

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K16752

研究課題名（和文）子宮内膜症を合併した不妊症におけるNK細胞機能分担と機能発現の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Role and Expression of NK Cell Function in Infertility Complicated by Endometriosis

研究代表者

山谷 文乃（Yamaya, Ayano）

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：50623766

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、子宮内膜症による不妊症におけるNK細胞の機能（活性化レセプターNCR、サイトカイン産生）との関連を明らかにし、不妊症を合併した子宮内膜症の病態を解明することである。子宮内膜症の腹水中NK細胞では、特に深部子宮内膜症において細胞傷害性の強いiNK細胞は低下しており、炎症性サイトカインであるTNF- α やIFN- γ を産生するNK細胞が増加していた。また、子宮内膜のNK細胞は不妊症患者と子宮内膜症患者では異なり、子宮内膜症の良好胚率は低下していたため、子宮内膜症の不妊原因は子宮内膜の免疫環境よりも胚因子が寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、体外受精-胚移植を行った患者を対象として子宮内膜のNK細胞を解析し、子宮内膜症患者と子宮内膜症のない不妊症患者との比較を行った。その結果、子宮内膜症患者の子宮内膜では細胞傷害性の強いiNK細胞の増加はなかった。良好胚を移植した場合は子宮内膜症患者の妊娠率の方が有意に良好であったものの、良好胚発生率が低く、子宮内膜症患者の不妊原因は胚因子が強く関与していると考えられた。これは、子宮内膜症患者に対して子宮内膜環境の治療よりも良好胚を得ることが先決であることが示唆され、子宮内膜症合併不妊症患者の治療方針の一案を示すことができると考える。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the relationship between NK cell function (such as activating receptors NCR and cytokine production) and infertility caused by endometriosis, and to clarify the pathophysiology of endometriosis complicated by infertility. In the peritoneal fluid of endometriosis patients, particularly those with deep infiltrating endometriosis, the number of highly cytotoxic NK cells decreased, while NK cells producing inflammatory cytokines such as TNF- α and IFN- γ increased. Additionally, NK cells in the endometrium differed between infertile patients and endometriosis patients, and the good embryo rate in endometriosis was reduced. This suggests that embryo factors contribute more to the cause of infertility in endometriosis than the immune environment of the endometrium.

研究分野：産婦人科

キーワード：子宮内膜症 NK細胞 不妊症 深部子宮内膜症 体外受精

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症の病因のひとつとして、免疫異常が指摘されている。そのなかで、子宮内膜症において、末梢血および腹水中のNK細胞の細胞傷害性が低下しているという報告がなされている。その詳細な機能発現においては、抑制性レセプターのひとつである NKG2A 発現¹や KIR 発現の増加²、活性化レセプターのひとつである NKG2D 発現の低下³などが報告されている。また、子宮内膜症におけるサイトカイン産生異常も指摘されており、腹腔内の TNF- α などの炎症性サイトカインの増加とそれによる内膜症細胞の増殖・血管新生が報告されている⁴。我々も子宮内膜症の腹水中NK細胞の活性化レセプターのひとつである NKp46 発現が低下しており、TNF- α や IFN- γ の炎症性サイトカイン産生が増加していることを報告してきた⁵。しかし、活性化レセプターおよび抑制性レセプターの共発現を解析した報告はこれまでにない。

さらに、不妊症や不育症においてもその原因のひとつとして子宮内膜のNK細胞のNKp46発現の低下を報告してきた⁶。子宮内膜症はその20~70%に不妊症を合併する。子宮内膜症治療においてはホルモン療法が現在第一選択とされているが、挙児希望のある患者には使用できず、新たな治療法開発が叫ばれている。そこで、免疫学的に子宮内膜症と不妊症・不育症と共通する点を見いだせた場合に、将来的に免疫療法を提案することが出来るものと考えた。しかし、子宮内膜症では腹水中、不妊症や不育症では子宮内膜のNK細胞NKp46発現の共通点はあるものの、局所で免疫状態は異なる可能性がある。実際に、末梢血と子宮内膜では免疫細胞の分布のみならず細胞表面抗原の発現も異なっている。同所での免疫学的異常の共通点を見出すことは、子宮内膜症と不妊症のマーカーとなることに加え、今後の治療法の開発の糸口となる可能性がある。

