

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02362

研究課題名(和文) カニクイザルを用いた子宮内膜症標的ペプチド治療薬の最適化

研究課題名(英文) Optimization of Endometriosis-Targeted Therapeutic Peptide Using Cynomolgus Monkey

研究代表者

中村 紳一郎 (Nakamura, Shinichiro)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：50307980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：根本的な治療法のない子宮内膜症に対し、[KLAKLAK]2-HLAHL-Z13による新規ペプチド療法を企図した。子宮内膜症のカニクイザル2例に2週間毎、計9回の内視鏡観察を行い、うち2から5回目に同ペプチドを、うち1例はヒアルロニダーゼ(HYD)を混じ、骨盤腔内の病変部へ投与した。分離血漿によるCA125とPD-L1に対するELISAでは、ペプチドのみ投与の1例はいずれの値も投与後に上昇し、HYD含有の1例はいずれの値も低下した。HYD含有の1例では内視鏡による骨盤腔内病変のスコア化値と連動した低下も認められた。本研究でHYDによって本新規開発ペプチドが有効に作用する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非ヒト霊長類を用いて子宮内膜症の治療ができる機会は少なく、これまでの多くの治験等の報告は投与後に安楽死させ、経過途中の所見の観察は困難だった。本研究ではカニクイザルに自然発症した子宮内膜症例を用い、径時的に腹腔内視鏡で病変観察、採血、バイオプシー組織採取が可能となり、非ヒト霊長類を用いた体系的な子宮内膜症研究の基盤整備が完了した。さらに新規開発した子宮内膜組織特異的結合ペプチドの効果を検討し、その良好な効果とともにヒアルロニダーゼの補助的作用についても明らかにできた。現行のヒトの治療法としては低用量ビルなど、根本治療法でないため、子宮内膜症治療法の新しい方向性を提示することができた。

研究成果の概要(英文)：We attempted a novel peptide-therapy by [KLAKLAK]2-HLAHL-Z13 for endometriosis, of which has not chosen effective treatment. Two cynomolgus monkeys with endometriosis were demonstrated to endoscopic observations every 2 weeks for a total 9 times. The peptide was administered at the second to fifth observation-times in endometriosis lesions of the pelvic cavities. One of them was mixed with hyaluronidase (HYD) in the peptide-solutions. In ELISA used plasma, the concentrations of CA125 and PD-L1 were increased in a case of administration just with peptide, while those were decreased in a case of administration with peptide containing HYD. In the latter case, a synchronized decrease was found between the concentrations of ELISA and the scores of lesion-sizes measured by endoscopy. In this study, a possibility was suggested that HYD might aid for the suitable effect for ectopic endometrial tissues by this newly developed peptide.

研究分野：実験動物学

キーワード：子宮内膜症 ペプチド療法 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

子宮内膜症の主な治療法は薬物療法と外科手術か、両者の併用である。薬物治療は避妊薬や炎症抑制剤、鎮痛剤などを使用し、痛みの軽減、症状の抑制が目的となっている。外科手術は温存治療と根治的外科的治療の2つに分かれている。子宮内膜症は再発率が高く、薬剤と手術では症状を和らげることにとどまり、根治は困難である。ただし、子宮内膜症の病巣は基本的に腹腔に面した組織表面に発生するため、腹腔壁表面で増殖する子宮内膜上皮には結合するが、腹腔表面には結合しない分子を同定すれば、腹腔内投与による子宮内膜症特異的治療薬ができる、との仮説に基づき subtractive phage library Screening によって子宮内膜症特異的標的 9-mer ペプチド配列 “Z13” を同定した。治療効果を狙いトコンドリア膜を破壊してアポトーシスを誘導する KLAKLAK、エンドソーム破壊活性を持つ HLAHL を組み合わせた [KLAKLAK]₂-HLAHL-Z13 を作製した。先行研究[Sugihara et al]ではヒヒへの単回投与を行い、投与後の死後材料を用いた検索で、子宮内膜症病変でのアポトーシス反応の増強を認めた [Sugihara et al]。一方で、投与に伴う病巣の経時的な変化は見いだせずにいた。

