

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592475

研究課題名(和文)子宮内膜症による骨盤内炎症が卵巣予備能に及ぼす影響に関する研究

研究課題名(英文)The research on the effects of intra-pelvic inflammation caused by endometriosis on ovarian reserve

研究代表者

北島 道夫(KITAJIMA, Michio)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：50380845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症による骨盤内炎症が卵巣機能に及ぼす影響を検討した。子宮内膜症は、卵巣皮質の炎症・線維化と表層上皮の陥入・化生変化を促進し、チョコレート嚢胞の発生・進展とともに卵巣皮質における原始卵胞の恒常性維持機構を破綻させる。その機序として、原始卵胞のリクルートメントと初期発育卵胞の閉鎖が同時に亢進して卵巣予備能の低下が進行する病態(burn-out)を明らかにした。チョコレート嚢胞への外科処置は卵胞発育に影響を与え、骨盤内炎症の重症度は術後の卵巣機能の回復に関与する。これらは、骨盤での局所炎症が女性の生殖機能に持続的な影響を与え、早期の医療介入が卵巣予備能の低下を予防できる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Ovarian superficial endometriosis induces inflammation and fibrosis in normal ovarian cortex, which harbor primordial follicles that constitute ovarian reserve. These inflammations may also induce invagination of ovarian surface epithelium and metaplasia of these cells that may form ovarian endometriomas. Inflammation and fibrosis in ovarian cortex may deteriorate the maintenance of dormant follicles. Enhanced recruitment of primordial follicles and atresia of early growing follicles, which can be regarded as "burn-out", may manifest the decrease of ovarian reserve in women with endometriosis. Inflammation and severity of endometriosis may affect the recovery of serum AMH levels after surgery. These results indicate that chronic focal pelvic inflammation derived by endometriosis may harm women's reproductive function continuously. Therefore, early medical intervention may reduce the incidence of infertility in these women. Further study is warranted to strengthen our results.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮内膜症 炎症 卵巣チョコレート嚢胞 卵巣予備能 卵巣皮質組織 卵胞発育 Burn-out 仮説

### 1. 研究開始当初の背景

晩婚化，初産年齢の上昇，それらの結果としての少子化，不妊症の増加への対策は，本邦で取り組むべき課題の一つである．卵巢機能（卵巢予備能）は加齢によって低下し，妊孕能を規定する因子であるが，卵巢予備能は様々な要素に修飾を受ける．卵巢予備能の低下に起因する不妊症は治療抵抗性であり，取り扱いに苦慮することが多い．

子宮内膜症は，性成熟期女性の約 5-6% に認められる疼痛と不妊を主徴とする慢性炎症性疾患である．子宮内膜症合併不妊症の病態は多岐にわたるが，本疾患が惹起する骨盤内癒着などの器質性変化に加えて，卵巢機能不全がその原因のひとつとして考えられる．子宮内膜症における卵巢機能低下は，卵巢チョコレート嚢胞に対する外科治療の結果として生じるが（Kitajima et al, Fertil Steril, 2011a），それに加えて，子宮内膜症の卵巢では外科処置による侵襲の以前に卵巢機能障害が生じている可能性がある（Kitajima et al, Fertil Steril, 2011b）．卵巢予備能は原始卵胞の数および質により規定されるが，子宮内膜症自身が原始卵胞数の維持にどのように影響しているかその作用機序については明らかでない．子宮内膜症による骨盤炎症が卵巢組織に及ぼす影響を解析し，組織炎症と原始卵胞数の維持との関連が明らかにされれば，治療抵抗性である卵巢性不妊を呈する子宮内膜症合併不妊症に対して新たな治療方策の開発の端緒となると考えられる．また，卵巢機能低下に起因する症候群である更年期障害においても新たな治療法の開発の一助となり得る．

近年，若年女性の悪性腫瘍患者で抗がん剤あるいは放射線療法を受け治療後に妊孕性が著しく低下することが予想される例において卵巢組織の凍結保存による妊孕性温存治療が試みられている．悪性腫瘍女性での妊孕性温存療法では，凍結保存した卵巢組織を融解し利用する際に，体外培養での卵胞発育が試みられているが，その手技は未だ確立されておらずその開発は容易でない．卵胞発育には周囲支持組織である間質細胞の存在が重要で，凍結融解卵巢皮質組織の活用の際には細胞組織工学の応用の必要性が認識されている．卵巢皮質特異の間質細胞の特性に関する検討は，今後の卵胞体外培養の成績改善に寄与する知見となることが期待され，妊孕性温存治療の発展に寄与する．

