

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 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：24592474

研究課題名(和文)子宮内膜症の病態における抗菌性ペプチドと細菌性エンドトキシンの役割に関する研究

研究課題名(英文)Study of antimicrobial peptides and bacterial endotoxin in endometriosis

## 研究代表者

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

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)：私どもは、これまでおよそ10年間にわたる検討から、子宮内膜症の発生および増殖・進展に関する新たな病態のひとつとしてbacterial contamination hypothesis細菌混入仮説」を提唱し発表した。子宮内膜症では非内膜症に比較して、月経血中への大腸菌混入が強く、結果として月経血中や腹水中でのエンドトキシン濃度が亢進していることが認められた。Defensinなどの抗菌性ペプチドや分泌型白血球プロテアーゼ阻害物質 (secretory leukocyte protease inhibitor, SLPI) は、動物および植物に種横断的に広く存在する宿主生得免疫のメディエーターである。

研究成果の概要(英文)：Bacterial contamination hypothesis and sub-clinical uterine infection in women with endometriosis is an innovative research idea in the pathogenesis or pathophysiology of endometriosis. Anti-microbial peptides (AMP) such as human beta defensin (HBD) and secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) are found to be regulated by estrogen. Decreased expression of these AMP in endometrium during the menstrual phase could be related to intrauterine microbial colonization and may support our proposed hypothesis. Papers on our new innovative study has been published in Human Reproduction (Khan KN et al., Hum Reprod, 29(11):2446-2456,2014 and Khan KN et al., Hum Reprod 27(12):3417-3424,2012). We presented our new data on bacterial contamination has been recognized and represented in different outstanding domestic and international congresses.Our new concept will open new idea in the development of new therapeutic strategy for the prevention and management of endometriosis.

研究分野：Pathogenesis and physiopathology of endometriosis

キーワード：endometriosis inflammation bacterial contamination TLR4 human beta-defensin SLPI

## 1. 研究開始当初の背景

私どもは、これまでおよそ 10 年間にわたる検討から、子宮内膜症の発生および増殖・進展に関する新たな病態のひとつとして「bacterial contamination hypothesis 細菌混入仮説」を提唱し発表した(Khan et al., Fertil Steril 94:2860,2010)。実際に、子宮内膜症では非内膜症に比較して、月経血中への大腸菌混入が強く、結果として月経血中や腹水中でのエンドトキシン濃度が亢進していることが認められた。これらは、月経血への細菌混入が骨盤内炎症の最初のトリガーとなり、TLR4 を介した内膜症組織の増殖に関与することを初めて示したものである。私どもは、子宮腔内への細菌混入について、いくつかの可能性のある機序を *in vitro* の細菌培養実験で検討してきたが、*in vivo* での機序について、子宮腔内局所の抗菌性ペプチドの変化が細菌混入に及ぼす作用についてはこれまで検討されておらず、これらの蛋白が子宮腔内での微生物混入を制御している可能性がある。本研究では、月経期の子宮内腔に存在することが予想されるいくつかの抗菌性ペプチドを測定し、それらの所見と細菌混入との関わりを検証することを立案した。

## 2. 研究の目的

Defensin ファミリーなどの抗菌性ペプチドや分泌型白血球プロテアーゼ阻害物質 (secretory leukocyte protease inhibitor, SLPI) は、動物および植物に種横断的に広く存在する宿主生得免疫のメディエーターである。これらの抗菌性ペプチドは、微生物の混入・感染から宿主を防御している生得的な抗菌物質と捉えられる。呼吸器あるいは生殖器では、ヒト  $\alpha$ -defensin-1 (HBD-1) タンパクおよび遺伝子の発現が高いことが報告されている。In situ