2. 研究の目的

新規治療薬として開発された [KLAKLAK]₂-HLAHL-Z13 の効果をより正確に確かめること、そして現実的な解析手法を確立することを目的とした。先行研究では、死後材料にて子宮内膜症の組織にアポトーシスを示す上皮細胞の増加を認めたが、実験途中の経過や長期的な効果、副作用については不明であった。まず、評価のための適切な疾患モデル動物種について解決する。子宮内膜症が自然発症するには月経が不可欠で、マカク属やヒヒ属などの非ヒト霊長類は月経を有する。先行研究で用いられたヒヒは、日本では実験動物として使用されておらず、この種を用いた追加検討は不可能である。またサル種の中には季節繁殖の種がある。そこで国内でも入手可能で、通年繁殖のマカク属であるカニクイザルを用い、本ペプチドの効果を評価する。そして生体にて経時的に子宮内膜症の病変を観察するため、腹腔内視鏡で定期的に骨盤腔内を観察し、投与前後の病変を数値として客観的に評価する方法を確立する。さらに内視鏡による病変の観察以外のパラメーターを決定するため、観察時に採血、内視鏡による組織バイオプシーを行い、ELISA ならびに組織学的な変化がペプチド効果の評価に値するパラメーターかを決定する。また投与するペプチド溶液にはヒアルロニダーゼの有無による効果の差違を決定する。これらの実施事項から、本ペプチド投与の最適化を図ることを総合的な目的とする。

3. 研究の方法

供試動物

初期の子宮内膜症を有する雌のカニクイザル (Case 1:12.8 歳、体重 2.5 kg と Case 2: 年齢 8.2 歳、体重 4.5 kg) の 2 頭を用いた。室温 25 ± 2 °C、湿度 50 ± 5%、光周期 8:00 ~ 20:00 の 12 時間人工光、実験時は幅 500 × 高さ 800 × 高さ 800 mm のケージ内で飼育された。午前中に 20 g/kg の市販のサル用ペレット (CMK-1; CLEA Japan、東京、日本) を与え、午後 20 ~ 50 g のサツマイモと半分のバナナを毎日補給した。水は自動給水装置で与えられた [20]。全ての実験手順は滋賀医科大学動物実験委員会による承認のもとに実施された。

実験スケジュール

骨盤腔内を観察するために動物用腹腔内視鏡 (LA-6500、町田製作所、千葉、日本) を使用した。ケタミンとキシラジン (5 mg/kg + 1 mg/kg) の筋肉内投与による麻酔を行い、大腿部から 2 ml 採血し、内視鏡で腹腔内の内膜組織の進行の観察を 2 週間毎に合計 9 回行った。1 回目は投与前、2 ~ 5 回目は同時にペプチドを投与、6 ~ 9 回目は投与後の観察だった。そのうち 1 回目、3 回目、4 回目、6 回目、8 回目の観察時に約 2mm³ の組織採取を行った。合成ペプチド [KLAKLAK]₂-HLAHL-Z13 (ペプチド研究所、茨木、日本) は Case 1 に対しては 10 mg/25 ml PBS、Case 2 に対しては 10 mg + 12.5 mg ヒアルロニダーゼ (ナカライテスク、京都、日本) /25 ml PBS を骨盤腔内投与した。

血液検査

血液を Celltac (日本光電工業株式会社、東京、日本) にて血液検査した。また血漿は免疫比濁分析測定ユニット スポットケム D-01 SD-3810 (アークレイマーケティング株式会社、東京、日本) を用いて血液生化学を検査した。血液学ならびに血液生化学の検査項目は結果とあわせ表 1, 2 に示す。

病変分布解析

骨盤腔内の観察動画を撮影し、各例の 3 ヶ所の患部を設定し、それぞれの観察日に定点観察した

映像をキャプチャし、その停止画像の病変の拡がりや色調の強さを ImageJ (Version 1.8.0、National Institutes of health、MD,US) で解析、スコア化した。

