様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月 １９ 日現在

機関番号：２４７０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2017
課題番号：１５Ｋ２０１５５
研究課題名（和文）子宮内膜症におけるケモカインシステムの分子病理学的研究

研究課題名（英文）The mechanism of chemokine system in endometriosis

研究代表者
溝口　美佳（Mizoguchi, Mika）

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：８０６４７５６１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：野生型（WT)マウスではBalb/cでは10/16匹（62.5%）、ｃ57BL/6では6/16（37.5%）で嚢胞が形成された．嚢胞上皮でエストロゲン受容体,プロゲステロン受容体が陽性で内膜症性様病変であることが確認できた．CCR5欠損（KO）マウスではドナー・レシピエントともにKO（KO-KO）の場合､病変は形成されなかった．WT-KOは4/10（40%），KO-WTは4/9（44.4%）の結果であり，有意にKO-KOで病変形成が抑制されていた．以上より子宮内膜そのもの及び腹腔内環境の両方においてCCL5-CCR5システムが子宮内膜症病変形成に不可欠な働きをしていることが示唆された．

研究成果の概要（英文）：We established mouse endometriosis model. The endometriotic cysts were formed 10/16 (62.5%)in Balb / c and 6/16(37.5%) in c57 BL / 6. This cyst epithelium expressed estrogen receptor and progesterone receptor. Thus, these cysts were confirmed endomtriotic cyst. In CCR5 deficient (KO) mice, the lesions were not formed in combination donor KO and recipient KO. The rate of lesion formation was 4/10 (40%), in WT - KO and 4/9(44.4%) in KO - WT. The endometiotic cysts were suppressed significantly in KO - KO. These results suggest that the CCL5-CCR5 system of endometrium itself and intraperitoneal environment plays essential role in endometriosis.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮内膜症　ケモカイン

１．研究開始当初の背景

子宮内膜症は治療抵抗性，再発・再燃，妊孕性の低下，腹腔内癒着，悪性化の可能性などから，一刻も早い病態解明が望まれているが，まだ明らかな病態解明には至っておらず謎の多い疾患と言われている．治療としては，NSAIDs による対症療法，LEP 製剤，ジェノゲスト，GnRH アゴニストなどの内分泌療法や手術療法があり，患者個人の年齢，挙児希望の有無，既往治療内容，副作用や経済的負担など女性のライフステージに合わせて最適な治療法を選択するのが現在のコンセンサスである．

子宮内膜症の発生機序に関しては子宮内膜移植説と体腔上皮化生説の二つの仮説が有力である．子宮内膜移植説は月経時に剥脱した子宮内膜が卵管を逆流して骨盤腔に至り，これらの細胞が腹膜上に生着し発育することによって子宮内膜症が発症するという仮説である．ほとんどすべての女性で月経血は逆流することはよく知られた事実であるが，すべての女性が子宮内膜症を発症するわけではない．近年,月経血中の viable な子宮内膜細胞が骨盤腹膜に生着・浸潤・増殖するにあたっての免疫学的機序の関与が提唱され,様々な免疫細胞およびサイトカイン・ケモカインなどとの関わりが報告されている．子宮内膜症患者での腹腔内環境では CCL2(MCP-1)，CCL5(RANTES)，CXCL1(Groα), IL-8 などのケモカインが高濃度に存在し，臨床進行期が進むにつれその濃度が高くなることが報告されている（Borrelli GM et al. Hum Reprod. 2014;29:253-66）．以上より、我々は子宮内膜症においてケモカインを介した免疫学的機序が関連しているという仮説を構築し,その詳細なメカニズムを解明することが子宮内膜症の病態解明・治療に繋がると考えた．

過去に我々はマウス卵巣癌腹膜播種モデルを用いて癌微小環境における宿主免疫寛容メカニズムと癌の進行との関連を検討してきた（Tanizaki Y, Mizoguchi M et. al. Cancer Sci. 2014;105:966-73）．特に近年は卵巣癌をはじめ，各種の癌において，ケモカインと癌の発生，増殖，浸潤，転移との関連に対する研究が進められており，我々もマウス卵巣癌におけるケモカインシステムの役割についての研究を現在行っている．その結果として，マウス卵巣癌細胞株を腹腔内に移植したケモカイン受容体（*Cx3cr1*$^{-/-}$）ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べて，生存期間が有意に長く卵巣癌とケモカインシステムとの関連が示唆され，CX3CL1-CX3CR1 システムを介して Tumor associated macrophage(TAM)が卵巣癌の腹膜播種メカニズムの一端を担っていることを解明した（論文投稿中）．また *Ccr5*$^{-/-}$マウスにおいて、卵巣癌腹膜播種、皮下腫瘍量が有意に減少することも我々の研究で分かった．卵巣癌組織内のマクロファージの浸潤、線維化、腫瘍血管新生が有意に減弱していることから，CCR5 が間質細胞を誘導し腫瘍発育進展に関与していることが示唆された（論文投稿中）．したがって，我々がこれまで癌微小環境における免疫寛容やケモカインシステムを研究してきた実績に基づいて，子宮内膜症病巣局所におけるケモカインを介した免疫学的なメカニズムを分子病理学的に解明するために今回の研究を企画した．

