

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16808

研究課題名(和文)子宮内膜症における制御性T細胞による免疫制御機構と病因病態への関与の解明

研究課題名(英文)Exacerbation of endometriosis due to regulatory T cell dysfunction.

研究代表者

田中 佑輝子(Tanaka, Yukiko)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：50806297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症は慢性炎症性疾患と言われているが、免疫抑制能を持つ制御性T細胞(Treg)の子宮内膜症への関与についての報告は少ない。Tregの子宮内膜症への影響を調べるために、Tregが一時的に減少するFoxp3DTRマウスを用いて子宮内膜症モデルマウスを作成した。マウスモデルでは、Tregを減少させた群では対照群と比較し、有意に子宮内膜症様病変の重さと数が増加し、炎症性サイトカインや血管新生因子が有意に上昇した。この結果よりTregの減少がeffector T細胞やマクロファージを活性化させ炎症性サイトカインや血管新生因子を増加させることによって子宮内膜症の増悪をもたらす可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜症ではeffector T cellや炎症性サイトカインの増加により免疫応答が生じており、またTregの増加による免疫寛容が子宮内膜の異所性着床を促すのではないかと考えられてきた。この免疫寛容と免疫応答が同時に同部位で生じている矛盾に対しては大きな謎とされてきたが、我々の研究により、子宮内膜症ではTregが減少しており、免疫応答が活性化し、炎症によって子宮内膜症が悪化することが示唆された。これは我々が初めて報告した新たな知見である。

研究成果の概要(英文)：Endometriosis is a chronic inflammatory disorder that is associated with the altered immune response. Regulatory T cells (Treg) play a key role in maintaining immune homeostasis. Here we demonstrate the role of Treg in endometriosis. A mouse model of endometriosis was made by transplanting donor mouse uterine fragments into the abdominal cavity of recipient mice. Foxp3DTR mice were used as Treg cell-depleted model. In Foxp3DTR mice, the number and weight of endometriotic lesions, and the level of inflammatory cytokines and growth factor were significantly increased compared with those in control mice. An enhanced inflammatory response caused by reduced activated Treg cells may be involved in the progression of endometriosis.

研究分野：産婦人科

キーワード：子宮内膜症 制御性T細胞 effector T cell 子宮内膜症モデルマウス 炎症性サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

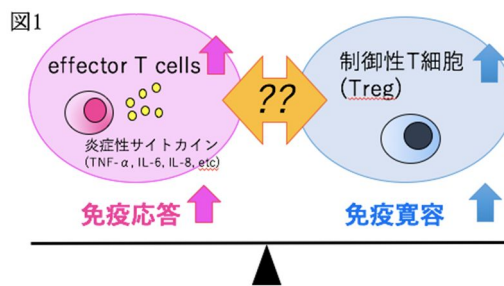
1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は子宮内膜様組織が卵巣、腹膜、骨盤深部などで異所性に増殖する疾患である。月経痛、慢性骨盤痛、不妊、さらには癌化などにより女性の健康を著しく損なう。これまで内分泌療法をはじめとした各種治療法の進歩が認められるものの、その病因・病態機序がまだ明らかではないため、理想的な治療法は確立していない。その発症機序については古くから議論されているが、月経血中の子宮内膜の一部が卵管を通して腹腔内に逆流し生着するという「移植説」は有力な仮説である。しかしながら、ほとんどの女性に月経血の逆流が認められるにもかかわらず、子宮内膜症を発症するのは全体の5-10%に過ぎない。

子宮内膜症病巣における免疫担当細胞の存在様式は正所性子宮内膜と大きく異なることがこれまで数多く報告されており、子宮内膜症の発症・進展にはその細胞の増殖や生存に適した免疫的局所環境が関与していると考えられる。病巣局所に存在するマクロファージやT細胞、大食細胞などの免疫担当細胞と子宮内膜症細胞が産生するサイトカインやケモカインとの相互作用が、炎症を誘導し慢性化させることが明らかになっている。

制御性T細胞(Treg)は免疫応答を抑制するT細胞として知られており、免疫自己寛容に必須の細胞である。子宮内膜症においてもこれまでにこの免疫細胞の存在は示されてきた。Tregのkey markerであるFoxp3の発現を中心に検討され、特に子宮内膜症患者の分泌期でFoxp3発現が増加することから、Tregの増加による免疫寛容が子宮内膜の異所性着床を促すのではないかと考えられてきた。

