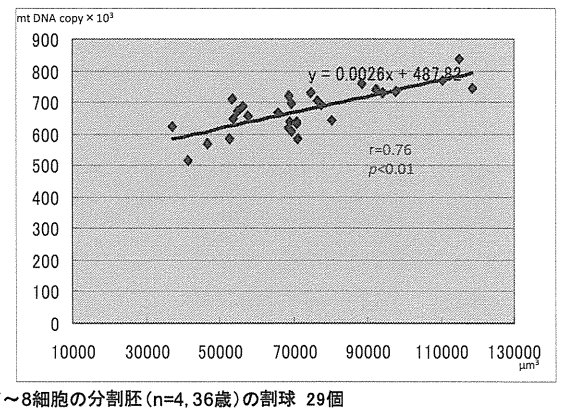


表4. 割球体積と mt DNA copy 数

表5

	Mean ± SE
40歳未満(31~39歳, n=55)	305,085 ± 4,329
40歳以上(40~47歳, n=53)	419,263 ± 19,362

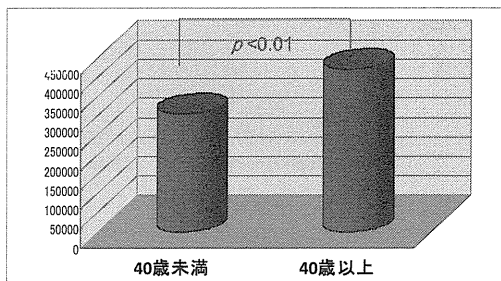


表 5. 卵子細胞質体積の年齢別比較

子宮内膜症における病態の解明、新規治療薬の探索

研究分担者 榎原 久司 大分大学医学部産科婦人科教授

研究要旨

子宮内膜症は子宮内膜あるいはその類似組織が子宮外で発育増殖する疾患であり、生殖年齢女性に好発する一般的な婦人科疾患である。その発症機序は明らかではないが、2007年に子宮内膜症ではDNAのメチル化がその発症に関与しているとの報告がなされ、エピジェネティックな変化が病因として注目されるようになった。我々はヒストンのアセチル化に注目し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるバルプロ酸、suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)、アピシジンの子宮内膜症に対する治療効果について、培養子宮内膜症間質細胞を用いて検討した。また、DNAのメチル化によるエピジェネティクス異常により発現が抑制されている遺伝子群について、cDNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析法により検討した。

卵巣子宮内膜症性嚢胞の手術時に卵巣子宮内膜症性嚢胞間質細胞を分離、培養した。培養卵巣子宮内膜症性嚢胞間質細胞に対してバルプロ酸、SAHA、アピシジンを添加し、細胞増殖、細胞周期、apoptosisについての検討を行った。さらに、ヒストンのアセチル化についての検討するため、クロマチン免疫沈降を行った。また、培養卵巣子宮内膜症性嚢胞間質細胞を、DNA脱メチル化剤である5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR)で刺激し、mRNAを抽出した。cDNAマイクロアレイを用いて、5-Aza-CdR処理により発現が亢進するmRNA群を抽出した。

培養子宮内膜症間質細胞の細胞増殖についてBrdUの取り込みを指標として検討したところ、バルプロ酸、SAHA、アピシジンにより細胞増殖は抑制された。また、細胞周期、アポトーシスについてフローサイトメトリーを用いて検討したところ、バルプロ酸およびアピシジンの添加により、G0/G1 cell cycle arrest およびアポトーシスが誘導された。一方、SAHAの添加では、G2/M cell cycle arrest およびアポトーシスが誘導された。バルプロ酸、SAHA、アピシジンは子宮内膜症細胞のヒストン H3 および H4 のアセチル化、細胞周期関連蛋白である p16^{INK4a}、p21^{Waf1/Cip1}、p27^{Kip1}、chk2 の発現を誘導した。また、SAHA およびアピシジンはアポトーシス抑制因子である Bcl-2 および Bcl-X_L の発現を抑制した。一方、バルプロ酸は Bcl-X_L の発現のみを抑制した。また、DNAのメチル化によるエピジェネティクス異常により、発現が抑制されている遺伝子群として、BCL2-like 11、Bone morphogenetic protein 2、Heat shock 70 kDa protein 2、Insulin-like growth factor binding protein-4、Laminin α 5、p21^{Waf1/Cip1}、Suppressor of cytokine signaling 2、Semaphorin 7A をはじめとする遺伝子が抽出できた。

本研究により、子宮内膜症の病態形成のメカニズムには、DNAのメチル化やヒストンの脱アセチル化をはじめとするエピジェネティクス異常が関

与していることが分かった。今後の研究により、子宮内膜症におけるエピジェネティクス異常の全容の解明とエピジェネティクスの可塑性と安定性を標的とした新たな治療法の開発が期待される。また、血液や尿などの検査材料から特異的なエピジェネティクス異常を検出することによる子宮内膜症の診断、子宮内膜症組織から特定のエピジェネティクス異常を検出することによる治療反応性の予測、エピジェネティクス異常の抑制による発症予防などへの応用も期待される。