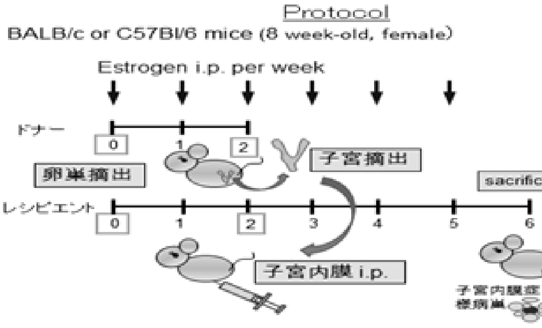
２．研究の目的

子宮内膜症におけるケモカインシステムの関連を解明し，子宮内膜症に対する新たな治療戦略の基盤を構築することを本研究の目的とした．

３．研究の方法

(1)<u>マウス子宮内膜症モデルの確立</u>

Day0 にマウスの卵巣を摘出し，エストロゲンを１週間毎に投与して子宮内膜増殖を図り，ホルモン動態を同調させる．マウスをドナー群，レシピエント群にわけ，ドナー群から子宮を摘出し，子宮内膜を細切後，レシピエントマウスの腹腔内に投与する．その後，1 週間ごとにエストロゲンを投与し，6 週間後に開腹し子宮内膜症様病巣が形成されているか確認した（下図）．



(2)<u>ノックアウトマウスを用いた内膜症病変におけるケモカインの機能的解析</u>

野生型（WT）マウスおよびノックアウト（KO）マウスにおいて,上記の腹腔内移植内膜症モデルを用いて,両群間における内膜症の進展の程度を比較した。次に両群の内膜症病変を摘出し,Real-time PCR およびフローサイトメトリーを用いて，子宮内膜症病巣局所における各種ケモカインおよびその受容体の発現と宿主免疫細胞の phenotyping 解析を行う．

(3)<u>ヒト子宮内膜症における検討</u>

当院での手術検体から採取した子宮内膜を用いて，ヒト子宮内膜症の子宮内膜におけるケモカイン・サイトカインシステムの発現を検討した．

４．研究成果

まずは WT マウス（Balb/c と c57BL/6）を用いてマウス内膜症モデルを確立した．ドナー、レシピエントは同じ遺伝子型を用いた．

Balb/c では 10/16 匹＝62.5%、c57BL/6 では 6/16＝37.5%で嚢胞が形成された．この病変が内膜症様病変であることを確認するため、ヒトの子宮内膜性嚢胞の病理診断で用いられるエストロゲン受容体（ER)、プロゲステロン受容体（PR)、CD10 の免疫染色を行った．嚢胞上皮で ER,PR ともに陽性となったが、CD10 は染色条件が調整困難で評価できなかった．ER, PR 陽性より子宮内膜由来の組織であると判断し内膜症性様病変が形成できたと考えた．それぞれの病変は小さく，マウス 1 匹から 1-2 個の病変のみの採取であったため，病変における解析が困難であった．今後は他の報告でみられるような LPS の投与や月経血の逆流を模した血液の注入などを行い病変形成の促進をする必要があると考える（Azuma Y et al. Am J Reprod Immunol. 2017; 77(4)）．
次に遺伝子改変マウス（***Ccr1***$^{-/-}$、***Ccr2***$^{-/-}$、***Ccr5***$^{-/-}$、***Cx3cr1***$^{-/-}$、***Ifn-r***$^{-/-}$）を用いて内膜症モデルを作成した．***Ccr5***$^{-/-}$ではドナー・レシピエントともに KO マウスの場合は 0/10＝0%と病変はまったく形成されなかったが，ドナーが WT マウス・レシピエントが KO マウスの場合は 4/10＝40%，ドナーが KO マウス・レシピエントが WT マウスの場合は 4/9＝44.4%の結果であり，有意に KO-KO で病変形成が抑制されていた．以上より子宮内膜そのもの及び腹腔内環境において CCL5-CCR5 システムが子宮内膜症病変形成に関与していることが示唆された．採取した病変や腹水を用いて Real-time PCR，免疫染色およびフローサイトメトリーを用いて，子宮内膜症病巣局所における各種ケモカイン・その受容体や炎症性サイトカインの発現，宿主免疫細胞の phenotyping 解析を継続中である．
　当院の手術症例から得られた子宮内膜を用いて、Real-time PCR で解析を行った。月経時と非月経時での子宮内膜に発現するケモカインやサイトカインを検索したところ、***Cx3cl1, Tgfb***が月経群で有意に発現していた．また子宮筋腫あるいは子宮腺筋症で摘出された子宮からえられた子宮内膜で炎症性サイトカイン及びケモカインを比較検討行ったが両群で有意差を認めたものはなかった．

