

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20152

研究課題名(和文) 腹腔内環境をターゲットとした子宮内膜症の内分泌療法を脱却した新規治療薬の開発

研究課題名(英文) The development of new treatment for endometriosis using non hormone therapy targeting intraperitoneal environment.

研究代表者

伊藤 史子 (ITO, Fumiko)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90648271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症患者の腹水中に、GM-CSF、IL-1、IL-2、IL-8、IP-10、MIP-1、RANTES、TNF- $\alpha$ 、sTREM-1が増加し、いずれも 期と比較して 期に増加していた。GM-CSFはマクロファージと子宮内膜間質細胞(ESC)にそのレセプター発現がみられ、濃度依存性にESCの細胞増殖を促進したことから、内膜症の病態形成における腹腔マクロファージとESCの相互作用に重要な因子であると考えられた。ESCの増殖に関わる転写因子Stat3の活性化は、天然化合物Corosolic acidによって抑制され、内膜症に対するStat3をターゲットとした治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The results of the cytokine array showed up-regulated IL-1, IL-2, IL-8, IP-10, MIP-1, RANTES, TNF- $\alpha$  and sTREM-1 production in ascites of endometriosis patients. GM-CSF and GM-CSF receptor mRNAs were expressed on macrophages and ESCs, and GM-CSF significantly and dose-dependently induced ESCs proliferation. GM-CSF may be associated with interaction between ESCs and macrophages in development of endometriosis. Corosolic acid, a triterpenoid compound, inhibited ESC proliferation and Stat3 activation. Targeting Stat3 signals or the regulation of macrophage function may aid the treatment of patients with endometriosis.

研究分野：産科婦人科学

キーワード：子宮内膜症 腹腔マクロファージ 子宮内膜間質細胞

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は生殖期女性の約 10%が罹患している婦人科良性疾患で、エストロゲン感受性疾患であることから、内分泌療法や手術療法が主流ではある。しかし、多くの場合は治療中や治療後に症状の再燃がみられる。従って、本疾患の病態を究明し、薬物治療による長期的な病態改善こそが最も重要な課題である。

内膜症の発生については未だ不明な点が多いが、経卵管性に逆流する月経血に含まれる子宮内膜上皮あるいは子宮内膜間質細胞 (ESC) が関与するという子宮内膜移植説が有力であり、近年、内膜症患者の子宮内膜の機能の変化が病態の発生や進展に寄与するとの報告もみられる。子宮内膜を構成する細胞の中でも ESC は、多種のサイトカインを産生し、月経や妊娠成立などの生理的機能に深く関与する。また、我々は内膜症患者の腹腔マクロファージが増加し、M2 マクロファージのマーカーである CD163 を用いた免疫細胞化学染色を行った結果、M2 マクロファージが増加していることを明らかとした。その他、マクロファージの貪食能や抗原提示能が低下しているとの報告もあり、腹腔マクロファージは内膜症の病巣の形成や進展に深く寄与すると考えられる。

2. 研究の目的

内膜症では、腹腔マクロファージが増加・活性化し、腹腔内環境に影響を与えることで、内膜症の初期病巣の形成やその後の進展に関与することが示唆されているが、その詳細な機序については未だ不明な点が多い。

本研究では2種類の活性化型マクロファージ (M1 ならび M2) に着目し、内膜症患者で増加している腹腔 M2 マクロファージと、腹腔内で共存する子宮内膜間質細胞 (Endometrial stromal cell: ESC) との細胞間相互作用が、内膜症の病巣形成や進展に深く関わる可能性について検討することで、内膜症における腹腔マクロファージの関与について明らかにすること、またマクロファージと ESC の相互作用に注目し、内膜症の新たな治療薬を探索することを最終的な目的とした。

具体的な研究項目は、(1)内膜症の発生や進展における腹腔M2マクロファージとESCの細胞間相互作用によって生じる腹腔内環境の変化を検証する、(2)この相互作用を担う重要な因子を同定し、新規治療のターゲットとする。

3. 研究の方法

(1)腹腔M2マクロファージとESCの細胞間相互作用を *in vitro* に再現し、内膜症の発生や進展に関わる腹腔内環境を検証する。具体的には、子宮内膜症患者とコントロールとして子宮筋腫患者より採取した腹水中のサイトカインについて評価を行った。次に、

