

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890055

研究課題名 子宮内膜症・不妊症の病態における子宮運動異常の役割に関する研究

研究課題名 A possible role of mechanical stress in pathophysiology of endometriosis and infertility

研究代表者

原田 美由紀 (HARADA MIYUKI)

東京大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 70451812

研究成果の概要：

子宮内膜症は、近年罹患率が増加し、また不妊症との関連も示唆されるなど、病態の解明が急がれる疾患である。本研究においては、子宮内膜症患者において、異常子宮運動により惹起される機械的刺激が、子宮内膜症における重要な病態である、増殖能、線維化の促進に働くことを示した。さらに機械的刺激に加え、細胞へのストレスとして注目されている、小胞体ストレスと本疾患の関連につき、その治療への応用の可能性も含め検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,170,000	351,000	1,521,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	351,000	2,851,000

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・不妊症・ストレス・子宮運動

1. 研究開始当初の背景

近年、臓器の運動という機械的な刺激が単に物理的作用をもたらすのみでなく、その臓器の構成細胞において生化学的なシグナルに変換され、種々の生理、病理的状态に関与していることが明らかになってきた。子宮は

妊娠時のみならず、非妊時においても収縮運動を示す。この子宮運動により子宮の各部位にもたらされる機械的刺激が、その物理的作用のみならず、生化学的作用により、生殖領域における種々の事象に影響を与えることが推測される。また、近年罹患率の増加が

報告されている子宮内膜症患者や不妊症患者において、子宮運動異常が報告されてきている。私達は、特に子宮内膜症および不妊症に注目し、これらの病態における子宮運動の果たす役割につき解析を進めてきている。一方、近年生体内におけるストレスの一つとして、機械的刺激に加え、小胞体ストレス、すなわち小胞体内に変性たんぱく質が蓄積した際に、細胞内にさまざまなストレス応答が引き起こされ、各種疾患との関わりが注目されてきている。

子宮内膜症は、子宮内膜が月経血とともに骨盤腔内に逆流することが主要な病因と考えられているが、実際には月経血の逆流はほとんどの女性に観察される。本来なら処理されるべき逆流子宮内膜が、生存、増殖を続け、局所で接着、浸潤し子宮内膜症病変を形成する子宮内膜症患者においては、逆流する子宮内膜の性質ならびに骨盤腔内（＝腹腔内貯留液）の環境が正常女性とは異なっているとされている。しかし、子宮内膜の性質や骨盤内環境が変質する原因は未だ明らかにならず、したがって疾患の予防法、根本的な治療法も解明されてはいない。

私達は、ヒト子宮内膜より分離した子宮内膜間質細胞（ESC）を用いて、伸展刺激によりESCにおけるinterleukin（IL）-8発現が亢進することを示した。このことは、子宮内膜において機械的刺激が生化学的シグナルに変換されうることを証明したという点において、初めてであり非常に意義深い。また、子宮内膜症の病態に、子宮内膜への機械的刺激の生化学的作用が関与しているという新たな概念を示すことができた。

また、子宮内膜症細胞において、アポトーシスが減弱していることも病態の一つに関わっているとされており、これまでに私達は、子宮内膜症患者の骨盤内環境においては、

tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) 誘導性アポトーシスを阻害する、osteoprotegerin (OPG)が増加していることも示してきている。

さらに、子宮内膜症患者においては、不妊症の合併がしばしば問題となる。私達は、子宮内膜症患者において観察される、異常子宮運動により脱落膜化子宮内膜にもたらされた機械的刺激が、これまで説明されてきたように、単に物理的に胚の子宮内膜への定着を妨げるという物理的作用を持つのみならず、脱落膜化子宮内膜において生化学的なシグナルに変換され、脱落膜化子宮内膜の性質が変化することにより、着床障害の原因となるのではないかと推測した。そこで同様の手法により脱落膜化子宮内膜間質細胞（DSC）を用いて検討し、伸展刺激によりDSCにおいて、脱落膜化の指標であるinsulin-like growth factor binding protein-1（IGFBP-1）の産生が増加することを示した。私達は、子宮蠕動運動という物理的な刺激が子宮内膜の脱落膜化を制御するという生化学的作用を介して、着床現象に関わっているという新しい可能性を示した。