hybridization 法により、HBD-1 mRNA は腎臓遠位尿細管および集合管上皮、また女性生殖器である膣、子宮頸部、子宮体部および卵管の上皮に発現していることが認められている (Valore EV et al., J Clin Invest 101:1633,1998)。一方で、細菌性膣炎 (BV) を罹患した女性では、膣上皮での HBD-1 および SLPI の発現が低下していることが報告されている (Doncel GF et al., AJRI 65:292,2011)。HBD-1 と SLPI の活性は酸性環境では変化が認められないが、塩基性環境では低下することが認められており、これらは膣内 pH の塩基性への移行が抗菌性ペプチドの発現に影響し BV の病態に関わっている可能性を示している。また、子宮腔内の抗菌性ペプチドの低下が膣内細菌の上行性侵入の一因である可能性がある。実際に、天然由来の HBD-1 あるいはリコンビナント HBD-1 は、実験室株あるいは臨床株の大腸菌いずれにも抑制的に作用することが報告されている (Valore EV et al., J Clin Invest 101:1633,1998)。また、この HBD-1 の抗菌作用は、気道上皮において HBD-1 のアンチセンスオリゴヌクレオチドを添加することにより消失することが認められている (Goldman MG et al., Cell 88:553,1997)。これらの結果は、HBD-1 が上皮表層における宿主防御に重要な役割を担っており、外界に露出している上皮において、そこから分泌される物質が直接的に微生物の定着と侵入を防いでいることを示している。女性生殖器組織における HBD-1 および SLPI の産生・分泌がエストロゲンとプロゲステロンにより制御されていることが報告されている (Cohen MS et al., Am J Obstet Gynecol 157:1122,1987; Valore EV et al., J Clin Invest 101:1633,1998)。これらの結果は、尿中の HBD-1 濃度が妊娠女性で最も高く、次いで非妊娠女性であり、男性で最も低い

ことにも合致している。これらから、私も、子宮内膜局所における HBD-1 および SLPI 濃度が月経周期により変化し、増殖期で最も高く、月経期で最も低くなるのではないかと推測している。もしこの予想が正しければ、本研究により、内膜症での月経血中への細菌混入の *in vivo* での機序の一端が示されると考える。

これらの背景から、本研究では、子宮内膜組織および子宮腔内分泌物における HBD-1 および SLPI 濃度を測定し、それらの結果を子宮内膜症の有無、月経周期の相違あるいは GnRHa 治療の有無により比較検討し、これら抗菌性ペプチドと子宮内膜症との関連を探索した。

子宮内膜症では月経血中の細菌コンタミネーションが亢進し、腹水中のエンドトキシン濃度が上昇している。その原因は子宮内膜の不顕性上行性感染の可能性がある。今回、子宮腔内分泌物における細菌コンタミネーションの頻度と子宮内膜炎の存在について、子宮内膜症の有無や GnRHa 療法の有無による相違を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) インフォームド・コンセントを得たうえで、無菌的操作により 45 例の子宮内膜症女性および 45 例の非子宮内膜症女性から子宮内膜組織を採取する。45 例の内訳は、月経周期により細別化して 増殖期 15 例、分泌期 15 例および月経期 15 例について組織採取を行う。採取した組織の一部はホルマリン固定の上、薄切切片を作成しヘマトキシリンエオジン (HE) 染色あるいは各種の免疫染色に供する。残りの組織は細切・均質化したのち遠沈して、その上清を採取し以降の実験に供するまで -70℃ に保存する。

(2) 上記の組織採取前に子宮腔内の分泌物の採取を行う。無菌操作下に 10ml シリン

ジに接続した 12Fr (外径 4 mm) のプラスチックカテーテルを経頸管的に子宮腔内奥に挿入し、陰圧をかけて子宮腔内の分泌物を採取する。採取した腔内分泌物は、チューブに移して遠沈し、以降の実験に供するまで -70℃ に保存する。

(3) GnRHa で治療された 20 例の子宮内膜症女性および GnRHa の使用経験のない 20 例の内膜症女性を対象に月経周期増殖期に上記の子宮内膜組織および子宮腔内分泌物採取を行う。得られた組織および分泌物は -70℃ で保存しておく。

(4) 子宮内膜組織および内膜分泌物でのヒト HBD-1 および SLPI 濃度を ELISA (USCN, Life Science Inc., USA) を用いて計測する。子宮内膜でのヒト HBD-1 および SLPI の局在を免疫染色により検討する。これらタンパクの発現動態を異なる月経周期あるいは薬物療法の有無により比較検討する。免疫染色には 1 次抗体として抗ヒト MDB-1 マウスモノクローナル (M11-14b-D10 [ab14425], abcam, USA) および抗ヒト SLPI ヤギポリクローナル抗体 (LS-B2174, LSBio; LifeSpan Biosciences Inc., USA) を用いる。

