

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592395

研究課題名(和文)子宮内膜症の発症・進展におけるアレルギー性炎症の意義

研究課題名(英文)Allergic inflammation in the development of endometriosis

研究代表者

大須賀 穰(Yutaka, Osuga)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80260496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症はTh2型免疫応答が亢進した慢性炎症性疾患である。また、疫学的にアレルギーと関連すること、臨床的にエストロゲン依存性であることが報告されている。本研究では、以下の2点を示した。第一に、Th2型アレルギー性炎症の新しい基幹分子であるTSLPの発現が子宮内膜症の病態に関与していることを示した。第二に、Th2型免疫応答と炎症が、子宮内膜症病巣局所においてHSD3B2を相乗的に誘導することで、病巣局所でのエストロゲン産生を誘導することが示された。本研究の成果は、アレルギー性炎症やHSD3B2の調節が、子宮内膜症の新たな治療法となりうる可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：Endometriosis is a chronic inflammatory disease in which the Th2 immune response is activated and has been suggested to promote the disease. TSLP is a master cytokine that drive Th2 immune response.

IL-1b stimulated the expression of TSLP mRNA and secretion of TSLP protein from ESCs. IL-4 enhanced the IL-1b-induced TSLP secretion from ESCs, while IFNg reduced it. Inhibitors of p42/44 MAPK, p38 MAPK and SAPK/JNK suppressed the IL-1b-induced secretion of TSLP from ESCs. Positive immunostaining of TSLP was observed in the stroma of endometrioma tissue. TSLP concentrations in the serum and PF were both higher in women with endometriosis compared with those without endometriosis.

This study provided new insights in the Th2 immune response-related mechanism in endometriosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：アレルギー 免疫 子宮内膜症 炎症

1. 研究開始当初の背景

(1) 子宮内膜症は産婦人科において最も重要な疾患の1つである。更年期や偽閉経療法といった低エストロゲン状態では症状が改善することより、エストロゲン依存性疾患と考えられている。近年、本疾患は慢性炎症性疾患として理解されるようになってきているが、その詳細は明らかにされていない。

(2) 我々は、子宮内膜症の発症・進展に Th2 細胞などアレルギーに関連する細胞が関与していることを示してきた。また、疫学的に子宮内膜症患者において、アレルギー、喘息といったアレルギー性疾患の頻度が高いことが報告されている。さらに、肥満細胞、好酸球、Th2 細胞といった、アレルギー性炎症を引き起こす免疫細胞が、子宮内膜症組織に存在していることが示されている。これらのことより、子宮内膜症とアレルギー性炎症に関連があることが示唆される。

(3) 最近、アトピー性皮膚炎や喘息といったアレルギー性疾患で新たなアレルギー性炎症の概念が提唱されており、その重要性が報告されている。新しいアレルギー性炎症の概念によると、thymic stromal lymphopoietin (TSLP) は炎症性 Th2 細胞を誘導し、アレルゲンがなくともアレルギー性炎症を引き起こしていると考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、子宮内膜症におけるアレルギー性炎症の誘導機序、アレルギー性炎症の実態と病態との関連性、アレルギー性炎症が子宮内膜症の発症・進展にあたる影響とそのメカニズムの解明を目的とした。具体的には下記の通りである。

- (1) アレルギー性炎症を引き起こす TSLP が、子宮内膜症でどのように誘導されているか解明すること。TSLP が子宮内膜症の進展や病態に与える影響を解明すること。
- (2) 炎症性 Th2 細胞によって分泌される IL-4 が、子宮内膜症局所でのエストロゲン産生に及ぼす影響を解明すること。このとき、エストロゲン合成酵素である 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (HSD3B2) に注目して検討した。

3. 研究の方法

東京大学病院倫理委員会承認のもと、書面で患者の同意を確認し、子宮内膜組織、子宮内膜症組織、血清、腹腔内貯留液を採取した。

(1) 子宮内膜症における TSLP の関与について

子宮内膜症を有する女性と、子宮内膜症を有さない女性の、血清と腹腔内貯留液に含まれる TSLP 濃度を ELISA にて測定した。

子宮内膜症組織中での TSLP 発現を、凍結切片を用いて免疫組織化学にて評価した。

子宮内膜症組織より子宮内膜症間質細

胞 (ESC) を分離・培養した。子宮内膜症に關与している炎症性サイトカインである IL-1 と、Th2 サイトカインである IL-4 と、Th1 サイトカインである IFN γ を ESC に添加した。ESC 中の TSLP mRNA 発現を real-time PCR 法で評価した。さらに、培養上清中の TSLP 濃度を ELISA 法で評価した。

