

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20120

研究課題名(和文)NK細胞に関する子宮内膜症の発症と進展の病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of development and progression of endometriosis related to NK cells

研究代表者

船水 文乃(FUNAMIZU, Ayano)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50623766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、子宮内膜症とNK細胞の機能(活性性レセプターNCR、サイトカイン産生)との関連を明らかにし、子宮内膜症の病態を解明することである。

子宮内膜症の腹水では、NCRのひとつであるNKp46発現の低下、炎症性サイトカインIFN-、TNF-の増加がみられた。すなわち、NK細胞の細胞傷害性が低下することで腹腔内の内膜症性細胞が除去できず、炎症が助長されていると考えられた。その病態は、子宮内膜症の治療薬である低用量エストロゲンプロゲスチンにより改善されることが示唆された。また、子宮内膜症合併不妊症での子宮内膜NK細胞NCRは変化がなく、子宮内膜の着床能低下は関連しないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the relationship between endometriosis and NK cell function (NCR expression and cytokine production) and to elucidate the pathology of endometriosis.

In peritoneal fluid in patients with endometriosis, there was a decrease in the expression of NKp46 which is one of NCRs, an increase in IFN- and TNF- which is one of inflammatory cytokines. In other words, endometriotic cells in the peritoneal cavity could not be removed due to decreased cytotoxicity of NK cells, suggesting that inflammation was promoted. In addition, it was suggested that the condition is improved by low dose estrogen progestin, a therapeutic agent for endometriosis. There was no change in NCR expression on NK cells in endometrium in patients with endometriosis and infertility, and it seemed that lower endometrial receptivity is not complicated by endometriosis.

研究分野：生殖免疫学

キーワード：子宮内膜症 NK細胞 不妊症

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 子宮内膜症は生殖年齢女性の約 10%に発症する疾患で、その 20~70%が不妊症の原因となることが知られているが、その発症病因はいまだ明らかにされていない。その発症原因のひとつとして子宮内膜症患者では腹腔内に存在する Natural killer (NK)細胞の機能が低下しているために、腹腔内に逆流してきた子宮内膜組織を免疫学的に排除することができずに移植を許してしまうという考えがある。NK 細胞はその表面に発現する活性化レセプターと抑制性レセプターのバランスによって機能を発現するが、子宮内膜症において抑制性レセプターのひとつである Killer Immunoglobulin-like Receptor (KIR)発現が増加しているという報告があるが(Maeda N et al. Fertil Steril. 77(2): 297-302, 2002)、我々は活性化レセプターのひとつである Natural Cytotoxicity Receptor (NCR)発現も子宮内膜症の病態に関連性があるのではないかと考えた。さらに、子宮内膜症におけるサイトカイン産生異常も指摘されており、腹腔内の TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインの増加とそれによる内膜症細胞の増殖・血管新生が報告されているが(Iwabe T et al. J Clin Endocrinol Metab. 85(2): 824-829, 2000)、NK 細胞のサイトカイン産生機能の直接的な異常がより病態に関連していると考えた。さらなる研究を行うことで子宮内膜症の病変の一端が解明できることが期待される。

(2) 子宮内膜症と不妊症・不育症をむすぶ原因の一つに免疫異常が挙げられる。我々は今まで、不妊症・不育症に関して、免疫担当細胞であるNK細胞を中心とした研究を一貫して行ってきた。子宮内膜症と不妊症・不育症の免疫状態を比較すると、不妊症・不育症ではNK細胞の細胞傷害性亢進がその原因であるといわれているのに対し、子宮内膜症ではNK細胞の細胞傷害性が低下しているという報告が見受けられる(Oosterlynck DJ et al. Fertil Steril. 58(2): 290-295, 1992)。すなわち、NK細胞の機能からみると、不妊原因の一つでもある子宮内膜症と一般的な不妊症・不育症の免疫状態は一見相反しているように見える。この研究により、NK細胞の細胞傷害性のみでは見えないNK細胞の詳しい機能分担を解明し、子宮内膜症と不妊症をつなぐ糸口とすることを目的とする。

