

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09260

研究課題名(和文) 生物発光モデルマウスを用いた子宮内膜症治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Exploring the target molecules for endometriosis therapy using bioluminescence model mice

研究代表者

谷口 文紀(TANIGUCHI, Fuminori)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：40322218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜移植説に基づいて開発したライブイメージング可能な発光・子宮内膜症モデルマウスを用いて、経時的な病変の発症・進展機序を解析した。移植した子宮内膜組織が恒常的に発光する生物発光マウスを得た。非侵襲的に体外から観察可能なIVISシステムにより、子宮内膜症組織の母地となる移植された子宮内膜組織の経時的動態解析を行い、初期段階からの発光組織数・発光量・接着位置を体外から経時的に観察し、重要な腹膜由来因子テネシンを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜症は子宮内膜に類似した組織が、子宮以外の部位に発生する疾患である。子宮内膜症組織は増殖・浸潤することにより周囲臓器と癒着を形成し、月経困難症や不妊の原因となる。生殖年齢女性の約10%、不妊患者の約50%と罹患率の高い疾患であるにも関わらず、初期病変の発生原因および接着・進展については本質に迫ることができていない。子宮内膜症の発症初期段階における局所の細胞生着・浸潤を切り口にした本研究成果は意義深い。

研究成果の概要(英文)：Using a luminescent and endometriosis model mouse with live imaging capability developed based on the endometrial transplantation theory, we analyzed the mechanism of lesion onset and progression over time. We obtained bioluminescent mice in which the transplanted endometrial tissue permanently emits light. The number of luminescent tissues, the amount of luminescence, and the position of adhesion from the initial stage were observed over time from outside the body, and an important peritoneal-derived factor, tenascin, was found.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮内膜症 疾患モデルマウス 発光マウス

1. 研究開始当初の背景

厚生省の調査によると、わが国の月経痛に悩む女性は推定 900 万人とされる。疼痛と不妊を主症状とする子宮内膜症は、少子化に伴い受療率は増加している。月経痛を有する思春期女性の大半が初期段階の子宮内膜症を有すること、血管内皮機能を障害する全身性の組織炎症が特徴であることが注目され、生涯を通じて影響を及ぼす慢性疾患であると捉えられている。子宮内膜症は子宮内膜に類似した組織が、子宮以外の部位に発生する疾患である。子宮内膜症組織は増殖・浸潤することにより周囲臓器と癒着を形成し、月経困難症や不妊の原因となる。その病因については、炎症・内分泌・免疫に関連する腹腔内の局所環境が発症・進展において重要であるとされ、生着する子宮内膜あるいは病変形成後の子宮内膜症組織に着目した研究がなされてきた。

本症の治療薬は内分泌製剤であり、一定の効果が得られるものの適応症例の限定や使用期間の制限があり、根本的な薬物療法は確立されていない。生殖年齢女性の約 10%、不妊患者の約 50% と罹患率の高い疾患であるにも関わらず、初期病変の発生原因および接着・進展については本質に迫ることができていないのが現状である。

約 10 年前より開発した子宮内膜症モデルマウスでは、ヒト初期病変に酷似した病巣組織がみられ、これまでに病巣組織における数種類の新規薬剤の抗炎症ならびに増殖抑制効果を示した。主に 1 ヶ月間の薬剤投与後に摘出した病変組織を解析し、効果と安全性を検討したが、開腹後に病変組織を摘出することから、子宮組織移植から数日で確認される初期病変の腹膜組織への生着・進展過程を経時的に観察することは不可能であった。その解析には、同一動物を体外から視覚的に観察できる実験系の構築が必須である。子宮内膜症組織の腹膜への接着部位では、炎症性サイトカインをはじめとする炎症関連物質やエストロゲンの関与が示唆されているものの、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

本症の発生仮説として、逆流月経血中の子宮内膜組織が骨盤腹膜に生着・浸潤するという「子宮内膜移植説」が広く受け入れられているが、核心に迫る定説は提唱されていない。生殖年齢女性の約 90% に月経血逆流がみられるのに、なぜ約 10% にしか発症しないのかという疑問に明確な答えはない。国内外で子宮内膜症モデル動物やヒト子宮内膜症培養細胞を用いた研究が散見されるが、いずれを用いても発症初期の経時的な解析は不可能である。