細胞内シグナル伝達を確認する目的で、p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 阻害剤 (SB202190)、p42/44 MAPK 阻害剤 (PD98059)、stress-activated protein kinase/Jun amino-terminal kinase 阻害剤 (SP600125) を用いた。

(2) 子宮内膜症病巣局所における IL-4 のエストロゲン産生への関与について

In situ hybridization 法で、子宮内膜症組織中での HSD3B2 と IL-4 の発現を検討した。

ESC における 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD3B1) と HSD3B2 の mRNA 発現を、real-time PCR 法で検討した。

子宮内膜組織の間質細胞 (NSC) と ESC に IL-4 と PGE2 を添加し、HSD3B2 と aromatase (P450arom) の mRNA 発現を real-time PCR 法で評価した。

ESC での P450arom と HSD3B2 の酵素活性を検討した。P450arom の酵素活性を確認するために、androstenedione から estrone への転換を評価した。また、HSD3B2 と P450arom の酵素活性を同時に確認するために、dehydroepiandrosterone (DHEA) から estrone への転換を同様に評価した。すなわち、ESC を IL-4 と PGE2 で刺激し HSD3B2 と P450arom を誘導した後に、androstenedione あるいは DHEA を添加し、培養上清中の estrone 濃度を特異的 EIA で測定した。

関節リウマチの治療薬として用いられている JAK3 阻害剤 CP-690550 を用いて、HSD3B2 発現を制御する細胞内シグナル伝達を検討した。

4. 研究成果

(1) 子宮内膜症における TSLP の関与について

子宮内膜症を有さない女性、子宮内膜症 stage I/II の女性、子宮内膜症 stage III/IV の女性の 3 群において、血清中および腹腔内貯留液中の TSLP 濃度を検討した。stage I/II の子宮内膜症を有する女性の血清中および腹腔内貯留液中の TSLP 濃度は、stage III/IV の子宮内膜症を有する女性と子宮内膜症を有さない女性と比べて有意に高かった。このことより、TSLP が子宮内膜症に関連していることが示唆された。

免疫組織化学では、子宮内膜症組織の間質部分に TSLP 発現を認めた。TSLP 発現は 10 検体中 3 検体に認めた。検体の上皮細胞はほとんど剥離していたが、残存していた上皮細胞は TSLP を発現していた。

ESC において、各種濃度の IL-1 (0.01,

0.1, 1, 10 ng/ml) は TSLP 産生を誘導した。0-0.1 ng/ml では濃度依存性に TSLP 産生を誘導し、1-10 ng/ml では TSLP 産生はやや減少していた。IL-1 刺激してから 3, 6, 12, 24 時間後の TSLP mRNA 発現を確認したところ、3 時間後に TSLP mRNA 発現のピーク(約 8 倍)を認めた。IL-1 に加えて、IL-4 と IFN を ESC に添加したところ、IL-1 刺激による TSLP 産生誘導は、IL-4 で促進され、IFN で抑制された。

SB202190、PD98059 および SP600125 は、IL-1 刺激による TSLP 産生誘導を抑制した。

IL-1 は子宮内膜症間質細胞より TSLP 分泌を誘導することで、Th2 免疫応答を誘導し、子宮内膜症の病態に関与することが示唆された。

子宮内膜症患者の腹腔内貯留液中は、子宮内膜症を有さない女性と比較して、IL-4 濃度が高く、IFN 濃度が低いことがわかっている。子宮内膜症において、IL-4 により子宮内膜症病巣で TSLP が分泌されることで炎症性 Th2 細胞が誘導され、さらに IL-4 が増加するという Th2 炎症応答のメカニズムの存在が示唆される。

(2) 子宮内膜症病巣局所における IL-4 のエストロゲン産生への関与について

HSD3B2 が子宮内膜症組織の間質に発現していることを in situ hybridization 法によって確認した。これまでの報告の通り、IL-4 は間質に発現していた。一部の検体でのみ、IL-4 と HSD3B2 の発現を近傍に認めた。