末梢血単球より分化をさせた M2 マクロファージと子宮内膜より分離した ESC を共培養し、共培養下の両細胞の機能変化や培養上清のサイトカイン変化を解析し、さらに相互作用に関わるシグナル分子について探索・同定を行った。

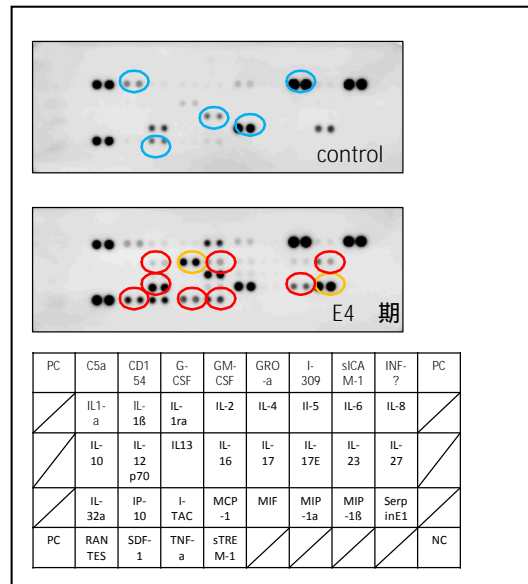
(2)の結果から得られたマクロファージとESCの相互作用に関わる重要な因子を制御する薬物を用いて、*in vitro*でのマクロファージやESCに与える影響、および内膜症モデルマウスに対する内膜症病巣の発生および増殖抑制効果を検証した。

4. 研究成果

(1)腹腔マクロファージと子宮内膜間質細胞の相互作用に関わる因子の探索

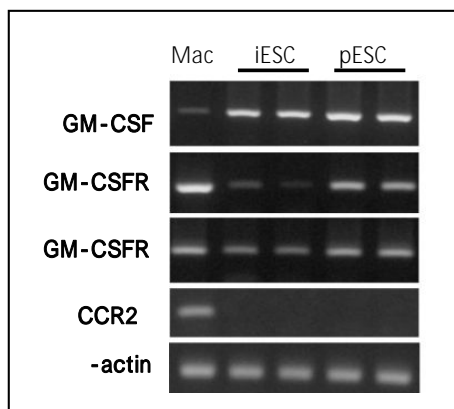
これまで我々の研究で、腹腔マクロファージとESCの共培養上清においてGM-CSF、IL-1RA、MCP-1、RANTESがそれぞれの単培養上清よりも増加した。今回、子宮内膜症患者の腹水中に含まれるサイトカインについてサイトカインアレイを用いて検討を行った。36種類のサイトカイン・ケモカインの検出が可能なサイトカインアレイを用いて、子宮内膜症(期、期)コントロールとして子宮筋腫の患者の腹水の評価を行った。

その結果、コントロール群と比較して、GM-CSF、IL-1、IL-2、IL-8、IP-10、MIP-1、RANTES、TNF-、sTREM-1の発現が増加していた。いずれも期と比較して期に強い発現がみられたことから、これら因子は子宮内膜症の初期の段階の形成に関わる可能性が示唆された。



次に、マクロファージから産生させることで知られている GM-CSF の作用について検討する目的で、GM-CSF ならびにそのレセプターの有無について、マクロファージおよび ESC における発現を評価したところ、GM-CSF ならびに GM-CSF レセプターは両者に強い発現がみられた。また、これは不死化 ESC と

比べ primary ESC により強い発現がみられた。



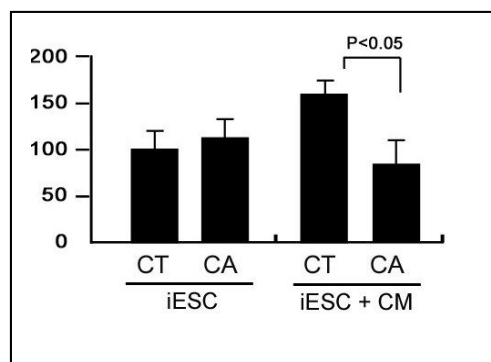
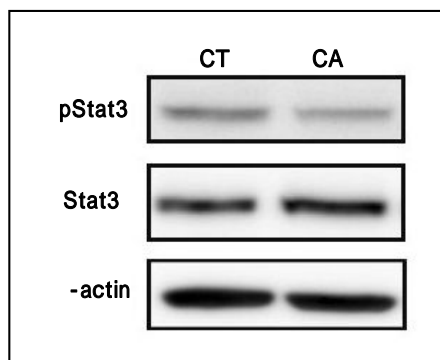
この結果より GM-CSF がマクロファージと ESC の相互作用に関わる可能性が示唆されたことから、次に GM-CSF が ESC に及ぼす影響について検討した。

