

研究種目：基盤研究（c）

研究期間：2006～2009

課題番号：18591844

研究課題名（和文） 子宮内膜症の発生機序の解明と分子標的治療の開発

研究課題名（英文） The elucidation of the pathogenesis and a search of the molecular targeted treatment of endometriosis.

研究代表者

藤原 寛行（FUJIWARA HIROYUKI）

自治医科大学医学部・准教授

研究者番号：50316535

研究成果の概要（和文）：内膜症がその発生、進展に免疫的機構が関与した慢性炎症性増殖性疾患であるという概念が提唱されるようになり、私たちもそこに新たな治療ターゲットを探すべく検討を行った。基礎研究ではラット内膜症モデルを用いて、炎症に関与する諸因子の同定を行い、osteopontin(OPN)とL-selectinが病態と深く関与していることを明らかにした。また臨床研究ではロイコトリエン受容体拮抗剤が子宮内膜症・月経困難症の治療に有効である可能性を二重盲検試験にて証明した。

研究成果の概要（英文）：One aspect of endometriosis is its chronic inflammatory proliferative disease nature and we believe an immunologic mechanism is associated with the development and extension. From this hypothesis, we carried out several studies to find a treatment target. Using rat endometriosis model, we identified two factors (osteopontin (OPN) and L-selectin) associated with pathogenesis of endometriosis. In clinical studies, we proved the possibility that a leukotriene receptor antagonist which has anti-inflammatory effects was effective in treatment of endometriosis and dysmenorrhea by a prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	570,000	4,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮内膜症、月経困難症、慢性炎症性増殖性疾患

### 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は子宮内膜あるいはその類似組織が異所性に増殖する疾患である。月経血が経卵管的に腹腔内に逆流し、この中に含まれる正所性子宮内膜上皮が腹膜などに生着して内膜症に進展するという逆流説が、その成因の一つとして挙げられている。最近、この疾患の発生・進展に各種炎症細胞が強く関与しており、また子宮内膜上皮細胞が腹腔内に生着する際にも、局所にて様々な免疫応答が生じていると考えられている。すなわち、通常は異物として各種炎症細胞によって排除される内膜上皮が、何らかの免疫学的寛容が生じた場合に腹腔内に生着し内膜症を形成する。さらに炎症が持続（慢性炎症）することにより病巣は拡大、進展する。我々は、免疫応答に関与する疾患特異的な因子を同定することにより、子宮内膜症の発生機序の解明と、特異因子を標的とした新しい治療法の開発を目的に、慢性炎症（炎症細胞）、免疫学的寛容、の2つのキーワードをもとに、以下の研究を企図した。

### 2. 研究の目的

- (1) 基礎研究：慢性炎症、免疫学的寛容という観点から子宮内膜症に関与している因子を同定する。
- (2) 臨床研究：抗炎症作用が疼痛改善効果を示すことが期待されている抗ロイコトリエン受容体拮抗剤を用いて実際の臨床で効果が認められるのかどうかを実証すること。

### 3. 研究の方法

- (1) ラット子宮内膜症モデルを用いての基礎実験。メスSDラットを用いて子宮内膜片の自己腹膜への移植を行い、内膜症様病変を作成し、種々の測定に供した。cDNAマイクロアレイとRT-PCRにて内膜症病変に特異的に upregulate している物質の同定を行った。
- (2) 方法①で高発現している osteopontin と L-selectin に関してはヒトおよびラットの正所性子宮内膜および内膜症組織でその局在を免疫組織化学にて確認した。
- (3) ヒトおよびラット子宮内膜症モデルにおける内膜症病変部において anti-ASMA antibody、anti-NCAM antibody、anti-NGF antibody を行い、病変部における平滑筋、神経、炎症細胞の局在を検討した。

- (4) 同ラットモデルにおいて、n-3 eicosapentaenoic acid (EPA) の抗炎症効果を確認するために、EPA 投与群と n-6 linoleic acid (LA) 投与群における病変部の差異を検討した。食事投与開始後 2 週目に自己移植を行い、2 週目、4 週目に病変部を採取して検討した。
- (5) 免疫抑制物質である IDO と子宮内膜症の関係を検討するため、ヒト正所性子宮内膜 70 例（内膜症 40 例、非内膜症 30 例）、ヒト月経血内子宮内膜上皮細胞 29 例（内膜症 11 例、非内膜症 18 例）、ヒト内膜症性嚢胞 25 例を LSAB 法にて免疫染色を施行した。
- (6) ロイコトリエン受容体拮抗剤（シングレア）の抗炎症効果による月経痛改善効果を確認する目的で当院倫理委員会の承認を得て prospective, randomized, placebo-control study を施行した。シングレア群は 1mg/day を 2 カ月連続投与した。VAS 値、NSAID 使用量を指標に臨床的効果を検討した。

