

## 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 5 月 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592101

研究課題名（和文）：抗菌剤と抗エストロゲン剤を用いた子宮内膜症の新たな治療法の開発に関する基礎的検討

研究課題名（英文）：Treatment of endometriosis with antibiotics and estrogen suppressing agent:  
a new approach to suppress pelvic inflammation and growth of endometriosis

研究代表者

Khan Khaleque（カーン カレク）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60336162

研究成果の概要（和文）：

子宮内膜症はエストロゲン（E2）依存性の慢性炎症性疾患である。内膜症には不明な点が多く、その病態をひとつの因子で一元的に説明することは困難である。私どもは過去3年間（H21-23）、内膜症でのLPSとマクロファージ（M $\phi$ ）の役割について検討を重ねてきたが、内膜症の病態を説明する仮説として、生得免疫を司るLPSとTLR4を介した「bacterial contamination hypothesis」に至った。内膜症の月経血においては、非内膜症コントロールに比して有意に大腸菌（*E.coli*）のコンタミネーションが多く、内膜症の月経血あるいは腹水中ではエンドトキシン（LPS）濃度が有意に高いことが認められた（Fertil Steril 2010;94:2860-3）。また、TLR4を介した内膜症の増殖では、LPSとストレス蛋白であるHsp70との分子クロストークが存在することを見いだした（7<sup>th</sup> FAOPS Congress, 台北, 2011）。また、LPSとE2が協働的にERおよびTLR4を介してマクロファージが惹起する局所炎症を誘導することを報告した（第55回日本生殖医学会，徳島市，2010）。

研究成果の概要（英文）：

Endometriosis is an estrogen dependent chronic inflammatory disease. Both hormonal and inflammatory mediators are involved in the growth regulation of endometriosis. As a continuation of our research work on LPS and macrophages (M $\phi$ ) in endometriosis during the last three years (H21-H23), we demonstrated a novel concept of “bacterial contamination hypothesis” in the development of endometriosis via LPS/TLR4-mediated engagement of innate immune response. In fact, menstrual blood of women with endometriosis is more contaminated with *E. coli* than that of control women and corresponds to higher levels of endotoxin (LPS) in the menstrual fluid and peritoneal fluid (Fertil Steril 2010; 94:2860-2863). We also found a cross-talk between inflammation (LPS) and stress reaction (Hsp70) in TLR4-mediated growth of endometriosis (7<sup>th</sup> FAOPS Congress, Taipei, 2011). Recently we demonstrated that combined effect of estrogen (E2) and LPS further promotes M $\phi$ -mediated inflammation and ER/TLR4-mediated growth of endometriosis (55<sup>th</sup> JSRM meeting, Tokushima, 2010).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：生殖医学・子宮内膜症

## 1. 研究開始当初の背景

研究成果の概要（和文）：子宮内膜症はエストロゲン（E2）依存性の慢性炎症性疾患である。内膜症には不明な点が多く、その病態をひとつの因子で一元的に説明することは困難である。私どもは過去3年間（H21-23）、内膜症でのLPSとマクロファージ（Mφ）の役割について検討を重ねてきたが、内膜症の病態を説明する仮説として、生得免疫を司るLPSとTLR4を介した「bacterial contamination hypothesis」に至った。内膜症の月経血においては、非内膜症コントロールに比して有意に大腸菌（*E.coli*）のコンタミネーションが多く、内膜症の月経血あるいは腹水中ではエンドトキシン（LPS）濃度が有意に高いことが認められた（Fertil Steril 2010;94:2860-3）。

## 2. 研究の目的

子宮内膜症は、その発生病理や病態に関して未だ一定の結論に至っていない疾患であり、症状や再発を効果的に制御する病態生理に基づいた治療法は確立されていないのが現況である。私どものこれまでの検討から、本疾患の病態においては、骨盤内局所および正所性子宮内膜における炎症反応が重要な因子であり、子宮内膜症が炎症を惹起するメカニズムとして、細菌由来のエンドトキシンとその受容体である Toll-like receptor 4 (TLR4) が関与し、その産生源は月経血中に存在する大腸菌（*Escherichia coli*, *E.coli*）である可能性がある。本研究では、これまでの私どもの知見を臨床的に応用するための基礎研究として、子宮内膜組織の増殖・進展にエンドトキシンおよび *E.coli* が及ぼす作用に対する抗菌剤と抗エストロゲン剤の効果と作用機序を *in vitro* で詳細に検討し、抗菌剤の子宮内膜症の薬物療法における新たな役割とその臨床応用への可能性を探ることを目的とする。また、マクロファージ(Mφ)により調節される炎症反応に関してエストロゲンとエンドトキシンの子宮内膜細胞の増殖に対する相乗的な影響について検討した。