A. 研究目的

子宮内膜症は子宮内膜あるいはその類似組織が子宮外で発育増殖する疾患であり、生殖年齢女性に好発する一般的な婦人科疾患である。その発症機序は明らかではないが、2007年に子宮内膜症ではDNAのメチル化がその発症に関与しているとの報告がなされ、エピジェネティックな変化が病因として注目されるようになった。我々はヒストンのアセチル化に注目し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるバルプロ酸、suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)、アピシジンの子宮内膜症に対する治療効果について、培養子宮内膜症間質細胞を用いて検討した。さらにDNAのメチル化によるエピジェネティクス異常により、発現が抑制されている遺伝子群について検討した。

B. 研究方法

卵巣子宮内膜症性嚢胞の手術時に卵巣子宮内膜症性嚢胞間質細胞を分離、培養した。培養卵巣子宮内膜症性嚢胞間質細胞に対してバルプロ酸、SAHA、アピシジンを添加し、細胞増殖、細胞周期、apoptosisについての検討を行った。また、ヒストンのアセチル化についての検討としてクロマチン免疫沈降を行った。

さらに、培養卵巣子宮内膜症性嚢胞間質細胞を、DNA脱メチル化剤である 5-aza-2'-deoxycytidine

(5-Aza-CdR)で刺激し、mRNAを抽出した。cDNAマイクロアレイを用いて、5-Aza-CdR処理により発現が亢進するmRNA群を抽出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、大分大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。また、研究の対象とした症例には、事前に十分な説明を行い、文書による同意を得て、組織を採取した。

C. 研究結果

バルプロ酸、SAHA、アピシジンにより、培養子宮内膜症間質細胞の細胞増殖は抑制された。また、バルプロ酸およびアピシジンにより、培養子宮内膜症間質細胞のG0/G1 cell cycle arrestおよびアポトーシスが誘導された。一方、SAHAにより、培養子宮内膜症間質細胞のG2/M cell cycle arrestおよびアポトーシスが誘導された。バルプロ酸、SAHA、アピシジンは培養子宮内膜症間質細胞のヒストンH3およびH4のアセチル化、細胞周期関連蛋白であるp16^{INK4a}、p21^{Waf1/Cip1}、p27^{Kip1}、chk2の発現を誘導した。また、SAHAおよびアピシジンはアポトーシス抑制因子であるBcl-2およびBcl-X_Lの発現を抑制した。一方、バルプロ酸はBcl-X_Lの発現のみを抑制した。

また、5-Aza-CdR処理した子宮内膜症間質細胞を用いたcDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析の結果、

DNAのメチル化によるエピジェネティクス異常により、発現が抑制されている遺伝子群として、BCL2-like 11、Bone morphogenetic protein 2、Heat shock 70 kDa protein 2、Insulin-like growth factor binding protein-4、Laminin α 5、p21^{Waf1/Cip1}、Suppressor of cytokine signaling 2、Semaphorin 7Aをはじめとする遺伝子が抽出できた。

D. 考察

ヒストンアセチル化やDNAメチル化をはじめとするエピジェネティクス異常が子宮内膜症の病態形成に関与することが明らかになりつつあり、これらの異常を標的とする治療薬が注目されている。我々の検討ではHDAC inhibitorおよびDNA脱メチル化剤の治療薬としての有用性が示唆された。

E. 結論

今後の研究により、子宮内膜症におけるエピジェネティクス異常の全容の解明とエピジェネティクスの可塑性と安定性を標的とした新たな治療法の開発が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表 著書

1)Kaei Nasu, Akitoshi Tsuno, Akitoshi Yuge, Masakazu Nishida, Hisashi Narahara.

Aromatase inhibitors for the medical treatment of endometriosis.

Ed: Jean R. Lamonte.

Aromatase Inhibitors: Types, Mode of Action and Indications.

Nova Science Publishers Inc., Hauppauge, NY, USA. pp. 95-111, 2010.

2)Kaei Nasu, Akitoshi Tsuno, Akitoshi Yuge, Yukie Kawano, Hisashi Narahara.

Roles of mevalonate-Ras homology (Rho)/Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase (ROCK)-mediated signaling pathway in endometriosis-associated fibrosis.

Ed: Lucy A. Mitchell.

Endometriosis: Symptoms, Diagnosis and Treatments.

Nova Science Publishers Inc., Hauppauge, NY, USA. pp. 197-212, 2010.

3)Kaei Nasu, Akitoshi Yuge, Harunobu Matsumoto, Akitoshi Tsuno, Hisashi Narahara

The Role of Endometrial Stromal Cell-Mediated Contractility in Endometrial Tissue Remodeling.

Eds: T. Abreu and G. Silva

Cell Movement: New Research Trends

Nova Science Publishers Inc., Hauppauge, NY, USA. pp247-263, 2009.

4)奈須家栄, 榎原久司.

子宮内膜症における癒痕形成の病態解明と新しい薬物療法の開発

子宮腺筋症・子宮内膜症における最新の動向

日本臨牀社, 大阪市 pp83-88, 2011

総説

1)Kaei Nasu, Masakazu Nishida, Yukie Kawano, Akitoshi Tsuno, Wakana Abe, Akitoshi Yuge, Noriyuki Takai, Hisashi Narahara.