組織学的検索

採取されたバイオプシー組織は 10% 中性緩衝ホルマリンに浸漬、パラフィン包埋の後、4 μm に薄切、HE 染色を行った。また抗 CD10 抗体 (abcam, ab951, ケンブリッジ、イギリス) を用いた免疫染色を行った。CD10 は様々な細胞で発現するが、子宮では内膜の子宮腺、粘膜上皮の刷子縁、間質細胞に発現している。

ELISA

CA125 (Human SimpleStep ELISA®Kit; abcam, ab195213-CA125 (MUC16) ケンブリッジ、イギリス) と PD-L1 (Quantikine®ELISA Human/Cynomolgus Monkey PD-L1/B7-H1 Immunoassay; R&D Systems、ミネソタ、アメリカ) の両キットを用い、それぞれのタンパクを定量した。スタンダードならびに血漿を免疫反応後、TMB 基質で発色し、吸光度は DPOWERSCAN 'MX (DS ファーマバイオメディカル株式会社、大阪、日本) を使用して、450 nm で測定した。CA125 は子宮内膜症で上昇が知られているマーカーで、PD-L1 は免疫抑制のマーカーである。

4. 研究成果

血液検査

血液、血液生化学値の異常は見られなかった。

病変分布解析

Case 1

病変 1: 膀胱子宮窩左側では (図 1-a) 1 回目、1 エリア内に小斑状ならびに細い帯状の茶褐色病変が見られた。2~5 回目は病変が拡がるとともに色調が濃くなることと、狭小化し色調が薄くなることを繰り返した。6~8 回目の観察では投与中の病変が縮小した時と同程度の変化の拡がりであったが、最終観察日である 9 回目の病変は 2 ヶ所の中型斑状病変として観察され、いずれの色調も濃かった。またこれら変化のスコアは (表 1) の通りで、色調や拡がりに応じた数値であった。

病変 2: 膀胱子宮窩右側では、1 回目、膜状で視野内約 1/2 に拡がる色調の薄い病変が見られた。3 回目の病変は小斑状に縮小するものの色調もさらに薄かったが、5 回目では病変は再び色調が濃くかつ膜状に拡がっており、小斑状の茶褐色病変も見られた。6 回目では斑状の病変は見られず薄い膜状病変が拡がったが、7、8 回目では 5 回目と同様に広い膜状病変に小斑状病変が混在した。9 回目では出血により見えにくい、膜状の病変を観察できた。またこれら変化のスコアは (表 1) の通りで、色調や拡がりに応じた数値であった。

病変 3: 左卵巣表面では、1 回目、小斑状の茶褐色病変が見られた。2,3,4 回目では病変に変化はなかったが、5 回目では病変がなくなっていた。7 回目では別の部位に斑状の茶褐色病変が複数見つかった。9 回目では投与前と同じ小斑状の茶褐色病変が見つかった。またこれら変化のスコアは (表 1) の通りで、色調や拡がりに応じた数値であった。

Case 2

病変 4: 膀胱子宮窩左側では (図 1-b) 1 回目、帯状の茶褐色病変が見られた。2 回目から 5 回目にかけて色調がやや薄くなった小斑状の病変が散在性に拡がっていった。投 6 回目は病変の拡がりはほぼ変化がなく、やや色調が濃くなったが、7 回目以降は 2~5 回目とほぼ同等の変化であった。またこれら変化のスコアは (表 2) の通りで、色調や拡がりに応じた数値であった。

病変 5: 膀胱子宮窩中央では、3 回目に茶褐色の帯状の病変が見られた。4 回目は色調がやや薄くなったが病変は拡がり中型斑状となり、5 回目の色調は少し濃くなり帯状に縮小した。6 回目では帯状の病変はなくなり、血の滲んだ小斑状の病変が見られた。またこれら変化のスコアは (表 2) の通りで、色調や拡がりに応じた数値であった。