ESC では HSD3B2 mRNA が HSD3B1 mRNA よりも優位に発現していた。

ESC において、各種濃度の IL-4 (0.1, 1, 10, 100 ng/ml) は濃度依存性に HSD3B2 mRNA 発現を誘導した。IL-4 10 ng/ml は HSD3B2 mRNA 発現をコントロールと比較して約 8 倍誘導した。PGE2 (10^{-7} M) は HSD3B2 mRNA 発現をコントロールと比較して約 2 倍誘導した。PGE2 との同時刺激で、IL-4 による HSD3B2 mRNA 発現誘導は相乗的に増加した。これまでの報告と同様に、PGE2 は P450arom mRNA 発現を誘導した。IL-4 は P450arom mRNA 発現を誘導しなかった。NSC において同様に実験したが、NSC の HSD3B2 mRNA 発現は real-time PCR の感度以下だった。

ESC において HSD3B2 と P450arom の酵素活性を検討した(図 1)。これまでの報告の通り、PGE2 は androsterone より estrone への転換を促進し、P450arom の酵素活性を誘導した。IL-4 は P450arom の酵素活性を誘導しなかった。PGE2 は DHEA から estrone への転換を促進させ、IL-4 と PGE2 の同時刺激は、DHEA から estrone への転換を相乗的にさらに促進させた。HSD3B2 siRNA を用いて HSD3B2 をノックダウンしたところ、IL-4 と PGE2 による DHEA から estoren への転換亢進は抑制された。IL-4 と PGE2 が HSD3B2 の酵素活性を相乗的に増加させることがわかった。

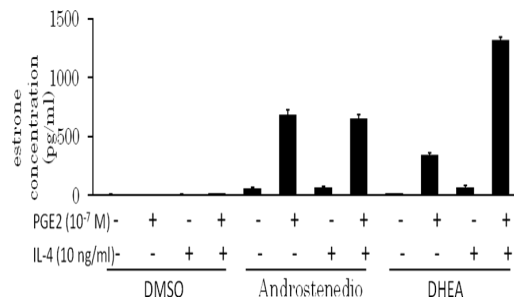


図 1. HSD3B2 と P450arom の酵素活性

CP-690550 は、IL-4 と PGE2 による DHEA から estrone への転換亢進を抑制した。

これらのことより、Th2 免疫応答と炎症反応が相乗的に作用して、子宮内膜症局所でのエストロゲン産生を促進している可能性が示唆された(図 2)。また、CP-690550 が子宮内膜症の治療に有効な可能性が示唆された。

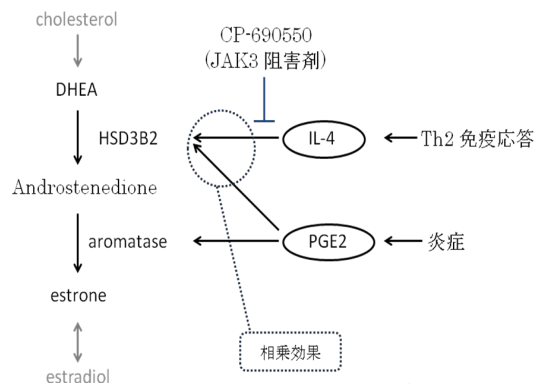


図 2. 子宮内膜症でのエストロゲン産生

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 20 件)

Taguchi A, Wada-Hiraike O, Kawana K, Koga K, Yamashita A, Shirane A, Urata Y, Kozuma S, Osuga Y, Fujii

T. Resveratrol suppresses inflammatory responses in endometrial stromal cells derived from endometriosis: a possible role of the sirtuin 1 pathway. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014; 40(3): 770-778. doi: 10.1111/jog.12252. 査読あり

Terao M, Koga K, Fujimoto A, Wada-Hiraike O, Osuga Y, Yano T, Kozuma S. Factors that predict poor clinical course among patients hospitalized with pelvic inflammatory disease. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014; 40(2): 495-500. doi: 10.1111/jog.12189. 査読あり

Tanaka E, Momoeda M, Osuga Y, Rossi B, Nomoto K, Hayakawa M, Kokubo K, Wang EC. Burden of menstrual symptoms in Japanese women - an analysis of medical care-seeking behavior from a survey-based study. *Int J Womens Health*. 2013; 6: 11-23. doi:

