

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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592110

研究課題名（和文） 子宮内膜症病態メカニズムに関するリポキシゲナーゼ経路関連因子の解析

研究課題名（英文） Analysis of the lipoxygenase and its signaling pathway involved in the pathophysiology of endometriosis

研究代表者

山崎 彰子 (YAMASAKI AKIKO)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：60528777

研究成果の概要（和文）：

本研究では、リポキシゲナーゼ（LOX）経路および関連する脂質メディエーターの働きに着目しながら、分子細胞生物学的な解析手法により、子宮内膜症の発症・進展・慢性化機序の一端を明らかにすることを目的とする。研究成果としては、LOX 経路を構成する酵素のなかで、5-LOX mRNA ならびに 15-LOX mRNA が、卵巣チョコレート嚢胞組織において正所性内膜組織に比して有意に高発現していた。一方、12-LOX に関しては両組織間で発現量に有意な差は認められなかった。LOX 経路の少なくとも一部が、子宮内膜症の病態メカニズムに関与し得る可能性が示唆された。また、LOX の *in vivo* の働きを明らかにするための研究ツールとして、重度免疫不全マウスを用いた複数のタイプのヒト内膜症モデルマウスの作成を行った。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this research project was to elucidate the role of the lipoxygenase (LOX) and its signaling pathway in the pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. We demonstrated that 5-LOX and 15-LOX mRNA were up-regulated in endometrioma compared to normal eutopic endometrium, whereas 12-LOX mRNA levels did not differ between them. These results collectively suggest that the LOX pathway may be, at least in part, involved in the pathophysiology of endometriosis. We have also developed several types of *in vivo* mouse model of endometriosis using severely immunodeficient mice as a research tool to explore the role of LOX and its signaling pathway in endometriosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：(1) 子宮内膜症 (2) 疼痛 (3) リポキシゲナーゼ (4) ロイコトリエン (5) リポキシン (6) 脂質メディエーター

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は、異所性(卵巣表面、腹膜など骨盤内臓器に頻発)に子宮内膜様組織が増殖、

機能する疾患である。生殖期年齢にある女性に多発する、性ステロイドホルモン依存性疾患であり、急性および慢性の疼痛を引き起こ

すことから、多くの女性の QOL を損なう疾患として日本国内のみならず全世界的にその効果的な治療法の確立が待ち望まれている。現在、もっとも効果的な治療法は外科的根治療法すなわち子宮および両側卵巣の摘除手術である。しかし、患者の多くが拳児希望者であることなどより、第一選択とはなる場合は少ない。妊孕性の温存ならびに QOL 維持(骨粗鬆症予防等)のためにも保存的治療が主な治療方針となるが、手術による保存的治療では再発率が高い。GnRH アゴニストや経口避妊薬による治療法も再発率が高いうえに、投与期間中は妊孕能を抑制することが問題となる。疼痛を訴える患者については対症療法として NSAIDs をはじめとする消炎鎮痛剤などを投与することとなるが、これらを使用してもなお日常生活に支障の生じる症例も多く存在する。以上の問題点を解決するためにも、子宮内膜症の発生・進展機序、並びに疼痛発生および慢性化のメカニズム解明が待たれるところであり、国内外を通じて多くの施設で精力的に研究が行われている。われわれは、以前より継続して子宮内膜症の病態メカニズムに関する分子生物学的研究、特に疼痛発生・慢性化機構の解明に重点をおいて研究をすすめており、NGF (nerve growth factor)、CTGF (connective tissue growth factor) など、いくつかの蛋白性メディエーターの疼痛への関与が示唆されている。蛋白性メディエーターのみならず、脂質メディエーター、特にプロスタグランジン類の子宮内膜症病態メカニズムへの関与が数多く報告されており、これらの合成系およびシグナル伝達経路を標的とした病態メカニズム研究が活発に行われ、薬剤による臨床応用も進んでいる。代表的な薬剤が、消炎鎮痛剤の一種で、プロスタグランジン合成系の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ(COX)を阻害する NSAIDs であるが、前述のように子宮内膜症症例の場合には効果が弱いケースも多い他、胃潰瘍など副作用の問題もある。そこで、副作用が少なく、なおかつ、患者のニーズに沿った多様かつ有効な治療法を確立する上で、新たな脂質メディエーター関連分子を探索し、その分子群と子宮内膜症病態メカニズムとのかかわりを明らかにしつつ薬剤を開発していく必要がある。さらに、リポキゲナーゼ経路の主要産物であるロイコトリエン類が子宮内膜症由来疼痛に関与しているとの報告(Konno R et al. Fam Med 2004 36; 8-9 など)もされた。以上のことから、脂質メディエーター関連分子の中でも、特にリポキゲナーゼ経路と、そこで産生されるメディエーターに着目して研究を展開することとした。