### 2. 研究の目的

本研究では，骨盤内の炎症の程度と卵巢機能，とくに卵巢予備能を規定する卵巢皮質における原始卵胞の恒常性との関連を明らかにする目的に，腹腔鏡手術を行う患者から，末梢血，腹水を採取して，末梢血では卵巢予備能マーカーを，腹水では各種炎症促進性サイトカインならびにマクロファージ濃度を測定し，両者の関連を比較する．また 1 部の対象においては，卵巢皮質組織を採取し，皮

質における炎症の程度や卵胞密度と前記の末梢血および腹水での解析結果を比較検討する．末梢血および腹水では ELISA 法を，組織標本では免疫染色を用いる予定である．これらから子宮内膜症の重症度と卵巢予備能との機能的な関連が明らかになることが予想され，子宮内膜症合併不妊症の病態において新たな知見をもたらすことが期待される．

子宮内膜症では，慢性炎症による組織構築の破壊が原始卵胞数の低下と関連する（Kitajima et al., Fertil Steril, 2011b）．このことは，ヒト卵巢皮質の原始卵胞周囲の支持組織が原始卵胞の恒常性の維持に重要な役割を担っていることを示唆している．一方で，原始卵胞周囲の間質細胞の分子生物学的特徴については不明な点が多い．これらが明らかにされれば，現時点では根本的な治療法のない卵巢性不妊や更年期障害などの卵巢機能不全に起因する各種婦人科疾患に対して新たな治療法の開発の一端となる可能性がある．本研究では，子宮内膜症性不妊症の病態ならびにヒト原始卵胞の恒常性維持について分子生物学的機序を解明することを目的に，子宮内膜症女性から得られた卵巢皮質組織の生検試料を用いて，免疫組織化学的手法，ELISA 法，LCM 法あるいは RT-qPCR 法により網羅的に検討を加える．

卵巢の組織構造は種による相違が大きく，卵巢研究においてヒト生検組織を用いた検討は多くない．ヒト卵巢は多様な要素から構成されている組織であり，そのなかで皮質特異の間質細胞での遺伝子発現を，LCM 法および RT-qPCR 法を用いて定量的解析を行う．本研究の代表者および分担者はこれらの手技に習熟しており，またこれまでにヒト卵巢組織での LCM 法の応用例は少ないため，本研究では卵巢組織の組織部位特異的なこれらの検討により，原始卵胞の恒常性の維持に重要と考えられる周囲支持組織の分子生物学的特徴とそれらに組織炎症が及ぼす影響が明らかにしたい．

### 3. 研究の方法

子宮内膜症における骨盤内炎症が卵巢機能に与える影響 - 卵巢予備能との関連

- 1) 腹腔鏡下手術を受ける 40 歳未満の子宮内膜症女性（卵巢チョコレート嚢胞あり n=20，卵巢チョコレート嚢胞なし n=20）および非子宮内膜症コントロール（良性嚢胞性卵巢腫瘍 n=20）を対象として，本研究参加に関してインフォームド・コンセントを得る．
- 2) 対象女性は術前に月経初期に診察し，超音波検査により，卵巢嚢胞の大きさ（3 方向の直径計測），卵巢実質部分の体積，片側例では対側の卵巢体積の計測および胞状卵胞数（antral follicle count, AFC; 経腔超音波検査で認められる 2-8mm の小卵胞の数で卵巢予備能を反映する）を計測する．このとき同時に末梢血を採取す

