

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462490

研究課題名(和文)子宮内膜症合併不妊に対するNFκBを標的とする新規薬物療法の開発

研究課題名(英文) Novel medical therapy targeted NFκB for the infertile patients with endometriosis

研究代表者

谷口 文紀 (Taniguchi, Fuminori)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：40322218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症による骨盤内炎症は、生殖年齢女性の妊孕能低下の原因となる。月経血や腹水中の細菌性エンドトキシン(リポポリサッカライド:LPS)濃度の上昇と子宮内膜症の病態との関連が示唆されている。本研究では、子宮内膜症モデルマウスを用いて、LPS投与が子宮内膜症病巣形成に及ぼす影響について検討した。細菌性エンドトキシンは骨盤内炎症を惹起することでNFκBの活性化を介して、子宮内膜症の初期病巣形成を促進することが示唆された。NFκB阻害剤が病巣形成と炎症反応を抑制することを確認した。本研究成績は、子宮内膜症合併不妊の新たな治療戦略の分子基盤の一助になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Local and chronic inflammatory reaction in the peritoneal environment is considered the contributing factors in the pathogenesis of the infertile patients with endometriosis. The inflammatory mediators, such as bacterial endotoxin, LPS (lipopolysaccharide), in the menstrual or peritoneal fluid, can activate the innate immune cells. A mouse endometriosis model was established by transplanting autologous endometrial tissue. LPS increased total number, size, and mRNA expression of the inflammation-related factors in murine endometriosis-like lesions, as human endometriotic tissues in the early stage. Treatment with a NFκB inhibitor negated these LPS-induced effects. LPS-induced pelvic inflammation status enhanced the development of murine endometriosis-like lesions via NFκB pathway. These data can be a molecular basis with regard to the strategy of novel treatment for the infertile patients with endometriosis.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮内膜症 炎症 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

体外受精による妊娠率は依然として 20 ~ 30%と停滞している。高齢不妊患者の増加と子宮内膜症合併不妊患者数の増加が問題であり、その対策が急務である。子宮内膜症合併不妊の多くは難治性であり、炎症性サイトカインをはじめとする炎症関連物質や卵巣ホルモンが複合的に関与している。特に、子宮内膜症による骨盤内炎症や卵巣チョコレート嚢胞の存在が、生殖年齢女性の卵巣機能低下の原因となっていると考えられている。月経血や腹水中の細菌性エンドトキシン濃度の上昇と子宮内膜症の病態との関連が示唆されている。私どもは、培養子宮内膜症細胞を用いて、その分子基盤について炎症性サイトカインの役割に着目して研究を推進し、なかでも Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) とインターロイキン (IL)-6、IL-8、Tumor necrosis factor (TNF) 等の炎症性サイトカインが、子宮内膜症の病態形成に関与することを示してきた。ヒト子宮内膜症間質細胞への細菌性エンドトキシン・リポポリサッカライド (LPS) 添加がシクロオキシゲナーゼ-2 遺伝子およびプロスタグランジン E2 (PGE2) 産生を促進し、細胞増殖と浸潤を促すことを示した。本研究では、モデルマウスを用い、骨盤内炎症が子宮内膜症組織と子宮内膜組織に及ぼす影響について検討する。このモデルシステムにより、本症の病態解明にとどまらず、新規抗炎症薬の開発へ繋がることを期待できる。

2. 研究の目的

不妊や骨盤痛を伴う子宮内膜症の薬物治療は、血中エストロゲン低下を誘導する内分泌療法が中心である。しかし、効果は一時的で、その治療期間中は妊娠が望めない。本研究では、マウス子宮内膜症モデルを用いて、子宮内膜症合併不妊患者の骨盤内環境を模したモデルシステムによる検討を展開し、骨盤内炎症による子宮内膜症様組織および子宮内膜へ及ぼす影響を評価することを目指した。独自に開発したマウスモデル実験系を用いる。この組織はヒト子宮内膜症の初期活動性病変に類似する。細菌性エンドトキシン LPS の役割に着目して、子宮内膜症モデルマウスにおける病巣形成への影響を検討した。病巣組織中の細胞増殖能や炎症反応強度を表すマーカーの免疫染色を行った。炎症性サイトカインと NF- κ B を中心に、子宮内膜症合併不妊の機序を解明し、新規薬剤による妊娠能改善を目標とする。