2. 研究の目的

本研究では、リポキゲナーゼ(LOX)経路および関連する脂質メディエーターの働きに着目しながら、分子生物学的な解析手法により、子宮内膜症の発症・進展・慢性化機序の一端を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) リポキゲナーゼ経路関連因子の発現解析および機能解析

リポキゲナーゼ経路を構成する酵素の一つである 5-リポキゲナーゼ(5-LOX)は、アラキドン酸からロイコトリエン類、ヒドロキシ酸類およびリポキシン類を合成する経路において最も重要な役割を果たしている。5-LOX が含まれるリポキゲナーゼ経路からの生成産物は慢性炎症・アレルギー反応に深く関与しており、そのことから、5-LOX 阻害剤ならびに COX と 5-LOX の同時阻害剤が抗炎症治療薬として応用されつつある。また、ロイコトリエン類が疼痛の大きな原因となる腹腔内癒着などの器質病変を引き起こすことも知られており、リポキゲナーゼ経路が子宮内膜症の発症・進展・慢性化に及ぼす影響は極めて大きいと考えられる。これらの現状も踏まえ、まず 5-LOX の子宮内膜症病巣ならびに正常内膜における発現パターンを解析し、病態とのかかわりを明らかにしていく。

具体的には、患者の同意の上、腹腔鏡下手術により診断・採取した子宮内膜症病巣組織ならびに正常子宮内膜組織を用いて、mRNA および蛋白質の発現挙動を時空間的に解析した(RT-PCR、リアルタイム PCR、ノザンプロット、ウエスタンプロット、免疫組織化学等)。

(2) 内膜症モデルマウスの構築

われわれは、ヒト子宮内膜細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入後、免疫不全マウスに移植し、子宮内膜症を模した異所性子宮内膜組織の周期的な増殖・破壊と再構築、ならびに細胞の動態を生体外から観察するシステムを構築したが(Masuda et al Proc Natl Acad Sci USA 2007 104;1925-30)、さらにこれを改善するとともに、新しい内膜症モデルマウスの構築も試みた。

まず、ヒト子宮内膜組織より数 mm³角の組織片を切離し、これを重度免疫不全マウスの腹膜に縫合して固定させて、異所性ヒト内膜組織の生着・進展を図った。また、ヒト子宮内膜組織より機械的ならびに酵素的処理により単離した分散内膜細胞を、直接、あるいはレンチウイルスにより luciferase (LUC) ならびに green fluorescent protein (GFP) の標識蛋白を発現させた後に、重度免疫不全マウスの尾静脈より投与することにより、血行性転移による異所性内膜症の構築を図った。

4. 研究成果

(1) 正常子宮内膜および内膜症病変における LOX 関連遺伝子・蛋白の発現

患者の同意を得て採取した子宮内膜症患者由来卵巣チョコレート嚢胞組織と、子宮内膜症を発症していない患者より採取した正所性内膜組織よりそれぞれ Total RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法にて 5-リポキシゲナーゼ (LOX)、12-LOX、15-LOX の mRNA 量を定量し、両組織間での発現量の差を比較した。その結果、5-LOX mRNA ならびに 15-LOX mRNA が、卵巣チョコレート嚢胞組織において正所性内膜組織に比して有意に高発現していた。一方、12-LOX に関しては両組織間で発現量に有意な差は認められなかった。5-LOX はロイコトリエン類生成の鍵酵素であり、炎症反応に深く関与している。一方、15-LOX もヒドロキシ酸類やリポキシン類生成に関与する重要な酵素であり、炎症応答を制御していることが示唆されている。これらの酵素が子宮内膜症病巣局所で特異的に高発現していることより、子宮内膜症の発症および慢性化にも何らかの重要な役割を果たしている可能性があり、これらの酵素の阻害剤などが子宮内膜症治療に役立つのではないかと考えられた。

