

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11274

研究課題名(和文) 腹膜に着目した子宮内膜症発症機序の解明

研究課題名(英文) Investigation for the peritoneal factor in development of peritoneal endometriosis

研究代表者

谷 洋彦 (Tani, Hirohiko)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70615252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究期間において腹膜因子投与による影響の検証をin vivoで行った。結果、腹膜因子versicanは生着に必要とされる期間の連日に渡る腹腔内投与で子宮内膜症の病巣形成を増大させることが確認された。これによりマイクロアレイ、in vitroでの検証により腹膜因子として抽出された分子がin vivoでの病巣形成に関与することが確認され、またその作用が子宮内膜組織の接着が行われる時期の一時的な発現増強によるものではなく、腹腔内に内膜組織が生着するまでの持続した発現によるものである可能性が示唆された。またこの因子の発現がエストロゲン非依存的に調整されることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究期間において腹膜因子であるversicanの子宮内膜症形成への関与をin vivoでの検証結果が得られ、versicanの発現がエストロゲン非依存性であることが示された。これらにより腹膜因子が子宮内膜症形成に関与することがより強く示唆され、一連の検証モデルが他の腹膜因子検証に用いることができる確証が得られた。

研究成果の概要(英文)：To investigate possible roles of peritoneal versican in the development of endometriosis using mouse model. Mouse model of developing endometriosis was prepared by intraperitoneally administration of endometrial tissue collected from donor mice to C57BL/6 8- to 9-week-old recipient mice. V1-CM or control-CM was intraperitoneally injected to model mice for continuous 5 days. Intraperitoneal endometriotic lesions were macroscopically confirmed. Experiments were approved by the Committee of the Institute for Animal Experimentation of Kyoto University Hospital. Results: Endometriotic lesions were observed in the peritoneal cavity of all mice. The total volume of the endometriotic lesion was significantly larger in V1-CM group than in the control group. Conclusions: Our results suggest that peritoneal versican is involved in the development of peritoneal endometriosis.

研究分野：産科婦人科

キーワード：腹膜因子 子宮内膜症 in vivo エストロゲン非依存性 持続分泌 生着期

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究は、子宮内膜症を発症している女性の肉眼的に正常と判断される部分の腹膜(肉眼的正常腹膜)と、子宮内膜症を発症していない女性の肉眼的正常腹膜との間でマイクロアレイ解析を行い腹膜内膜症形成に關与する腹膜因子を抽出し、これをターゲットとする新規治療法を開発することを目的としている。研究者らはこれまでに子宮内膜症を有する群において発現が上昇している分子の抽出(図1)を行い、その中のひとつである versican に着目し、子宮内膜症を発症する女性の臨床腹膜サンプルにおいて versican の発現がメッセージレベル、蛋白レベルのいずれにおいても増強していること、*in vitro* の実験系で子宮内膜細胞の腹膜への接着・浸潤に versican が強く關与している可能性を見出した(Tani H. JCEM 2016)。



2. 研究の目的

本研究の目的は、腹膜内膜症を発症する女性の肉眼的に正常な腹膜における分子学的特徴を検討することで、その発症の初期段階に寄与する因子を見出し、最終的に腹膜子宮内膜症に対する新しい内科的治療法を開発することである。

3. 研究の方法

肉眼的正常腹膜サンプルを用いた腹膜因子の検討

申請者はこれまでに骨盤腹膜に内膜症病変を有する内膜症腹膜群に有意に高発現している腹膜因子として versican の機能を検証することで内膜症の発症に対する腹膜因子の關与の可能性を強く示唆する結果を得ることができた。しかし、これまでに行った予備的なマイクロアレイ解析では、この手法の妥当性を探る目的で最小限のサンプル数(各4例ずつ)しか用いておらず、腹膜因子のすべてが抽出されたとは考えていない。そこでさらに多くの内膜症の発症に關与する腹膜因子の抽出を目指して研究開始当初より継続して蓄積してある肉眼的正常腹膜サンプルのすべてを用いてマイクロアレイ解析を行う。