病変 6: 膀胱子宮窩右側では、1 回目、チョコレート嚢胞と斑状の茶褐色病変が見られた。2 回目から 7 回目の間、嚢胞は拡張と縮小を繰り返して、嚢胞周囲の膜状病変は出現と消失を繰り返した。9 回目では嚢胞は縮小、小斑状の病変が複数見られた。またこれら変化のスコアは (表 2) の通りで、色調や拡がりに応じた数値であった。

組織学的解析

採取されたすべての時期、いずれの例にも異所性子宮内膜間質組織が観察された (図 2-a)。また Case 1 は 1 回、3 回、Case 2 は 1 回、4 回目の採取時材料に腺構造の上皮組織 (図 2-b) を認められたが、6 回目以降は認められなかった。間質組織の間質細胞 (図 2-c)、上皮組織の腺構造の刷子縁 (図 2-d) は CD10 陽性だった。

ELISA

CA125: Case 1 では、投与前の 41 U/ml に対して投与中は多少増加しているものの 55-90 U/ml の間で変動していた。しかし、投与終了後は 45 U/ml まで一旦減少し、その後、大きく上昇して

おり、9回目では195 U/mlまで増加していた。Case 2では、投与前は89 U/mlだったが、投与中は3回目に132 U/mlまで増加したが、前後は50 U/ml以下で上下動を繰り返した。投与終了後6,7回目は増加しているが、56 U/mlまでしか増加せず、その後は減少していき、9回目では20 U/mlまで減少していた(図3-a)。

PD-L1: Case 1では、投与前は60 pg/mlで、投与中の2回目には84 pg/mlに増加、3,4回目52 pg/mlに減少し、投与最終日の5回目は85 pg/mlまで増加した。投与後の6回目は一旦70 pg/mlまで下がり、7回目と8回目に上下動を繰り返し、9回目では117 pg/mlまで増加した。Case 2では投与前が54 pg/mlだったのに対し、投与中は4回目まで68 pg/mlまで漸増し、5回目は61 pg/mlに減少した。投与後は6回から7回目にかけて8 pg/mlまで減少したが、8回目、9回目は投与前より低い45 pg/mlに近い数値が続いた(図3-b)。

血液学、血液生化学の結果から子宮内膜症の病状の変化、またはペプチドの投与に伴う変化をモニターするための良好な項目は見いだせなかった。一方で異常な項目が見られなかったことは、ペプチド投与による血液学および血液生化学的な副作用を見られなかったことを意味している。

各例において3ヶ所の患部の観察を行った。Case 1では投与中は全ての部位で病変の減少を確認した。しかし、投与後に病変の拡がりが増加された。Case 2では投与中、一部の病変の減少が見られたが、投与後に増殖が増加された。[KLAKLAK]₂-HLAHL-Z13は内膜組織を抑制する効果があるが、投与を止めると効果が減弱化していた。従ってさらに長期間投与の検討の必要がありそうだ。

Case 1のCA125とPD-L1のグラフはかなり近い変動を示している。また病変のスコアが高くなると、CA125とPD-L1が増加、両者が連動していた。子宮内膜症の病変の広がりとともにCA125が増加し、免疫学的に移植された組織を許容するため免疫抑制作用のあるPD-L1が増加するという現象と一致していた。しかしCA125は必ずしも病変の重篤化と一致して上昇するわけでもないという報告や、免疫抑制にはPD-L1以外の物質が関わっているため、これら2つのマーカーを検索しただけでは説明できない病変の増減がある可能性も考慮すべきである。一方、投与後にCA125、PD-L1の値がCase 1では増加し、Case 2では安定して低かったのは、ヒアルロニダーゼが[KLAKLAK]₂-HLAHL-Z13の浸透、働きを助長したことで、[KLAKLAK]₂-HLAHL-Z13は強い効果を発揮する事ができたのではないかと考えられた。