- る。採取した末梢血は血清分離を行い、血液中の卵巣予備能のマーカーである血清中 FSH, E2 および AMH を ELISA 法で測定する。残余の血清は -80 で保存する。
- 3) 腹腔鏡手術の際に、全例において腹水を採取する。採取した腹水は、遠沈して細胞成分と上清とに分け、細胞成分はパーコール法を用いてマクロファージ (M ) を抽出する。腹水上清はその後の炎症性サイトカイン濃度測定まで -80 で保存する。抽出した M は単位体積あたりの CD68 免疫染色陽性の活性化 M 数をフローサイトメトリー法で計測する。
  - 4) 腹水中の HGF, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , VEGF 濃度を ELISA 法で測定する。
  - 5) 子宮内膜症においては、腹腔鏡手術時に進行期、骨盤腹膜病変の色調および癒着の程度を rASRM 分類に基づいてスコア化して評価する。
  - 6) 対象のなかで、その後の挙児希望のない片側チョコレート嚢胞 (n=5) あるいは良性嚢胞性卵巣腫瘍 (n=5) の症例で、インフォームド・コンセントを得たうえで、嚢胞側卵巣および対側卵巣の卵巣皮質の小組織片 (卵巣長軸方向 5mm  $\times$  短軸方向 1mm  $\times$  皮質の厚み 1.5mm) を生検する。本手技は卵巣に対して少なからず侵襲的操作を伴うものなのでその後の挙児希望のない症例に限定して行う。
  - 7) 採取した組織片は 2 切片に分け、1 切片はブアン固定ののちパラフィン包埋切片を作成しその後の免疫組織化学的手法による検討に供する。1 切片は組織中 mRNA の保存度を高めるため、RNA later で処理したのち、凍結包埋して、その後の平成 25 年度以降に計画している実験に供するまで -80 に保存する。

ブアン固定した組織は 5 $\mu$ m 厚のパラフィン包埋連続切片を作成する。10 切片を選択して HE 染色を行い組織構築の確認と原始卵胞数の計測を行う。組織の線維化の程度をマッソントリクローム染色により評価する (Kitajima et al., Fertil Steril, 2011)。皮質組織の血管密度を CD34 免疫染色で評価する。構成細胞の増殖性を Ki-67 免疫染色により評価する。Kit ligand (KL), c-kit, GDF-9 および AMH の免疫染色により卵胞構成細胞の成熟度を評価する。

Laser capture microdissection (LCM) 法を用いた卵巣皮質の間質細胞における組織特異的発現遺伝子の解析

卵巣皮質においては、組織形態学的に原始卵胞を取り巻く細胞密度の高い帯状の皮質特異的間質細胞が存在する。これまでの私どもの検討では、子宮内膜症による組織局所の炎症に起因する組織の線維化が、原始卵胞の現象と皮質特異的間質細胞の低下に関連することが認められている (Kitajima et al, Fertil Steril, 2011)。この知見は、原始卵胞の維持にこれら周囲支持組織の重要な役

割を持つことを示唆している。一方でこれら皮質特異的間質細胞の分子生物学的特性は明らかでなく、原始卵胞数がどのように維持されているかその機序には不明な点が多い。平成 25 年度以降の研究計画においては、間質細胞に特異的に発現している遺伝子を定量解析を行い、その発現を子宮内膜症の有無で比較することにより、子宮内膜症が原始卵胞の恒常性にどのように影響しているかを詳細に検討する。平成 24 年度の研究計画で述べたように、対象女性から生検し凍結包埋ブロックとして保存した卵巣皮質検体で LCM 法を用いて皮質特異的間質細胞を特異的に切り出し、それらから mRNA を抽出して、RT-qPCR 法を用いて発現遺伝子を網羅的に解析する。

- 1) 対象女性から生検した卵巣皮質組織を RNA later で処理したうえ、クリオモールドにより凍結包埋ブロックを作成し実験に供するまで -80 で保存する。
- 2) 8 $\mu$ m 厚の凍結切片を作成して、LCM のために開発された専用の膜付きスライドガラスの乗せる。LCM のための凍結切片染色キットを用いて染色し、顕微鏡下に卵巣皮質組織中で原始卵胞に付随する間質細胞組織を確認し LCM 装置を用いてその部位を特異的に切り出す。
- 3) 複数のプレパラートから切り出した組織はエッペンドルフチューブに集めて、RNA を抽出する。抽出した RNA は -80 で次の実験に供するまで保存する。
- 4) 抽出した RNA の質についてはマイクロフルイドチップを用いた integrity 解析により評価する。