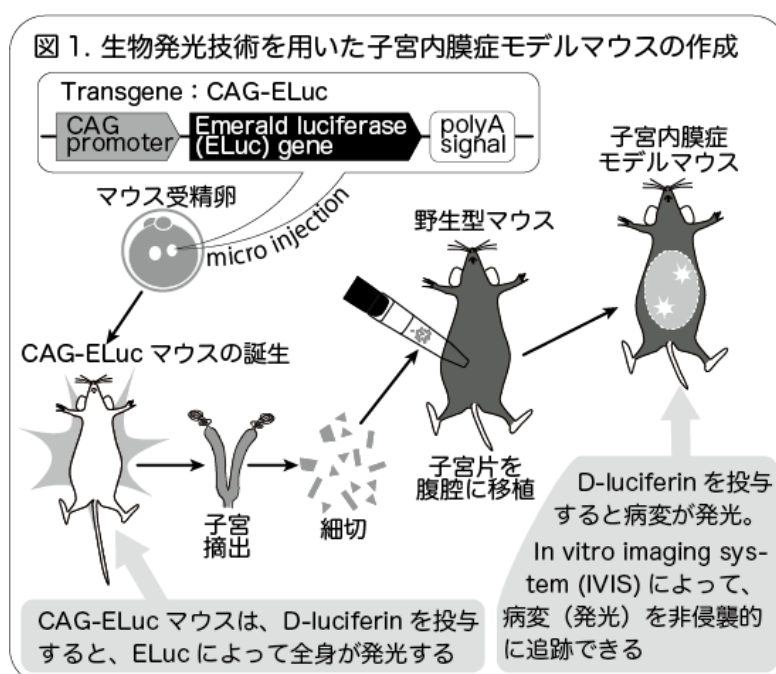
本研究では、「子宮内膜移植説」に基づいて初期病変の観察目的に開発した生物発光モデルマウスを用いて、子宮内膜症の初期段階における局所の細胞生着・浸潤を切り口にした発症機序ならびに標的分子の探索を行うことにより、新規治療薬開発の基盤となる知見を追求する。

3. 研究の方法

前核期のマウス受精卵にマイクロインジェクションで遺伝子導入したのちに偽妊娠マウスに胚移植・出産させることにより、独自に開発したトランスジェニックマウスを作製した。CAG とエメラルド・ルシフェラーゼ遺伝子の導入により、生物発光マウスを得た。このマウスの子宮内膜組織を摘出・細切し、8 週齢の野生型マウスの腹腔に移植することにより、接着部位で恒常的に発光する子宮内膜症様病変の形成過程が確認できた(図 1)。体外から、発光画像解析システム (in vivo imaging system: IVIS) を用いて解析する。

また、エストロゲン依存性疾患である本症の病態を模倣する目的でエストラジオールを投与し、状態での初期病変における影響(病変組織の個数と重量)について検討した。

腹膜組織の検討では、病変辺縁から径 2mm までの腹膜組織を病変周囲腹膜(PAC)とした。対照は、病変部位から離れた背側の腹膜組織(PE)とした(図 2)。子宮移植後より 3 日目におけるマウス腹膜組織から抽出した total RNA を混合し、各組織由来



の cDNA を得た。DNA アレイを用いて、接着・浸潤因子の遺伝子解析を行った。その結果を基に、RT-PCR で遺伝子発現検索を行った。

4. 研究成果

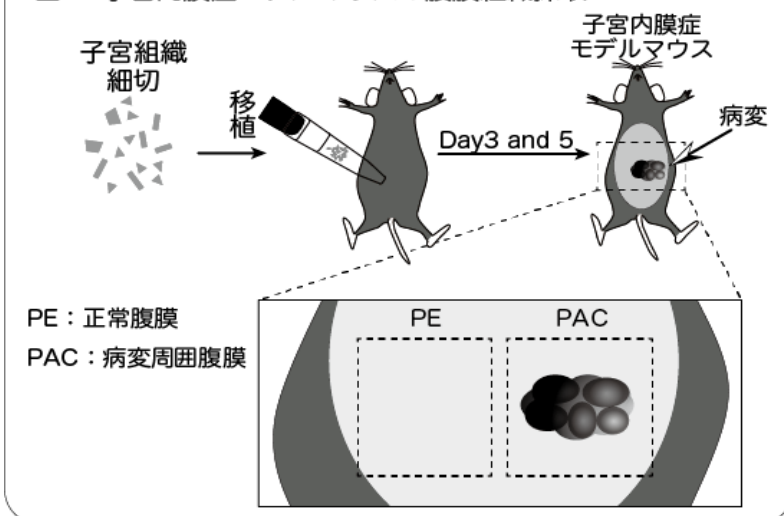
CAG-EIuc 発光トランスジェニックマウスの作製に成功した。IVIS によって観測することにより、発症初期の病変の存在とその位置を非侵襲的に追跡することが可能である。生物発光モデルは安定して作成可能であり、経時的な発症・進展機序と分子発現を解析可能である。