上記の対象において、末梢血と腹水を採取し、これら体液中のエストラジオール (E2) およびプロゲステロン (P) 濃度を測定し、これらと子宮内膜組織および分泌物における HBD-1 および SLPI の発現との関連を検討する。

(5) 73 例の子宮内膜症および 55 例の非子宮内膜症コントロールからインフォームド・コンセントを得て手術時に腔内分泌物および子宮内膜を採取した。腔内 pH を測定し、グラム染色により Nugent による細菌性膣症 (BV) スコアを算出した。子宮腔内分泌物培養により発育する細菌種を同定し、GnRHa 投与の有無で比較した。子宮内膜での Syndecan-1 および myeloperoxidase

の免疫染色により子宮内膜炎の有無を検討した

#### 4. 研究成果

(1) 月経血，腹水および血清の3者のなかで，PGE2濃度は月経血で最も高かった．月経血中のPGE2濃度は腹水あるいは血清に比して2-3倍亢進していた．また，月経血および腹水中のPGE2濃度はコントロールに比較して内膜症で有意に高かった．

(2) PGE2は濃度依存的に*E. coli*のコロニー形成を増加させ，それらは低濃度のPGE2あるいは高濃度のPGE2に反応する2峰性のコロニー形成のピークが認められた．

(3) 内膜症およびコントロールいずれにおいてもPHAは濃度依存的にリンパ球の増殖が亢進させた．一方，内膜症由来のリンパ球では，PGE2はPHAのリンパ球刺激作用を濃度依存的に抑制した．これらのPGE2の抑制作用はコントロール女性由来のリンパ球では認められなかった．

(4) 正所性子宮内膜におけるHBDとSLPIの発現を免疫組織化学的手法を用いてQ-Hスコアで検討すると，両者の発現スコアは増殖期で高く，月経期で低下し，分泌期にはその中間を示し，両者の月経期の発現スコアは増殖期あるいは分泌期に比して有意に低値であった．しかしながら，月経期におけるHBDとSLPIの発現には内膜症とコントロールで有意差を認めなかった．

以上より，子宮内膜症の病態に強く関連しているPGE2やエストロゲンの影響下に局所での発現が調節されている抗菌蛋白が，子宮内膜症での上行性細菌コンタミネーションに関与していることが推察される．

(5) 子宮内膜症では腔内pHが上昇しており，pH4.5以上の例がコントロールに比して有意に増加し(79.3% vs. 58.4%,  $p=0.03$ )，GnRHaの使用は両群でpHを有意に上昇させる要素であった．子宮内膜症では

GnRHaの使用によりBVスコアが高くなる傾向が認められた．Gardnella, -streptococcus, Enterococci および *E. coli* のコロニー形成能は子宮内膜症由来の子宮腔内分泌物で有意に亢進しており，GnRHaの使用はコロニー形成能を有意に上昇させた．子宮内膜症の有無によらずGnRHa療法施行例では，子宮内膜炎を呈する頻度が有意に上昇していた．

#### 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12件)

1) Khan KN, Fujishita A, Kitajima M, Hiraki K, Nakashima M, Masuzaki H. Intra-uterine microbial colonization and occurrence of endometritis in women with endometriosis. Hum Reprod, 29(11):2446-2456, 2014. (査読有)

2) Khan KN, Fujishita A, Kitajima M, Hiraki K, Nakashima M, Masuzaki H. Occult microscopic endometriosis: undetectable by laparoscopy in normal peritoneum. Hum Reprod 29(3):462-472, 2014(査読有)

3) Khan KN, Kitajima M, Inoue T, Fujishita A, Nakashima M, Masuzaki H. 17 $\beta$ -estradiol and lipopolysaccharide additively promote pelvic inflammation and growth of endometriosis. Reprod Sci 2014 (DOI:10.1177/1933719114556487). (査読有)

4) Khan KN. Visible and invisible (occult) endometriosis (book chapter 3). In: Harada T eds. Endometriosis: Pathogenesis and Treatment. Japan: The Springer publishing Co., pp19-32, 2014. (査読有)

5) Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Nakashima M, Masuzaki H. Involvement of hepatocyte growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition in human adenomyosis. *Biol Reprod* 2015;92(2) (DOI: 10.1095/biolreprod.114.124891). (査読有)

6) Khan KN, Kitajima M, Fujishita A, Hiraki K, Nakashima M, Masuzaki H. Visible and occult microscopic lesions of endometriosis. *Gynecology and Minimally Invasive Therapy* (review), 3(4):109-114,2014. (査読有)

7) Khan KN, Kitajima M, Fujishita A, Nakashima M, Masuzaki H. Toll-like receptor system and endometriosis (review). *J Obstet Gynecol Res*, 39(8):1281-92,2013(査読有)

(8) Khan KN, Kitajima M, Inoue T, Tateishi S, Fujishita A, Nakashima M, Masuzaki H. Additive effects of inflammation and stress reaction on Toll-like receptor 4-mediated growth of endometriotic stromal cells. *Hum Reprod* 28:2794-2803,2013. (査読有)

9) 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. (査読有)

10) Khan KN, Kitajima M, Yamaguchi N, Fujishita A, Nakashima M, Ishimaru T, Masuzaki H. Role of prostaglandin E2 in bacterial growth in women with endometriosis. *Hum Reprod* 27(12):3417-3424,2012. (査読有)

11) Khan KN, Kitajima M, Masuzaki H. Role of bacterial endotoxin in endometriosis and its effect on reproductive outcome. *Proceedings of the 4<sup>th</sup> Congress of the ASPIRE, the 30<sup>th</sup> Annual Meeting of JSFI*, 41-48,2012(査読有)

12) Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Nakashima M, Ishimaru T, Masuzaki H. Bacterial contamination hypothesis: role of bacterial endotoxin and Toll-like receptor 4 in endometriosis. *Journal of Japan Society of Endometriosis* 33:62-67,2012 (Japanese) (査読有)

〔学会発表〕(計 3件)

(1) 骨盤子宮内膜症の発生に関する新たな視点 (New insights into peritoneal endometriosis)第35回日本エンドメトリオーシス学会教育講演抄録 (educational lecture)January 24-26, 2014 (城山観光ホテル・鹿児島県)

(2) Bacterial contamination hypothesis : 細菌性エンドトキシンと Toll-like receptor 4 (TLR4)が司る子宮内膜症の増殖・進展に関する新たな病態生理 第66回日本産科婦人科学会 (symposium), April 18-20, 2014 (東京国際フォーラム・東京都)

(3) (a) Seminar lecture: v12th World Congress on Endometriosis (WCE), April 30-May 3,2014, Sao Paulo, Brazil.

(b) Seminar lecture: Occult endometriosis: an undetectable finding by laparoscopy in normonal peritoneum. 12th World Congress on Endometriosis (WCE), April 29-May 3, 2014, Sao Paulo, Brazil.

(c) Oral paper: Sub-clinical vaginal and intra-uterine infection in women with endometriosis. 12th World Congress on

Endometriosis(WCE), April 29-May 3,  
2014, Sao Paulo, Brazil.

〔図書〕(計 3件)

(1) Khan KN. Visible and invisible (occult) endometriosis (Book chapter 3). In: Harada T eds. Endometriosis: Pathogenesis and Treatment. Japan: The Springer publishing Co.: pp19-32, 2014.

(2) Khan KN, Kitajima M, Fujishita A, Masuzaki H. Role of bacterial endotoxin in endometriosis and its effect on reproductive outcome. Proceedings of the 4<sup>th</sup> Congress of the ASPIRE, Publisher: Medimond SRL, Italy, 2012 (Book).

(3) Khan KN, Fujishita A, Kitajima M, Hasuo A, Miyamura Y, Masuzaki H, Ishimaru T. Immunoexpression of hepatocyte growth factor and c-Met receptor in eutopic endometrium predicts the activity of ectopic endometrium. In: Genazzani AR, Artini PG and Petralgia F eds. Recent Research in Gynecological Endocrinology. New York: The Parthenon Publishing Group, pp111-114, 2001 (Book).

〔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

カーン クレク (KHAN, Kha leque)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・

助教

研究者番号：60336162

### (2) 研究分担者

北島 道夫 (KITAJIMA, Michio)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：50380845