### 4. 研究成果

- (1) マイクロアレイにより 71 の upregulate、45 の downregulate した物質が抽出された。その中で osteopontin, Lyn, Vav1, Runx1, l-selectin が子宮内膜症病変部において、正常子宮内膜と比較しそれぞれ 130, 10, 10, 12, 46 倍高発現していることを確認した。これらは細胞の接着、遊走、サイトカイン産生に関与する細胞内のシグナル伝達系の諸因子などであり、内膜症の炎症性疾患としての側面を反映している結果であった。
- (2) osteopontin(OPN) と L-selectin に関してはヒトおよびラットの正所性子宮内膜および内膜症組織でその局在を免疫組織化学にて確認したところ、OPN は腺上皮細胞を中心に、L-selectin は間質を中心として局在していることがわかった。L-selectin は T リンパ球の表面に発現し、血管内皮細胞との接着に関与することが知られており、局所に白血球が浸潤する際に大きな役割をはたしていると考えられている。よってこれらの結果も、内膜症の慢性炎症という病態を支持するものであった。
- (3) 線維芽細胞と神経線維は内膜症固有 (stroma) ではない周囲の間質

(interstitium) に豊富であり、同部位にマクロファージなどの炎症細胞も多数認められた。炎症による線維化、平滑筋化生、収縮などが疼痛と関与している可能性を示した。

- (4) EPA 投与群において有意に n-3:n-6 ratio が上昇していることを確認した。内膜症の炎症の首座と考えられている間質 (interstitium) の厚さが EPA 投与群で有意に減少していた。また interleukin-1beta, interleukin-1r, prostaglandin E synthase (Ptges), nuclear factor (NF)-kappaB の発現レベルが低下していた。EPA による抗炎症作用が内膜症を改善する可能性を示した。
- (5) indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) 正所性子宮内膜においては増殖期には発現が低く、分泌期に高発現していた (増殖期 15% (7/46) vs 分泌期 67% (16/24);  $p < 0.01$ )。内膜症症例においては増殖期においても発現が認められる症例が多かった (内膜症 43% (17/40) vs 非内膜症 20% (6/30);  $p < 0.05$ )。さらに月経血内 IDO 陽性細胞の割合は内膜症症例において高率であった (内膜症 91% (10/11) vs 非内膜症 50% (9/18);  $p < 0.05$ )。内膜症性嚢胞は全例染色され、月経のどの周期でも同様に染色された (GnRha2/2, 増殖期 11/11, 分泌期 12/12)。IDO の発現を現在不死化子宮内膜上皮細胞で検討中である。
- (6) 期間中に計 62 人がエントリーし、最終的にモンテルカスト群 24 人、プラセボ群 26 人の計 50 人が評価対象となった。全例 NSAID のみでは疼痛コントロールに難渋していた症例であったが、モンテルカスト群において VAS 値、NSAID 数ともに投薬後に有意に低下した。しかしプラセボ群においても両値の低下が認められた。VAS 値、NSAID 数ともモンテルカスト群でプラセボ群に比し平均低下数は大きかったが、統計学的には有意差は認められなかった。しかし VAS 値が前値と比べ投薬後に 1/2 以上減少した有効症例 (本研究で「著効」と定義) が、モンテルカスト群で、プラセボ群に比し統計学的有意差をもって多く認められた。NSAID 使用数に関しても、投薬後に 1/2 以上減少した著効症例が、モンテルカスト群で有意に多く認められた (VAS: montelukast, 4 vs. placebo, 0 ( $P=0.029$ ); NSAID: montelukast, 9 vs. placebo, 3 ( $P=0.031$ ))。平均値の比較においては両群間で有意差は無かったが、有効症例数の割合は明らかにモンテルカスト群で高いことがわかり、モンテルカストの疼痛改善効果が確認された。