Aberrant expression of apoptosis-related molecules in endometriosis: a possible

- mechanism underlying the pathogenesis of endometriosis. *Reprod Sci* 2011; 18 (3): 206-218.
- 2) Kaei Nasu, Yukie Kawano, Yoshiyuki Tsukamoto, Masayuki Takano, Noriyuki Takai, Haili Li, Yuichi Furukawa, Wakana Abe, Masatsugu Moriyama, Hisashi Narahara. Aberrant DNA methylation status of endometriosis: Epigenetics as the pathogenesis, biomarker, and therapeutic target. *J Obstet Gynaecol Res* 2011; 37 (7): 683-695.
- 3) Masakazu Nishida, Kaei Nasu, Hisashi Narahara. Role of chemokines in the pathogenesis of endometriosis. *Front Biosci* 2011; S3: 1196-1204.
- 4) Masakazu Nishida, Kaei Nasu, Hisashi Narahara. The role of apoptosis in the pathogenesis of endometriosis. *Curr Res Immunol* 2011; 5: 1-18.
- 5) Masakazu Nishida, Kaei Nasu, Hisashi Narahara. The role of the interleukin-1 system in reproductive biology. *Curr Trends Endocrinol* 2011; 5: 67-73.
- 6) Kaei Nasu, Akitoshi Yuge, Akitoshi Tsuno, Hisashi Narahara. Mevalonate-Ras homology (Rho)/Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase (ROCK)-mediated signaling pathway as a therapeutic target for the treatment of endometriosis-associated fibrosis. *Curr Signal Transduct Ther* 2010; 5 (2): 141-148.
- 7) Kaei Nasu, Akitoshi Tsuno, Akitoshi Yuge, Yasushi Kawano, Hisashi Narahara. Combined oral contraceptives for the medical treatment of endometriosis-associated pain. *Recent Adv Endocrinol Metab* 2009; 1: 1-14.
- 8) Kaei Nasu, Hisashi Narahara. Molecular mechanisms of malignant transformation of endometriosis. *Curr Res Cancer* 2009; 3: 137-155.
- 9) Masakazu Nishida, Kaei Nasu, Hisashi Narahara. The role of cytokines in the pathogenesis of endometriosis. *Curr Res Immunol* 2009; 3: 61-85.
- 10) 奈須家栄, 川野由紀枝, 榎原久司. 子宮内膜症をめぐる最近の話題 — 子宮内膜症におけるエピジェネティック異常 — 産婦治療 2011; 102 (3): 215-220.
- 11) 奈須家栄. 子宮内膜症の病態解明と新しい薬物療法の開発. 日産婦誌 2010; 62 (9): 1691-1701.
- 12) 奈須家栄. 子宮内膜症に対するホルモン療法の現状 — 低用量経口避妊薬の位置付け —. 日本医事新報 2010; 4501: 50-51.
- 13) 西田正和, 榎原久司. 妊孕性向上のための内膜症治療 ジェノゲスト. 産と婦 2010; 77 (7): 828-832.
- 14) 奈須家栄, 榎原久司. 子宮内膜症におけるアポトーシスの異常とアポトーシスを誘導する薬物療法の可能性. 産婦治療 2010; 101 (3): 317-320.
- 15) 津野晃寿, 榎原久司. 性ホルモン製剤の疾患別選択.

産婦実際 2010; 59 (1): 1-20.
16)西田正和, 奈須家栄, 榎原久司.
子宮内膜症のホルモン療法の現状.
産婦治療 2009 ; 98 (Suppl):
335-339.
17)奈須家栄, 榎原久司.
ジェノゲストを用いた子宮内膜
症に伴う疼痛の治療.
産婦実際 2009; 58 (8):
1119-1123.
18)奈須家栄.
子宮内膜症ホルモン療法の現況.
日産婦誌 2009; 61 (9):
N340-N344.
19)奈須家栄, 榎原久司.
子宮内膜症ホルモン療法の現況.
産婦治療 2009; 99 (5):
526-530.

原著

1) Akitoshi Tsuno, Kaei Nasu,
Yukie Kawano, Akitoshi Yuge,
Haili Li, Wakana Abe, Hisashi
Narahara.
Fasudil hydrochloride inhibits
the proliferation and the
contractility and induces
apoptosis of human endometriotic
stromal cells: a promising agent
for the treatment of
endometriosis.
J Clin Endocrinol Metab (Epub
ahead of print)
2) Yasushi Kawano, Yuichi
Furukawa, Yukie Kawano, Kaei Nasu,
Hisashi Narahara.
Thrombin-induced chemokine
production in endometrial stromal
cells.
Hum Reprod 2011; 26 (2): 407-413.
3)Yukie Kawano, Kaei Nasu, Haili
Li, Akitoshi Tsuno, Wakana Abe,

Noriyuki Takai, Hisashi Narahara.
Application of the histone
deacetylase inhibitors for the
treatment of endometriosis:
Histone modifications as
pathogenesis and novel
therapeutic target.
Hum Reprod 2011; 26 (9):
2486-2498.
4)Masatake Adachi, Kaei Nasu,
Akitoshi Tsuno, Akitoshi Yuge,
Yukie Kawano, Hisashi Narahara.
Attachment to extracellular
matrices is enhanced in human
endometriotic stromal cells: a
possible mechanism involved in
the pathogenesis of
endometriosis.
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol
2011; 155 (1): 85-88.
5)Kaei Nasu, Akitoshi Tsuno,
Marina Hirao, Hironao Kobayashi,
Akitoshi Yuge, Hisashi Narahara.
Heparin is a promising agent for
the treatment of
endometriosis-associated
fibrosis.
Fertil Steril 2010; 94 (1): 46-51.
6)Akitoshi Tsuno, Kaei Nasu,
Akitoshi Yuge, Harunobu Matsumoto,
Masakazu Nishida, Hisashi
Narahara.
Decidualization attenuates the
contractility of human eutopic
and ectopic endometrial stromal
cells: implications for hormone
therapy of endometriosis.
J Clin Endocrinol Metab 2009; 94
(7): 2516-2523.
7)Kaei Nasu, Akitoshi Yuge,
Akitoshi Tsuno, Hisashi Narahara.
Simvastatin inhibits the
proliferation and the
contractility of human

endometriotic stromal cells: a promising agent for the treatment of endometriosis.