2. 研究の目的

近年、がん治療において免疫療法がさまざま開発されているが、子宮内膜症においても免疫療法が活用できないかという報告がなされている。しかし、その治療効果と副作用を天秤にかけた場合に副作用が多く出てしまう可能性が大きく、また妊娠希望の場合に使えるかどうかの検討がなされていない。これまで我々は、子宮内膜症ではNK細胞の活性化レセプターのひとつであるNKp46発現が低下しており、NK細胞の細胞傷害性が低下してしまうことで子宮内膜症が発症・進展してしまう可能性について報告してきた。NK細胞の機能は活性化レセプターと抑制性レセプターのバランスで調節されている。本研究では、子宮内膜症のNK細胞の活性化・抑制性レセプターの共発現、およびそのサイトカイン産生を解析し、さらに子宮内膜でのNK細胞の細胞表面抗原を解析することで、子宮内膜症と不妊症患者での共通点を見出し、将来の免疫療法の開発の一助とすることを目的とする。

3. 研究の方法

子宮内膜症におけるNK細胞の活性化・抑制性レセプターの共発現およびサイトカイン産生を明らかにする。すなわち、

1. 子宮内膜症患者と正常患者の末梢血・腹水・子宮内膜におけるNK細胞上活性化レセプター・抑制性レセプター共発現の違い

2. 上述のNK細胞サイトカイン産生の違い

3. 子宮内膜症患者の手術後薬物療法の有無での末梢血・子宮内膜NK細胞レセプター発現およびサイトカイン産生の変化 以上の3点を解明する。

1) 当院における子宮内膜症手術患者と子宮内膜症以外の良性疾患(子宮筋腫、卵巣嚢腫など)での手術患者より末梢血を採取し、Ficoll-Hypaque法にて末梢血単核球浮遊液(PBMC)を作成する。腹水は遠心・洗浄し、腹水細胞浮遊液を作成する。

2) 活性化レセプター(CD16、NKp46、NKp44、NKp30、NKG2C、NKG2D)および抑制性レセプター(NKG2A、CD158a)の発現と分布を同時染色し、フローサイトメトリーにて測定する。共発現をみることで、単一細胞レベルでのNK細胞の活性化レセプターと抑制性レセプターのバランスを測定することができ、NK細胞のより詳細な機能発現を解析することができると考えられる。

3) 1)で採取した検体を用いて、細胞内にサイトカインを産生させ、そのサイトカインを細胞内蓄積させる目的で、PMA、Ionomycin、Brefeldin-Aを細胞浮遊液に入れ、NK細胞を刺激する。NK細胞内に産生されたサイトカイン(TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10)を染色し、フローサイトメトリーにて測定する。TNF- α 、IFN- γ は炎症性サイトカインのひとつで細胞性免疫を調整している。IL-4、IL-10は液性免疫やアレルギー反応に関与する。これらを測定することで、子宮内膜症の病態を解明する。

4) 子宮内膜症のない不妊患者、手術をしていない子宮内膜症患者、手術をした子宮内膜症患者から黄体中期の月経周期の子宮内膜を採取し、1)~3)の手技を行い、子宮内膜のNK細胞表面抗原の発現を調査する。

4. 研究成果

子宮内膜症の腹水中NK細胞の活性性受容体のひとつであるNKp46発現は低下しており、なかでも細胞傷害性が強いと考えられるCD56^{dim}/NKp46⁺細胞が低下していた(図1, a,b)。NKp46とほかの活性性レセプター、抑制性レセプターとの共発現をみると、NKG2D(活性性受容体)発現の上昇(図1, d)、NKp46陽性NK細胞のNKG2C(活性性受容体)発現の低下(図1, e)が確認された。NKp46やNKG2Cの低下はNK細胞の細胞傷害性の低下を示していると考えられる。また、NKG2D発現の上昇は、以前の報告で子宮内膜症の腹腔内可溶性NKG2Dリガンドの上昇により子宮内膜症細胞が免疫回避しているとされており⁷、反応性にNKG2D発現が上昇しているものと考えられ、子宮内膜症細胞が生存・増殖していくことに寄与していると考えられた。