2. 研究の目的

子宮内膜症の病態に関わる重要な因子として、上記の炎症とならび、逆流子宮内膜の増殖能の亢進、アポトーシスの減少が挙げられる。さらに子宮内膜症病変はその局所において急性炎症から慢性炎症へと様相を変化させ、それに伴い線維化が亢進する。線維化は、強い疼痛や子宮内膜症に合併する不妊症の原因となる、直腸腔中隔の深部病変や骨盤内癒着の形成に深く関わっている。炎症に引き続き、このような炎症以外の子宮内膜症の病態形成のステップにおける、機械的刺激の関与につき検討を進める。また子宮内膜症細

胞における、小胞体ストレスと TRAIL 誘導性アポトーシスの変化との関与につき、検討を進める。

3. 研究の方法

(1) 子宮内膜への機械的刺激が増殖能に及ぼす影響に関する検討：良性疾患のために子宮摘出手術を施した患者より同意を得たうえで、子宮内膜の一部を採取した。以上の行程は、以前より東京大学の研究倫理委員会の承諾を得ており、引き続き同様に行なった。採取した子宮内膜より子宮内膜間質細胞(ESC)を分離し、初代培養系において以下の実験を行なった。培養細胞伸展刺激装置 Flexercell tension system FX 4000T (Flexcell International)を用いて、ESCに周期的伸展刺激を加え、増殖能の変化をMSTアッセイ法、BrdU取り込み法を用いて解析した。

(2) 子宮内膜への機械的刺激が細胞外基質の産生能、線維化に及ぼす影響に関する検討：(1)と同様にESCの初代培養系を用いて、これに伸展刺激を添加した。伸展刺激により、ESCが肉芽形成に重要で、直腸腔中隔の深部病変においてほぼ100%認められるmyofibroblast様に形質転換するのではないかという予測のもと、smooth muscle actinの発現の変化をreal-time PCR法、Western Blot法、免疫染色法を用いて検討した。さらに、子宮内膜症の慢性炎症病変で発現の亢進しているtype I collagenの発現の、伸展刺激による変化につき、PCR法、sircol assay法を用いて検討した。また、ESCにおいて産生される profibrotic cytokine である TGF- β (tissue growth factor- β)の、伸展刺激による発現の変化をreal-time PCR法、Western Blot法を用いて検討した。

(3) 小胞体ストレスの、TRAIL 誘導性アポトーシスに及ぼす影響の検討：子宮

内膜症性卵巣嚢胞にて嚢胞切除術、もしくは卵巣摘出術を施行した患者より同意を得たうえで、子宮内膜症性嚢胞の一部を採取した。以上の行程は、以前より東京大学の研究倫理委員会の承諾を得ており、引き続き同様に行なった。採取した子宮内膜より子宮内膜症性間質細胞(EEC)を分離し、初代培養系において以下の実験を行なった。Tunicamycin(小胞体ストレス惹起物質)添加による、DR5(機能性TRAIL受容体)の発現の変化をreal-time PCR法により検討した。またTunicamycin前処置の、TRAIL誘導性アポトーシスに及ぼす影響をFlow cytometry法により検討した。またこのアポトーシス経路の検討のため、汎カスパーゼ阻害剤(z-VAD-fmk)、およびDR5siRNA添加の影響も検討した。

4. 研究成果

(1) 子宮内膜への機械的刺激が増殖能に及ぼす影響に関する検討：周期的伸展刺激により、ESCの増殖能は亢進した。この効果は子宮内膜症患者より分離したESCでより著明な傾向にあった。

(2) 子宮内膜への機械的刺激が細胞外基質の産生能、線維化に及ぼす影響に関する検討：周期的伸展刺激により、ESCにおけるSMAの発現を亢進し、子宮内膜間質細胞はmyofibroblast様に形質転換すると考えられた。また、周期的伸展刺激は、type I collagenの発現も亢進させた。そしてこれには、TGF- β の発現亢進も伴っていた。

(3) 小胞体ストレスの、TRAIL 誘導性アポトーシスに及ぼす影響の検討：Tunicamycin添加により、EECにおいて、DR5の発現は12時間後まで時間依存性に増加した。またtunicamycin前処置により、TRAIL誘導性アポトーシスは有意に増加し、その効果はz-VAD-fmk、およ