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　4　件）

1: Yamamoto M, Ikezaki M, Toujima S, Iwahashi N, Mizoguchi M, Nanjo S, Minami S, Ihara Y, Ino K. Calreticulin Is Involved in Invasion of Human Extravillous Trophoblasts Through Functional Regulation of Integrin β1. Endocrinology. 2017; 158: 3874-3889. doi: 10.1210/en.2016-1966.

2: Nanjo S, Minami S, Mizoguchi M, Yamamoto M, Yahata T, Toujima S, Shiro M, Kobayashi A, Muragaki Y, Ino K. Levels of serum-circulating angiogenic factors within 1 week prior to delivery are closely related to conditions of pregnant women with pre-eclampsia, gestational hypertension, and/or fetal growth restriction. J Obstet Gynaecol Res. 2017; 43: 1805-1814. doi:10.1111/jog.13452.

3: Kobayashi A, Yahata T, Nanjo S, Mizoguchi M, Yamamoto M, Mabuchi Y, Yagi S, Minami S, Ino K. Rapidly progressing large-cell neuroendocrine carcinoma arising from the uterine corpus: A case report and review of the literature. Mol Clin Oncol. 2017; 6: 881-885. doi: 10.3892/mco.2017.1229.

4: Yahata T, Yagi S, Mabuchi Y, Tanizaki Y, Kobayashi A, Yamamoto M, Mizoguchi M, Nanjo S, Shiro M, Ota N, Minami S, Terada M, Ino K. Prognostic impact of primary tumor SUV(max) on preoperative (18)F-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography and computed tomography in endometrial cancer and uterine carcinosarcoma. Mol Clin Oncol. 2016; 5: 467-474.

〔学会発表〕（計　4　件）

1：溝口美佳，中田久実子，八幡環，南條佐輝子，山本円，小林彩，城道久，太田菜美，八木重孝，南佐和子，井箟一彦．マウス早産モデルにおける fractalkine/CX3CR1 システムの関与．第 52 回日本周産期・新生児医学会学術集会．2016 年 7 月．富山．

2：溝口美佳，八幡環，南條佐輝子，山本円，小林彩，野坂みずほ，石田裕子，國中由美，木村章彦，南佐和子，向田直史，近藤稔和，井箟一彦． CX3CR1 欠損は脱落膜へのマクロファージの遊走を減少させ LPS 誘導早産を抑制する． 第 24 回日本胎盤学会学術集会．2016 年 11 月． 和歌山．

3：Mika Mizoguchi, Mizuho Nosaka, Yuko Ishida, Akihiko Kimura, Toshikazu Kondo. CX3CL1-CX3CR1 system involves preterm labor via recruitment of CX3CR1 positive macrophages in myometrium. 第 45 回日本免疫学会学術集会．2016 年 12 月．沖縄．

4：溝口美佳，八幡環，南條佐輝子，山本円，南佐和子，井箟一彦．LPS 誘導マウス早産モデルにおける Fractalkine-CX3CR1 システムの役割の解明　CX3CR1 欠損は脱落膜へのマクロファージの遊走の低下により早産を抑

制する．第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会．2017 年 4 月．広島．

〔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〕なし

６．研究組織

(1)研究代表者

溝口美佳（Mika Mizoguchi）
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：80647561

(2)研究分担者　なし

(3)連携研究者　なし

(4)研究協力者　なし