## 3. 研究の方法

- 1) これまで私どもが月経血中に存在することを認めたものと同種の *E.coli* (strain K12, subtype B4:0111) を LB (Luria-Bertani)アガープレート上で培養し、最小コロニー形成を得る。
- 2) 培地へ広域スペクトルのカルバペネム系抗生物質であるファロペネム (FRPM, 10~100 μg/mL) およびニューキノロン系抗生物質であるレボフロキサシン (LVFX, 10~100 μg/mL) を種々の濃度で単独あるいは同時に添加し、コロニー形成能の変化を検討する。
- 3) limulus amoebocyte lysate (LAL)法を用いて、培地中のエンドトキシン濃度を測定し、上記の薬剤添加の有無により比較する。
- 4) 子宮内膜症および非子宮内膜症コントロール女性から、インフォームドコンセントを得て子宮内膜組織を採取し、腺上皮あるいは間質細胞を分

離・抽出し培養する。2) の薬剤添加実験で得られた種々のエンドトキシン濃度を有する大腸菌培養上清を添加し、子宮内膜細胞の増殖能の変化を bromodeoxyuridine (BrdU)取り込み能を測定することにより検討する。

- 5) 正所性子宮内膜および異所性子宮内膜組織における heat shock protein70 (Hsp70) の発現局在を解析し、各種体液中の Hsp70 濃度を ELISA 法で測定した。マクロファージのサイトカインや増殖因子産生能、あるいは子宮内膜での Hsp70 の発現とその子宮内膜増殖に対する TLR4 を介した LPS の作用、また、マクロファージや子宮内膜組織に対する Hsp70 の作用に対する LPS の影響を検討した。
- 6) 子宮内膜症女性 46 人および非内膜症女性 30 人の腹水 (PF) から同意を得て Mφ を分離した。Mφ の卵巣ステロイド受容体 (ER/PR) は、免疫染色と RT-PCR によって確認した。エストラジオール (E2) /プロゲステロン (P) および LPS によって刺激された Mφ によるサイトカイン産生は ELISA 法で、HGF とそのレセプターである c-Met は RT-PCR によって計測した。子宮内膜細胞の増殖はプロモデオキシウリジン (BrdU) 取込能によって調べた。

## 4. 研究成果

内膜症の月経血においては、非内膜症コントロールに比して有意に大腸菌 (*E. coli*) のコンタミネーションが多く、内膜症の月経血あるいは腹水中ではエンドトキシン (LPS) 濃度が有意に高いことが認められた (Fertil Steril 2010;94:2860-3)。また、TLR4 を介した内膜症の増殖では、LPS とストレス蛋白である Hsp70 との分子クロストークが存在することを見いだした (7<sup>th</sup> FAOPS Congress, 台北, 2011)。また、LPS と E2 が協働的に ER および TLR4 を介してマクロファージが惹起する局所炎症を誘導することを報告した (第 55 回日本生殖医学会, 徳島市, 2010)。これらは、内膜症の増殖・進展を抑制するためには、エストロゲン作用。

月経血および腹水中の LPS 濃度は非内膜症コントロールと比較して内膜症において有意に高値であった。正所性子宮内膜および異所性子宮内膜の腺上皮および間質細胞に Hsp70 の発現を認め、Hsp70 濃度は内膜症の月経血で最も高値であった。また、LPS は TLR4 を介してマクロファージのサイトカインや増殖因子産生を促進し、子宮内膜組織における Hsp70 発現や細胞増殖能を亢進させ、それらの作用は子宮内膜症においてより顕著であった。また、LPS により惹起されるマクロファージのサイトカインや増殖因子の産生は、Hsp70 の添加でさらに促進され、これらの作用は抗 TLR4 抗体で処理することにより有意に抑制された。また子宮内膜に対する LPS の細胞増殖促進作用も同様に Hsp70 により亢進し、抗 TLR4 抗体により抑制された。