Fertil Steril 2009; 92 (6): 2097-2099.

8) 奈須家栄, 津野晃寿, 安達正武, 弓削彰利, 川野由紀枝, 阿部若菜, 榎原久司

子宮内膜症細胞の細胞外マトリックスに対する接着性の増強

日エンドメトリオーシス会誌 2011; 32: 75-77.

9) 川野由紀枝, 奈須家栄, 津野晃寿, 高井教行, 黎海莉, 安達正武, 吉田俊恵, 河野康志, 榎原久司.

培養子宮内膜症細胞に対するバルプロ酸のエピジェネティック修飾効果についての検討.

日エンドメトリオーシス会誌 2010; 31: 222-224.

10) 奈須家栄, 津野晃寿, 弓削彰利, 榎原久司.

子宮内膜症の癒痕化に対するジェノゲストの効果 — 脱落膜化との関連 —.

エンドメトリオーシス学会会誌 2009; 30: 43-46.

11) 津野晃寿, 奈須家栄, 平尾菜里菜, 小林弘尚, 吉田俊恵, 弓削彰利, 榎原久司.

子宮内膜症による癒痕化に対するヘパリンナトリウムの作用.

エンドメトリオーシス会誌 2009; 30: 130-132.

2. 学会発表

1) 第 32 回日本エンドメトリオーシス学会 (東京都千代田区) 2011 年 1 月 22 日-23 日

ワークショップ 1 「子宮内膜症の成因に関する基礎的研究」

奈須家栄, 津野晃寿, 安達正武, 弓削彰利, 川野由紀枝, 阿部若菜, 榎

原久司.

子宮内膜症細胞の細胞外マトリックスに対する接着性の増強

2) 第 32 回日本エンドメトリオーシス学会 (東京都千代田区) 2011 年 1 月 22 日-23 日

川野由紀枝, 奈須家栄, 阿部若菜, 津野晃寿, 高井教行, 吉田俊恵, 梶原真理子, 中尾晶子, 河野康志, 榎原久司.

子宮内膜症細胞に対する SAHA のエピジェネティック修飾による治療効果

3) 第 32 回日本エンドメトリオーシス学会 (東京都千代田区) 2011 年 1 月 22 日-23 日

阿部若菜, 奈須家栄, 川野由紀枝, 津野晃寿, 吉田俊恵, 中尾晶子, 梶原真理子, 河野康志, 榎原久司.

子宮内膜症による癒痕化における PI3K-Akt-mTOR pathway の関与

4) 第 5 回日本エピジェネティクス研究会年会 (熊本市) 2011 年 5 月 19 日-20 日

川野由紀枝, 奈須家栄, 阿部若菜, 高井教行, 榎原久司.

子宮内膜症細胞に対するバルプロ酸と SAHA のエピジェネティック修飾による治療効果

5) 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会 (大阪市) 2011 年 8 月 29 日-31 日

津野晃寿, 奈須家栄, 弓削彰利, 川野由紀枝, 阿部若菜, 唐木田真也, 河野康志, 榎原久司

子宮内膜症による癒痕化に対するヘパリンの作用

6) 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会 (大阪市) 2011 年 8 月 29 日-31 日

川野由紀枝, 奈須家栄, 阿部若菜, 津野晃寿, 高井教行, 河野康志, 榎原久司

培養子宮内膜症細胞に対する HDAC

inhibitor, Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)のエピジェネティック修飾による治療効果の検討

7)第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会 (大阪市) 2011 年 8 月 29 日-31 日

阿部若菜, 奈須家栄, 川野由紀枝, 津野晃寿, 河野康志, 榎原久司

子宮内膜症による癒痕化における phosphatidylinositol

3 kinase-Akt pathway の関与

8) XXII Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynecology (Taipei) 2011年9月23 日-27日

Kaei Nasu.

Roles of mevalonate-Ras homology (Rho)/Rho-associated

coiled-coil-forming protein kinase (ROCK)-mediated signaling pathway in

endometriosis-associated fibrosis.

9)第 31 回日本エンドメトリオーシス学会 (京都市) 2010 年 1 月 16 日-17 日

川野由紀枝, 奈須家栄, 津野晃寿, 安達正武, 吉田俊恵, 河野康志, 榎原久司.

子宮内膜症に対するバルプロ酸の治療効果についての検討.

10)第 31 回日本エンドメトリオーシス学会 (京都市) 2010 年 1 月 16 日-17 日

津野晃寿, 奈須家栄, 安達正武, 川野由紀枝, 吉田俊恵, 河野康志, 榎原久司.