1) 肉眼的正常腹膜サンプルを用いたマイクロアレイ解析

申請者は倫理委員会の承認と患者の同意のもと、良性婦人科疾患手術の際に、開腹腹壁直下もしくは腹腔鏡ポート刺入部直下の肉眼的に内膜症病変の存在しない腹膜の小片をサンプリングしている。これらを術中所見で骨盤腹膜に内膜症病巣があった群(内膜症腹膜群)と内膜症病巣のなかった群(非内膜症腹膜群)との2群に分ける。各群の mRNA を Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix 社)によるマイクロアレイに供し、得られた遺伝子発現プロファイリングを解析ソフト SAGx により samroc 法を用いてその差異を解析する。

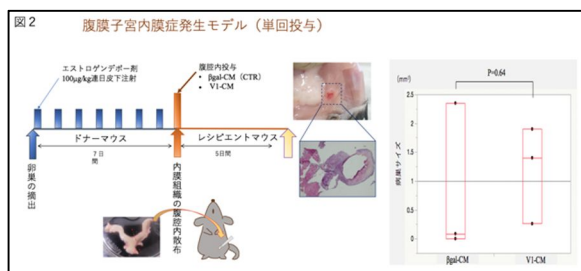
マウス自家子宮移植による腹膜内膜症 *in vivo* モデルを用いた検討

逆流子宮内膜組織モデル：具体的には C57 BL/6 マウスの片側子宮角を摘出し、この摘出子宮の内膜組織を細切（自家子宮内膜）、腹腔内に散布し、子宮内膜症病巣を形成する。同時に散布当日よりマウス腹腔内へ腹膜因子を腹腔内投与する。

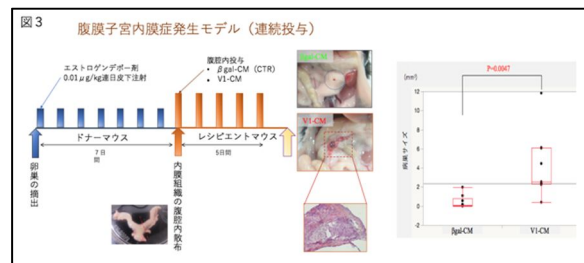
1) 接着能への影響の評価：子宮内膜の腹腔内散布・腹膜因子投与 5 日後のマウス腹膜表面の 1. 病巣の個数、2. 病巣のサイズについて検討する。

4. 研究成果

本研究期間において研究者らは *in vitro* モデルでの検証結果をさらに発展させる目的で C57BL/6 マウスの自家子宮移植による内膜症発症モデル (Kobayashi.Reprod Med Biol 2011) への腹膜因子投与による影響の検証を *in vivo* で行った。結果、腹膜因子 versican は子宮内膜組織が逆流する初期(具体的には組織散布の初日のみ)に短期的に存在する形では子宮内



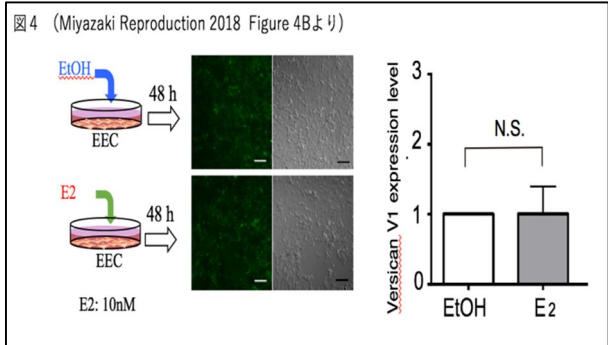
膜症の病巣形成は増大させなかった(図 2)が、生着に必要とされる期間(組織散布より 5 日間) versican の腹腔内投与を連日で行い一定の濃度を維持する条件とした場合、子宮内膜症の病巣形成を増大させること(図 3)が確認された。これによりマ



イクロアレイ、*in vitro* での検証により腹膜因子として抽出された分子が *in vivo* での病巣形成に関与することが確認され、またその作用が子宮内膜組織の接着が行われ

る時期の一時的な発現増強によるものではなく、腹腔内に内膜組織が生着するまでの持続した発現によるものである可能性が示唆された。

また研究者らはマイクロアレイで見出した versican が細胞間の接着、特に子宮内膜上皮細胞においても関与するという点を、着床モデルを用いた検証から明らかにし、その過程において versican の子宮内膜上皮細胞における発現上昇がエストロゲン非依存性であること(図 4)を証明した (Miyazaki. Reproduction