本研究ではカニクイザル子宮内膜症の自然発症例を用い、腹腔内視鏡観察を行うことで、新規開発治療法の適切な径時的観察ならびに材料採取を行うことができた。カニクイザルの解析手法を確立できた。そのため[KLAKLAK]₂-HLAHL-Z13の効果、動物を安楽死させることなく、径時的に観察した。さらに、[KLAKLAK]₂-HLAHL-Z13は単回投与ではなく、複数回投与で子宮内膜症を抑制する効果があり、かつヒアルロニダーゼによって[KLAKLAK]₂-HLAHL-Z13がより有効に作用することがわかった。しかし、2ヶ月間の投与では投与期間中は子宮内膜症を抑えることはできたが、投与後の症状まで抑えることはできなかった。そのためもっと長期的な投与実験を行うことで子宮内膜症をどれだけ治療できるかを明確にし、今回は認められなかった副作用について検討する必要がある。

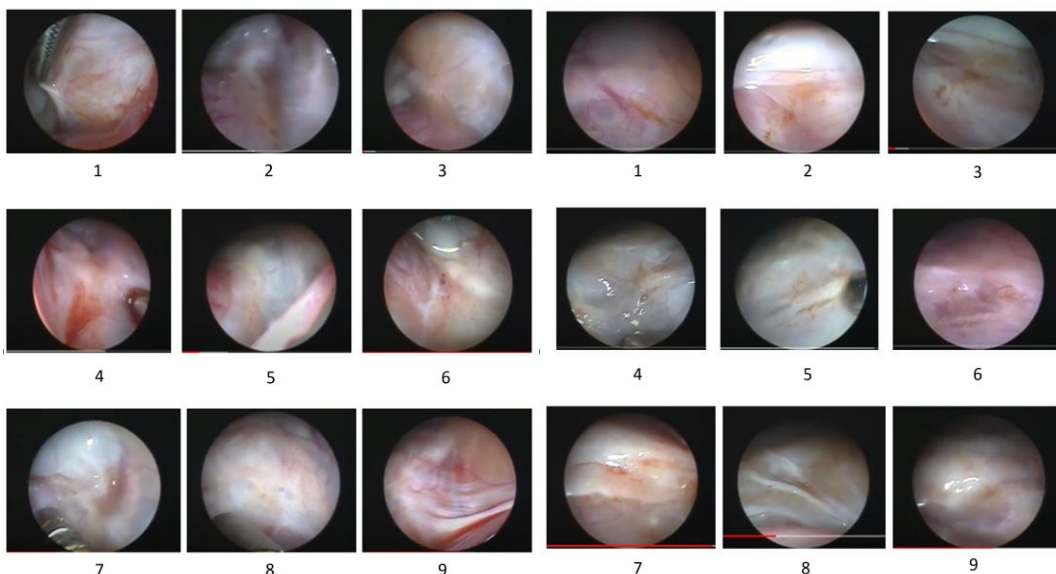


図1-a. 病変の定点観察、Case 1、病変1

図1-b. 病変の定点観察、Case 1、病変4

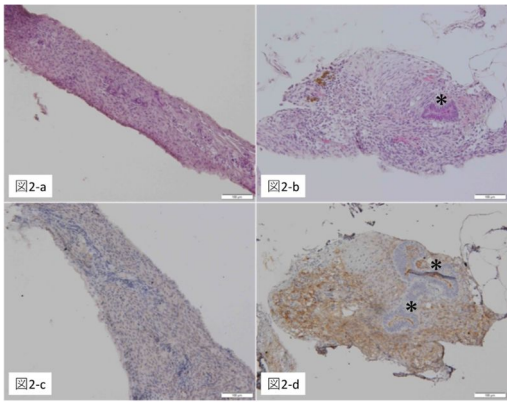


図 2 バイオプシー組織の組織学的解析、a; 異所性子宮内膜間質組織、Case 1、HE 染色、3 回目、b; 子宮腺構造 (*) を含む異所性子宮内膜組織、Case 2、HE 染色、3 回目、c; 異所性子宮内膜間質組織、Case 1、抗 CD10 抗体免疫染色、3 回目、d; 子宮腺構造 (*) を含む異所性子宮内膜組織、Case 2、抗 CD10 抗体免疫染色