子宮内膜症による癒痕化に対する Fasudil の効果.

11)2010 Society for Gynecologic Investigation 57th Annual Meeting (Orlando,

Florida) 2010 年 3 月 24 日-27 日

Kaei Nasu, Akitoshi Tsuno, Yukie Kawano, Yasushi Kawano, Hisashi Narahara.

Decidualization attenuates the contractility of endometriotic stromal cells.

12)2010 Society for Gynecologic Investigation 57th Annual Meeting (Orlando, Florida) 2010 年 3 月 24 日-27 日

Yukie Kawano, Kaei Nasu, Masakazu Nishida, Yasushi Kawano, Hisashi Narahara. Application of the nuclear factor- κ B inhibitor, BAY 11-7085, for the treatment of endometriosis.

13)第 62 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 (東京都) 2010 年 4 月 23 日-25 日

川野由紀枝, 奈須家栄, 津野晃寿, 安達正武, 河野康志, 榎原久司.

子宮内膜症に対するバルプロ酸の治療効果についての検討.

14)第 62 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 (東京都) 2010 年 4 月 23 日-25 日

津野晃寿, 奈須家栄, 安達正武, 川野由紀枝, 河野康志, 榎原久司.

子宮内膜症による癒痕化に及ぼす Fasudil の影響.

15)第 28 回日本受精着床学会総会・学術講演会 (横浜市) 2010 年 7 月 28 日-29 日

奈須家栄, 津野晃寿, 弓削彰利, 川野由紀枝, 河野康志, 榎原久司.

子宮内膜症による癒痕化に対するヘパリンの効果.

16) 第 28 回日本受精着床学会総会・学術講演会 (横浜市) 2010 年 7 月 28 日-29 日

川野由紀枝, 奈須家栄, 津野晃寿, 高井教行, 安達正武, 河野康志, 榎原久司.

培養子宮内膜症細胞に対するバルプロ酸のエピジェネティック修飾効果についての検討.

17) The First Asian Conference on Endometriosis (ACE I) (Shanghai) 2010 年 10 月 16 日-17 日.

Kaei Nasu.

Mini-symposium: Endometriosis research in Japan

Mevalonate-Ras homology (Rho)/Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase-mediated signaling pathway as a therapeutic target for the treatment of endometriosis-associated fibrosis

17) The First Asian Conference on Endometriosis (ACE I) (Shanghai) 2010 年 10 月 16 日-17 日.

Yukie Kawano, Kaei Nasu, Masakazu Nishida, Wakana Abe, Hisashi Narahara.

Application of the nuclear factor- κ B inhibitor, BAY 11-7085, for the treatment of endometriosis.

18) The First Asian Conference on Endometriosis (ACE I) (Shanghai) 2010 年 10 月 16 日-17 日.

Wakana Abe, Kaei Nasu, Akitoshi Tsuno, Yukie Kawano, Hisashi Narahara.

Decidualization attenuates the contractility of

endometriotic stromal Cells.

19) 第 55 回日本生殖医学会総会・学術講演会 (徳島市) 2010 年 11 月 11 日-12 日

奈須家栄, 弓削彰利, 津野晃寿, 川野由紀枝, 河野康志, 榎原久司.

子宮内膜間質細胞の contractility に対する tumor necrosis factor- α の作用.

20) 第 55 回日本生殖医学会総会・学術講演会 (徳島市) 2010 年 11 月 11 日-12 日

川野由紀枝, 奈須家栄, 津野晃寿, 阿部若菜, 高井教行, 河野康志, 榎原久司.

培養子宮内膜症細胞に対する HDAC inhibitor のエピジェネティック修飾効果についての検討.

21) 第 55 回日本生殖医学会総会・学術講演会 (徳島市) 2010 年 11 月 11 日-12 日

西田正和, 奈須家栄, 古川雄一, 津野晃寿, 榎原久司.

子宮内膜症細胞における interferon γ により惹起されるアポトーシスの検討.

22) 第 55 回日本生殖医学会総会・学術講演会 (徳島市) 2010 年 11 月 11 日-12 日

津野晃寿, 奈須家栄, 川野由紀枝, 阿部若菜, 西田正和, 古川雄一, 河野康志, 榎原久司.

子宮内膜症による癒痕化に対する fasudil dihydrochloride の効果.

23) 第 55 回日本生殖医学会総会・学術講演会 (徳島市) 2010 年 11 月 11 日-12 日

阿部若菜, 奈須家栄, 津野晃寿, 弓削彰利, 川野由紀枝, 河野康志, 榎原久司.

子宮内膜症による癒痕化に対す

る simvastatin の効果.

24)第30回日本エンドメトリオーシス学会(仙台市)2009年1月17日-18日

津野晃寿, 奈須家栄, 平尾茉里菜, 小林弘尚, 弓削彰利, 榎原久司.

子宮内膜症による癒痕化に対するヘパリンナトリウムの作用.

25)第30回日本エンドメトリオーシス学会(仙台市)2009年1月17日-18日

奈須家栄, 津野晃寿, 弓削彰利, 榎原久司.

子宮内膜症の癒痕化に対するジェノゲストの効果 —脱落膜化との関連—.

26)第61回日本産科婦人科学会総会・学術講演会(京都市)2009年4月3日-5日

生涯研修プログラム クリニカルカンファレンス 6 子宮内膜症の up-to-date

奈須家栄.