2018)。最もエストロゲンが強く作用する細胞のひとつである子宮内膜上皮細胞においてさえ、腹膜因子と位置づける versican がエストロゲンの支配を受けないというこの事実は、腹膜因子 versican をターゲットとしたアプローチが子宮内膜症に対し従来行われてきたエストロゲン依存性を利用した治療と独立して行うことができる可能性を示唆している。

今後、本期間で新たに得られた腹膜サンプルを用い、2019年度までに行ったマイクロアレイ解析(内膜症の影響を受けない臍近辺の肉眼的に正常な腹膜:P、ダグラス窩の正常な腹膜:D)について内膜症を発症する女性:内膜症群、内膜症を発症しない女性:非内膜症群との間で比較検討(各群 n=6 ずつ)から得られた腹膜の局在場所によらず子宮内膜症群の腹膜で常に発現が上昇している遺伝子を単一分子レベル(図5)、GOtermレベル(図6)で抽出し、その役割を *in vitro*、*in vivo* の両面から検討する予定である。

その結果得られる子宮内膜症が発症する腹膜において持続して発現上昇している腹膜因子のうち、内膜症発症に関与する分子の中から最も効果的に治療対象となり得るものを選択しそれをターゲットとした新規治療を開発する。

図5 内膜症腹膜において発現変動する遺伝子(数)

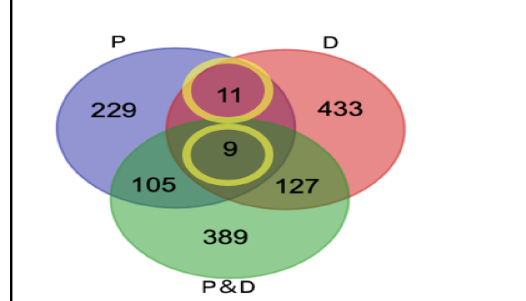
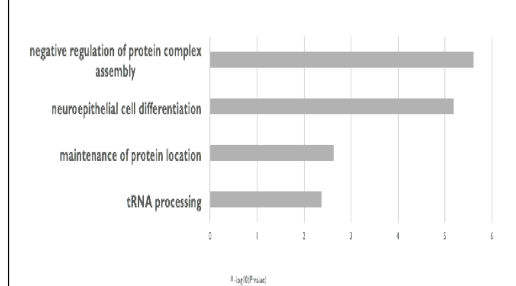


図6 内膜症の有無で変動するGO



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 下仲 慎平、伊藤 美幸、古武 陽子、北脇 佳美、寒河江 悠介、上田 匡、谷 洋彦、堀江 昭史、万代 昌紀
2. 発表標題 当院における子宮内膜症を有する不妊治療患者への治療アルゴリズム化を目指して
3. 学会等名 第28回 近畿エンドメトリオーシス研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷 洋彦
2. 発表標題 子宮内膜症の形成における腹膜因子の働きについて-Versicanに着目した発生機序へのアプローチ
3. 学会等名 子宮内膜症 若手医師セミナー in 米子 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hirohiko Tani
2. 発表標題 Role of versican as a peritoneal factor in the development of endometriosis
3. 学会等名 The 4th Congress of the "Society of Endometriosis and Uterine Disorders" (SEUD) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷 洋彦
2. 発表標題 「腹膜因子 versican に着目した子宮内膜症形成の検討」
3. 学会等名 第 10 回 JAPAN ENDOMETRIOSIS FORUM (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirohiko Tani
2. 発表標題 Role of versican as a peritoneal factor in the development of endometriosis
3. 学会等名 11th International Conference on Proteoglycans (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 幸保 (Sato Yukiyasu) (00508236)	京都大学・医学研究科・非常勤講師 (14301)	
研究分担者	伊藤 美幸 (Ito Miyuki) (00760951)	京都大学・医学研究科・特定病院助教 (14301)	
研究分担者	堀江 昭史 (Horie Akihito) (30535836)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	