

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592097

研究課題名（和文）子宮内膜症組織培養系の確立と月経血の抗原性による子宮内膜症発症機序の解明

研究課題名（英文）Pathogenesis of endometriosis by the inflammatory cytokines in three-dimension culture system

研究代表者：

岩部 富夫 (IWABE TOMIO)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：10284001

研究成果の概要（和文）：

1 月経血と免疫担当細胞の採取

月経血を採取し、健常成人から末梢血を用いて単核を分離した。単球細胞に IL-4 と GM-CSF を添加して培養し、樹状細胞に分化させ、月経血を培養液の 2% と 10% を添加し、IL-6 と IL-8 濃度を ELISA で測定した。逆流した月経血は、CD14+ の単球細胞と樹状細胞において IL-6 および IL-8 蛋白産生を促進した。

2 3次元培養

2次元の培養より組織培養に近いと考えられる、3次元培養を行った。子宮内膜症由来の間質細胞と正所性子宮内膜の間質細胞において単層培養と3次元の立体培養したもので比較検討した。IL-6 および IL-8 のタンパク産生は無刺激で、正所性内膜細胞では産生がみられなかったが、細胞間の相互作用により内膜症細胞では増加することが明らかとなった。子宮内膜症細胞では、オートリンやパラクリン作用も病変に関与していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

1. We examined the effect of menstrual blood on the ability of cytokine production in these immune cells. We examined the CD14+ monocyte and DC were cultured the containing 2% or 10% menstrual blood in the culture medium for 24 hours, and measured the concentration of interleukin-6 and interleukin-8 in the supernatants with ELISA. We demonstrated that the menstrual blood induced the cytokine levels in the immune cells. These results suggest that retrograde menstruation may be contributed to the pathogenesis of endometriosis.

2 We examined the three-dimensional culture system. Endometrial and endometriotic stromal cells were obtained from normal endometrium and from chocolate cyst linings. We used Celltight X TM (SUMILON). We evaluate the effect of TNF α on those cells compared with monolayer culture systems. IL-6 and IL-8 protein production was examined by ELISA. Endometriotic stromal cells product the inflammatory cytokines without TNF α . The addition of TNF α promoted the production of inflammatory cytokines, compared with monolayer culture systems. These results suggested that the inflammatory cytokines work as the autocrine and paracrine factor for the proliferation of endometriotic cells,

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮内膜症、子宮内膜、炎症性サイトカイン、3次元培養系

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症はヒトと一部の霊長類のみに発症する疾患であり、検体採取の点から研究を行う上で障害となっている。一般的にはディッシュへの単層培養で研究が行われており、実際の組織構築と異なる。従って、より実際の組織に近い間質と上皮の3次元培養系の確立することは、子宮内膜症の病態の解明に大変重要である。そして、本症の進展過程を明らかにすることは、新たな治療薬の開発に結びつく斬新で独創的な研究である。

子宮内膜症患者の骨盤内環境は健常者のそれと異なり、種々のサイトカインの産生・分泌の亢進や発現の異常が観察されるようになった。これまで、子宮内間症患者の腹腔内貯留液に存在するサイトカインに着目し、その病因、病態に関する基礎的ならびに臨床研究を進めてきた。子宮内膜症患者の腹水中には tumor necrosis factor (TNF) α ,

interleukin-6 (IL-6) や IL-8 などのサイトカインが高濃度存在する事を明らかにし、子宮内膜症の初期活動性病変と考えられる赤色病変の程度と相関することを示した IL-6 はマウス初期胚発育やヒト精子の運動能を抑制すること、卵巣顆粒膜細胞に作用しアロマターゼ活性を減弱することでエストラジオール産生を抑制することから子宮内膜症患者の妊孕能低下に関与する事を示唆した。血管新生因子として知られるケモカインである IL-8 は子宮内膜症由来の間質細胞の増殖を促進することで子宮内膜症の進展に関与することを初めて明らかにした。さらに TNF α は子宮内膜症由来の間質細胞から IL-6 および IL-8 遺伝子の発現と蛋白産を濃度ならびに時間依存性に up-regulate する事を明らかとした。