子宮内膜症ホルモン療法の現況.

27)第27回日本受精着床学会総会・学術講演会(京都市)2009年8月6日-7日

津野晃寿, 奈須家栄, 弓削彰利, 川野由紀枝, 吉田俊恵, 河野康志, 榎原久司.

子宮内膜の脱落膜化における contractility の調節機構.

28)第54回日本生殖医学会総会・学術講演会(金沢市)2009年11月21-23日

津野晃寿, 奈須家栄, 川野由紀枝, 弓削彰利, 榎原久司.

子宮内膜症による癒痕化に対するヘパリンナトリウムの作用.

G. 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

子宮内膜症：発症・進展における免疫と炎症の制御機構とその意義の解明

研究分担者 大須賀 穰 東京大学医学部 准教授

研究要旨

ライフスタイルの変化にともない、子宮内膜症が生殖年齢女性の妊孕性を減弱させる大きな原因の一つとなっている。しかしながら、本疾患は発症・進展機序が不明で予防・治療に苦慮している。今回の研究では、本疾患の発症・進展メカニズムとして重要である炎症と免疫について4つの課題について検討した。

①近年、新たなT細胞であるTh17細胞が発見され、我々は本細胞が子宮内膜症の進展に関与しており、病巣局所に集積していることを示してきた。しかしながら、Th17細胞の子宮内膜症病巣への集積機序は不明であった。そこで、我々はTh17細胞が発現するケモカイン受容体CCR6がそのリガンドであるCCL20の影響を受けて集積すると考えた。本研究では、まず、子宮内膜症病巣でTh17細胞がCCR6を発現しており、CCL20が周囲の間質細胞に発現していることを示した。ついで、CCL20が末梢血よりTh17細胞を遊走させることを示した。また、培養系にて炎症性サイトカインであるIL-1 β , TNF α , IL-17Aが子宮内膜症間質細胞からのCCL20産生を促進し、特に、TNF α とIL-17Aが相乗作用を持つことを示した。また、これらの作用が各種MAPキナーゼ阻害剤で抑制されることも示した。以上の所見より、子宮内膜症の局所環境として知られている炎症が各種サイトカインを介して子宮内膜症間質細胞からのCCL20産生を増やしてTh17を局所に集積させることが示唆され、これにはIL-17Aを介するフィードフォワード作用も関与していると考えられた。

②子宮内膜症の病態において重要であるproteinase-activated receptor 2 (PAR2)の発現制御とその意義について検討した。方法は、卵巣子宮内膜症性嚢胞から子宮内膜症の間質細胞(ESC)を分離培養し、まずTGF β , IL-1 β , TNF α にて刺激してPAR2mRNA発現をRT-PCRで測定した。TGF β のみPAR2発現を増加させたため、TGF β 刺激後PAR2 agonist peptide (PAR2AP)を添加し、上清中のIL-6をELISAで測定した。TGF β 前投与なしではPAR2AP添加は無添加に比しIL-6産生を2.8倍としたが、TGF β はこの比を濃度依存的に増幅し、10 ng/mlでは5.1倍とした。つぎに、ESCにPAR2siRNAを導入し、TGF β 、PAR2AP刺激後のIL-6を測定した結果、TGF β 前投与の増強作用は、PAR2siRNA導入により消失した。また、各種阻害薬を用いた実験によりTGF β によるPAR2の発現増加作用はMAPキナーゼ系を介することが示唆された。以上より、TGF β はESCのPAR2発現を促進し、proteinaseによるIL-6産生を増強することにより子宮内膜症を進展させることが示唆された。

③我々は免疫の観点からの検討によりTh17細胞とその産生するIL-17Aが子宮内膜症の進展に重要であることを明らかにしてきたが、今回はTh17細胞の分泌する別のサイトカインであるIL-17Fについて検討した。子宮内膜症組織より間質細胞を分離・培養し、種々の添加実験を行った。IL-17FはIL-8, COX2の発現を促進し、TNF α との同時添加により相乗的にIL-8産生を促進した。

④子宮内膜症で増加しているが、いまだその作用が謎であったアクチビンの子宮内膜症における役割について検討した。IL-1 β , TNF α はアクチビンの産生を促進

し、かつ、アクチビン[®]は IL-6, PAR2 の発現を促進した。よって、アクチビンが炎症の増幅因子として子宮内膜症の進展に関与していることが示唆された。

以上をまとめると、子宮内膜症における免疫と炎症の新たなメカニズムを明らかにすることができた。これらのメカニズムは今後の治療選択において新たなターゲットとなる可能性が期待でき、将来的には女性の妊孕性の改善、QOL の改善などに寄与すると考えられる。