一方、子宮内膜症病巣局所では先述のようにエフェクターT細胞や炎症性サイトカインの増加により免疫応答が生じており、この免疫寛容と免疫応答が同時に同部位で生じている矛盾に対しては大きな謎とされてきた(図1)。こうした背景の中、Foxp3陽性のTregには免疫抑制能を持たない細胞が含まれており、Foxp3とCD45RAで分画されるCD4⁺CD45⁻Foxp3^{high}細胞(activated Treg)こそが真に免疫抑制能を有していることが報告された¹⁾。この報告はこれまでFoxp3発現解析を中心に行われてきた子宮内膜症免疫研究に一石を投じる極めて重要な研究である。研究代表者らはこの研究を受けてactivated Tregについて着目し病巣におけるその役割を検討した結果、ヒト子宮内膜症病巣や内膜症性子宮内膜においては正常子宮内膜と比較し著明に減少していることを見出した²⁾。本研究ではさらに、Tregによる免疫異常が子宮内膜症病巣に及ぼす影響について検証することで子宮内膜症における免疫学的病態機序を明らかにし、新規療法開発への方向性を明確にする。



2. 研究の目的

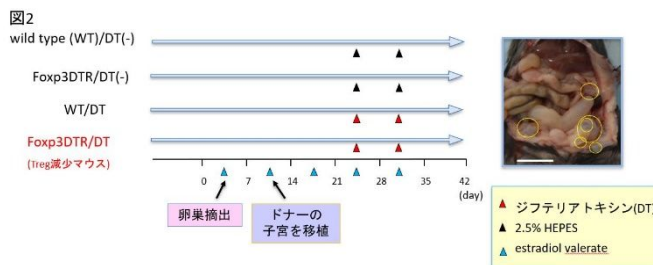
本研究ではTregによる子宮内膜症への免疫制御機構を明らかにすることで子宮内膜症発症・進展についての病態メカニズムを解明する。

我々は、子宮内膜症患者において、病巣局所でactivated Tregが減少していることを明らかにしたが、Tregの減少が子宮内膜症に対して影響があるのかどうかは不明である。そのため、Tregを減少させたマウスモデルを用いて、子宮内膜症の病態に変化があるかどうかを検証する。

3. 研究の方法

Tregを減少させる方法としてFoxp3^{DTR}/DT遺伝子改変マウスを使用する。これはジフテリアトキシン投与によりFoxp3と同時にジフテリアトキシンレセプター(DTR)も発現する結果、Tregを減少させることが可能である。

本研究では当科で確立してきたプロトコルを用いて子宮内膜症モデルマウスを作成する(図2)。6~8週齢のC57BL/6マウスを使用し、1週目にドナーマウスとレシピエントマウスの卵巣を摘出する。以降、1週間毎にエストロゲン筋内投与し、2週目にドナーマウスの子宮を摘出し細切したものをレシピエントマウスの腹腔内に散布する。6週目にマウスをサクリファイし、子宮内膜症性嚢胞の評価をする方法である。Tregを減少させる薬剤であるジフテリアトキシンは5~6週目の期間に投与する。ジフテリアトキシン自体の影響や、マウスの違いによる影響をなくすために、コントロールとして、WT(wild type)/DT(-)、WT/DT、Foxp3^{DTR}/DT(-)の3群を作成する。



Treg減少による発現変化についての影響は、内膜症様嚢胞病変、腹水、血液から採取した検体を用いて、それぞれ分子生物学的手法により解析する。

1. 各免疫担当細胞(エフェクターT細胞、NK細胞、マクロファージ)について、フローサイトメトリーやリアルタイムPCR、ELISA法、免疫組織化学法を用いて検討する。

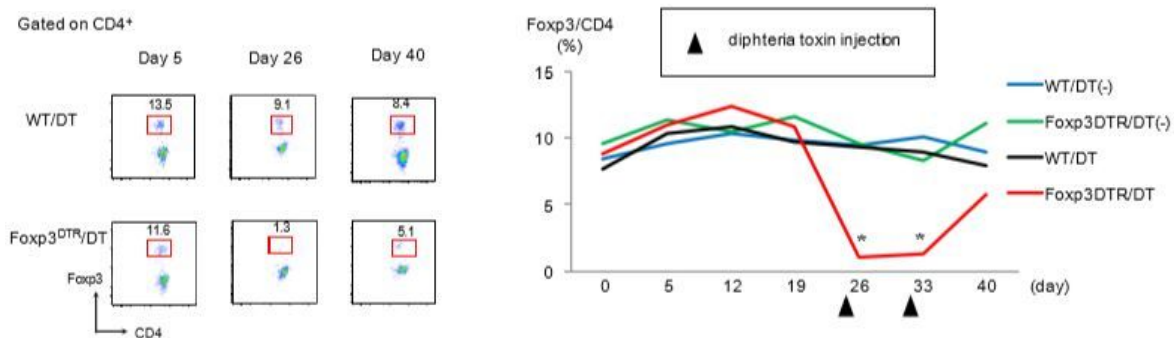
2. 炎症性サイトカイン(IL-6、IL-8、CCL2)や血管新生増殖因子(VEGF)の変化について上

