

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11273

研究課題名(和文) 潜在型TGF-β陽性細胞除去カラムを用いた新規子宮内膜症治療法の確立

研究課題名(英文) Novel treatment for endometriosis using latent TGF-beta apheresis

研究代表者

辻 俊一郎 (Shunichiro, Tsuji)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：30601546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は子宮内膜症患者の腹水における潜在型制御性T細胞とエフェクター制御性T細胞が増加し、LAPと呼ばれる陽性マクロファージが減少していること、その結果活性型のトランスフォーミング増殖因子(TGF-β)と呼ばれるサイトカインが増加していることを明らかにした。次に、子宮内膜症に罹患しているカニクイザルに対する月に1度の腹腔鏡観察を行うことで、ヒトと同様に進行性の病気であることを明らかにした。さらに、ヒトとは異なり膀胱子宮窩に子宮内膜症病巣を高頻度に認め、ヒトで高頻度に認める内膜症性嚢胞は認めなかったことを見出した。さらに、サル子宮内膜症の腹腔鏡所見による重症度スコアも作成できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では子宮内膜症患者の腹水中マクロファージがTGF-βの産生源であることが示唆され、その制御により治療につながる可能性が考えられた。また、カニクイザルの子宮内膜症がヒトと同様に進行性の病変であることを確認し、腹腔鏡観察による評価方法を作成したことで、子宮内膜症治療の動物モデルとしてカニクイザルが有用であることを示すことができた。また、サルに対する体外循環カラムの実験系も確立できた。不妊と疼痛を主訴とする子宮内膜症の新規治療法の確立のための土台作りは本研究課題で達成できた。これらは少子・晩婚化の現在に社会的意義のある基礎研究となりえたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We revealed increases in the proportions of resting Tregs and effector Tregs in the peritoneal fluid of women with endometriosis, as well as reduced expression of latency-associated peptide (LAP) on macrophages, resulting in the release of activated TGF-β. These observations may be associated with suppressed immune responses, which may initiate and promote endometriosis in the pelvic cavity. Next, we demonstrated that endometriosis is a progressive disease in cynomolgus monkeys as reported in humans by performing monthly laparoscopy. These findings also showed most sites of endometriosis were observed in the vesicouterine pouch, and an endometrial cyst of the ovary, which is the most common site of human endometriosis, was not observed. Furthermore, we could establish the scoring system for endometriosis in cynomolgus monkeys.

研究分野：産婦人科

キーワード：子宮内膜症 カニクイザル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

**子宮内膜症は罹患率の高い疾患であり、未解決問題を抱えている疾患である。**

子宮内膜症は、不妊と疼痛を主訴とし、子宮内膜類似組織が子宮以外の部位で発生・発育する疾患であり、生殖可能年齢の女性 10 人に 1 人と罹患率の高い疾患である。子宮内膜症に対する治療法として、薬物療法（ホルモン療法）や、手術療法（腹腔鏡下手術）が存在する。しかし、重症例では尿管切除再吻合を必要とする症例や、消化管の切除を必要とするような症例が存在し、高度な手術侵襲を必要とする症例が存在する。また、腹腔鏡下手術後の再発率も 2 年で約半数と高い。そこで、腹腔鏡下手術後に薬物療法を併用することで、その再発率を抑える報告が多数存在するが、薬物療法は排卵抑制作用も有し不妊症症例には適さない。つまり、子宮内膜症の治療戦略において既存の治療が奏功しない、もしくは非常に高度な侵襲を要求する症例が存在し、新規治療法の開発が望まれていた。

**Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  は子宮内膜症の病態生理に深く関与する。**

子宮内膜症の発症要因として、現在最も受け入れられている学説が 1927 年に発表された Sampson の月経血逆流説である。卵管を通して月経期に逆流した子宮内膜が骨盤腹膜に生着し子宮内膜症病変を形成する学説である。しかし、子宮内膜組織が逆流しただけでは子宮内膜症は発症しない。その病態生理に深く関与していると考えられているのが、Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  である。TGF- $\beta$  は、細胞増殖、上皮間葉転換、免疫寛容、細胞接着と子宮内膜症を形成するいずれの工程においても重要な影響を与える。そこで、我々は TGF- $\beta$  の産生を抑制することで子宮内膜症の発症および再発を抑制するという新規治療法の開発に取り組みうと考えた。