### 2. 研究の目的

子宮内膜症とNK細胞の機能(活性化レセプターNCR、サイトカイン産生)との関連を明らかにし、子宮内膜症の病態を解明することが本研究の目的である。子宮内膜症患者、子宮内膜症のない患者の末梢血、腹水、子宮内膜、卵巣内膜症性嚢胞内溶液のNK細胞の機能を比較検討し、その違いを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 子宮内膜症の手術予定患者(子宮内膜症群)と子宮内膜症以外の良性疾患(子宮筋腫、卵巣嚢腫など)の手術予定患者(Control群)より検体を採取する。手術直前の末梢血・腹水。子宮内膜の採取を行う。子宮内膜症群とControl群において、NCRs 発現・サイトカイン産生の違いを検討する。

(2) 術後3カ月、6カ月、12カ月の末梢血を採取し、術後の薬物療法を施行した群と施行していない群、Control群とを比較し、NK細胞の変化が先天的か可変的かを検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 子宮内膜症における腹水中および末梢血中NK細胞NCR発現とサイトカイン産生についての検討

研究当初は内膜症性嚢胞内容液中のNK細胞も採取する予定であったが、NK細胞の抽出が困難であったため検討できなかった。

腹水中のNK細胞NCRのひとつであるNKp46<sup>+</sup>細胞の割合は、子宮内膜症群でControl群に比して有意に低下していた( $p < 0.05$ )(図1)。なかでも、細胞傷害性の強いCD56<sup>dim</sup>/NKp46<sup>+</sup>細胞の割合が子宮内膜症群で有意に低下していた( $p < 0.05$ )。また、サイトカイン産生性については、腹水中のIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>細胞およびTNF- $\alpha$ <sup>+</sup>細胞の割合が、子宮内膜症群でControl群に比して有意に増加していた( $p < 0.05$ )(図2)。それ以外のサイトカイン産生について有意差は認められなかった。

すなわち、子宮内膜症患者の腹腔内では、NK細胞の細胞傷害性が低下しており、炎症性サイトカインが増加し内膜症細胞の増殖・血管新生を引き起こしていると考えられる。

末梢血のNK細胞NCR発現、サイトカイン産生において有意差は認められなかった。

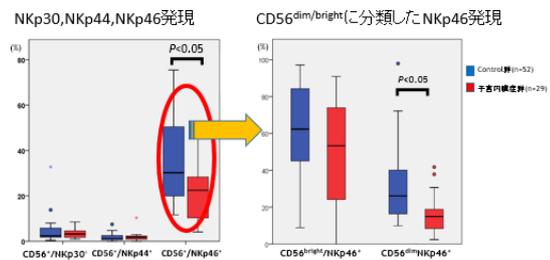


図1. 腹水NK細胞のNCR発現

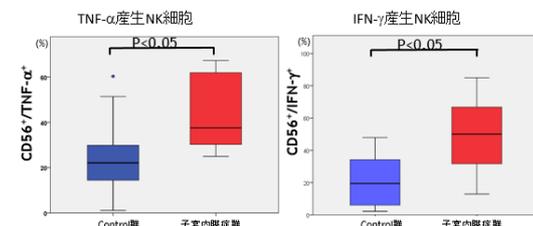


図2. 腹水のNK細胞サイトカイン産生

## (2) 子宮内膜症に対する低用量エストロゲンプロゲステン製剤(LEP)治療による末梢血・腹水中NK細胞NCR発現とサイトカイン産生についての検討

当初は子宮内膜症術後の患者に対するLEP製剤投与での変化を検討する計画であったが、(1)の検討により子宮内膜症群とコントロール群で末梢血中のNK細胞NCR発現、サイトカイン産生に有意差がみられなかったため、術前に子宮内膜症治療(LEP)を行った群(LEP群)、治療を行わなかった群(未治療群)、子宮内膜症を有さなかった群(Control群)において検討を行った。