- 記方法にて検証する。
3. 内分泌的環境に与える因子（エストロゲン受容体やプロゲステロン受容体、他）の変化について上記方法を用いて検討する。
 4. 子宮内膜症モデルマウスにおける子宮内膜症様病変について Treg 減少による影響（子宮内膜症病変の大きさ、重さ、体積）を評価する。
 5. 子宮内膜症モデルマウスより採取した病変における細胞増殖能、血管新生能について、免疫組織化学法を用いて検証する。

4. 研究成果

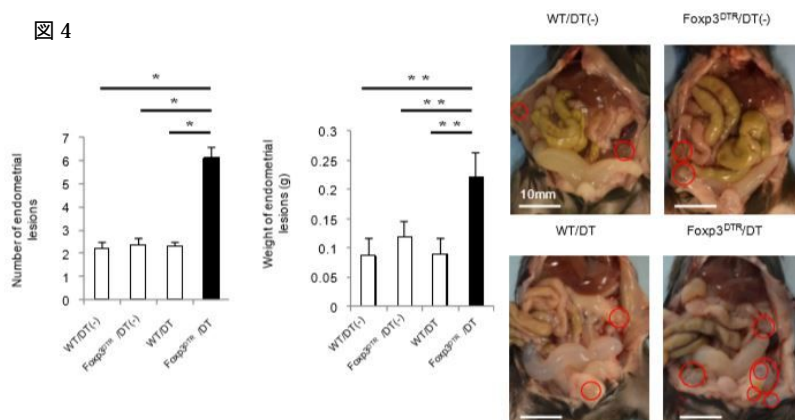
(1) 週 1 回それぞれのマウスの血液を採取し、末梢血中の Treg の割合を測定した。ジフテリアトキシン(DT)投与時に一時的に Treg が減少する Foxp3^{DTR}/DT マウスでは、コントロールマウス 3 群と比較し、DT 投与後に有意に Treg が減少していることを確認した。また、コントロール群では、CD4 陽性細胞に占める Treg の割合はほぼ 10% 前後で保たれていることを確認した(図 3)。

図 3



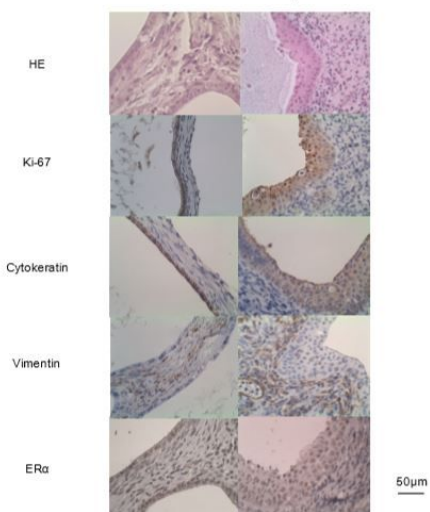
(2) 図 4 に示すように、子宮内膜症モデルマウスでは、病巣である子宮内膜症性嚢胞が腹腔内に形成される。Treg を減少させた Foxp3^{DTR}/DT 群ではコントロール群と比較し、有意に子宮内膜症性嚢胞の重さ ($P < 0.01$) と数 ($P < 0.05$) が増加していた。

図 4



(3) 図 4 に示した嚢胞が子宮内膜由来である子宮内膜症性嚢胞であることを確認するために、それぞれのマウスより子宮内膜症性嚢胞を採取し、免疫染色を行った。子宮内膜の上皮が染色される Cytokeratin、子宮内膜の間質が染色される Vimentin、子宮内膜全体が染色される ER で免疫染色を行ったところ、Foxp3^{DTR}/DT マウス、コントロールマウスのいずれの子宮内膜症性嚢胞も染色され、どちらの群の嚢胞も子宮内膜由来であることが示された。また、Treg を減少させた Foxp3^{DTR}/DT マウスの子宮内膜症性嚢胞では、コントロールと比較して、Ki-67 で強く染色され、増殖能が亢進していると考えられた(図 5)。PR の検討も予定していたが、抗体が入手困難で不可能であった。