抽出した RNA を cDNA へ逆転写したうえ、real time qPCR 法により組織中に発現している mRNA の定量的解析を行う。これまでの知見から、子宮内膜症による炎症が間質細胞組織の安定性に影響し、間質細胞組織のリモデリングおよびアポトーシスがそこに存在している原始卵胞の維持に関与していることが予想される。本研究では、皮質特異的間質組織における細胞外基質のリモデリングに関与している遺伝子群、アポトーシスに関与する遺伝子群、血管新生に関わる遺伝子群を解析する。具体的には、MMPs (MMP1, 3, 9), TGF $\beta$ , Bax, Bcl2 および VEGF の mRNA の定量解析を行い間質細胞の分子生物学的特性を検討する。

#### 4. 研究成果

- ・ 腹腔鏡手術を受けた卵巣チョコレート嚢胞を有する女性において、疾患自身および疾患に対する外科処置が卵巣予備能に及ぼす影響を評価する目的に、腹腔鏡手術を受けた子宮内膜症および非子宮内膜症コントロールから採取した末梢血および腹水を用いて、末梢血中 AMH および腹水中の炎症促進性サイトカイン濃度を ELISA 法により測定し、進行期などの子宮内膜症の臨床病理的因子やサイトカイ

ン濃度による腹腔内炎症の程度と AMH の相関を解析した。子宮内膜症による骨盤内炎症の亢進および骨盤内臓器の癒着の進行は、末梢血 AMH 濃度と関連しており、これらが卵巣予備能に影響していることが推察された。

- ・ 子宮内膜症女性から得られた卵巣皮質組織において、皮質に存在する初期卵胞の形態的評価を行った。チョコレート嚢胞を有する卵巣から得られた皮質組織では、初期卵胞のリクルートメントおよび閉鎖の亢進が認められた。これらは、免疫染色による卵胞顆粒膜細胞での PCNA 陽性率の亢進と一致していた。また、形態的に閉鎖していると判断された初期卵胞ではアポトーシスの調節蛋白である活性型カスパーゼ3の局在が認められた。これらの結果は、チョコレート嚢胞の形成過程において、卵巣皮質に存在する原始卵胞が消失する (= 卵巣予備能の低下) 過程を示していると考えられ、原始卵胞のリクルートメントと初期発育卵胞の閉鎖が同時に亢進して卵巣予備能の低下が進行する病態 (burn-out) が子宮内膜症で卵巣予備能が低下する機序の1つであると考えられた。
- ・ LCM を用いて卵巣皮質から一定量の組織を切り出し、それらから mRNA の抽出を行った。LCM による組織特異的 RNA の抽出は複数の実験段階に分かれており、その各ステップの実験手技の調整を重ねて、マイクロフルイドチップを用いた RNA integrity 解析により、凍結卵巣組織から一定以上の quality の RNA の抽出を試みた。現在のところ、いくつかのヒト卵巣組織からの一定以上の quality を持つ RNA の抽出が可能であったが、複数検体を通して一定した質および量の RNA を抽出は困難であった。
- ・ 卵巣チョコレート嚢胞に対して一期的あるいは薬物療法を併用して二期的腹腔鏡下手術を行った例を対象に、骨盤内炎症と卵巣予備能との関連を解析した。子宮内膜症では有意に腹水中 IL-6 濃度が高く、それらはプロゲステロン療法により有意に低下した。血中 AMH は術後 3-6 ヶ月まで一旦有意に低下し、その後 12 ヶ月ごろまでに一定の回復を示す傾向が認められた。卵巣組織での AMH の発現は一次卵胞から前胞状卵胞の顆粒膜細胞で最も強い発現が認められた。これらの知見は、手術による炎症や組織ストレスにより、AMH の主な産生源である初期発育卵胞が一過性に消失したのち、原始卵胞の選択・発育機構が再構築されることを示唆している。また、AMH の回復と子宮内膜症の重症度に関連が認められ、骨盤内炎症が強い例では卵巣予備能が低下し、さらに手術操作での原始卵胞の消失が著しく、術後に卵巣機能が低下することが推

察された。

卵巣の表層性子宮内膜症では、マクロファージの浸潤が認められ、浸潤マクロファージからは炎症性サイトカインの産生が亢進している。表層子宮内膜症の周囲正常皮質では、炎症・線維化とともに表層上皮の陥入と化生変化が観察された。これら、卵巣表層の子宮内膜症の初期病変による強い組織炎症が、卵巣チョコレート嚢胞の発生要因となっていることを示唆し、チョコレート嚢胞の形成過程の進行とともに周囲卵巣皮質の組織構造を破壊し、原始卵胞の恒常性を維持機構が破綻することが推察された。