(2) 内膜症モデルマウスの構築

ヒト子宮内膜を異所性に担う内膜症モデルマウスにおいても、LOX が同様の発現パターンを呈するかを調べるために、内膜症モデルマウスの構築を行った。これまでホストになる免疫不全マウスとして NOD-SCID マウスが用いられてきたが、このマウス natural killer (NK) 活性を有していることより、異所性内膜組織の特性やポテンシャルをマスクする可能性がある。そこで、NK 細胞および NK 活性もほぼ欠如した重度免疫不全マウスである NOG マウスを用いて、その腹腔内にヒト内膜組織片を移植して、内膜症モデルマウスとした。LOX 類の解析を行う前に、このヒト化 NOG マウスが内膜症モデルとして妥当か否かについて免疫組織化学および HE 染色にて検証した。その結果、移植後 3 週間の時点で、腺管・間質構造を有する内膜様組織が維持されていた。従来、マウス由来の血管ネットワークが移植組織内に構築されると考えられていたが、本モデルでは、ヒト内膜移植片から宿主に向かって血管新生が起こり、ヒト-マウス間のキメラ血管が移植片の生着と維持に寄与していることが明らかになった。以上、本年度は、次年度の研究に向けての基盤となる材料や知見が得られた。

さらに、マウスを用いた *in vivo* 異所性内膜モデルの更なる開発を主に行った。重度免疫不全マウスに対して、分散したヒト子宮内膜細胞を尾静脈より投与し、血行性に異所性生着する内膜症モデルマウスの作成を試み

た。その解析対象臓器は、子宮、卵巣、肺、腹膜、消化管などとして、ヒト子宮内膜を構成する腺上皮、間質、血管内皮などの各細胞を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織化学、ならびにヒト DNA を特異的に認識するプライマーを用いた real-time PCR によりヒト組織の定量化を行った。一方、LOX 関連遺伝子の導入を念頭において、まず luciferase (LUC) ならびに green fluorescent protein (GFP) などの標識遺伝子を組み込んだレンチウイルスの作成を行った。必要に応じて、このレンチウイルスを用いて移植内膜細胞を LUC および GFP で標識した。また、本モデルに同時に腹腔内に同じ分散内膜細胞を投与し、LOX が関与し得ると考えられる腹腔内炎症を惹起することで、異所性内膜の発生や進展にどのような影響が及ぶかについても検討した。これまでの結果として、移植内膜細胞は主に肺に集積しその後徐々に減少したが、移植後 20 週以降でも少なくとも肺実質にはヒト内膜由来の細胞集落を免疫組織化学で確認し得た。さらに、real-time PCR でもヒト由来 DNA がマウス肺に認められた。以上より、異所性内膜症、特に肺内膜症のモデルになり得ると考えられた。

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 26 件)

Uchida H, Maruyama T, Nishikawa-Uchida S, Oda H, Miyazaki K, Yamasaki A, Yoshimura Y: Studies using an *in vitro* model show evidence of involvement of epithelial-mesenchymal transition of human endometrial epithelial cells in human embryo implantation. *J Biol Chem.* 2012, 287(7), 4441-4450. 査読有

Maruyama T, Yoshimura Y: Stem cell theory for the pathogenesis of endometriosis. *Front Biosci.* 2012, E4, 2754-2763. 査読有

Yuhki M, Kajitani T, Mizuno T, Aoki Y, Maruyama T: Establishment of an immortalized human endometrial stromal cell line with functional responses to ovarian stimuli. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011, 9, 104. 査読有

丸山哲夫: ミニ・シンポジウム 2 「子宮内膜幹細胞と子宮内膜症」第 1 回 Asian Conference on Endometriosis Mini-symposium: Endometriosis research in Japan. *Prog. Med.* 2011; 31 621-628. 査読無

Ono M, Kajitani T, Uchida H, Arase T,

Oda H, Nishikawa-Uchida S, Masuda H, Nagashima T, Yoshimura Y, Maruyama T: OCT4 expression in human uterine myometrial stem/progenitor cells. Hum Reprod. 2010; 25(8), 2059-2067. 査読有

Maruyama T, Masuda H, Ono M, Kajitani T, Yoshimura Y: Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology. Reproduction. 2010; 140(1), 11-22. 査読有