**TGF- $\beta$  は、Latency associated peptide (LAP) と呼ばれるペプチドに内包され、生物学的活性を有さない潜在型として産生される**

TGF- $\beta$  は Latency associated peptide (LAP) に内包されるような潜在型として分泌され、Activator により LAP の構造が変化することで、TGF- $\beta$  が遊離し生物学的活性を持つことが知られている。その LAP が近年細胞表面上に発現していることが報告された (Dat Q et al. PNAS 2009)。

つまり、図 1 に示すように細胞表面上において LAP を発現し、active TGF- $\beta$  の産生源となっている。

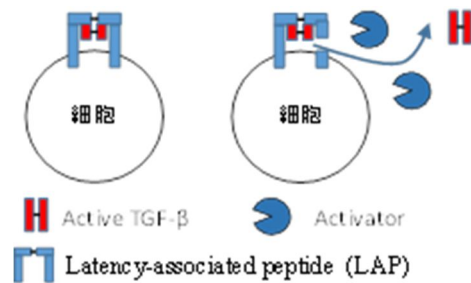


図1: 活性化TGF- $\beta$ が産生される仕組み

## 2. 研究の目的

上記を背景に、体外循環カラムを用いて末梢血における LAP 陽性細胞を除去することで、子宮内膜症を治療することが可能になるのではないかと着想に至った。そこで、ヒトで LAP と子宮内膜症の関係性を明らかにし、サルを用いて体外循環カラムを用いた新規治療法の加療を確立することを本研究の目的とした。

実験動物としてサルを選択した理由は、子宮内膜症はげっ歯類では自然発症しないが、サルはヒトと同様に自然発症し、ヒト子宮内膜症とその性質が酷似していることが知られており、実験動物として最適と考えられたからである。