#### 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 10 件)

- 1) Kitajima M, Dolmans MM, Donnez O, Masuzaki H, Soares M, Donnez J. Enhanced follicular recruitment and atresia in cortex derived from ovaries with endometriomas. *Fertil Steril*. 2014 Apr;101(4):1031-7. 査読あり
- 2) 北島 道夫, Van Langendonkt A, Dolmans MM, Donnez J, 増崎英明. 卵巣皮質の組織形態解析からみた子宮内膜症が卵巣予備能に及ぼす影響. *日本エンドメトリオーシス学会会誌* 2013; 34: 79-84. 査読なし
- 3) Khan KN, Kitajima M, Fujishita A, Hiraki K, Matsumoto A, Nakashima M, Masuzaki H. Pelvic pain in women with ovarian endometrioma is mostly associated with coexisting peritoneal lesions. *Hum Reprod* 28(1):109-118,2013. 査読あり
- 4) Jadoul P, Kitajima M, Donnez O, Squifflet J, Donnez J. Surgical treatment of ovarian endometriomas: state of the art? *Fertil Steril* 98(3):556-63,2012. 査読あり
- 5) 北島道夫, Van Langendonkt A, Defrère S, Dolmans MM, Colette S, Squifflet J, Donnez J, 増崎英明. 卵巣チョコレート嚢胞が周囲卵巣皮質および初期卵胞の組織形態と卵巣予備能に及ぼす影響に関する検討. *日本エンドメトリオーシス学会会誌* 33: 83-87, 2012. 査読なし

[学会発表](計 18 件)

- 1) 北島道夫. チョコレート嚢胞における卵巣予備能の低下機序-局所炎症と burn-out. 2014 年 5 月 24 日, 第 5 回婦人科ホルモン依存性疾患研究会, ホテルグランパシフィック LE DAIBA(東京都) 招請講演
- 2) Kitajima M, Khan KN, Matsumoto A, Hiraki K, Inoue T, Miura K, Masuzaki H. Longitudinal changes in post-operative serum AMH levels in women had three step laparoscopic cystectomy for endometrioma utilizing dienogest. 3<sup>rd</sup> Asian Conference on

Endometriosis, October 24-26, Seoul, South Korea

- 3) Kitajima M, Khan KN, Van Langendonck A, Dolmans MM, Hideaki Masuzaki H, Donnez J. Ovarian Superficial Endometriosis May Facilitate Formation Of Ovarian Endometrioma: A Histological Analysis. 12<sup>th</sup> World Congress on Endometriosis (WCE 2014), 30 April to 3 May 2014, Sao Paulo, Brasil
- 4) Kitajima M, VanLangendonck A, Dolmans MM, Donnez J, Hideaki Masuzaki H. Diminished ovarian reserve in women with endometrioma: concerns for fertility preservation in women with endometriosis. The 3<sup>rd</sup> World Congress of the International Society for Fertility Preservation (IFSP2013), 7-9. November, 2013. Valencia, Spain.
- 5) Kitajima M., Defrère S., Colette S., Donnez J., Guiot Y., Dolmans M.M., Van Langendonck A. Laser-capture microdissection as a tool to analyse inflammation- and oxidative stress induced genes in endometriotic lesions in a murine endometriosis model. 2nd world congress on Fertility and Antioxidants Therapy 2012 December 6-7, Paris.

〔図書〕(計3件)

- 1) Kitajima M. Ovarian reserve in patients with endometriosis. In: Harada T eds. Endometriosis: Pathogenesis and Treatment. Japan: The Springer publishing, 2014.
- 2) 北島道夫, 増崎英明: 卵巣組織移植に関する現状(同所性・異所性). 卵巣組織凍結・移植 新しい妊孕性温存療法の実践(鈴木直編)東京:医歯薬出版:2013. 第1版:78-86.
- 3) カーン カレク, 北島道夫, 藤下 晃, 増崎英明: 1 発生機序. 子宮筋腫・子宮内膜症・子宮腺筋症診療マニュアル. 百枝幹雄, 編. p144-148, 診断と治療社, 東京 2013. 著書

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等:なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北島 道夫 (KITAJIMA, Michio)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号: 50380845

### (2) 研究分担者

カーン カレク (KHAN, Khaleque)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号: 60336162