GM-CSF は濃度依存性に ESC の細胞増殖を促進したが、GM-CSF に対する中和抗体を添加しても ESC の増殖は抑制されなかった。また、我々の先の実験で ESC の増殖に Stat3 の活性化に関わることを明らかにしていることから、GM-CSF 投与による Stat3 活性化の有無をウェスタンブロットで解析したが、GM-CSF 投与による ESC の Stat3 活性化は本検討においては確認されなかった。

## (2) Corosolic acid の作用

Stat3 をターゲットとした子宮内膜症の新たな治療の可能性を検討する目的で、天然化合物 Corosolic acid 用いた研究を行った。Corosolic acid は、バナバ茶やリンゴなどに含まれる成分で、Stat3 活性化を強く抑制し、M2 マクロファージの誘導を抑制することが報告されている。今回、Corosolic acid の ESC に及ぼす作用を検討した。ESC は、単培養条件では Stat3 が活性化されていないため、マクロファージとの共培養液を添加した状態で corosolic acid を添加し、ESC の Stat3 の活性化や細胞増殖を評価した。

その結果、ESC の Stat3 活性化は抑制され、有意に ESC の細胞増殖が抑制された。この結果から、Stat3 をターゲットとした薬物が、マクロファージと子宮内膜間質細胞の細胞間相互作用を制御する可能性が示唆されました。



## 内膜症モデルマウスの作成

我々の研究成果より得られた内膜症の病巣形成に関わるサイトカインや分子シグナル因子をターゲットとした内膜症治療薬探索のため、モデルマウスの作成を行った。

8~10w の Balb/c wild mouse を用いて、内膜症モデルマウスの作成を行った。エストラジオール  $3\mu\text{g}$  を投与後 8 日目のドナーマウスより腫大した子宮を摘出し、子宮を細断、断片化した。レシピエントマウスの腹腔内に同組織を投与し、2 週間後に病巣形成の有無を評価した。その結果、腹膜および腸間膜表面に出血斑、嚢胞性病変、結節性病変が確認された。組織学的にヒト内膜症と同様に腺管構造を作る子宮内膜上皮とそれを取り囲む薄い間質、新生血管で構成されていたことから、内膜症が形成されることを確認した。しかし、病巣の形態や大きさ、発生部位にばらつきが大きかったため、病巣の定量化のための内膜症の作成方法を検討した。

次に、モデルマウスの病巣の定量化のため、移植する子宮片のサイズの大きさ（子宮内膜のみ、子宮筋層を含む）、子宮片の投与方法（腹腔内投与と腹膜縫い付け法）、ホルモン負荷（レシピエントマウスの E2 投与量）の条件を変えて検討を行った。その結果、子宮内膜のみでの投与では病巣はできず、子宮筋層を含めた縫い付け法が最も病巣のサイズが大きく形成されたが、その反面、手術操作に伴う腹腔内癒着のため観察が困難となる症例が多くなった。本研究期間中に、内膜症コントロールとして病巣評価として一定の条件を設定できなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕なし

〔学会発表〕なし

〔図書〕なし

〔産業財産権〕なし

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 史子 ( ITOH, Fumiko )  
熊本大学・大学院生命科学研究部  
産科婦人科学・助教  
研究者番号：90648271

(2) 連携研究者

片淵 秀隆 ( KATABUCHI, Hidetaka )  
熊本大学・大学院生命科学研究部  
産科婦人科学・教授  
研究者番号：90224451

本田 律生 ( HONDA, Rituo )  
熊本大学・大学院生命科学研究部  
産科婦人科学・講師  
研究者番号：10301376

(3)研究協力者

坪木 純子 ( TUBOKI, Junko )  
熊本大学医学部附属病院 地域医療・総合  
診療実践学寄付講座  
研究者番号：70772408