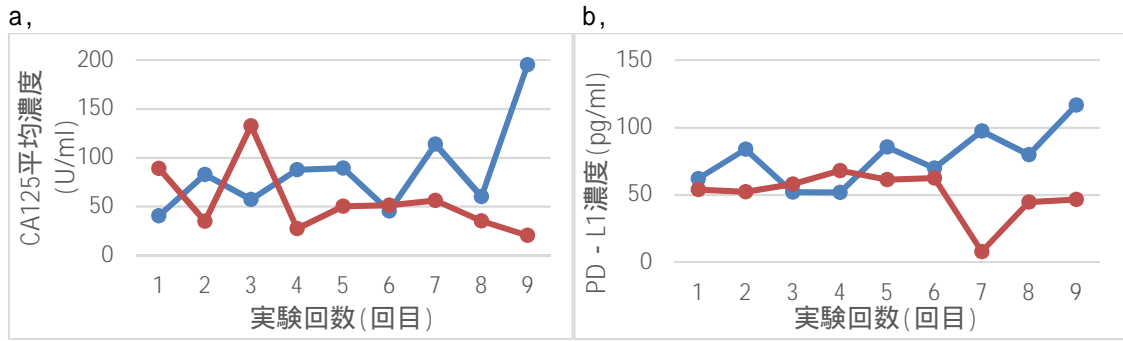


図 3 ELISA による CA125 (a)、PD-L1 (b)の定量結果 (青 Case 1、赤 Case 2)

表 1 病変分布解析による Case 1 の病変スコア 1, 3, 4

	病変 1	病変 2	病変 3
1 回目	28.96	28.932	9.517
2 回目	56.949	—	7.401
3 回目	12.085	16.321	16.459
4 回目	88.837	—	14.000
5 回目	36.697	30.370	11.173
6 回目	47.967	17.494	14.209
7 回目	20.000	18.407	26.076
8 回目	25.301	18.088	41.16
9 回目	52.095	74.964	4.362

表 2 病変分布解析による Case 2 の病変スコア 6, 7, 8

	病変 4	病変 5	病変 6
1 回目	66.251	—	47.321
2 回目	44.933	—	38.970
3 回目	32.282	35.150	87.095
4 回目	31.128	39.292	76.573
5 回目	34.587	51.441	58.547
6 回目	44.177	16.078	72.462
7 回目	37.381	—	40.043
8 回目	25.928	—	—
9 回目	32.924	—	57.675

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 中村紳一朗、岩谷千鶴、土屋英明	4. 巻 24 (1)
2. 論文標題 サル類の子宮内膜症、動物実験モデルとしての可能性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 オペリスク	6. 最初と最後の頁 15-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi K, Nakayama M, Iwatani C, Tsuchiya H, Nakamura S, Nonoguchi K, Itoh Y, Tsuji S, Ishigaki H, Mori T, Murakami T, Ogasawara K	4. 巻 251 (4)
2. 論文標題 The Natural History of Spontaneously Occurred Endometriosis in Cynomolgus Monkeys by Monthly Follow-Up Laparoscopy for Two Years	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tohoku J Exp Med	6. 最初と最後の頁 241-253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1620/tjem.251.241.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村紳一朗、仲山美沙子、林香里、土屋英明、岩谷千鶴、野々口耕介、村上節、小笠原一誠、森崇英
2. 発表標題 CD10免疫染色によるカニクイザル子宮内膜と卵管組織の鑑別、子宮内膜症診断への応用
3. 学会等名 第40回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会
4. 発表年 2018年～2019年

〔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	野中 元裕 (Nonaka Motohiro) (70514173)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	土屋 英明 (Tsuchiya Hideaki) (10378440)	滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・技術専門職員 (14202)	
研究分担者	福田 道子 (Fukuda Michiko) (80741066)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・招聘 研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関