以上述べたような実験系で本症の発生および進展過程の詳細な機序の一端を明らかにすることが可能となり、子宮内膜症に対する新たな治療薬の開発に結びつく重要かつ独創的な研究である。

2. 研究の目的

ほとんどの女性は月経時に月経血が骨盤腔内に逆流し、この逆流する月経血が子宮内膜症の発症や病変の進展に何らかの関与が考えられている。しかしながら、子宮内膜症が生殖年齢女性の 10%のみに発症することは、病因や病態に免疫が関与している。発症機序に関して自然免疫機構の関与が重要であると考えられる。獲得免疫は子宮内膜症の進展や腹膜病変の退縮に関与している可能性が高い。一方で、本症の発生機序についてはいまだ結論は

得られていない。月経血の逆流が子宮内膜症の発症機序と関連が予測されることから、月経血中に含まれる物質が、子宮内膜症の病態深く関わるサイトカイン産生に及ぼす影響を検討する。このような観点から子宮内膜症の病態の一端を明らかにすることを目的とした。

また、実際の病変組織は立体構造を有しており、より生体組織に近い実験は行われていなかった。そこで、実際の病変を培養するか、それに近い形での新たな培養系を確立し、子宮内膜症研究を進めていくことが可能になる。今回は、新たに 3 次元培養系を構築し、子宮内膜症細胞でのサイトカインの誘導能を検討する。これまで行ってきた、2 次元の培養系と比較することで、細胞間の立体構築が子宮内膜症の病態に及ぼす影響について検討し、より病変に近い研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

①検体の採取

月経血は産婦人科の外来診察時に同意の得られた患者から経腔的に頸管内から採取し、直ちに超音波破砕機で懸濁液にして凍結保存する。末梢血も同様に超音波破砕機で懸濁液にして保存しておく。正所性子宮内膜と卵巣チョコレート嚢胞は腹腔鏡手術時に当院倫理委員会の承認の元手術時に摘出した組織の一部から検体として採取する。

②月経血の免疫担当細胞に対するサイトカイン誘導能

健常成人から末梢血をヘパリン採血し、リンパ球分離用溶液 (LSM[®]) を用いて単核球層 (PBMC) を分離した。その後、磁気ビーズを用いて CD14+単球細胞を分離精製した。単球細胞に IL-4 と GM-CSF を添加して 7 日間培養し、樹状細胞に分化させた。

単球と樹状細胞に検体として採取した月経血を培養液の 2% と 10% となるように添加し、24 時間後の培養上清中の IL-6 と IL-8 濃度を ELISA で測定した。

③3次元培養系の確立とサイトカイン産生

3次元培養はスミロセルタイト X (24 well) を用いて実験を行う。子宮内膜および子宮内膜間質細胞は、手術時に摘出した正所性子宮内膜および卵巣チョコレート嚢胞壁から分離培養した。間質細胞を各細胞数と 24 時間ごとの培養から 3 次元の形態を観察し、至適な実験条件を確立する。培養条件を確立した後、単層培養と 3 次元の立体培養したもので TNF α を添加し IL-6 と IL-8 産生を時間依存性に比較検討する。

④間質細胞塊と上皮細胞の被覆によるサイトカイン産生

子宮内膜症や子宮内膜の上皮細胞は増殖せず、実験に用いるのが困難であったため、上皮細胞として子宮内膜癌の細胞を用いる。使用する細胞株は ISHIKAWA、HEC-1 および SNG-II とした。間質細胞塊の外層を 3 種類の細胞で被覆する実験系の条件を検討し、確立する。免疫組織化学でその形態を確認する。その系に TNF α を添加し IL-6 と IL-8 産生を時間依存性に比較検討する。

4. 研究成果

①検体の採取

月経血は子宮内膜症のある患者 3 例、子宮内膜症のない患者 2 例および不明の患者 1 例から採取した。正所性子宮内膜および卵巣チョコレート嚢胞の組織は当院で手術を施行した、各 19 例から採取し、間質細胞を分離培養した。免疫担当細胞の分離には、ボランティアの健康者 6 例より抹消血を採取した。子宮内膜癌の細胞株はそれぞれ、購入して使用した。