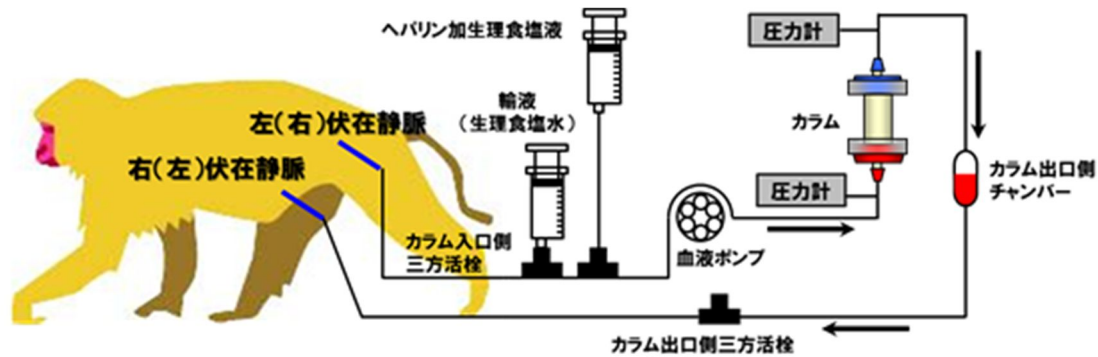
## 3. 研究の方法

### ヒト子宮内膜症と LAP の関係性における研究

、滋賀医科大学倫理審査委員会の承認の下、全ての患者に文書による説明と同意を得て行った。閉経後やホルモン療法などの薬物治療を施行されている患者、子宮内膜症以外の慢性および急性炎症性疾患を持つ患者、悪性腫瘍患者は対象外とし、滋賀医科大学医学部附属病院産婦人科に入院した腹腔鏡手術予定患者のうち、子宮内膜症患者 28 人および非子宮内膜症患者 20 人を対象とした。腹腔鏡手術施行時に末梢血および腹水を採取し、採取後直ちに Ficoll を用いて遠心分離し単核球を分離した。分離した単核球をフローサイトメトリーによる解析にて CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg の 3 つの亜集団 CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup> resting Tregs (rTregs)、CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>high</sup> effector Tregs (eTregs)、cytokine-secreting CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>low</sup> non-Tregs (non-Tregs) に分類し、それぞれの FoxP3 陽性リンパ球中の割合、および LAP 陽性単球 (抹消血液中) およびマクロファージ (腹水中) 割合につき、モノクローナル抗体を用いて分析を行った。同時に腹水中の TGF- $\beta$  についても ELISA 法によって定量した。解析は Mann-Whitney U 検定にて行い、P 値が 0.05 未満を有意差ありと定義した。

### サル子宮内膜症における潜在性 TGF- $\beta$ 吸着カラムを用いた新規治療法の開発

当大学動物生命科学センターにおいてカニクイザルを全身麻酔下に腹腔鏡下検査を行い、子宮内膜症の有無を判定する。子宮内膜症と診断されたカニクイザルは定期観察を行う。子宮内膜症と診断されたカニクイザルの内、2 頭に対してまずカラム治療を行う。2 週間に 1 度の頻度で計 4 回、カラムを用いた治療を試みる。カラム治療による安全性を検討する。1 か月に 1 度腹腔鏡観察を行いその治療効果を判定する。サルに対するカラム治療の概略図を下記に示す。



#### 4. 研究成果

子宮内膜症患者では、腹腔内で局所的に抑制性 Treg の上昇および LAP 陽性マクロファージが減少し、TGF- $\beta$  濃度が上昇していることを明らかにした。

CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> 細胞中の抑制性 Treg (iTregs および eTreg) は、子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者の腹水中 iTregs の中央値がそれぞれ 0.60% と 0.25%、eTreg の中央値がそれぞれ 3.4% と 1.7% であり、子宮内膜症患者の腹水中で有意に割合が高かった (P=0.02 および P<0.01) が、末梢血中では有意差を認めなかった。non-Treg については腹水中でも末梢血中でも両群間に有意差は認めなかった。また腹水中の LAP<sup>+</sup> マクロファージの割合は、子宮内膜症患者の腹水中では有意に減少していた (中央値: 子宮内膜症群 6.2%、非子宮内膜症群 21.2%、P<0.01) が、末梢血中では有意差を認めなかった。TGF- $\beta$  は子宮内膜症患者腹水中で有意に上昇を認めた (中央値: 子宮内膜症群 1.08ng/mL、非子宮内膜症群 0.75 ng/mL、P<0.01)。

本研究では子宮内膜症患者の腹水中で抑制性 Treg が上昇し、末梢血中では変化がないことを示した。これまでも CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> 細胞についてはいくつか報告があったものの、結果が一定ではなく議論の余地が残されていたが、我々の得た結果によりやはり Treg に関連した免疫寛容状態が子宮内膜症の病態に寄与していることが明らかとなった。また子宮内膜症患者の腹水中の TGF- $\beta$  が上昇していることについてはこれまで多くの報告があったが、産生源については不明な点が多かった。本研究では子宮内膜症患者の腹水中マクロファージ表面に発現する LAP が減少し、同時に TGF- $\beta$  が上昇することを明らかとしたことで、腹水中のマクロファージが TGF- $\beta$  の産生源であることを示唆した。TGF- $\beta$  はそれ自身が組織の繊維化を促すだけでなく Treg の分化も促進する。今回我々が得た結果より子宮内膜症患者の腹水中では、マクロファージ表面の LAP から活性型 TGF- $\beta$  が放出されることで腹水中の TGF- $\beta$  濃度が上昇し、さらに Treg の増加が誘導されている可能性を示した。このカスケードを制御できれば、子宮内膜症の病勢をコントロールする治療戦略に繋がる可能性があると考えられた。