また、サイトカイン産生をみると、CD56⁺/NKp46⁺細胞とTNF- α 、IFN- γ 、TNF- β およびIFN- γ 共産生するNK細胞とは負の相関関係を示した(図2, A)。CD56^{dim}/NKp46⁺NK細胞も同様の結果を示した(図2, B)。すなわち、子宮内膜症では炎症性サイトカイン産生性が増加しており、それはNKp46発現と負の相関をしていることがいえる。TNF- α は腹腔内の炎症、血管新生、子宮内膜間質細胞増殖に関与していると報告されている。また、IFN- γ は炎症および血管新生に関連していると報告されている。つまり、子宮内膜症の進展に大きく寄与している。

子宮内膜のNK細胞を調査すると、子宮内膜症術後に体外受精-胚移植を行った患者および子宮内膜症を有しながら体外受精-胚移植を行った患者ではNKp46発現やCD16⁺/CD56^{dim}細胞に変化はなく、不妊症患者ではCD16⁺/CD56^{dim}細胞が上昇していた(図3)。子宮内膜症の腹腔内と子宮内膜のNK細胞環境は異なっていると考えられる。また、子宮内膜症の良好胚率は低下しており、子宮内膜症の不妊原因は子宮内膜の免疫環境よりも胚因子が寄与している可能性が示唆された。

子宮内膜症合併不妊での子宮内膜の影響は、子宮内膜症のエストロゲンレセプターのUpregulationとプロゲステロン抵抗性となることで子宮内膜の受容能が低下するという報告や、子宮内膜の着床マーカーの発現が低下するという報告がなされてきた。前述のように、我々の報告では不妊症や不育症では、子宮内膜のNKp46発現が低下していることを報告してきた。しかし、本研究では子宮内膜症の子宮内膜ではNKp46発現は低下しておらず、また細胞傷害性の強いと報告されるCD16⁺/CD56^{dim}細胞も上昇はしていなかった。また、子宮内膜症において手術したかしていないかによってもそれらに変化は認められなかった。