CD68 陽性 Mφ は、初期の子宮内膜症や非内膜症女性と比較して、進行した子宮内膜症においてより多く

認められた。Mφでの ER/PR 蛋白および遺伝子発現は正常コントロールと同様に認められた。正常コントロールまたは未処置の細胞と比較して、E2 (10-8M) 存在下での子宮内膜症 Mφからの HGF および VEGF 産生は有意に高値であった。Mφおよび子宮内膜間質の HGF と c-Met の mRNA 発現は、E2 存在下とともに増加した。卵巣ステロイドに対する Mφを介した HGF/VEGF の産生は、LPS 処置でさらに増強された。E2 (10-8M) と LPS (10ng/mL) で処置を行うと、正所性および異所性子宮内膜間質細胞の増殖に相乗的に作用した。細胞増殖に関するこの E2+LPS の影響は、コントロールと比べて子宮内膜症女性においてより明らかであった。

## 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 5 件)

- 1) Khan KN. Toll-like receptor 4 (TLR4)を介した子宮内膜症の増殖における炎症ストレス反応のクロストーク  
子宮腺筋症・子宮内膜症における最新の動向  
2011, 70-76
- 2) Khan KN. 子宮腺筋症において腺細胞が子宮筋層へ侵入するメカニズムに関する検討  
子宮腺筋症・子宮内膜症における最新の動向  
2011, 34-40
- 3) Khan KN. 細菌混入仮説：子宮内膜症におけるエンドトキシンと Toll-like receptor 4 (TLR4)の役割  
Progress in Medicine (Life Science)  
2011, 56-60
- 4) Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Yamaguchi N, Katamine S, Matsuyama T, Fujishita A, Nakashima M, Ishimaru T, Masuzaki H. Escherichia coli contamination of menstrual blood and effect of bacterial endotoxin on endometriosis. Fertil Steril Dec;94(7):2860-2863.e3,2010.
- 5) Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Nakashima M, Ishimaru T, Masuzaki H. Cell proliferation effect of GnRH agonist on pathologic lesions of women with endometriosis, adenomyosis and uterine myoma. Hum Reprod. Nov;25(11): 2878-2890,2010.
- 6) Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H. Effect of human seminal fluid on the growth of endometrial cells of women with endometriosis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 149:204-209,2010.
- 7) Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H. Changes in tissue inflammation, angiogenesis and apoptosis in endometriosis, adenomyosis and uterine myoma after GnRH agonist therapy. Hum Reprod. Mar;25(3):642-53, 2010.
- 8) Khan KN, Kitajima M, Hiraki H, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H. Toll-like receptors in innate

immunity: role of bacterial endotoxin and toll-like receptor 4 (TLR4) in endometrium and endometriosis. Gynecol Obstet Invest (review article) 68:40-52,2009.

[学会発表] (計 3 件) (H21)

- 1) 第 30 回エンドメトリオーシス学会 (平成 21 年 1 月 17-18 日, 仙台市)  
卵巣チョコレート嚢胞における骨盤痛と併存する骨盤腹膜病変との関連  
カレク・ネワズ・カーン, 北島道夫, 平木宏一, 藤下 晃, 関根一郎, 石丸忠之, 増崎英明
- 2) 第 61 回日本産科婦人科学会学術講演会 (平成 21 年 4 月 3-5 日, 京都)  
卵巣チョコレート嚢胞, 子宮腺筋症および子宮筋腫に対する GnRH アゴニスト療法の多面的な作用  
カレク・ネワズ・カーン, 北島道夫, 平木宏一, 藤下 晃, 関根一郎, 石丸忠之, 増崎英明
- 3) 第 1 回婦人科ホルモン依存性疾患研究会 (平成 21 年 5 月 9 日, 東京)  
子宮腺筋症において腺細胞が子宮筋層へ侵入するメカニズムに関する検討  
カレク・ネワズ・カーン, 北島道夫, 平木宏一, 藤下 晃, 増崎英明
- 4) 第 49 回日本産科婦人科内視鏡学会 (平成 21 年 9 月 3-5 日, 高知市)  
子宮腺筋症の組織内ストレス反応, 炎症, 血管新生およびアポトーシスに対する GnRH アゴニストの影響に関する検討  
カレク・ネワズ・カーン, 北島道夫, 平木宏一, 藤下 晃, 関根一郎, 石丸忠之, 増崎英明
- 5) 第 54 回日本生殖医学会 (平成 21 年 11 月 21-23 日, 金沢市)  
子宮内膜症, 子宮腺筋症および子宮筋腫組織における GnRH 受容体の発現と各疾患に対する GnRH アゴニストの直接的作用に関する検討  
カレク・ネワズ・カーン, 北島道夫, 平木宏一, 藤下 晃, 関根一郎, 石丸忠之, 増崎英明
- 6) 第 24 回日本生殖免疫学会 (平成 21 年 11 月 27-28 日, 東京)  
熱処理した血清が誘導する *Escherichia coli* の増殖からみた子宮内膜症の病態における補体系の関与についての研究  
カレク・ネワズ・カーン, 北島道夫, 平木宏一, 井上統夫, 片峰 茂, 藤下 晃, 関根一郎, 石丸忠之, 増崎英明
- 7) XVth Symposium of Czech Reproductive Immunologists (International Participation), The Castle, Zdar nad Sazavou, Czech Republic (May 29-31, 2009).  
Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated growth of endometriosis by human heat-shock protein 70 (Hsp70)  
Khan KN (invited speaker), Kitajima M, Masuzaki H
- 8) 7<sup>th</sup> European Congress on Reproductive Immunology (ECRI), (September 17-20, 2009), Marathon, Greece  
Khan KN (invited Chairperson) for the session "Recurrent Abortion"