## 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 5 件)

- ① Fujiwara H, Konno R, Netsu S, Odagiri K, Taneichi A, Takamizawa S, Ohwada M, Suzuki M. Usefulness of montelukast, a leukotriene receptor antagonist, for dysmenorrheal — A prospective, randomized, placebo - controlled study—. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 査読有, 148, 2010, 195-8.
- ② Odagiri K, Konno R, Fujiwara H, Netsu S, Yang C, Suzuki M. Smooth muscle metaplasia and innervations in interstitium of endometriotic lesions related to pain. Fertil Steril. 査読有, 92, 2009, 1525-31.
- ③ Netsu S, Konno R, Odagiri K, Soma M, Fujiwara H, Suzuki M. Oral eicosapentaenoic acid supplementation as possible therapy for endometriosis. Fertil Steril. 査読有, 90, 2008, 1496-502.
- ④ Konno R, Fujiwara H, Netsu S, Odagiri K, Shimane M, Nomura H, Suzuki M. Gene expression profiling of the rat endometriosis model. Am J Reprod Immunol. 査読有, 58, 2007, 330-343.
- ⑤ Odagiri K, Konno R, Fujiwara H, Netsu S, Ohwada M, Shibahara H, Suzuki M. Immunohistochemical study of osteopontin and L-selectin in a rat endometriosis model and in human endometriosis. Fertil Steril. 査読有, 88, 2007, 1207-11.

[学会発表] (計 9 件)

- ① 藤原寛行、野中宏亮、今野 良、竹井裕二、嵯峨 泰、大和田倫孝、鈴木光明 :

子宮内膜症発生におけるトリプトファン分解酵素, Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) の関与(シンポジウム). 第 29 回エンドメトリオーシス研究会. 2008 年 1 月 19-20 日. 高知.

- ② 藤原寛行、野中宏亮、今野 良、嵯峨 泰、竹井裕二、高橋詳史、種市明代、大和田倫孝、鈴木光明：子宮内膜症におけるトリプトファン分解酵素、Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) の特異的関与. 第 60 回日本産科婦人科学会総会. 2007 年 4 月 12-15 日. 横浜.
- ③ 根津幸穂、今野 良、小田切幸平、藤原寛行、山川洋光、大和田倫孝、鈴木光明：ヒト子宮内膜症血清中のオステオポンチン値に対する検討. 第 60 回日本産科婦人科学会総会. 2007 年 4 月 12-15 日. 横浜.
- ④ 今野 良、根津幸穂、小田切幸平、藤原寛行、柴原浩章、大和田倫孝、鈴木光明：子宮内膜症・子宮腺筋症の発症・増殖に関する分子生物学的検討. 子宮内膜症増加の原因は何か？疼痛発症の機序は何か？(シンポジウム). 第 28 回エンドメトリオーシス研究会. 2007 年 1 月 19-20 日. 和歌山.
- ⑤ 藤原寛行、今野 良、根津幸穂、小田切幸平、野中宏亮、柴原浩章、大和田倫孝、鈴木光明：子宮内膜症・月経困難症に対するロイコトリエン受容体拮抗剤の有用性の検討—2 重盲検試験—(シンポジウム). 第 28 回エンドメトリオーシス研究会. 2007 年 1 月 19-20 日. 和歌山.
- ⑥ 根津幸穂、小田切幸平、藤原寛行、今野良：エイコサペンタエン酸経口投与による子宮内膜症治療の可能性. 第 28 回エンドメトリオーシス研究会. 2007 年 1 月 19-20 日. 和歌山.
- ⑦ 小田切幸平、今野 良、根津幸穂、藤原寛行、大和田倫孝、柴原浩章、鈴木光明：子宮内膜症間質における Osteopontin、Transforming Growth Factor  $\beta$  1 の発現とリモデリングと疼痛発症機序への関与. 第 28 回エンドメトリオーシス研究会. 2007 年 1 月 19-20 日. 和歌山.
- ⑧ 藤原寛行、今野 良、根津幸穂、小田切幸平、野中宏亮、柴原浩章、大和田倫孝、鈴木光明：子宮内膜症・月経困難症に対するロイコトリエン受容体拮抗剤の有用性の検討—2 重盲検試験—. 第 59 回日本産科婦人科学会総会. 2006 年 4 月 14-17 日. 京都.
- ⑨ 根津幸穂、今野 良、小田切幸平、藤原寛行、榎本明美、山川洋光、大和田倫孝、鈴木光明：エイコサペンタエン酸投与による子宮内膜症治療の可能性. 第 59 回日本産科婦人科学会総会. 2006 年 4 月

14-17 日. 京都.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤原 寛行 (FUJIWARA HIROYUKI)  
自治医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：50316535

### (2) 研究分担者

今野 良 (KONNO RYO)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70271905

鈴木 光明 (SUZUKI MITSUAKI)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50110870

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：