

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870148

研究課題名(和文) オメガ3脂肪酸の子宮内膜症に対する治療的効果に関する研究

研究課題名(英文) Investigation about the therapeutic effects of omega-3 fatty acids in endometriosis

研究代表者

富尾 賢介 (TOMIO, KENSUKE)

埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：40707254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症は慢性炎症性疾患であり新規治療法が待たれる。本研究では、オメガ3脂肪酸(以下 3FA)の子宮内膜症抑制効果をin vitroで検証した。子宮内膜症患者の培養腹腔マクロファージ(以下M)を3FA処理下にLPSで刺激したが、TNF- α 産生は抑制されなかった。そこで3FAがMのインフラマソーム活性を抑制し、IL-1 β 産生を抑制することに着目した。3FA処理下では、ニゲリシン刺激(インフラマソーム活性化の試薬)に対する培養腹腔MからのIL-1 β 産生は抑制された。3FAはMのインフラマソーム活性を抑制することで子宮内膜症の炎症を抑制し、新規治療戦略に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A new therapeutic method is highly anticipated for endometriosis, a chronic inflammatory disease. In the present study, the inhibitory effect of omega-3 fatty acids (3FAs) on endometriosis was verified in vitro. LPS-stimulation of cultured peritoneal macrophages (M) from endometriosis patients with 3FAs present did not inhibit TNF- α production. It was thus focused on how 3FAs reduce IL-1 β production by inhibiting M inflammasome activity. After treatment with 3FAs, IL-1 β production from cultured peritoneal M in response to stimulation with nigericin (a reagent for inflammasome activation) was inhibited. These results suggested that 3FAs suppress inflammation in endometriosis by inhibiting the M inflammasome activity, a finding which could lead to a novel therapeutic strategy.

研究分野：産婦人科学

キーワード：オメガ3脂肪酸 子宮内膜症 抗炎症作用 マクロファージ インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は、産婦人科領域の代表的な慢性炎症性疾患である。その病態は、腹腔内で炎症が繰り返され、子宮内膜上皮が子宮内膜間質とともに、腹膜などの子宮外の組織に生着・浸潤、さらには生着部位で増殖することで進展すると考えられている。

炎症性疾患という観点からは、子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージは活性化され、IL-6・IL-18・TNF- α などの炎症性サイトカインを発現、さらにそれらの炎症性サイトカインにより異所性の子宮内膜組織が活性化され、IL-6やIL-8などを発現していることが知られている。

また腫瘍性疾患という観点からは、培養子宮内膜間質細胞 (Endometriotic Stromal Cell: 以下 ESC) は種々のアポトーシス刺激に対してアポトーシス耐性を示すことが知られている。その機序の一つとして、アポトーシス刺激下で抗アポトーシス蛋白である survivin 発現が維持されることが挙げられる。子宮内膜症は悪性腫瘍ではないが、浸潤・増殖し、アポトーシスに抵抗性を示すことは、腫瘍性疾患の性格も有しているといえる。

現在の子宮内膜症の治療法には、手術切除による外科的治療やホルモン療法などの非外科的治療などがある。一方で、生殖年齢の女性に生じる疾患のため、侵襲や副作用が少なく、また生殖能に影響を与えない治療法が望まれてきた。近年、子宮内膜症が炎症性かつ腫瘍性疾患であるという性格に着目した、抗炎症効果や抗腫瘍効果を機序とする治療薬の開発が期待されている。

先行研究において、抗炎症効果をもつオメガ3脂肪酸が、子宮内膜症マウスモデルで病変抑制効果を示し、子宮内膜症の治療薬として期待されることを報告している。

2. 研究の目的

オメガ3脂肪酸が、子宮内膜症治療薬としてどのような効果を示すか、*in vitro* の系を用いて検証した。*in vitro* の系を用いることで、各種製剤の対象となる細胞や子宮内膜症抑制機序を詳細に検証できる利点があると考えられた。

さらにオメガ3脂肪酸と同様に食品由来成分であり、抗炎症および抗腫瘍効果を持つとされるレスベラトロール(以下 RVT: ポリフェノールの一種)にも着目した。RVT は、間質細胞や免疫担当細胞などの様々な細胞において抗炎症効果を持つことが知られている。RVT の子宮内膜症に対する治療的効果についても、並行して検証を行った。

3. 研究の方法

・ESC、腹腔内マクロファージの採取
倫理委員会承認のもと、同意が得られ手術摘出された子宮内膜症患者の子宮内膜症性卵巣嚢胞より内膜症組織を採取した。腹腔内マクロファージは手術時の腹水から採取した。いずれも術前3か月以内に性ステロイドホルモンや GnRH アゴニストは投与されていない。

(1)オメガ3脂肪酸によるESCへの効果

LPS 刺激により活性化される ESC の炎症性反応に対し、オメガ3脂肪酸が抗炎症効果を示すか検討した。ESC を各濃度の EPA、DHA で前処置し、LPS で刺激、RT-qPCR で TNF- の発現を評価した。