カニクイザルはヒトと同様に進行性の子宮内膜症病変を有するがその好発部位は異なることを明らかにした。

当大学動物生命科学センターにおいてカニクイザルを全身麻酔下に腹腔鏡下検査を行い、子宮内膜症と診断したサル 11 頭を 1 か月に 1 度定期観察した。8 頭は 24 か月、1 頭は 21 か月、1 頭は 18 か月、1 頭は 11 か月行った。サルにおける子宮内膜症病巣が膀胱子宮窩にあることが多いことに気が付いた (11 頭中 10 頭)。ヒト子宮内膜症患者においてはダグラス窩とよばれる子宮と直腸窩との間に多く観察できる。これはヒトではダグラス窩に多く月経血が貯留するからで、サルは 4 つ足歩行のために膀胱子宮窩が腹腔内で最も底になるため、同部位に月経血が貯留するためと考えられた。このことは、前述した Sampson の月経血逆流説を裏打ちするものと考えられた。

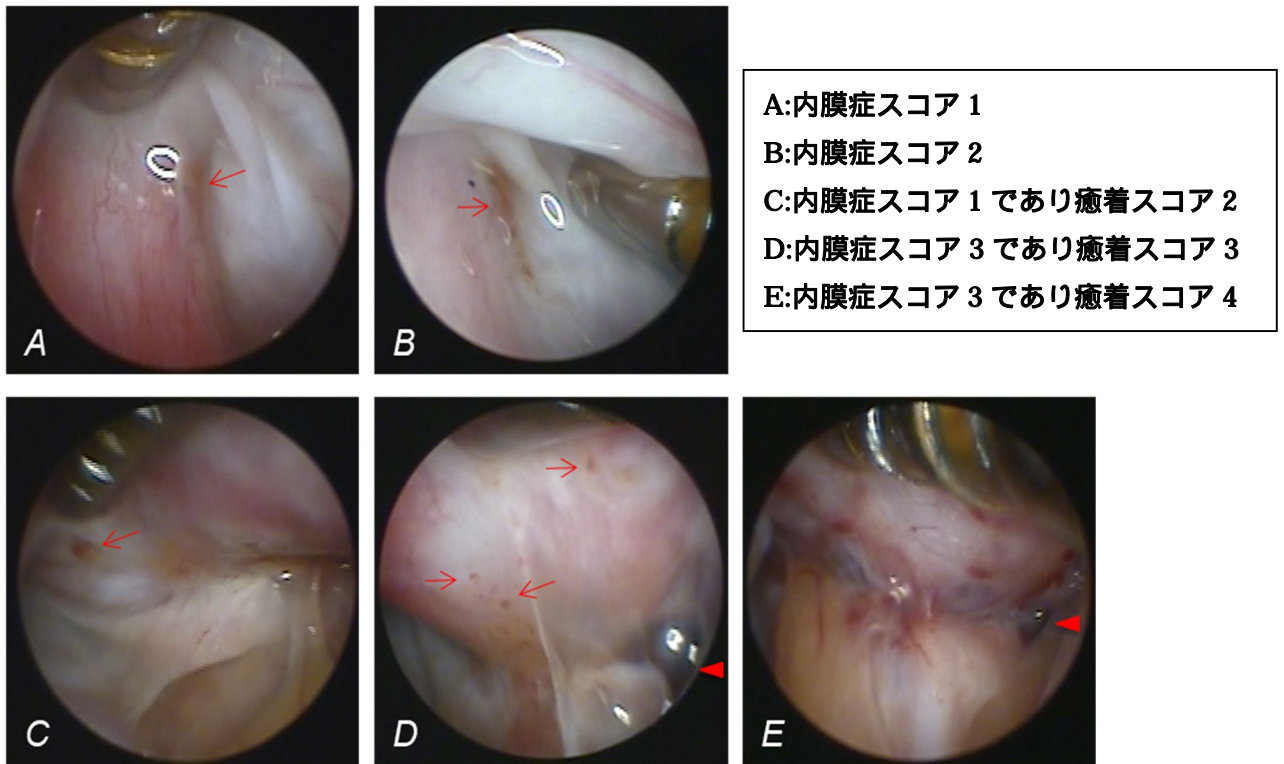
子宮内膜症サルにおける腹腔鏡検査所見による重症度分類を作成した。

本研究では上述したように、長期に渡り腹腔鏡を用いてサル子宮内膜症を観察してきた。その過程の中で、下記のような重症度分類を作成し、その進行を 11 頭で評価することができた。