10.2147/IJWH.S52429. 査読あり

Tomio K, Kawana K, Taguchi A, Isobe Y, Iwamoto R, Yamashita A, Kojima S, Mori M, Nagamatsu T, Arimoto T, Oda K, Osuga Y, Taketani Y, Kang JX, Arai H, Arita M, Kozuma S, Fujii T. Omega-3 polyunsaturated Fatty acids suppress the cystic lesion formation of peritoneal endometriosis in transgenic mouse models. *PLoS One*. 2013; 8(9). doi: 10.1371/journal.pone.0073085. 査読あり

Saito A, Koga K, Osuga Y, Harada M, Takemura Y, Yoshimura K, Yano T, Kozuma S. Individualized management of umbilical endometriosis: a report of seven cases. *J Obstet Gynaecol Res*. 2014; 40(1): 40-5. doi:

10.1111/jog.12118. 査読あり

Urata Y, Osuga Y, Akiyama I, Nagai M, Izumi G, Takamura M, Hasegawa A, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Yoshino O, Koga K, Kozuma S. Interleukin-4 and prostaglandin E2 synergistically up-regulate 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in endometrioma stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98(4):1583-90. doi:

10.1210/jc.2012-3475. 査読あり

Akiyama I, Yoshino O, Osuga Y, Izumi G, Urata Y, Hirota Y, Hirata T, Harada M, Koga K, Ogawa K, Kozuma S. Follistatin is induced by IL-1 and TNF- α in stromal cells from endometrioma. *Reprod Sci*. 2013;20(6):675-9. doi: 10.1177/1933719112463253. 査読あり

Takamura M, Osuga Y, Izumi G, Yoshino O, Koga K, Saito A, Hirata T, Hirota Y, Harada M, Hasegawa A, Taketani Y. Interleukin-17A is present in neutrophils in endometrioma and stimulates the secretion of growth-regulated oncogene-1 (GRO-1) from endometrioma stromal cells. *Fertil Steril*. 2012; 98(5):

1218-24.e1-2. doi:

10.1016/j.fertnstert.2012.07.1117.

査読あり

Urata Y, Osuga Y, Izumi G, Takamura M, Koga K, Nagai M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Yoshino O, Taketani Y.

Interleukin-1 stimulates the secretion of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) from endometrioma stromal cells: possible involvement of TSLP in endometriosis. *Hum Reprod*.

2012;27(10):3028-35. doi:

10.1093/humrep/des291. 査読あり

Takemura Y, Osuga Y, Fujimoto A, Oi N, Tsutsumi R, Koizumi M, Yano T, Taketani Y. Increased risk of placenta previa is associated with endometriosis and tubal factor infertility in assisted reproductive technology pregnancy. *Gynecol Endocrinol*. 2013;29(2):113-5. doi: 10.3109/09513590.2012.706669. 査読あり

Osuga Y, Hirota Y, Yoshino O, Hirata T, Koga K, Taketani Y.

Proteinase-activated receptors in the endometrium and endometriosis. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2012;4:1201-12.

Review. 査読あり

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22652866>

Isono W, Wada-Hiraike O, Osuga Y, Yano T, Taketani Y. Diameter of dominant leiomyoma is a possible determinant to predict coexistent endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*.

2012;162(1):87-90. doi:

10.1016/j.ejogrb.2012.01.018. 査読あり

Yoshino O, Izumi G, Shi J, Osuga Y, Hirota Y, Hirata T, Harada M, Nishii O, Koga K, Taketani Y. Activin-A is induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor- α and enhances the mRNA expression of interleukin-6 and protease-activated receptor-2 and proliferation of stromal cells from endometrioma. *Fertil Steril*.

2011;96(1):118-21. doi:

10.1016/j.fertnstert.2011.05.006. 査読あり

Hirata T, Osuga Y, Takamura M, Saito A, Hasegawa A, Koga K, Yoshino O, Hirota Y, Harada M, Taketani Y.

Interleukin-17F increases the secretion of interleukin-8 and the expression of cyclooxygenase 2 in endometriosis. *Fertil Steril*.