初期病変の接着は主に、下腹部の腹膜切開部、脂肪組織および膵臓表面にみられた。

マウスへのエストラジオール投与により、病変サイズの増加を認めた。PE に比して、PAC において強発現を呈する因子を抽出した。PAC において高発現を示す分子として、上皮間葉転換分子やセレクチン、インテグリン、マトリックスメタロプロテアーゼなどを検出し、なかでもテネイシン C の著しい発現増強を認めた。Day3 の病変周囲腹膜組織では、対照の腹膜組織に比して E カドヘリンの減少および N カドヘリンの増加を認め、上皮間葉転換の関与が示唆された。テネイシン C 遺伝子は、病変周囲腹膜組織において 10 倍以上の発現増強が認められた。

マウス子宮内膜症初期病変の周囲腹膜において、テネイシン C の発現が増強していることが明らかとなったことより、テネイシン C は、子宮内膜症の発症初期段階における子宮内膜細胞の細胞接着・浸潤におけるキーファクターであることが示唆された。本実験系は、創薬に向けたアッセイ系としても利用可能であり、将来のトランスレーショナル・リサーチに向けた基盤ツールとなる。

図 2. 子宮内膜症モデルマウスの腹膜組織採取



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagira Kei, Taniguchi Fuminori, Nakamura Kazuomi, Tokita Yohei, Tsuchiya Naoko, Khine Yin Mon, Harada Tasuku	4. 巻 82
2. 論文標題 Tokishakuyakusan, a Kampo medicine, attenuates endometriosis like lesions and hyperalgesia in murine with endometriosis like symptoms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/aji.13182	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Osaku Daiken, Taniguchi Fuminori, Moriyama Maako, Sato Shinya, Oishi Tetsuro, Harada Tasuku	4. 巻 2019
2. 論文標題 Retroperitoneal Endometrioid Carcinoma Arising from Ureteral Endometriosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Case Reports in Obstetrics and Gynecology	6. 最初と最後の頁 1~4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/9273858	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Izawa Masao, Taniguchi Fuminori, Harada Tasuku	4. 巻 81
2. 論文標題 GATA6 expression promoted by an active enhancer may become a molecular marker in endometriosis lesions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 e13078 ~ e13078
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/aji.13078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Harada Takashi, Taniguchi Fuminori, Amano Hiroki, Kurozawa Youichi, Ideno Yuki, Hayashi Kunihiko, Harada Tasuku, Japan Environment and Children's Study Group	4. 巻 14
2. 論文標題 Adverse obstetrical outcomes for women with endometriosis and adenomyosis: A large cohort of the Japan Environment and Children's Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0220256	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Khine Yin Mon, Taniguchi Fuminori, Nagira Kei, Nakamura Kazuomi, Ohbayashi Tetsuya, Osaki Mitsuhiro, Harada Tasuku	4. 巻 80
2. 論文標題 New insights into the efficacy of SR-16234, a selective estrogen receptor modulator, on the growth of murine endometriosis-like lesions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 e13023 ~ e13023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aji.13023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Izawa Masao, Taniguchi Fuminori, Harada Tasuku	4. 巻 81
2. 論文標題 GATA6 expression promoted by an active enhancer may become a molecular marker in endometriosis lesions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 e13078 ~ e13078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aji.13078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Fuminori Taniguchi
2. 発表標題 Tokishakuyakusan, a Kampo medicine, attenuates endometriosis like lesions and hyperalgesia in murine with endometriosis like symptoms
3. 学会等名 第8回Asian conference on endometriosis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fuminori Taniguchi
2. 発表標題 Obstetrical complications in women with endometriosis: A cohort study in Japan
3. 学会等名 第5回Congress of the society of endometriosis and uterine disorder (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口文紀 太田郁子 井庭裕美子 戸田稔子 大島順恵 田頭由紀子 栗岡裕子 東幸弘 原田省
2. 発表標題 The efficacy and safety of dydrogesterone for treatment of dysmenorrhea: an open label multicenter clinical study
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口文紀 原田 省
2. 発表標題 マウス子宮内膜症モデルにおける新規選択的エストロゲン受容体調節剤の効果
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口文紀
2. 発表標題 本邦における子宮内膜症の癌化の頻度と予防に関する疫学研究
3. 学会等名 第40回日本エンドメトリオーシス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 カイインモン、谷口文紀、原田 省
2. 発表標題 New insights into the efficacy of SR-16234, a selective estrogen receptor modulator, on the growth of murine endometriosis-like lesions.
3. 学会等名 日本産科婦人科学会
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	原田 省 (HARADA Tasuku) (40218649)	鳥取大学・医学部・教授 (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------