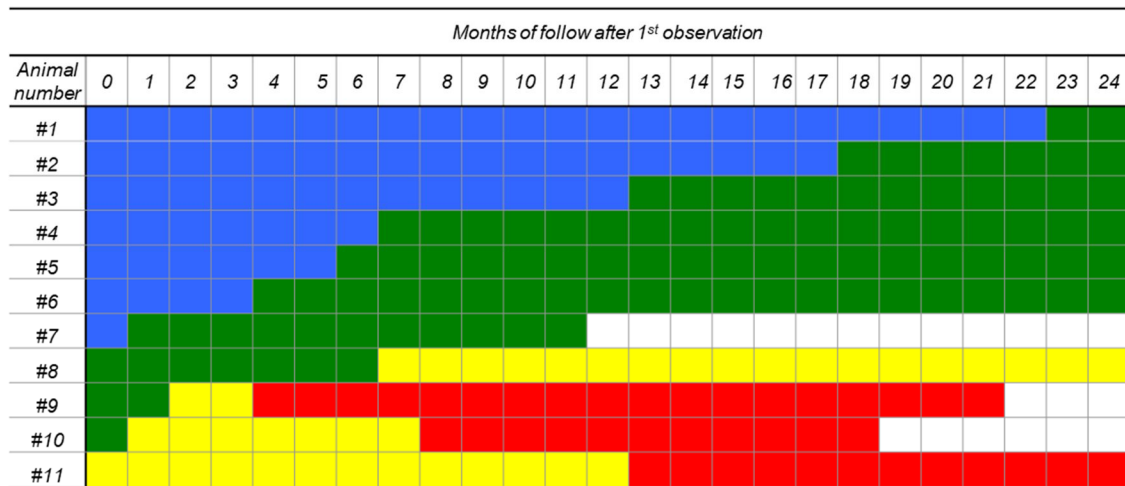
表 1)カニクイザルにおける腹腔鏡観察による子宮内膜症スコア

Score	Endometriosis lesion <sup>a</sup>	Adhesion <sup>b</sup>
1	<3mm	<3mm
2	3mm $\leq$ , <6mm	3mm $\leq$ , <6mm
3	6mm $\leq$ , <50mm	6mm $\leq$ , <50mm
4	$\geq$ 50mm	$\geq$ 50mm

上記スコアの実際を下記に示す。



本評価システムによるカニクイザル 11 頭の子宮内膜症の重症度評価



注) 青色 (Score 1 と 2) 緑色 (Score 3 と 4) 黄色 (Score 5 と 6) 赤色 (Score 7 と 8)

上記スコアを鑑みてもカニクイザルの子宮内膜症はヒト同様に進行性的の変化を辿った

カニクイザルを用いた体外循環研究の実験系を確立したが、カラムがヒトとサルとの種差により機能しなかった。

開始当初はカラム内圧の上昇および脱血不良等にて中断することがあったが、流量を下げることによりその問題を解決することができた。カラム前後の血液を用いた比較試験において、免疫抑制性因子である activated Treg および TGF-β 濃度はカラム後の血液にて低下を認めた。共同研究者におけるヒト血液を用いた予備実験において当カラムが潜在型 TGF-β 陽性細胞を除去することが確認できていたため、同様にカラム前後の血液を用いて検証を行ったが、カニクイザルを用いた試験においては単球の同陽性細胞比率は予想に反しカラム後に上昇し、リンパ球の同陽性細胞比率は一定の傾向は認められないという結果であった。子宮内膜症病変は月に 1 回全身麻酔下に腹腔鏡を用いて病変を直接観察することにより評価した。1 頭は治療開始後に一度増悪した後所見は変化せず。もう 1 頭も一度増悪するが治療前に比べ病変の改善を認めた。しかし、改善を認めた個体は治療期間中無月経であり、無月経のため子宮内膜症が軽快したのか、カ