3. 研究の方法

同系マウス子宮内膜組織の腹腔内移植後に形成される嚢胞組織を用いる。マウス卵胞

体外培養システムを構築し検討したが、当初の計画に合致したデータが得られないことから、抗炎症作用のある新規薬剤とモデルマウスを用いて、同様の検討を行った。LPS の長期投与により、慢性炎症を模倣した子宮内膜症モデルマウスを作成し、子宮内膜症様病巣について検討した。病巣組織における炎症関連遺伝子発現を定量した。LPS 受容体の Toll-like receptor (TLR) 4 発現、細胞増殖能は Ki-67、血管新生は PECAM、T 細胞とマクロファージの集簇は CD3 と F4/80、NF- κ B およびリン酸化 NF- κ B の発現を検出した。また、天然型 NF- κ B 阻害剤 (パルテノライド; Parthenolide: Part) や抗炎症剤デキサメサゾン (DEX) 投与の影響をみた。次に、同モデルマウスを用いて、新規選択的エストロゲン受容体調節剤 (SERM) である SR-16234 の効果を検証した。テールフリックテスト (熱刺激鎮痛効果測定法) および ホットプレートテスト (痛覚感受性測定法) に供し、鎮痛効果を行動的差異により検討した。

4. 研究成果

LPS 投与は、マウスあたりの病巣個数とサイズを増加させた。LPS 投与により、病巣組織中の TLR4、Ki67、CD3、F4/80 および PECAM の陽性細胞率は上昇し、NF- κ B およびリン酸化 NF- κ B の染色強度も増強した。また、正所性子宮内膜組織では、LPS 投与によって、*Il-6*、*Vegf*、*Ccl-2* と *Ptgs-2* 炎症関連遺伝子発現の影響はみられなかったが、子宮内膜症病巣では増強がみられた。これらの LPS による効果は、Part あるいは DEX の併用投与により完全に抑制された。子宮内膜症モデルマウスにおいて、細菌性エンドトキシンは骨盤内炎症を惹起することで NF- κ B の活性化を介して、子宮内膜症の初期病巣形成を促進することが示唆された。また、Part 投与が病巣形成や炎症反応を抑制したことから、子宮内膜症の新たな治療戦略として、NF- κ B を標的とする薬物治療が期待される結果を得た。

続いて、LPS を腹腔内投与したのちに、SR16234 を連日投与し、4 週後の子宮内膜症様病巣について検討した。SR16234 投与により、マウスあたりの病巣重量は減少した。LPS 投与により増加した *Il-6*、*Ccl-2* と *Ptgs-2* の遺伝子発現量は、SR16234 により抑制された。Ki67 陽性細胞比率は低下し、CD3、F4/80 および TLR4 発現も低下した。テールフリックテストおよび ホットプレートテストにおいては、明らかな薬剤によるマウス行動の差異はみられなかったが、マウス子宮内膜症様病巣において、SR16234 は病巣縮小と炎症抑制効果を示した。本研究成績は、子宮内膜症合併不妊の新たな治療戦略の分子基盤の一助になると考えられた。

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 10 件)

(1) Azuma Y, Taniguchi F, Nakamura K, Nagira K, Khine YM, Kiyama T, Uegaki T, Izawa M, Harada T. Lipopolysaccharide promotes the development of murine endometriosis-like lesions via the nuclear factor-kappa B pathway. *Am J Reprod Immunol*, 査読有, 2017, 77(4), DOI. 10.1111/aji.12631.

(2) Harada T, Taniguchi F, Onishi K, Kurozawa Y, Hayashi K, Harada T. Obstetrical complications in women with endometriosis: A cohort study in Japan. *PLoS One*, 査読有, 11(12), 2016, DOI.10.1371/journal.pone.0168476.

(3) Taniguchi F, Sakamoto Y, Yabuta Y, Azuma Y, Hirakawa E, Nagira K, Uegaki T, Deura I, Hata K, Harada T. Analysis of pregnancy outcome and decline of anti-Müllerian hormone after laparoscopic cystectomy for ovarian endometriomas. *J Obstet Gynaecol Res*, 査読有, 42(11), 2016, 1534-1540. DOI. 10.1111/jog.13081.

(4) Izawa M, Taniguchi F, Harada T. Molecular background of estrogen receptor gene expression in endometriotic cells. *Reprod Sci.*, 査読有, 23(7), 2016, 871-876. DOI. 10.1177/1933719115623642.