2011;96(1):113-7. doi:

10.1016/j.fertnstert.2011.04.060. 査読あり

Saito A, Osuga Y, Yoshino O, Takamura M, Hirata T, Hirota Y, Koga K, Harada M, Takemura Y, Yano T, Taketani Y. TGF- 1 induces proteinase-activated receptor 2 (PAR2) expression in endometriotic stromal cells and stimulates PAR2 activation-induced secretion of IL-6. Hum Reprod. 2011;26(7):1892-8. doi:

10.1093/humrep/der125. 査読あり

Harada M, Osuga Y, Izumi G, Takamura M, Takemura Y, Hirata T, Yoshino O, Koga K, Yano T, Taketani Y. Dienogest, a new conservative strategy for extragenital endometriosis: a pilot study. Gynecol Endocrinol. 2011;27(9):717-20. doi: 10.3109/09513590.2010.533800. 査読あり

大須賀 穰【内分泌ホルモンのすべて】(第10章)性ホルモン関連 エストロゲン・プロゲステロン. 内分泌・糖尿病・代謝内科(1884-2917)36巻 Suppl.4 Page345-351(2013.04)

大須賀穰【エキスパートの子宮内膜症・子宮腺筋症治療】手術療法 チョコレート嚢胞 産婦人科の実際(0558-4728)62巻5号 Page651-657(2013.05)

大須賀穰【子宮内膜症・子宮腺筋症-最近の話題-】子宮内膜症 子宮内膜症の病態の新たな側面. HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY;19巻4号 Page291-296.2012

大須賀穰 子宮内膜症の病因・病態をめぐる 内分泌学的・免疫学的アプローチから 日本産科婦人科学会雑誌;64巻1号 Page105-111.2012.

〔学会発表〕(計7件)

Urata Y, Osuga Y, Nagai M, Izumi G, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Yoshino O, Koga K, Yano T, Kozuma S. Interleukin (IL)-4 and prostaglandin (PG) E2 synergistically increase the expression of 3beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (HSD3B2) in endometrioma stromal cells. 第65回日本産科婦人科学会学術講演会 2013年5月10日札幌

Urata Y, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Fuji T. INTERLEUKIN-1beta INCREASES EXPRESSION OF TRYPTOPHAN 2,3-DIOXYGENASE AND STIMULATES TRYPTOPHAN. A conjoint meeting of the International Federation of Fertility Societies and the American Society for Reproductive.2013年10月14日ポストン

浦田陽子、大須賀穰、秋山育美、永井美

和子、泉玄太郎、高村将司、長谷川亜希子、原田美由紀、平田哲、廣田泰、吉野修、甲賀かをり、藤井知行. 子宮内膜症間質細胞において IL-4 と PGE2 は 3beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (HSD3B2) を相乗的に誘導する. 第58回日本生殖医学会学術講演会. 2013年11月15日 神戸

浦田陽子、大須賀穰、秋山育美、中澤明里、宮下真理子、原口広史、永井美和子、泉玄太郎、山本直子、原田美由紀、平田哲也、廣田泰、吉野修、甲賀かをり、上妻志郎. IL-1 は子宮内膜症細胞の TDO 発現増加を介してトリプトファン代謝を亢進する. 第32回日本エンドメトリオース学会. 2013年1月18日 栃木

浦田陽子、大須賀穰、永井美和子、泉玄太郎、高村将司、長谷川亜希子、原田美由紀、廣田泰、吉野修、甲賀かをり、矢野哲、武谷雄二. 子宮内膜症における thymic stromal lymphopoietin の発現制御とその意義. 第64回日本産科婦人科学会学術講演会. 2012年4月15日神戸
Urata Y, Osuga Y, Izumi G, Nagai M, Takamura M, Yamamoto N, Saito A, Hasegawa A, Takemura Y, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Yoshino O, Koga K, Taketani Y. Interleukin-4 and prostaglandin E2 synergistically upregulate 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in endometrioma stromal cells European Society of Human Reproduction and Embryology. 2012年7月1日 イスタンブール

浦田陽子、大須賀穰、永井美和子、泉玄太郎、山本直子、高村将司、齊藤亜子、長谷川亜希子、原田美由紀、森本千恵子、平田哲也、吉野修、甲賀かをり、武谷雄二. IL-17A は子宮内膜症細胞のトリプトファンジオキシゲナーゼ発現を増加させる. 第31回日本エンドメトリオース学会. 2012年1月21日 長崎

〔図書〕(計3件)

大須賀穰 子宮内膜症と生殖、産婦人科学レビュー、総合医学社、東京、190-194, 2011年

大須賀穰 序文：子宮腺筋症・子宮内膜症における最近の動向、日本臨床社、東京1-2, 2011年

大須賀穰 子宮腺筋症 総論、子宮腺筋症・子宮内膜症における最近の動向、日本臨床社、東京5-13, 2011年

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/kyobgyn/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大須賀 穰 (OSUGA, Yutaka)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80260496