ラムにより病変が軽快したのかの判断は困難であった。両個体とも体外循環施行中のバイタルサインや体重の変化は認めず、1クール目の生化学検査値異常も認めなかった。その後計8週間無治療で経過観察したところ、両個体とも病変は増悪した。

潜在型 TGF- $\beta$  陽性細胞除去カラムを用いた体外循環試験では治療効果を認めることができず、子宮内膜症病変の変化がカラムの治療効果によるものか体外循環操作によるものか検討するために、新たな2個体を用いて潜在型 TGF- $\beta$  陽性細胞除去性能のないコントロールカラムを4回ずつ施行、その後10週間経過観察を行なったのちに、潜在型 TGF- $\beta$  陽性細胞除去カラムを4回ずつ施行した。カラム施行前および終了時の入口出口より採取した血液で測定した潜在型 TGF- $\beta$  陽性細胞・activated Treg の比較においてコントロールカラムと治療カラムで潜在型 TGF- $\beta$  陽性細胞・activated Treg の変化に差は認められなかった。子宮内膜症病変はいずれも進行を認め改善所見は得られなかった。

体外循環を行うことで、TGF- $\beta$  以外のサイトカイン産生が促進あるいは抑制されていることが子宮内膜症病変の経過に影響を与えている可能性を考え、Milliplex Map Non-Human Primate Cytokine Panel を用いて43項目のサイトカインを測定した。治療前後およびカラム通過前後の血液検体で明らかな上昇・低下を示すサイトカインは同定されなかった。

実験開始前のヒト血液を用いた予備実験と、カニクイザルを用いた本実験との間でカラム性能が異なる結果となり、これらが種差によるものか *in vitro* および *in vivo* によるものかを評価するために、子宮内膜症を発症していないカニクイザル安楽死個体から得られた血液を用いた *in vitro* 試験を行なった。リンパ球の潜在型 TGF- $\beta$  陽性細胞はカラム通液後低下を認めたが、単球の同陽性細胞は開始直後は通過後の方が高く、徐々に低下して入口より低くなる結果となり、ヒトと同様の除去性能を示すことはできなかった。

ヒト血液を用いた予備実験では共同研究者が潜在型 TGF- $\beta$  陽性細胞除去カラムの効果を示すデータを得たが、サルでは奏功しなかった。しかし、カニクイザルに安全に体外循環カラムを施行する実験系は確立することができた。今後はカラムの性能を改善させ、子宮内膜症を治癒させることが真にできるかを検討し、その評価には我々が確立したサルにおける子宮内膜症の評価システムを使用することができると確信している。

上記 の研究成果を下記 1.2.に論文として掲載もしくは掲載予定である。

1.Hanada T, Tsuji S, Nakayama M, Wakinoue S, Kasahara K, Kimura F, Mori T, Ogasawara K, Murakami T. Suppressive regulatory T cells and latent transforming growth factor- $\beta$ -expressing macrophages are altered in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018 Feb 1;16(1):9.

2.Kaori Hayashi, et al. The natural history of spontaneously occurred endometriosis in cynomolgus monkeys by monthly follow-up laparoscopy for two years. (in press)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsuji Shunichiro, Tsuji Kiyoshi, Otuska Hirokuni, Murakami Takashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Increased mast cells in endocervical smears of women with dysmenorrhea	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cytojournal	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4103/cytojournal.cytojournal_54_17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hanada T, Tsuji S, Nakayama M, Wakinoue S, Kasahara K, Kimura F, Mori T, Ogasawara K, Murakami T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Suppressive regulatory T cells and latent transforming growth factor- $\beta$ -expressing macrophages are altered in the peritoneal fluid of patients with endometriosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reprod Biol Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12958-018-0325-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村上 節 (Murakami Takashi) (20240666)	滋賀医科大学・医学部・教授  (14202)	
研究分担者	山中 章義 (Yamanaka Akiyoshi) (60452249)	滋賀医科大学・医学部・医員  (14202)	

## 6. 研究組織 (つづき)

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	林 香里  (Hayashi Kaori)  (70569251)	滋賀医科大学・医学部・助教     (14202)	