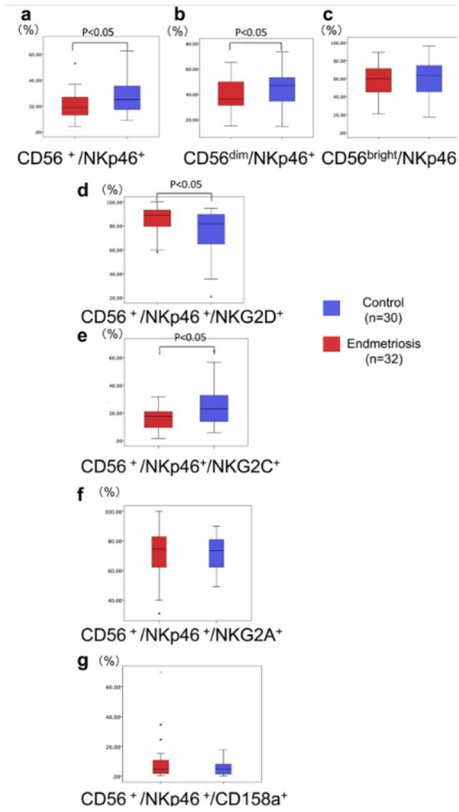


図1. 腹水中NK細胞表面抗原発現

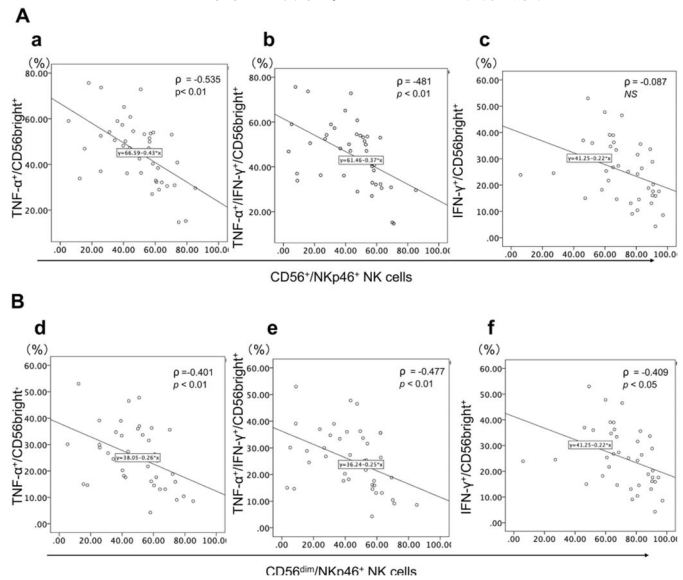


図2. 腹水中NK細胞のサイトカイン産生およびNKp46発現の相関

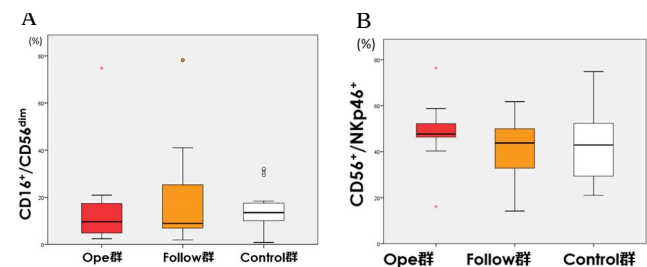


図3. 子宮内膜NK細胞細胞表面抗原発現

- A, Benedetti-Panici P, Santoni A: Increased frequency of human leukocyte antigen-E inhibitory receptor CD94/NKG2A-expressing peritoneal natural killer cells in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2008;**89**:1490-1496.
- 2 Maeda N, Izumiya C, Yamamoto Y, Oguri H, Kusume T, Fukaya T: Increased killer inhibitory receptor KIR2DL1 expression among natural killer cells in women with pelvic endometriosis. *Fertil Steril* 2002;**77**:297-302.
- 3 Guo SW, Du Y, Liu X: Platelet-derived TGF-beta1 mediates the down-modulation of NKG2D expression and may be responsible for impaired natural killer (NK) cytotoxicity in women with endometriosis. *Hum Reprod* 2016;**31**:1462-1474.
- 4 Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Nagano Y, Yoshida S, Tanikawa M, Terakawa N: Tumor necrosis factor-alpha promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**:824-829.
- 5 Funamizu A, Fukui A, Kamoi M, Fuchinoue K, Yokota M, Fukuhara R, Mizunuma H: Expression of natural cytotoxicity receptors on peritoneal fluid natural killer cell and cytokine production by peritoneal fluid natural killer cell in women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2014;**71**:359-367.
- 6 Fukui A, Funamizu A, Yokota M, Yamada K, Nakamura R, Fukuhara R, Kimura H, Mizunuma H: Uterine and circulating natural killer cells and their roles in women with recurrent pregnancy loss, implantation failure and preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2011;**90**:105-110.
- 7 Groh V, Wu J, Yee C, Spies T: Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002;**419**:734-738.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Saeki Shinichiro, Fukui Atsushi, Mai Chuxian, Takeyama Ryu, Yamaya Ayano, Shibahara Hiroaki	4. 巻 155
2. 論文標題 Co-expression of activating and inhibitory receptors on peritoneal fluid NK cells in women with endometriosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 103765 ~ 103765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jri.2022.103765	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 Fukui Atsushi, Mai Chuxian, Saeki Shinichiro, Yamamoto Mayu, Takeyama Ryu, Kato Toru, Ukita Yuji, Wakimoto Yu, Yamaya Ayano, Shibahara Hiroaki	4. 巻 85
2. 論文標題 Pelvic endometriosis and natural killer cell immunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 e13342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aji.13342	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 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Saeki Shinichiro, Fukui Atsushi, Yamaya Ayano, Takeyama Ryu, Shibahara Hiroaki
2. 発表標題 Co-expression of activating and inhibitory receptors on peritoneal fluid NK cells differs between deep endometriosis and peritoneal endometriosis
3. 学会等名 78th American Society for Reproductive Medicine Scientific Congress & Expo (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐伯信一朗、福井淳史、竹山龍、山谷文乃、柴原浩章
2. 発表標題 子宮内膜症における腹水中NK細胞受容体の発現強度の解析