〔学会発表〕(計7件)(H22)

- 1) 第31回エンドメトリオーシス学会(平成22年1月16-17日, 京都)  
子宮内膜症における正所性・異所性子宮内膜でのGnRH受容体の発現とその臨床的意義  
カレク・ネワズ・カーン, 北島道夫, 平木宏一, 藤下 晃, 関根一郎, 石丸忠之, 増崎英明
- 2) 第62回日本産科婦人科学会学術講演会(平成22年4月23-25日, 東京)  
子宮腺筋症の病態において子宮内膜腺組織が筋層へ浸潤する機序に関する基礎的検討  
カレク・ネワズ・カーン, 北島道夫, 平木宏一, 藤下 晃, 石丸忠之, 増崎英明
- 3) 第2回婦人科ホルモン依存性疾患研究会(平成22年5月8日, 東京)  
Toll-like receptor 4 (TLR4)を介した子宮内膜症の増殖における炎症 ストレス反応のクロストーク (Symposium)  
カレク・ネワズ・カーン, 北島道夫, 平木宏一, 藤下 晃, 石丸忠之, 増崎英明
- 4) 第28回日本産婦人科感染症研究会(平成22年6月5日, 京都)  
月経血中に混入する大腸菌が子宮内膜症の増殖に及ぼす影響 (Symposium)  
カレク・ネワズ・カーン, 北島道夫, 平木宏一, 藤下 晃, 石丸忠之, 増崎英明
- 5) 第50回日本産科婦人科内視鏡学会(平成22年7月29-31日, 東京)  
皮様嚢腫を有する女性では腹腔内子宮内膜症の発生が少ない  
カレク・ネワズ・カーン, 北島道夫, 平木宏一, 藤下 晃, 石丸忠之, 増崎英明
- 6) 第25回日本生殖免疫学会 (International Symposium on Reproductive Immunology, ISRI) (平成22年8月28-29日, 大坂)  
Role of Escherichia coli and Toll-like receptor 4 in endometriosis (Best Award Winner)  
カレク・ネワズ・カーン, 北島道夫, 平木宏一, 井上統夫, 藤下 晃, 増崎英明
- 7) 第55回日本生殖医学会(平成22年11月11-13日, 徳島市)  
エストロゲンおよびエンドトキシンが骨盤内の炎症と子宮内膜症の増殖に及ぼす影響  
カレク・ネワズ・カーン, 北島道夫, 平木宏一, 藤下 晃, 関根一郎, 石丸忠之, 増崎英明
- 8) 日本大学学部連携研究推進シンポジウム(平成22年12月3日, 東京)  
細菌混入仮説: 子宮内膜症におけるエンドトキシンと Toll-like receptor 4 (TLR4)の役割 (Symposium)  
カレク・ネワズ・カーン, 北島道夫, 平木宏一, 藤下 晃, 石丸忠之, 増崎英明
- 9) The 3<sup>rd</sup> Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction (ASPIRE), (April 9-11, 2010), Bangkok, Thailand  
GnRH receptor expression and direct cell proliferation effect of GnRHa in endometriosis, adenomyosis and