(5) Harada T, Khine YM, Kaponis A, Nikellis T, Decavalas G, Taniguchi F. The impact of adenomyosis on Women's fertility. *Obstet Gynecol Surv*, 査読有, 2016, 71(9): 557-568. DOI.10.1097/OGX.0000000000000346.

(6) Taniguchi F, Hirakawa E, Azuma Y, Uejima C, Ashida K, Harada T. Primary umbilical endometriosis: Unusual and rare clinical presentation. *Case Rep in Obstet and Gynecol*, 2016; 9302376, 2016. DOI: 10.1155/2016/9302376.

(7) Taniguchi F, Enatsu A, Ota I, Toda T, Arata K, Harada T. Effects of low dose oral contraceptive pill containing drospirenone/ethinylestradiol in patients with endometrioma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 査読有, 2015, 191, 116-120. DOI.10.1016/j.ejogrb.2015.06.006.

(8) Itamochi H, Oumi N, Oishi T, Taniguchi F, Shoji T, Fujiwara H, Sugiyama T, Suzuki M, Kigawa J, Harada T. Fibroblast growth factor receptor 2 is associated with poor overall survival

in clear cell carcinoma of the ovary and may be a novel therapeutic approach. *Int J Gynecol Cancer*, 査読有, 2015, 25(4): 570-6.

(9) Kaponis A, Taniguchi F, Azuma Y, Deura I, Vitsas C, Decavalas GO, Harada T. Current treatment of endometrioma. *Obstet Gynecol Surv*. 査読有, 2015, 70(3): 183-95.

(10) Uegaki T, Taniguchi F, Nakamura K, Osaki M, Okada F, Yamamoto O, Harada T. IAPs may be effective therapeutic targets for treating endometriosis. *Hum Reprod*. 査読有, 2015, 30(1): 149-58.

〔学会発表〕(計 10 件)

(1) 谷口文紀 卵巣チョコレート嚢胞からの癌発生に関する遺伝子解析と疫学研、日本エンドメトリオーシス学会 2017年1月21日~1月22日、「東京コンベンションホール(東京都中央区)」

(2) 上垣崇、谷口文紀ら、子宮内膜症モデルマウスにおけるLPSのNF- κ B経路を介した病巣形成促進効果、2016年11月3日~4日「バシフィコ横浜(神奈川県横浜市)」

(3) Taniguchi F, Azuma Y, Harada T. Lipopolysaccharide promotes the development of murine endometriosis-like lesions via the nuclear factor-kappa B pathway. Annual meeting of American Society for Reproductive Medicine, 2016年10月17日~10月20日、「ソルトレークシティー(米国)」

(4) Taniguchi F. Role of ER beta in endometriosis. Asian endometriosis on conference. 2016年9月22日~9月24日、「大阪国際会議場(大阪府大阪市)」

(5) 東幸弘、谷口文紀ら。モデルマウスを用いた骨盤内炎症による子宮内悪性病巣形成の促進、日本産科婦人科学会、2016年4月21日~4月24日、「東京国際フォーラム(東京都千代田区)」

(6) 谷口文紀ら。SR-16234, a selective estrogen receptor modulator, represses development of endometriosis-like lesions in rat model. 日本産科婦人科学会、2016年4月21日~4月24日、「東京国際フォーラム(東京都千代田区)」

(7) 荒田和也、谷口文紀ら。合成レチノイドによる子宮内膜症間質細胞増殖抑制効果、日本産科婦人科学会、2016年4月21日~4月24日「東京国際フォーラム(東京都千代田区)」

(8) 東幸久、谷口文紀ら。子宮内膜症モデルマウスにおけるNF- κ Bを介したエンドキシンの病巣形成促進効果。日本産科婦人科学会、2016年4月22日~24日「東京国際フォーラム(東京都千代田区)」

(9) 谷口文紀。抗アポトーシス因子(IAP)阻害による子宮内膜症治療の可能性。日本エンドメトリオーシス学会、2016年1月23日~24日「ホテル日航熊本(熊本県熊本市)」

(10)東幸弘、谷口文紀ら。子宮内膜症モデルマウスにおけるエンドトキシンの病巣形成促進効果。日本エンドメトリオーシス学会、2016年1月23日～24日「ホテル日航熊本(熊本県熊本市)」

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷口 文紀 (TANIGUCHI, Fuminori)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号：40322218

(2)研究分担者

原田 省 (HARADA, Tasuku)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号：40218649

伊澤 正郎 (IZAWA, Masao)
鳥取大学・医学部・特任教授
研究者番号：50032222

(3)連携研究者

(4)研究協力者