3. 学会等名 第37回日本生殖免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐伯信一朗、福井淳史、竹山龍、山谷文乃、柴原浩章
2. 発表標題 子宮内膜症における腹水中NK細胞受容体の発現強度およびサイトカイン産生解析
3. 学会等名 第67回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐伯信一朗、福井淳史、麦楚嫻、山口桃李、竹山龍、山谷文乃、柴原浩章
2. 発表標題 子宮内膜症における腹水中NK細胞受容体の発現強度の解析
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹山龍、福井淳史、麦楚嫻、佐伯信一朗、山谷文乃、柴原浩章
2. 発表標題 NKp46の発現率が妊娠率に影響を及ぼすかの検討
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福井淳史、麦楚嫻、佐伯信一朗、竹山龍、山谷文乃、柴原浩章
2. 発表標題 流産時脱落膜NK細胞に発現するNKp46から不育症のリスク因子を知る
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐伯信一朗、福井淳史、麦楚嫻、竹山龍、加藤徹、山谷文乃、柴原浩章
2. 発表標題 子宮内膜症における腹水中NK細胞受容体の発現強度の解析
3. 学会等名 第40回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐伯信一朗、福井淳史、麦楚嫻、竹谷龍、加藤徹、山谷文乃、柴原浩章
2. 発表標題 子宮内膜症における腹水中NK細胞受容体の発現強度の解析
3. 学会等名 第146回近畿産科婦人科学会総会ならびに学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayano Yamaya, Joanne Kwak-Kim, Atsushi Fukui, Hiroaki Shibahara
2. 発表標題 Immunopathology and treatment of polycystic ovarian syndrome
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the American Society for Reproductive Immunology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayano Yamaya, Thanh Vinh Luu, Umida Ganieva, Amy Thees, Svetlana Dambaeva, Joanne Kwak-Kim
2. 発表標題 Expression of cell adhesion molecules on peripheral blood NK cells in reproductive failures
3. 学会等名 70th Annual Scientific Meeting of Society for Reproductive Investigation (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山谷文乃、福井淳史、麦楚嫻、佐伯信一郎、竹山龍、加藤徹、柴原浩章
2. 発表標題 子宮内膜症における腹水中NK細胞の活性化受容体および抑制性受容体発現
3. 学会等名 第73回 日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山谷文乃、福井淳史、福原理恵、横山良仁
2. 発表標題 子宮内膜症におけるNK細胞NCR発現とサイトカイン産生
3. 学会等名 近畿子宮内膜症Web研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐伯信一郎、福井淳史、麦楚嫻、竹山龍、加藤徹、山谷文乃、柴原浩章
2. 発表標題 子宮内膜症における腹水中NK細胞受容体の発現強度の解析
3. 学会等名 第66回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山谷文乃、福井淳史、佐伯信一郎、麦楚嫻、竹山龍、柴原浩章
2. 発表標題 子宮内膜症とNK細胞における病態解明
3. 学会等名 第8回兵庫医科大学先端医学セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山谷文乃、福井淳史、佐伯信一朗、杉山由希子、竹山龍、脇本裕、加藤徹、柴原浩章
2. 発表標題 当院でのチョコレート嚢胞の治療戦略
3. 学会等名 第143回近畿産科婦人科学会学術集会生殖内分泌・女性ヘルスケア研究部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山谷文乃、福井淳史、福原理恵、横山良仁、柴原浩章
2. 発表標題 子宮内膜症における末梢血・腹水中NK細胞NCR発現とサイトカイン産生
3. 学会等名 第38回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山谷文乃、福井淳史、福原理恵、横山良仁、柴原浩章
2. 発表標題 子宮内膜症の病態におけるNK細胞Natural Cytotoxicity Receptor発現とサイトカイン産生の関与
3. 学会等名 第35回日本生殖免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamaya A, Fukui A, Taima A, Yokota M, Fukuhara R, Yokoyama Y
2. 発表標題 Relationship between NCR expression on NK cells and natural pregnancies after surgical treatment for severe endometriosis
3. 学会等名 14th Congress of the International Society for Immunology of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayano Yamaya, Atsushi Fukui, Ayako Taima, Kohei Fuchinoue, Megumi Yokota, Rie Fukuhara, Yoshihito Yokoyama
2. 発表標題 Natural cytotoxicity receptors expression and cytokines production of natural killer cells in patients with endometriosis
3. 学会等名 American Society for Reproductive Immunology (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究協力者	佐伯 信一郎 (Saeki Shinichiro)	兵庫医科大学・産科婦人科・助教 (34519)	

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