(2)オメガ3脂肪酸による腹腔内マクロファージへの効果

培養腹腔内マクロファージの炎症性反応に対し、オメガ3脂肪酸が抗炎症効果を示すか検討した。培養腹腔内マクロファージを EPA、DHA で前処置し、LPS で刺激、TNF- の蛋白レベルを検討した。

また近年、オメガ3脂肪酸がインフラマソームの活性化を抑制することで、マクロファージの IL-1 産生を抑制することが報告されている。そこで、LPS 存在下での培養腹腔マクロファージのインフラマソーム活性について、ニゲリシン刺激 (インフラマソーム活性化の試薬) に対する IL-1 産生を ELISA で検討した。

(3)RVTによるESCへの効果

TNF- により活性化される ESC の炎症性反応に対し、RVT が抗炎症効果を示すか検討した。ESC を各濃度の RVT で前処置し、TNF- で刺激、IL-8 の mRNA、蛋白レベルをそれぞれ検討した。RVT の ESC アポトーシス耐性への影響を調べた。RVT で 24-48 時間培養した後、Annexin-V PI 染色での FACS を施行した。

子宮内膜症患者では TNF - related - apoptosis inducing ligand (TRAIL) 誘導性アポトーシスが起こりにくくなっていることが知られている。このため、RVT が ESC の TRAIL 感受性に影響を及ぼすかを検討した。RVT (40 μ M) 存在下で培養した後、TRAIL (100 ng/ml) で刺激、Annexin-V PI 染色での FACS を施行した。

RVT は種々の細胞で survivin 発現を低下させることが報告されている。RVT が ESC における survivin mRNA の発現に与える影響を検討した。ESC を RVT (40 μ M) 存在下で培養し、RT-qPCR で survivin の発現を評価した。

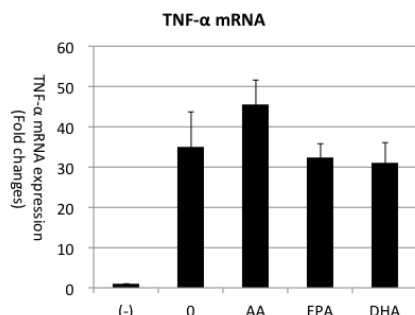
4. 研究成果

(1)オメガ3脂肪酸によるESCへの効果

オメガ3脂肪酸は、LPS 刺激により活性化

される ESC の炎症性反応を mRNA レベルで抑制効果は示さなかった (図 1)。

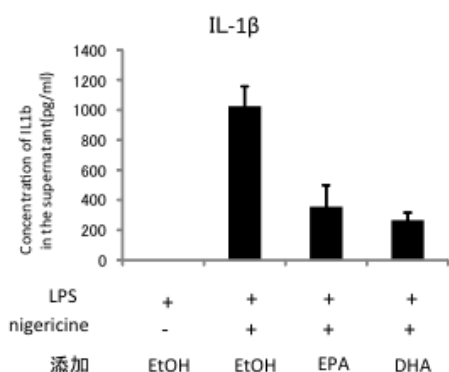
図 1



(2)オメガ 3 脂肪酸による腹腔内マクロファージへの効果

オメガ 3 脂肪酸は、LPS 刺激による培養腹腔内マクロファージからの TNF- α 産生に抑制効果は示さなかった。しかし、オメガ 3 脂肪酸はニゲリシンによる IL-1 産生は有意に抑制することが示された。(図 2)

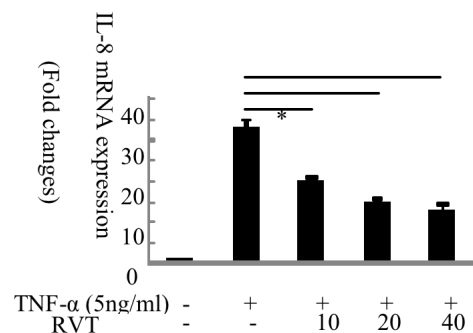
図 2



(3)RVT による ESC への効果

RVT は、TNF- α 刺激によって誘導される ESC からの IL-8 発現を濃度依存的に抑制することが示された (図 3)。

図 3

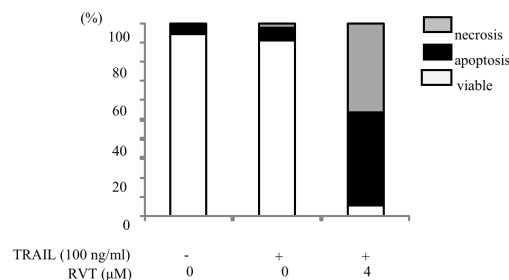


RVT は単独では 40 μ M 下でも ESC のアポトーシスを誘導しないことが示された

(Cont:3.80 \pm 0.53, RVT:4.47 \pm 1.70(%))