末梢血中のNK細胞NCRのひとつであるNKp30<sup>+</sup>細胞の割合は、LEP群で未治療群に比して有意に増加していた( $p<0.05$ ) (図3)。腹水中のNKp46<sup>+</sup>細胞の割合は、LEP群で未治療群に比して有意に増加していた( $p<0.05$ ) (図4)。

NK細胞サイトカイン産生については、末梢血において3群間で有意差を認めなかった。腹水中のCD56<sup>dim</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>細胞、CD56<sup>bright</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>細胞およびCD56<sup>bright</sup>/TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>細胞の割合は未治療群でControl群に比して有意に増加しており、LEP群では未治療群に比して低下していた(図5)。それ以外のサイトカイン産生について有意差は認められなかった。

すなわち、子宮内膜症における細胞傷害性や炎症性サイトカインの状態は、LEP使用によって改善される可能性が示唆された。

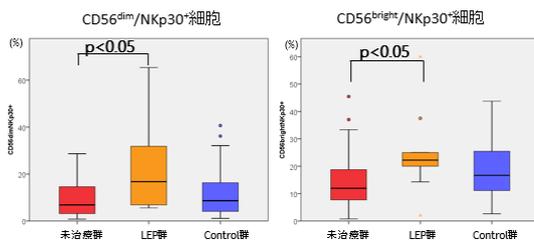


図3. LEPによる末梢血中NKp30<sup>+</sup>細胞の変化

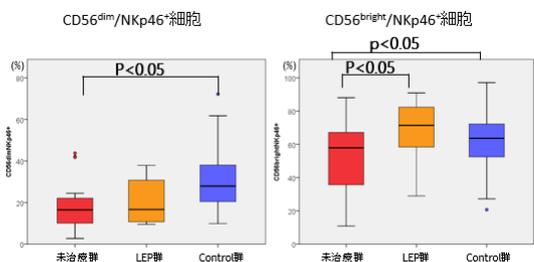


図4. LEPによる腹水中NKp46<sup>+</sup>細胞の変化

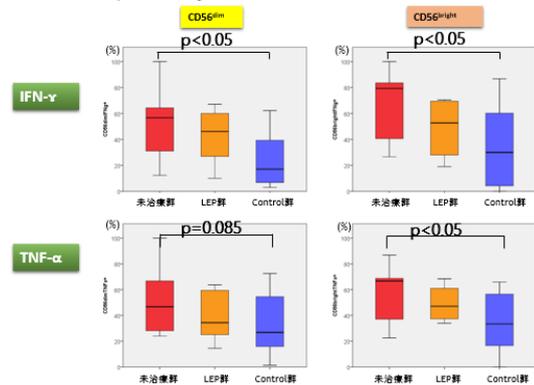


図5. LEPによる腹水中NK細胞サイトカイン産生の変化

## (3) 子宮内膜症における子宮内膜NK細胞NCR発現の検討

術前に患者ごとに月経周期をあわせて子宮内膜を採取することが困難であったため、不妊治療(体外受精胚移植(IVF-ET))を行う患者で検討することとなった。IVF-ETを行う前に子宮内膜症の手術を行った群(Ope群)、子宮内膜症を有したままIVF-ETを行った群(未治療群)、IVF-ETを行う前に子宮内膜症以外の良性疾患の手術を行った群(Control群)において、IVF-ETを行う前周期の黄体中期の子宮内膜を採取し、そのNK細胞NCR発現について、そのIVF-ET成績について検討した。

### IVF-ET成績

卵子回収率はOpe群(76.6%)、Follow群(77.5%)においてControl群(91.7%)に比して有意に低値であった( $p<0.01$ ) (表1)。また、初期胚移植ではVeeck分類の1ないし2を、胚盤胞移植ではGardner分類の3BB以上を良好胚とした場合の良好胚発生率も、Ope群(55.6%)、Follow群(56.7%)ではControl群(84.2%)に比して有意に低値であった( $p<0.05$ )。しかし、胚移植あたりの臨床妊娠率は3群間に有意差を認めなかった。