②月経血の免疫担当細胞に対するサイトカイン誘導能

CD14+の単球細胞に、月経血を 2% と 10% になるように、展開して、培養液中の IL-6 濃度は非添加に比して、それぞれ 1.4 倍と 16.3 倍に IL-8 濃度は 1.3 倍と 39.6 倍に産生が促進された。子宮内膜症の有無では症例数が少なく有意差は認めなかった。単球を IL-4 と GM-CSF で誘導した樹状細胞では、IL-6 濃度は非添加に比して、それぞれ 5.0 倍と 11.1 倍に IL-8 濃度は 7.0 倍と 40.9 倍に産生が促進された (図 1、2)。

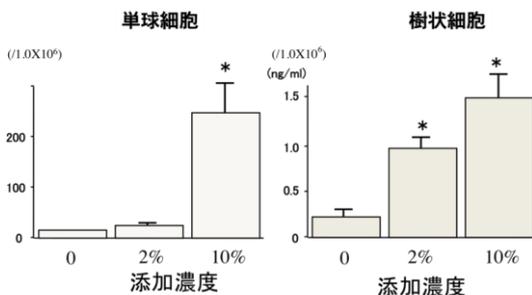


図1 月経血添加とIL-6産生

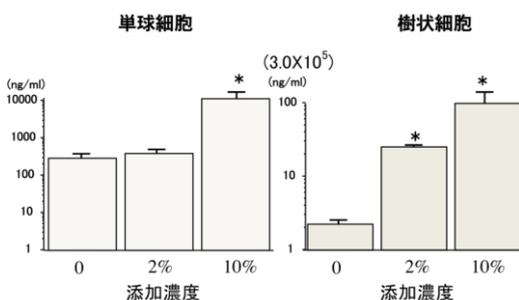
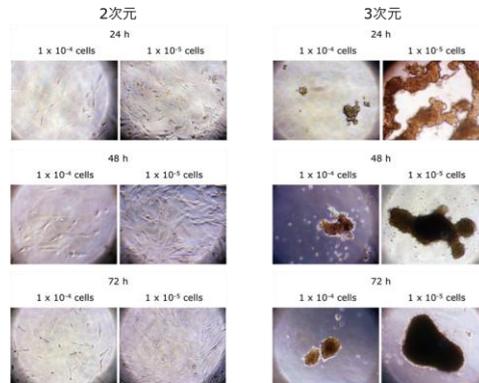


図2 月経血添加とIL-8産生

③3次元培養系の確立とサイトカイン産生
24well プレートに間質細胞を撒いたときの 24 時間ごとの経時的細胞像を図 3 に示す。



これらの成績がもとで、50000 個/well で 72 時間培養する条件で実験を行っていくこととした。

④間質細胞塊と上皮細胞の被覆によるサイトカイン産生

間質細胞を 50000 個/well で 5 日間培養した後、上皮細胞を添加してさらに 5 日間培養を行った。間質細胞塊の外層に上皮細胞を被覆した時に、サイトケラチンおよびビメンチンと HE 染色の顕微鏡写真を図 4 に示す。TNF α を非添加および 100pg/ml の濃度で添加したときの培養上清中の IL-6 および IL-8 濃度を測定した結果を図 5、6 に示す。