Masuda H, Matsuzaki Y, Hiratsu E, Ono M, Nagashima T, Kajitani T, Arase T, Oda H, Uchida H, Asada H, Ito M, Yoshimura Y, Maruyama T*, Okano H: Stem Cell-Like Properties of the Endometrial Side Population: Implication in Endometrial Regeneration. PLoS ONE. 2010; 5(4), e10387. 査読有

Maruyama T: Stem/progenitor cells and the regeneration potentials the human uterus. Reprod Med Biol. 2010; 9(1), 9-16. 査読有

川田陽子, 島田友恵, 浅田弘法, 杉本昌弘, 平山明由, 阿部しのぶ, 古谷正敬, 内田 浩, 浜谷敏生, 梶谷 宇, 丸山哲夫, 久慈直昭, 吉村泰典, 曾我朋義, 富田 勝: 腹水と血清中における代謝物質の網羅的分析による子宮内膜症特異的な代謝物質の探索. 日本エンドメトリオース学会誌 2010; 31, 210-212. 査読無

[平成21年度日本産科婦人科学会優秀論文賞] Arase T, Uchida H, Kajitani T, Ono M, Tamaki K, Oda H, Nishikawa S, Kagami M, Nagashima T, Masuda H, Asada H, Yoshimura Y, Maruyama T: The UDP-glucose receptor P2RY14 triggers innate mucosal immunity in the female reproductive tract by inducing IL-8. J Immunol. 2009; 182(11), 7074-7084. 査読有

丸山哲夫: ヒト子宮における幹細胞. 日本生殖内分泌学会雑誌 2010; 15, 25-27. 査読無

[学会発表](計37件)

荒瀬 透, 丸山哲夫, 宮崎 薫, 小田英之, 内田明花, 山崎彰子, 玉城香代子, 内田 浩, 吉村泰典: 子宮内膜におけるUDP-glucoseとその受容体 P2RY14の着床促進作用について. 第56回日本生殖医学会(神奈川県横浜市・パシフィコ横浜) 2011年12月8日-9日.

Tetsuo Maruyama Takashi Kajitani,

Hideyuki Oda, Kaoru Miyazaki, Sayaka Uchida, Akiko Yamasaki, Hironori Asada, Hiroshi Uchida, Yasunori Yoshimura; Identification of a novel endometrial gene associated with menstruation, endometriosis and adenomyosis. 11th World Congress on Endometriosis(WCE). September 4-7, 2011, Montpellier France.

[招請講演/セミナー] Tetsuo Maruyama; Human uterine stem/progenitor cells. Program in Developmental biology, Baylor College of Medicine(BCM). October 21, 2010, Huston, USA..

[招請講演] Tetsuo Maruyama, Hirotaka Masuda, Takashi Nagashima, Takashi Kajitani, Masanori Ono, Sayaka Nishikawa-Uchida, Hideyuki Oda, Kaoru Miyazaki, Toru Arase, Maki Kagami, Hiroshi Uchida, Hironori Asada, Yasunori Yoshimura; Possible involvement of endometrial stem/progenitor cells in the pathogenesis of endometriosis. 1st Asian Conference on Endometriosis(ACE). October 16-17, 2010, Shanghai, China.

Takashi Kajitani, Tetsuo Maruyama, Hironori Asada, Akiko Yamasaki, Hideyuki Oda, Sayaka Nishikawa, Hiroshi Uchida, Yasunori Yoshimura; Up-regulation of 5- and 15-lipoxygenases in endometriosis. 25th European Society of Human Reproduction and Embryology(ESHRE). June 26 - July 1, 2009, Amsterdam, The Netherlands.

[図書](計1件)

丸山哲夫: 『子宮腺筋症・子宮内膜症における最新の動向』子宮内膜症 幹細胞からみた子宮内膜症の発展・進展メカニズム. 日本臨牀社 2011年, 89-95頁.

[産業財産権]

出願状況(計5件)

名称: 動物モデルとその作成方法

発明者: 丸山哲夫 他

権利者: 学校法人 慶應義塾

種類: PCT 経由日本特許

番号: 特願 2007-545171

出願年月日: 2006年9月29日

国内外の別: 国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山崎 彰子 (YAMASAKI AKIKO)
慶應義塾大学・医学部・研究員
研究者番号：60528777

(2)研究分担者

丸山 哲夫 (MARUYAMA TETUSO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：10209702

内田 浩 (UCHIDA HIROSHI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：90286534