A. 研究目的

ライフスタイルの変化に伴い結婚年齢、出産年齢が高齢化している。このため、妊娠希望時には生殖年齢に好発する各種疾患を罹患している女性が少なくない。特に、子宮内膜症は子宮筋腫と同様に生殖年齢の女性に高頻度に発症し、全国で 10 万人以上の患者が通院しているとされている。子宮内膜症は解剖学的ならびに生化学的な機序により妊孕性を減弱させることが知られており、不妊症の代表的な原因でもある。よって、子宮内膜症を予防・治療することが、本邦における挙児希望年齢の女性の妊孕性を向上することに寄与すると考えられる。しかしながら、子宮内膜症は謎の疾患とも言われており、その発症・進展機序については不明な部分が多く、免疫・遺伝・環境など種々の要因が関与していると言われている。子宮内膜症の発症としていわゆる逆流月経血移植説が広く信じられているが、ほとんどの女性に認められる逆流血中の子宮内膜組織が何故一部の女性にのみ生着・増殖するのか大きな問題となっている。このことより子宮内膜症では局所において子宮内膜の移植を受け入れやすくする免疫学的寛容が機能していると推測されている。同時に、子宮内膜症は慢性炎症性疾患としての性格も備えており、局所での免疫学的反応は炎症を介して子宮内膜症の進展を促進すると考えられている。子宮内膜症患者の腹腔内貯留液内ではサイトカン、成長因子などの液性成分や細胞成分が変化しており、またそれらが複雑に関与しあい、子宮内膜症の発症、進展に寄与していると考えられている。

具体的には、活性化マクロファージ、肥満細胞、リンパ球、好酸球などの炎症細胞や、transforming growth factor (TGF)- β , tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 などの炎症性サイトカンの増加を認めている。本研究では、子宮内膜症における免疫と炎症の役割を明らかにするために下記の検討を行うこととした。

① 我々はこれまで子宮内膜症組織において Th 細胞系の反応が子宮内膜症の進展に関係していると考え、なかでも Th2 細胞, Th17 細胞の重要性を示してきた。Th17 細胞については同細胞より特異的に産生される IL-17A が子宮内膜症間質細胞 (endometriotic stromal cells, 以下 ESC と略) の増殖、cyclooxygenase-2 発現、ならびに IL-8 産生を刺激することを報告している。この際に、子宮内膜症病巣に Th17 細胞が豊富に存在することを認めていたが、その集積機序については不明であった。本研究では、Th17 細胞が子宮内膜症細胞に集積する機序を子宮内膜症の病態と関連させて解析することを目的とした。

② 近年、子宮内膜症細胞に発現する proteinase-activated receptor 2 (PAR2) が子宮内膜症の進展に重要な役割を担うことが注目されるようになってきた。PAR2 は活性化された肥満細胞や好中球から分泌される特定のプロテアーゼによって特異的に活性化される三量体 G タンパクと共役した 7 回膜貫通型受容体であり、様々な組織において向炎症的に働く受容体である。トリプターゼなどの酵素が PAR2 分子の細胞外アミノ

末端側ペプチド鎖を特定の部位で切断することにより新しいアミノ末端ペプチド鎖を露出させ、これが同じ受容体分子の細胞外第2ループに結合後、細胞内にシグナルが誘起される。実験系では合成されたペプチド (PAR2 agonist peptide, PAR2AP) を外来性に与えることにより、アミノ酸末端側ペプチドを切断することなく受容体の活性化を誘起することができる。PAR2はESCにおいて活性化されると、炎症性サイトカンであるIL-6, IL-8がなどの分泌を増加させ、また、ESCの細胞増殖を促進する。このような作用により、PAR2は子宮内膜症の増悪を促進していると考えられている。しかしながら、これまで子宮内膜症においてPAR2の発現調節因子は明らかではなかった。そこで子宮内膜症で重要とされるサイトカンのPAR2の発現調節に与える影響について検討した。

③ 近年、高い病原性をもつT細胞であるTh17が子宮内膜症患者の腹腔内貯留液中に存在することより、子宮内膜症の病態との関係が注目されている。従来、IL-8やCOX2の増加が子宮内膜症の促進因子とされているが、本研究では、第一にTh17が分泌する代表的な炎症性サイトカンであるIL-17FがESCにおいてIL-8, COX2の発現に影響するか否か検討した。

④ 諸家により子宮内膜症病変ではアクチビンAが強発現していること、また正所性子宮内膜におけるアクチビンAの発現は、子宮内膜症症例では正常よりも著明に上昇していることが報告されている。しかし、アクチビンAの子宮内膜症における役割はこれまで検討されていない。そこで、本研究の第二の目的としてESCを用いて、アクチビンAの発現調節およびその機能に関して検討を行った。

B. 研究方法

① (1) 試料として子宮内膜症治療のた

めの腹腔鏡手術を施行した患者より子宮内膜症組織ならびに末梢血を採取して実験に用いた。

(2) 末梢血と子宮内膜症組織より単核球を、子宮内膜症組織よりESCを分離・培養した。

(3) 子宮内膜症組織の一部はパラフィン固定の後、免疫染色実験に供した。ケモカインリガンドであるCCR6とこれに対応するケモカインのCCL20を染色した。

(4) CCL20のTh17細胞に対する遊走刺激活性を見るために、分離した末梢血単球をTranswellの上層に添加した。下層に遊走した細胞をPMAとionomycinで刺激後にCD3, CD4, IL-17Aに対する抗体で染色し、FACSで解析した。

(5) ESC培養系にIL-1 β , TNF α , IL-17Aを添加して、24時間培養し、上清のCCL20濃度をELISAキットにより測定した。

(6) 上記の実験に際し、SB202190 (p42/44MAPK阻害剤)、PD98059 (p38MAPK阻害剤)、SP600125 (SAPK/JNK阻害剤)を添加して、同様にCCL20濃度を測定した。