### 子宮内膜のNK細胞NCR発現

CD56<sup>+</sup>/NKp46<sup>+</sup>細胞の割合は3群間に有意差を認めなかった。

すなわち、子宮内膜症合併不妊症では、子宮内膜NK細胞NCR発現には変化がなく、子宮内膜の受容能よりも受精卵の質の低下が大きく関わっている可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

船水文乃、福井淳史、當麻絢子、淵之上康平、佐々木幸江、中村理果、福原理恵、横山良仁、子宮内膜症における子宮内膜NK細胞Natural Cytotoxicity Receptor発現、日本エンドメトリオーシス学会誌、査読無、38巻、2017、154-157、<http://search.jam.as.or.jp/link/ui/2017357>  
221

船水文乃、福井淳史、淵之上康平、鴨井舞衣、福原理恵、水沼英樹、子宮内膜症に対する LEP 製剤投与による NK 細胞の変化、日本エンドメトリオーシス学会会誌、査読無、37 巻、2016、96-101、<http://search.jam.as.or.jp/link/ui/2016372315>

[学会発表](計 17 件)

Ayano Funamizu, The expression of NKp46 on NK cells in uterine endometrium from infertile women with pelvic endometriosis, American Society for Reproductive Immunology, 2017

船水文乃、子宮内膜症における子宮内膜 NK 細胞 NKp46 発現、日本生殖免疫学会、2017

船水文乃、子宮内膜症患者の子宮内膜 NK 細胞における Natural Cytotoxicity Receptor 発現、日本受精着床学会、2017

船水文乃、子宮内膜症における子宮内膜 NK 細胞 Natural Cytotoxicity Receptor 発現、日本産科婦人科学会、2017

船水文乃、子宮内膜症における子宮内膜 NK 細胞 Natural Cytotoxicity Receptor 発現、日本エンドメトリオーシス学会、2017

船水文乃、子宮内膜症の腹水中 NK 細胞の Natural Cytotoxicity Receptor 発現に対するホルモン療法の影響、日本生殖免疫学会、2016

Ayano Funamizu, Hormonal treatment for women with endometriosis affects expression of Natural Cytotoxicity Receptors on NK cells, American Society for Reproductive Immunology, 2016

船水文乃、子宮内膜症に対するホルモン療法が腹水中 NK 細胞 NCR 発現に与える影響、日本生殖医学会、2016

船水文乃、子宮内膜症患者の腹水中 NK 細胞の NCR 発現に対するホルモン療法の影響、東北生殖医学会、2016

船水文乃、子宮内膜症のホルモン療法が NK 細胞の Natural Cytotoxicity Receptor 発現に与える影響、北日本産科婦人科学会、2016

Ayano Funamizu, Hormonal treatment for women with endometriosis affects expression of Natural Cytotoxicity Receptors on NK cells, Asian Conference on Endometriosis, 2016

船水文乃、子宮内膜症に対する GnRH アゴニスト投与が NK 細胞の NCR 発現に与える影響、日本産科婦人科学会、2016

船水文乃、子宮内膜症に対する LEP 製剤投与による NK 細胞の変化、日本エンドメトリオーシス学会、2016

船水文乃、子宮内膜症患者に対する術前の低用量エストロゲンプロゲステン製剤

(LEP)投与による末梢血中および腹水中の NK 細胞尾における影響、日本受精着床学会、2015

Ayano Funamizu, The change of Natural Cytotoxicity Receptors expression and cytokines production of NK cells in peripheral blood and peritoneal fluid according to severity of endometriosis, American Society for Reproductive Immunology, 2015

Ayano Funamizu, The difference of NCRs expression and cytokine production of NK cells in peripheral blood and peritoneal fluid according to severity of endometriosis, International Federation of Fertility Societies / Japan society for Reproductive Medicine, 2015

船水文乃、子宮内膜症における重症度と末梢血・腹水中の NK 細胞 NCR 発現・サイトカイン産生との関連性について、日本産科婦人科学会、2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船水 文乃 (FUNAMIZU, Ayano)  
弘前大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：50623766

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

福井 淳史 (FUKUI, Atsushi)  
福原 理恵 (FUKUHARA, Rie)  
當麻 絢子 (TAIMA, Ayako)