- uterine myoma (oral presentation). Khan KN, Kitajima M, Hiraki H, Fujishita A, Nakashima M, Ishimaru T, Masuzaki H
- 10) The 92<sup>nd</sup> Annual Meeting of American Society of Endocrinology, June 19-22, 2010, San Diego, CA  
Cross-talk between inflammation and stress reaction in TLR4-mediated growth of endometriosis (poster). Khan KN, Kitajima M, Hiraki H, Fujishita A, Nakashima M, Ishimaru T, Masuzaki H
  - 11) XI International Congress on Reproductive Immunology (ICRI), August 15-19, 2010, Cairns, Australia. (invited Chairperson/speaker for the session "Immune regulation of infertility and endometriosis")  
Cross-talk between inflammation and stress reaction in TLR4-mediated growth of endometriosis. Khan KN, Kitajima M, Hiraki H, Fujishita A, Nakashima M, Ishimaru T, Masuzaki H.
  - 12) The 1<sup>st</sup> Asian Congress on Endometriosis (ACE 1), October 15-17, 2010, Shanghai, China.  
Bacterial contamination hypothesis: role of endotoxin and Toll-like receptor 4 (TLR4) in endometriosis (invited symposium speaker). Khan KN, Kitajima M, Hiraki H, Fujishita A, Nakashima M, Ishimaru T, Masuzaki H

〔学会発表〕(計7件)(H23)

- 1) 第32回エンドメトリオーシス学会(平成23年1月22-23日, 東京)  
子宮腺筋症において腺細胞が子宮筋層へ侵入するメカニズムに関する検討 (workshop presentation)  
カーン カレク, 北島道夫, 平木宏一, 井上統夫, 藤下 晃, 石丸忠之, 増崎英明
- 2) 第3回婦人科ホルモン依存性疾患研究会(平成23年5月7日, 東京)  
子宮筋腫における炎症反応とプロスタグランジン産生-生殖に及ぼす影響について- (Symposium)  
カーン カレク, 北島道夫, 平木宏一, 井上統夫, 藤下 晃, 石丸忠之, 増崎英明
- 3) 第51回日本産科婦人科内視鏡学会(平成23年8月4-6日, 大坂)  
卵巣チョコレート嚢胞における骨盤痛と骨盤腹膜病変との関連  
カーン カレク, 北島道夫, 井上統夫, 平木宏一, 藤下 晃, 増崎英明
- 4) 第63回日本産科婦人科学会学術講演会(平成23年8月29-31日, 大坂)  
Toll-like receptor 4 (TLR4)を介した子宮内膜症の増殖における炎症 ストレス反応のクロストーク  
カーン カレク, 北島道夫, 平木宏一, 井上統夫, 藤下 晃, 石丸忠之, 増崎英明
- 5) 第3回Japan Endometriosis Forum (3<sup>rd</sup> JEF) meeting (平成23年10月29日, 大分)  
子宮腺筋症において腺細胞が子宮筋層へ侵入するメカニズムに関する検討 (symposium)  
カーン カレク, 北島道夫, 井上統夫, 平木宏一, 藤下 晃, 増崎英明

7) 第56回日本生殖医学会(平成23年12月7-9日, 横浜)

子宮内膜症女性の腹腔内環境と不妊 (symposium)  
カーン カレク、北島道夫、井上統夫、平木宏一、藤下晃、増崎英明

8) Invited speaker/Research discussion at National Institute of Immunology, February 6-8, 2011, New Delhi, India

Immune aspects of endometriosis and reproductive outcome (lecture). Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Inoue T, Fujishita A, Nakashima M, Masuzaki H

9) The International Conference on Frontiers in Reproductive Biology & 21<sup>st</sup> Annual Meeting of the Indian Society for the Study of Reproduction and Fertility (ISSRF), February 9-11, 2011, Karnal, India

Endometriosis and its effect on reproductive outcome (invited speaker). Khan KN, Kitajima M, Hiraki H, Inoue T, Fujishita A, Nakashima M, Masuzaki H

10) 31<sup>st</sup> Annual Meeting of the American Society for Reproductive Immunology (ASRI), May 19-22, 2011, Salt Lake City, USA.

Bacterial contamination hypothesis: role of endotoxin and Toll-like receptor 4 (TLR4) in endometriosis. Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Nakashima M, Masuzaki H.

11) 11<sup>th</sup> World Congress on Endometriosis (WCE 2011), September 4-7, 2011, Montpellier, France,

Pain in women with ovarian endometrioma is mostly associated with coexisting peritoneal lesions. Khan KN, Kitajima M, Inoue T, Hiraki K, Fujishita A, Nakashima M, Masuzaki H

12) 7<sup>th</sup> Federations of Asian and Oceanian Physiological Society (FAOPS) Congress, September 11-15, 2011, Taipei, Taiwan. (invited speaker)

Cross-talk between inflammation and stress reaction in TLR4-mediated growth of endometriosis. Khan KN, Kitajima M, Hiraki H, Fujishita A, Nakashima M, Masuzaki H

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

Khan Khaleque (カーン カレク)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究  
科・助教

研究者番号：60336162

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし