

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09471

研究課題名(和文)子宮内膜症発生仮説としての「子宮内膜移植説」の解明：腹膜由来分子の役割に注目して

研究課題名(英文)The implantation theory as a hypothesis for the development of endometriosis: focusing on the role of peritoneal-derived molecules.

研究代表者

谷口 文紀(TANIGUCHI, Fuminori)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：40322218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症腹膜病変の初期形成に関わる接着関連因子を検討した。モデルマウスを作製し、病変周囲腹膜(PSL)と正常腹膜(PDL)の遺伝子発現をみた。PSLで著明な発現増強を認めたテネイシンC(Tnc)に着目した。Tncノックアウトマウス(TncK0)と野生型マウス(WT)を用い、4種類のモデルマウスを作製した。レシビエントマウスをTncK0とすると接着病変数の減少と病変重量の低下を認めた。ヒト子宮内膜間質細胞と腹膜細胞による共培養系において、Tnc遺伝子ノックダウンにより子宮内膜間質細胞の浸潤比率が減少したことから、Tncが病変初期発生における細胞接着・浸潤に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜症組織は、主には骨盤内に増殖・浸潤することにより周囲臓器と癒着を形成し、月経困難症や不妊の原因となる。月経痛を有する思春期女性の大半が初期段階の子宮内膜症を有することが注目されている。マウス組織とヒト培養細胞を用いることにより、子宮内膜症の初期段階における局所の細胞生着・浸潤を切り口にした発生機序の探索を行うことにより、テネイシンCが子宮内膜症の初期病変形成に関わるキーファクターであることを明らかにした。本研究成績は、テネイシンを標的分子とした新たな治療戦略の可能性を示唆し、子宮内膜症患者の疼痛ならびに妊孕性の改善につながる新知見となった。

研究成果の概要(英文)：We aimed to identify extracellular matrix components that contribute to adhesion to, and invasion of, the peritoneum, proximal to lesions in the early phase of endometriosis. Expression of upregulated genes in the peritoneum surrounding lesions (PSL) was verified. Tnc gene expression was higher in PSL than in peritoneum distal to lesions. TncK0 mice were used to investigate the role of Tnc in the development of endometriosis. Using Tnc si-RNA, we examined the invasive capacity of human endometrial stromal cells (hESCs) in a coculture system with peritoneal cells (HMrSV5). The weight and number of TncK0 lesions in TncK0 hosts were lower than those of WT lesions in WT hosts. In contrast, the weight and number of non-attached TncK0 lesions in TncK0 hosts were higher than those of non-attached WT lesions in WT hosts. Silencing of Tnc expression in hESCs and HMrSV5 diminished the invasivity of hESCs. Tnc may be a crucial factor in the development of early peritoneal endometriosis.

研究分野：子宮内膜症

キーワード：子宮内膜症 月経困難症 不妊

1. 研究開始当初の背景

厚生省の調査によると、わが国の月経痛に悩む女性は推定 900 万人とされる。疼痛と不妊を主症状とする子宮内膜症は、少子化に伴い受療率は増加している。月経痛を有する思春期女性の大半が初期段階の子宮内膜症を有すること、血管内皮機能を障害する全身性の組織炎症が特徴であることが注目され、生涯を通じて影響を及ぼす慢性疾患であると捉えられている。その病因については、炎症・内分泌・免疫に関連する腹腔内の局所環境が発症・進展において重要であるとされ、生着する子宮内膜あるいは病変形成後の子宮内膜症組織に着目した研究がなされてきた (Harada T, et al. Fertil Steril, 2001)。本症の治療薬は内分泌製剤であり、一定の効果が得られるものの適応症例の限定や使用期間の制限があり、根本的な薬物療法は確立されていない。発生仮説として、逆流月経血中の子宮内膜組織が骨盤腹膜に生着・浸潤するという「子宮内膜移植説」(Sampson JA. Am J Obstet Gynecol, 1940) が広く受け入れられているが、核心に迫る仮説の検証はなされていない。生殖年齢女性の約 90% に月経血逆流がみられるのに、なぜ約 10% にしか発症しないのかという疑問に明確な答えはない。これまでに子宮内膜組織を受ける側の腹膜を対象とした検討は稀有であることから、腹膜組織由来因子に注目する。本症は良性疾患であるが、転移・播種・再発をきたすなど悪性腫瘍に類似した特徴を有し、最近では卵巣癌の発生母地と考えられている。古くから癌転移において提唱される「seed and soil 説」すなわち、転移能を有した細胞と増殖に適した正常細胞との複雑な相互反応の上に転移が成り立つ、という理論に基づく予防・治療法の開発を目標とし、本症の発症起点における腹膜因子の役割、ならびに治療標的分子を明らかにすることを主眼におく。

2. 研究の目的

子宮内膜症組織は増殖・浸潤することにより周囲臓器と癒着を形成し、月経困難症や不妊の原因となる。月経痛を有する思春期女性の大半が初期段階の子宮内膜症を有すること、血管内皮機能を障害する全身性の組織炎症が特徴であることが注目されている。罹患率の高い疾患であるにも関わらず、初期病変の発生原因および接着・進展については本質に迫ることができていない。本研究では、「子宮内膜移植説」に基づいて初期病変の観察目的に開発した発光モデルマウス、ノックアウトマウス(テネインC) およびヒト腹膜細胞と子宮内膜細胞による共培養系システムを用いて検討する。子宮内膜組織を受ける側の腹膜を対象とした検討は稀有であることから、腹膜組織由来因子に注視する。子宮内膜症の初期段階における局所の細胞生着・浸潤を切り口にした発症機序の探索を行うことにより、新規治療薬開発の基盤となる知見を追求する。

3. 研究の方法

(1) 生物発光技術を用いた子宮内膜症動物モデルの作製と病変・周囲腹膜組織の評価

(谷口、中村、大学院生 3 名)

CAG-Eluc 発光トランスジェニックマウスの作製に成功しており、発光画像解析システム (IVIS) によって観測することにより、発症初期の病変を非侵襲的に追跡する。このマウスにテネインC 中和抗体を投与し、IVIS で腹膜病変を確認しうる子宮組織移植後 3 日を目安にして、病変と周囲腹膜組織を評価する。病変組織の重量・個数・サイズを経時的に観察する。子宮内膜症病変の細胞増殖能は Ki67 で、炎症反応はマクロファージと T リンパ球のマーカである F4/80 と CD3 の陽性率にて評価する。

(2) テネインC-ノックアウトマウスを用いた評価 (谷口、中村、大学院生 3 名)

テネインC-KO マウスの凍結精子を取得し、野生型雌マウス(Wild) との体外受精で得られる雌雄ヘテロマウスの交配により、テネインC 雌 KO マウスを得る。KO と Wild 間の子宮組織移植により、モデルマウスを作製する。(a) Wild 子宮組織 KO、(b) Wild 子宮組織 Wild、(c) KO 子宮組織 KO、(d) KO 子宮組織 Wild の 4 群間で病変の形成および進行を評価することで、子宮内膜症発症に寄与するテネインC 発現組織を明らかにする。評価時期は移植後 3 から 5 日目とし、上記(1)と同じ方法で解析する。

図 1. 生物発光技術を用いた子宮内膜症モデルマウスの作成

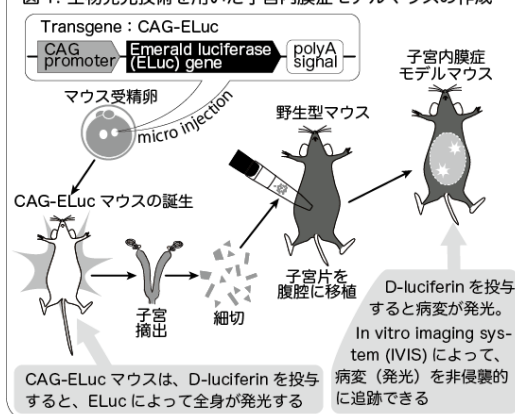
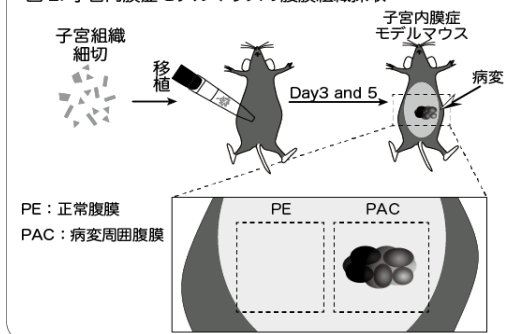


図 2. 子宮内膜症モデルマウスの腹膜組織採取



(3)マウス腹腔免疫担当細胞の解析 (谷口、大学院生 3名)

子宮内膜症患者では腹腔マクロファージが増加・活性化し、発生と進展に関与する。(1)-(2)で用いたマウスにおける腹腔洗浄液、および腹腔鏡手術の際に得た子宮内膜症患者の腹水を検体とする。フローサイトメトリーにより、NK細胞、炎症性マクロファージ、M1およびM2マクロファージ数の割合への薬剤投与とテネシシンC抑制の影響をみる。サイトカイン発現量はELISAで測定する。最終年度は、上記実験における検体数を増やして確実なデータを得る。

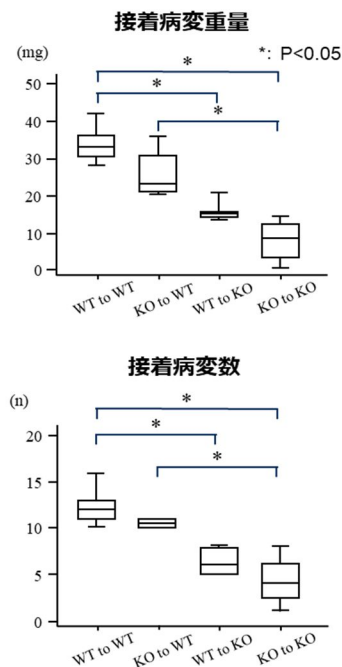
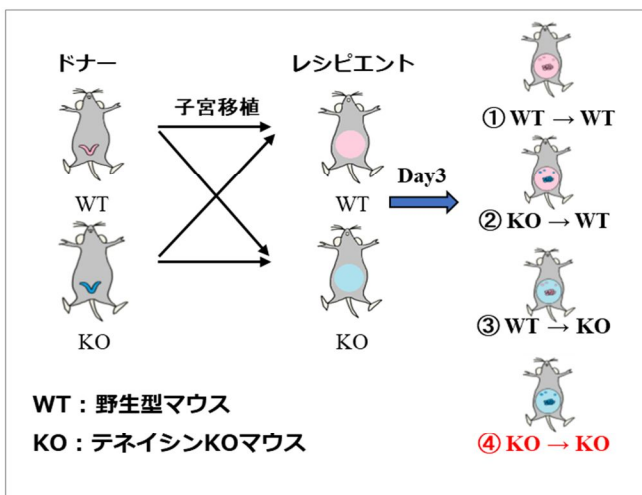
(4)ヒト腹膜細胞と子宮内膜細胞の共培養系による検討 (谷口、大学院生 3名) ヒト検体の利用では、患者から文書による同意を得る。マウス実験で得たデータを検証するために、発症起点と考えられるヒト子宮内膜細胞と腹膜への接着現象を再現する共培養系を構築する。ヒト腹膜中皮細胞を下層に単層培養したのちに、ヒト子宮内膜間質細胞をマトリゲル上層に播種する共培養系による浸潤アッセイを行う。腹膜細胞へのテネシシンC siRNA 導入により、浸潤する子宮内膜細胞割合への影響をみる。

4. 研究成果

ドナーマウス由来の細切した子宮組織片を、レシピエントマウスの腹腔内に移植して子宮内膜症モデルマウスを作製した。卵巣摘出とエストラジオールの投与により性周期を調整した。

移植後3日に開腹して病変を評価し、腹膜組織については病変周囲腹膜(peritoneum surrounding the lesions: PSL)と正常腹膜(peritoneum distal to lesions: PDL)に分けて採取した。PCRアレイを用いて、接着関連因子群の遺伝子発現をスクリーニングし、発現差の大きい遺伝子群についてRT-PCRで検討した。PCRアレイおよびRT-PCRにおいて、PSLではPDLに比してテネシシンC(Tenascin-C: Tnc)の著明な遺伝子発現増強を認めた。Tncノックアウトマウス(Tnck0)と野生型マウス(wild type mouse: WT)を用いて、WT to WT、WT to Tnck0、Tnck0 to WT、Tnck0 to Tnck0 (ドナー to レシピエント)の4種類のモデルマウスを作製した。これらの子宮内膜症病変の接着を比較し、増殖能とT細胞の集簇をKi67およびCD3の免疫組織化学染色で、腹腔洗浄液中マクロファージの分布をフローサイトメトリーで評価した。4種類のモデルマウスの比較により、レシピエントマウスをTnck0とした場合に接着病変数の減少と病変重量の低下を認めた。また、Tnck0 to Tnck0群では浮遊子宮片数の増加がみられた。WT to WT群に比して、Tnck0 to Tnck0群では病変の上皮および間質組織におけるKi67およびCD3の発現比率と強度の低下がみられ、腹腔洗浄液中M1マクロファージ割合の減少とM2マクロファージ割合の増加がみられた。子宮内膜症患者由来の子宮内膜間質細胞と腹膜中皮細胞による共培養系を用い、Tnc-siRNA導入による細胞浸潤への影響をみた。両細胞におけるTnc遺伝子ノックダウンにより子宮内膜間質細胞の浸潤比率が減少した。

テネシシンK0マウスを用いた検討



- ・テネシシンK0マウスをレシピエントに用いると、接着病変の数・重量が減少した。
- ・ドナー・レシピエント双方がK0マウスの場合、接着していない子宮片数の増加がみられた。

Tnck0を応用したモデルマウスの作製により、子宮内膜症初期病変の形成過程において、病変周囲腹膜組織で発現するTncが重要な役割を有することを明らかにした。Tnck0 to Tnck0群において、病変組織の増殖能やT細胞集簇の抑制、ならびに腹腔洗浄液中マクロファージの分布の

特徴を見出した。ヒト細胞を用いた共培養系では、発症起点と考えられる子宮内膜間質細胞の接着・浸潤過程における Tnc の関与を示した。また、TncKO に明らかな奇形や産仔数の減少がみられなかったことから、Tnc を標的分子とする薬物治療は、ホルモン療法が適さない子宮内膜症合併不妊患者に対する福音となる可能性がある。本研究成績より、Tnc は子宮内膜症病変の初期発生における細胞接着・浸潤のキーファクターであることが示唆された。Tnc を標的分子とした新たな治療戦略を示唆し、子宮内膜症患者の疼痛ならびに妊孕性の改善につながる可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 5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 Ikebuchi Ai, Osaki Mitsuhiro, Wada Ikumi, Nagata Hiroki, Nagira Kei, Azuma Yukihiro, Okada Futoshi, Harada Tasuku, Taniguchi Fuminori	4. 巻 52
2. 論文標題 Increased chemokine ligand 26 expression and its involvement in epithelial-mesenchymal transition in the endometrium with adenomyosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction	6. 最初と最後の頁 102645 ~ 102645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jogoh.2023.102645	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 Moriyama Maako, Nakamura Kazuomi, Nagata Hiroki, Wada Ikumi, Nagira Kei, Azuma Yukihiro, Sato Eri, Harada Tasuku, Taniguchi Fuminori	4. 巻 5
2. 論文標題 Role of tenascin C in lesion formation in early peritoneal endometriosis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 F&S Science	6. 最初と最後の頁 69 ~ 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xfss.2023.12.004	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 Ishikawa Hiroshi, Yoshino Osamu, Taniguchi Fuminori, Harada Tasuku, Momoeda Mikio, Osuga Yutaka, Hikake Tamiki, Hattori Youko, Hanawa Michiko, Inaba Yosuke, Hanaoka Hideki, Koga Kaori	4. 巻 21
2. 論文標題 Efficacy and safety of a novel pain management device, AT-04, for endometriosis-related pain: study protocol for a phase III randomized controlled trial	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Reproductive Health	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12978-024-01739-8	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 Komatsu Hiroaki, Taniguchi Fuminori, Harada Tasuku	4. 巻 162
2. 論文標題 Impact of myomectomy on the obstetric complications: A large cohort study in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Gynecology & Obstetrics	6. 最初と最後の頁 977 ~ 982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijgo.14767	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 Harada Tasuku, Taniguchi Fuminori, Guo Sun Wei, Choi Young Min, Biberoglu Kutay Omer, Tsai Shaw Jenq Sean, Alborzi Saeed, Al Jefout Moamar, Chalermchokcharoenkit Amphan, Sison Aguilar Angela G., Fong Yoke Fai, Senanayake Hemantha, Popov Alexander, Hestiantoro Andon, Kaufman Yuval	4. 巻 22
2. 論文標題 The Asian Society of Endometriosis and Adenomyosis guidelines for managing adenomyosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 e12535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12535	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 Ikebuchi A, Osaki M, Wada I, Nagata H, Nagira K, Azuma Y, Okada F, Harada T, Taniguchi F.	4. 巻 9
2. 論文標題 Increased chemokine ligand 26 expression and its involvement in epithelial-mesenchymal transition in the endometrium with adenomyosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Gynecol Obstet Hum Reprod.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jogoh.2023.102645	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 -

1. 著者名 Moriyama M, Nakamura K, Nagata H, Wada I, Nagira K, Azuma Y, Sato E, Harada T, Taniguchi F.	4. 巻 5
2. 論文標題 Role of tenascin C in lesion formation in early peritoneal endometriosis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 F S Sci.	6. 最初と最後の頁 69-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xfss.2023.12.004	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 -

1. 著者名 Ishikawa H, Yoshino O, Taniguchi F, Harada T, Momoeda M, Osuga Y, Hikake T, Hattori Y, Hanawa M, Inaba Y, Hanaoka H, Koga K.	4. 巻 1
2. 論文標題 Efficacy and safety of a novel pain management device, AT-04, for endometriosis-related pain: study protocol for a phase III randomized controlled trial	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Reprod Health.	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12978-024-01739-8.	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 -

1. 著者名 Komatsu H, Taniguchi F, Harada T.	4. 巻 3
2. 論文標題 Impact of myomectomy on the obstetric complications: A large cohort study in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Gynaecol Obstet	6. 最初と最後の頁 977-982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijgo.14767.	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 -

1. 著者名 Harada T, Taniguchi F, Guo SW, Choi YM, Biberoglu KO, Tsai SS, Alborzi S, Al-Jefout M, Chalermchokcharoenkit A, Sison-Aguilar AG, Fong YF, Senanayake H, Popov A, Hestiantoro A, Kaufman Y	4. 巻 1
2. 論文標題 The Asian Society of Endometriosis and Adenomyosis guidelines for managing adenomyosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Reprod Med Biol	6. 最初と最後の頁 e12535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12535	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 -

1. 著者名 WIBISONO Hermawan, NAKAMURA Kazuomi, TANIGUCHI Fuminori, SENO Misako, MORIMOTO Kayoko, YOSHIMURA Yuki, HARADA Tasuku	4. 巻 -
2. 論文標題 Tracing location by applying Emerald luciferase in an early phase of murine endometriotic lesion formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.21-0146	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 Ota Ikuko, Taniguchi Fuminori, Ota Yoshiaki, Nagata Hiroki, Wada Ikumi, Nakaso Takaya, Ikebuchi Ai, Sato Eri, Azuma Yukihiro, Harada Tasuku	4. 巻 20
2. 論文標題 A controlled clinical trial comparing potent progestins, LNG IUS and dienogest, for the treatment of women with adenomyosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 427 ~ 434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12408	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 Azuma Yukihiro, Taniguchi Fuminori, Wibisono Hermawan, Ikebuchi Ai, Moriyama Maako, Harada Tasuku	4. 巻 64
2. 論文標題 A Case Report of an Accessory and Cavitated Uterine Mass Treated with Total Laparoscopic Hysterectomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Yonago Acta Medica	6. 最初と最後の頁 207 ~ 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.33160/yam.2021.05.004	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森山真亜子 谷口文紀 長田広樹 和田郁美 池淵 愛 山根恵美子 柳樂 慶 東 幸弘 佐藤絵理 原田 省
2. 発表標題 子宮内膜症初期病変の腹膜浸潤におけるテネインの役割
3. 学会等名 第44回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷口文紀
2. 発表標題 子宮内膜症における悪性転化とその対応
3. 学会等名 The 22nd Annual Symposium Japanese Society for the Advancement of Women's Imaging(JSAWI2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森山真亜子、谷口文紀、長田広樹、和田郁美、中曾崇也、池淵愛、山根恵美子、東幸弘、佐藤絵理、原田省
2. 発表標題 子宮内膜症初期病変の腹膜浸潤におけるテネインの役割
3. 学会等名 第43回日本エンドメトリオーシス学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷口文紀、柳樂慶、原田省
2. 発表標題 子宮内膜症モデルマウスの病巣を縮小させ疼痛を軽減した漢方薬
3. 学会等名 第40回婦人科漢方研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口文紀
2. 発表標題 私たちの子宮内膜症研究の変遷と展望
3. 学会等名 第75回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷口文紀
2. 発表標題 子宮内膜症の癌化とそのマネージメント
3. 学会等名 第45回日本エンドメトリオーシス学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 谷口文紀
2. 発表標題 子宮内膜症における漢方療法の効果
3. 学会等名 第42回婦人科漢方研究会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷口文紀
2. 発表標題 子宮内膜症に対する薬物療法の現状と未来
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会/第44回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2023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	原田 省 (HARADA Tasuku) (40218649)	鳥取大学・医学部附属病院・教授 (15101)	
研究分担者	中村 和臣 (NAKAMURA Kazuomi) (90598137)	鳥取大学・医学部附属病院・助教 (15101)	

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
---------	---------