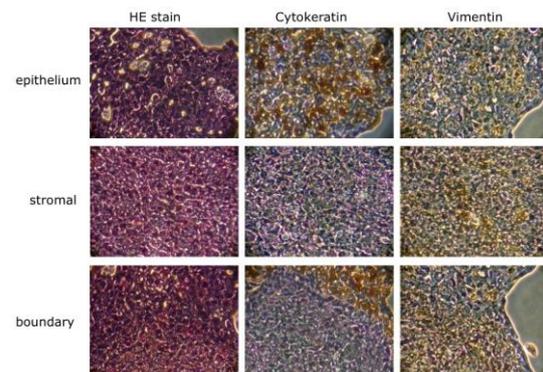


図4 3次元培養の免疫組織化学

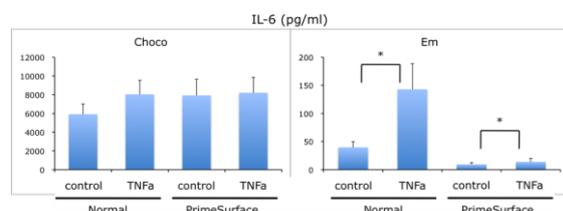


図5 TNF α 添加と IL-6 産生

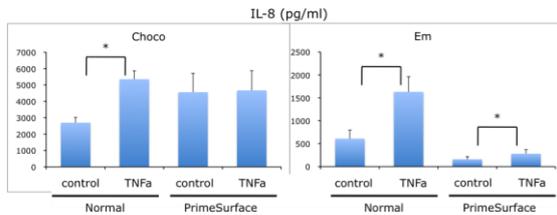


図6 TNF α 添加と IL-8 産生

3次元培養では子宮内膜症間質細胞はTNF α を添加しなくてもIL-6およびIL-8蛋白を産生し、TNF α の添加にはほとんど反応がなかった。

以上の成績から、逆流月経血は腹腔内の免疫細胞を刺激して、炎症性サイトカインを産生し、子宮内膜症の病態に関与する可能性が示唆された。2次元の培養と3次元培養の成績は異なり、子宮内膜症の細胞は自ら炎症性サイトカインを産生することが明らかとなった。TNF α による産生誘導は必要がなく、autocrineあるいはparacrine作用が子宮内膜症の病態に関与していると考えられた。

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4件)

1, Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Ito M, Deura I, Decavalas G, Terakawa N, Harada T. **The role of NF-kappaB in endometriosis.** Front Biosci. 4: 1213-34 2012.

2, Taniguchi F, Kaponis A, Izawa M, Kiyama T, Deura I, Ito M, Iwabe T, Adonakis G, Terakawa N, Harada T. **Apoptosis and endometriosis.** Front Biosci. 3: 648-62. 2011.

3, Izawa M, Taniguchi F, Uegaki T, Takai E, Iwabe T, Terakawa N, Harada T. **Demethylation of a nonpromoter cytosine-phosphate-guanine island in the aromatase gene may cause the aberrant up-regulation in endometriotic tissues.** Fertil Steril. 95:33-9, 2011

4, Taniguchi F, Harada T, Miyakoda H, Iwabe T, Deura I, Tagashira Y, Miyamoto A, Watanabe A, Suou K, Uegaki T, Terakawa N. **TAK1 activation for cytokine synthesis and proliferation of endometriotic cells.** Mol Cell Endocrinol. 307:196-204. 2009.

[学会発表] (計5件)

1, Taniguchi F, Izawa M, T.Uegaki, Iwabe T, Terakawa N, Harada T: Aberrant expression of IAP family in endometriotic cells may cause resistance to apoptosis

11th World Congress on Endometriosis, Montpellier, 6 September, 2011

2, Deura I, Kaponis A, Ito Mu, Taniguchi F, Iwabe T, Harada T: Advanced Techniques of Adhesiolysis for Severe Endometriosis.

39th Global Congress of Minimally Invasive Gynecology, Las Vegas, 10 November, 2010

3, 岩部富夫 子宮内膜症

第55回日本生殖医学会総会・学術講演会、ワークショップ 徳島, 11月11日, 2010

4, Taniguchi F, Izawa M, Iwabe T, Terakawa N, Harada T. Aberrant expression of IAP family in endometriotic cells may cause resistance to apoptosis.

66th Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine, Denver, 28 October, 2010

5, Taniguchi F, Tagashira Y, Suou K, Iwabe T, Harada T. Apigenin inhibits TNF α -induced cell proliferation in endometriotic stromal cells

65th Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine, Atlanta, 20 October, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩部 富夫 (IWABE TOMIO)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：10284001

(2) 研究分担者

出浦 伊万里 (DEURA IMARI)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50464293