② 子宮内膜症性卵巣嚢胞からESCを分離培養し以下の実験に用いた。ESCにTGF- β 10ng/ml, IL-1 β 10ng/ml, TNF α 1ng/mlを6時間添加し、PAR2 mRNA発現をRT-PCRにて測定した。TGF- β のみが反応を示したため、ここからはTGF- β について検討した。ESCにTGF- β 10ng/mlを0, 3, 6, 12, 24時間添加し経時的反応を、TGF- β 0, 1, 5, 10ng/mlを6時間添加し容量反応を調べた。PAR2APが起こすESCからのIL-6分泌に対してTGF- β の前投与が与える影響を調べるために、まずESCをTGF- β 10ng/ml, 24時間で刺激し、その後PAR2AP 30 μ M, 24時間刺激し、上清中のIL-6をELISAにて測定した。TGF- β のtype I receptorの阻害剤であるSB431542のPAR2 mRNAに対する影響をみるために、ESCをSB431542 10 mM添加、TGF- β 10ng/ml 6時間添加した。

SB431542 の PAR2AP 刺激による IL-6 分泌に対する影響を調べるために、SB431542 10mM, TGF β 10ng/ml 24 時間添加、PAR2AP 30 μ M で 24 時間刺激した。また PAR2 siRNA を導入したうえで、TGF- β 10ng/ml, 24 時間で刺激し、その後 PAR2AP 30 μ M, 24 時間刺激し、上清中の IL-6 を測定した。TGF- β の細胞内シグナル伝達には Smad 経路と mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路が存在する。このうち MAPK 経路を調べるために、EmSC を p38 MAPK、p42/44 MAPK、stress-activated protein kinase /c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) それぞれの阻害剤にて 30 分刺激し、その後 TGF- β (10ng/ml) で 6 時間刺激した。また Smad 経路については Smad4 siRNA を導入し、TGF- β (10ng/ml) で 6 時間刺激し、PAR2 mRNA を測定した。

③ ESC を分離培養し、以下の検討に供した。(1) IL-17F (0.01ng/ml-100ng/ml) を添加し、培養上清中の IL-8 の産生を ELISA 法にて測定した。(2) IL-17F (10ng/ml) を添加し、IL-8 mRNA, COX2 mRNA の発現の変化を検討した。(3) TNF α (1ng/ml) の存在下に IL-17F (1ng/ml-100ng/ml) を添加し、培養上清中への IL-8 産生を ELISA 法にて測定した。(4) IL-17F (50ng/ml) と同時に IL-17F の受容体である IL-17RA, IL-17RC の抗体を同時に添加し、培養上清中の IL-8 の産生を ELISA 法にて測定した。

④ 培養 ESC に IL-1 α もしくは TNF β 刺激を加え、inhibin- α , inhibin/activin β A, β B mRNA 発現量を検討した。また、同培養上清中のアクチビン A 濃度を ELISA 法にて測定した。次に ESC にアクチビン A (0-300 ng/ml) を添加し、ESC に対する増殖作用を細胞数計測により検討し、また子宮内膜症の増悪因子として知られている IL-6 および protease-activated receptor-2 (PAR-2) mRNA の発現を検討した。

C. 研究結果

① (1) 子宮内膜症組織から分離された Th17 細胞のうち 97.6 \pm 3.1% に CCR6 の発現が認められた。また、CCR6 陽性 Th 細胞のうち 14.7 \pm 5.1% が Th17 細胞であった。(2) CCL20 免疫陽性細胞は病巣の上皮細胞と上皮直下の間質細胞に認められた。一部の CCL20 陽性細胞は上皮から離れた線維性間質に存在した。一方、CCR6 陽性細胞は上皮直下の間質に局在していた。これらの細胞は円形で骨髄由来と考えられた。(3) CCL20 の末梢血 T 細胞に対する遊走促進活性は Transwell system を用いて測定された。CCL20 は CD4 陽性細胞の遊走インデックスを約 4 倍にしたが、有意差には至らなかった。CCL20 は Th17 細胞については遊走インデックスを 18.2 倍と有意に増加させた。このことから、CCL20 は特異的に Th17 細胞の遊走を刺激していることが確認された。(4) 子宮内膜症間質細胞の培養系において、IL-1 β は 1ng/ml 以上、TNF α は 0.1ng/ml 以上、IL-17A は 1ng/ml 以上で CCL20 の分泌を増加させた。これらの CCL20 増加作用は p42/44MAPK、p38MAPK、SAPK/JNK の阻害剤の添加により抑制された。(5) TNF α と IL-17A の同時添加は各々の単独投与に比べて相乗的に CCL20 の分泌を促進した。

② ESC において TGF- β (10ng/ml) は PAR2 mRNA を約 2 倍に増加させたが、IL-1 β (10ng/ml), TNF- α (1ng/ml) はその作用を示さなかった。TGF- β の PAR2 mRNA に対する作用をさらに詳細に検討したところ、経時的な変化では 6 時間後にピークを認め約 3.2 倍に増加した。また TGF- β は濃度依存性に PAR2 mRNA を増加させ、以上で対象に比し有意差が認められた。ESC において PAR2AP 刺激によって IL-6 が分泌されることが報告されている。TGF- β 前投与はこの作用をさらに増強した。この増強作用は TGF- β の濃度依存性にみられた。PAR2AP 刺激のみ