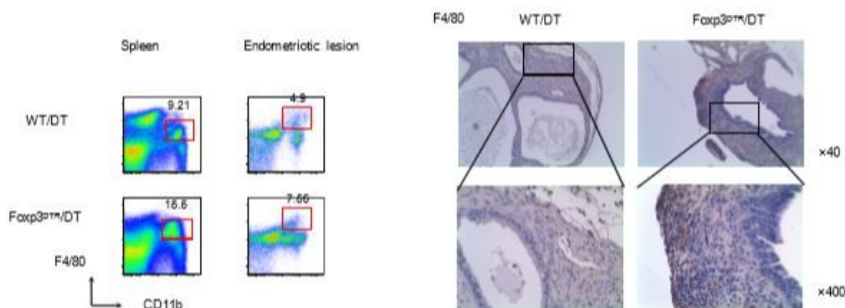
図 5



(4) Treg が減少している Foxp3^{DTR}/DT マウスでは、Treg が減少しているため、helper T cell などの effector T cell が相対的に増加している。また、Foxp3^{DTR}/DT マウスでは、コントロールマウスと比較し、子宮内膜症性嚢胞、脾臓でのマクロファージが増加していた(図 6)。Treg はマクロファージに対しても抑制的

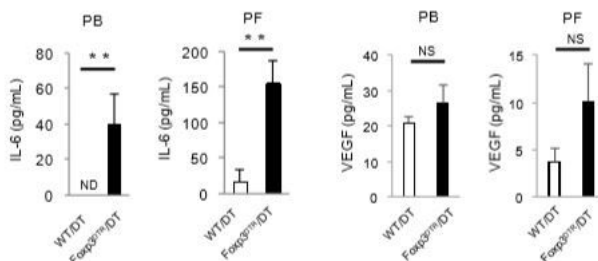
に働くため、Treg 減少によりマクロファージが増加した可能性がある。

図 6



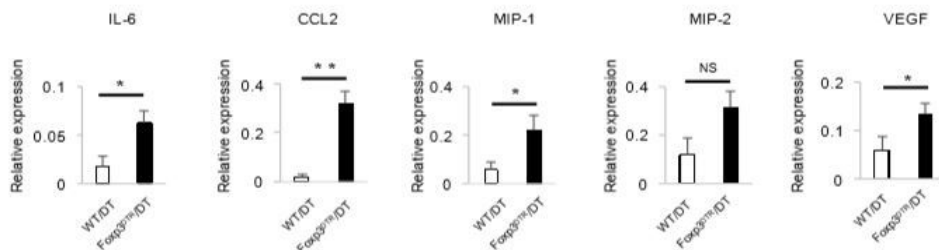
(5) Treg が減少している Foxp3^{DTR}/DT マウスでは、末梢血と腹水で IL-6 がコントロールマウスと比較し有意に増加していた (図 7)。IL-6 は子宮内膜症の増悪因子としてよく知られている炎症性サイトカインである。また、有意差は認めなかったが、血管新生因子である VEGF が Foxp3^{DTR}/DT マウスで増加していた。

図 7



(6) 両群の子宮内膜症性嚢胞の RNA を採取し、リアルタイム PCR 法にて炎症性サイトカインの量を比較した。Treg が減少している Foxp3^{DTR}/DT マウスでは、IL-6, CCL2, IL-8 のホモログである MIP-1 と MIP-2, VEGF が有意に増加していた (図 8)。

図 8



(7) これらの結果より、マウスの嚢胞性病巣局所において、マクロファージの誘導や子宮内膜症病巣で特異的に分泌している IL-6 や MIP-1 などの炎症性サイトカインや血管増殖因子 (VEGF) の増加が認められたが、Treg の減少はマクロファージや effector T 細胞を活性化し、局所の炎症性サイトカインや血管新生因子を増加させることで子宮内膜症の進展に寄与すると考えられた。

子宮内膜症病巣では、Treg が担う免疫制御機構が破綻することによって免疫応答が亢進し、局所の炎症や増殖を促進することによって病変が増悪していることが明らかになった。Treg が及ぼす免疫機能を活性化あるいは不活化することで、子宮内膜症における新たな治療法や予防法の確立が期待される。

< 引用文献 >

- 1) Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor.
Miyara M, et al. *Immunity* 2009; 30(6):899-911.
- 2) Exacerbation of endometriosis due to regulatory T cell dysfunction.
Tanaka Y, et al. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017; 102(9): 3206-3217.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中佑輝子, 森 泰輔, 伊藤文武, 小芝明美, 高岡 宰, 片岡 恒, 前田英子, 沖村 浩之, 森 崇英, 北脇 城
2. 発表標題 Exacerbation of Endometriosis Due To Regulatory T-Cell Dysfunction
3. 学会等名 日本産科婦人科学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 柴原浩章編、田中佑輝子、北脇城	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 730のうち4
3. 書名 実践 臨床生殖免疫学 子宮内膜症と免疫 制御性T細胞の項	

〔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
---------------------------	-----------------------	----