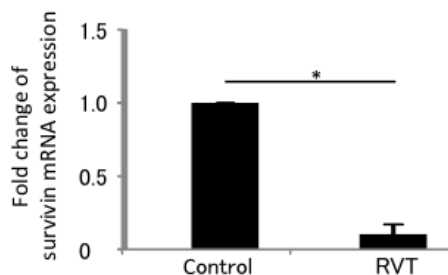
また、TRAIL での刺激は、単独では ESC のアポトーシスを誘導しなかったが、RVT (40 μ M) で前処置をすることで、ESC のアポトーシスを誘導することが示された (TRAIL:9.03 \pm 1.28, TRAIL+RVT:46.16 \pm 5.01(%):p<0.05) (図 4)。

図 4



RVT (40 μ M) 存在下で培養した ESC では、survivin の発現が有意に低下していることが示され、ESC のアポトーシス感受性向上に關与している可能性が示唆された。(図 5)

図 5



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 5 件)

Nagasaka K, Kawana K, Tomio K, Tsuruga T, Mori-Uchino M, Miura S, Tanikawa M, Miyamoto Y, Ikeda Y, Sone K, Adachi K, Matsumoto Y, Arimoto T, Oda K, Osuga Y, Fujii T.: Positive peritoneal cytology at interval surgery is a poor prognostic factor in patients with stage T3c advanced ovarian carcinoma: A retrospective study. J Obstet Gynaecol Res. 査読有, 41(5), 2014, 755-62.
doi: 10.1111/jog.12616.

Kawana K, Adachi K, Kojima S, Taguchi A, Tomio K, Yamashita A, Nishida H, Nagasaka K, Arimoto T, Yokoyama T, Wada-Hiraike O, Oda K, Sewaki T, Osuga Y,

Fujii T.: Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients. *Vaccine*. 査読有, 32(47), 2014, 6233-9.
doi: 10.1016/j.vaccine.2014.09.020.

Tsuruga T, Fujimoto A, Kawana K, Mori M, Hasumi Y, Kino N, Tomio K, Miura S, Tanikawa M, Sone K, Miyamoto Y, Ikeda Y, Kojima S, Adachi K, Nagasaka K, Matsumoto Y, Arimoto T, Oda K, Nakagawa S, Horie K, Yasugi T, Yokota H, Osuga Y, Fujii T., Radical hysterectomy with or without para-aortic lymphadenectomy for patients with stage IB2, IIA2, and IIB cervical cancer: outcomes for a series of 308 patients. *Int J Clin Oncol*. 査読有, 21(2), 2016, 359-66.
doi: 10.1007/s10147-015-0907-3.

Sato M, Kawana K, Adachi K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, Nishida H, Inoue T, Taguchi A, Takahashi J, Kojima S, Yamashita A, Tomio K, Nagamatsu T, Wada-Hiraike O, Oda K, Osuga Y, Fujii T., Decreased expression of the plasminogen activator inhibitor type 1 is involved in degradation of extracellular matrix surrounding cervical cancer stem cells. *Int J Oncol*. 査読有, 48(2), 2016, 829-35.
doi: 10.3892/ijo.2015.3283.

Nishida H, Matsumoto Y, Kawana K, Christie RJ, Naito M, Kim BS, Toh K, Min HS, Yi Y, Matsumoto Y, Kim HJ, Miyata K, Taguchi A, Tomio K, Yamashita A, Inoue T, Nakamura H, Fujimoto A, Sato M, Yoshida M, Adachi K, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Oda K, Nagamatsu T, Nishiyama N, Kataoka K, Osuga Y, Fujii T., Systemic delivery of siRNA by actively targeted polyion complex micelles for silencing the E6 and E7 human papillomavirus oncogenes. *J Control Release*. 査読有, 231, 2016, 29-37.
doi: 10.1016/j.jconrel.2016.03.016.

〔学会発表〕(計3件)

田口歩、甲賀かをり、川名敬、平池修、宮下真理子、須江英子、真壁友子、山下亜紀、富尾賢介、大須賀穰、藤井知行、サバイピンをターゲットとした子宮内膜症治療方法～レスベラトロール～, 日本エンドメトリオース学会, 2015年1月24～25日, 東京.

Ayumi Taguchi, Kaori Koga, Kei Kawana, Osamu Hiraike, Mariko Miyashita, Fusako Sue, Tomoko Makabe, Aki Yamashita, Kensuke Tomio, Tomoyuki Fujii and Yutaka Osuga,

Resveratrol has a therapeutic potential for treating endometriosis, International Federation of Fertility Societies International Meeting, 2015年4月26～29日, 横浜.

吉田 光代, 田口 歩, 川名 敬, 富尾 賢介, 中村 寛江, 藤本 麻葉, 山下 亜紀, 長阪 一憲, 足立 克之, 織田 克利, 清野 透, 大須賀 穰, 藤井 知行, 癌遺伝子(ras, myc)は癌微小環境に働きかけ卵巣癌の腹腔内の癌進展様式を変化させる, 第74回日本癌学会学術総会, 2015年10月8～10日, 名古屋.

〔図書〕(計0件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者 (1)
富尾 賢介 (TOMIO, Kensuke)
埼玉県立がんセンター・婦人科・医長
研究者番号: 40707254

(2) 研究分担者 (0)
(3) 連携研究者 (0)