び DR5siRNA 添加により有意に阻害された。

以上本研究により、子宮運動により子宮内膜に惹起される機械的刺激は、以前に私達が示してきたように、炎症反応の亢進、子宮内膜間質細胞脱落膜化の亢進、といった効果のほかに、増殖能、線維化を促進する効果を持つことが示された。増殖能、線維化の亢進はいずれも子宮内膜症の病態の一つであると考えられており、子宮内膜症患者において認められる異常子宮運動が子宮内膜症の病態に関わっていることが、さらに裏付けられた。プロスタグランジン産生阻害などによる、子宮運動抑制が、子宮内膜症の病態改善に広く関わる可能性を示しえた。また、tunicamycin が、やはり子宮内膜症の病態において重要であるアポトーシスを、TRAIL との共処理により亢進することを示しえた。この効果は、tunicamycin による DR5 の発現亢進を介した、death receptor 経路の促進によるものと考えられた。この知見は、子宮内膜症の治療戦略の新たな可能性を示すものである。

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 13 件)

(1) Hasegawa A, Osuga Y, Hirota Y, Hamasaki K, Kodama A, Harada M, 他 7 名 Tunicamycin enhances the apoptosis induced by tumor necrosis factor -related apoptosis inducing -ligand in endometriotic stromal cells. Human Reproduction 2009 24: 408 -414 査読有

(2) Hirota Y, Osuga Y, Hasegawa A, Kodama A, Tajima T, Hamasaki K, Koga K, Yoshino O, Hirata T, Harada M, 他 4 名 Interleukin (IL) -1 beta stimulate migration and survival of first -trimester villous cytotrophoblast cells through endometrial endothelial cell -derived IL -8. Endocrinology 2009 150:350 -356 査読有

(3) OuYang Z, Hirota Y, Osuga Y, Hamasaki K, Hasegawa A, Tajima T, Hirata T, Koga K, Yoshino O, Harada M, 他 4 名 Interleukin -4 stimulates proliferation of endometriotic stromal cells. American Journal of Pathology 2008 173: 463 -469 査読有

(4) 原田美由紀、平田哲也、大石元、他 8 名 長期 GnRH agonist 療法後の凍結融解胚移植により妊娠し得た子宮腺筋症合併不妊症の 2 例 日本産科婦人科学会東京地方部会誌 2008 (57) 361 -365 査読有

(5) 原田美由紀、大須賀穰 特集 子宮内膜の機能と生殖医療—その最前線— 子宮運動は、子宮内膜の脱落膜化を介して着床、妊娠の維持に関わっている可能性がある 産婦人科の実際 2008 57(2) 185 -190 査読無

(6) 原田美由紀、大須賀穰 他 12 名 子宮鏡手術時の抗生剤使用に関する検討 日本産科婦人科内視鏡学会誌 2008 23(1) 239 -241 査読有

(7) Hirata T, Osuga Y, Hamasaki K, Yoshino O, Ito M, Hasegawa A, Takemura Y, Hirota Y, Nose E, Morimoto C, Harada M, 他 5 名 Interleukin (IL) -17 stimulates IL -8 secretion, cyclooxygenase -2 expression, and cell proliferation of endometriotic stromal cells. Endocrinology. 2008; 149: 1260 -1267. 査読有

(8) Takemura Y, Osuga Y, Yoshino O,

Hasegawa A, Hirata T, Hirota Y, Nose E, Morimoti C, Harada M, 他 4 名 Metformin suppresses interleukin (IL) -1 beta-induced IL-8 production, aromatase activation, and proliferation of endometriotic stromal cells. J Clin Endocrinol Metab. 2007; 92:3213-3218 査読有

(9) Hirata T, Osuga Y, Hamasaki K, Hirota Y, Nose E, Morimoto C, Harada M, 他 7 名 Expression of toll-like receptor 2, 3, 4, and 9 genes in the human endometrium during the menstrual cycle. J Reprod Immunol. 2007;74:53-60 査読有

(10) 原田美由紀、大須賀穰 産科編 III. 治療ナビゲーション 妊娠中の手術—良性卵巣腫瘍に対する腹腔鏡手術の可否を中心として— 周産期医学 2007 37 増刊 312-314 査読無

(11) 原田美由紀、大須賀穰 特集 子宮内膜症の薬物療法 漢方 HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY 2007 14(4) 333-336 査読無

(12) 原田美由紀、大須賀穰、他 8 名 柴苓湯・芍薬甘草湯は、子宮内膜間質細胞において、抗炎症効果を持つ可能性がある - 子宮内膜症治療への応用の可能性 他 7 名 産婦人科漢方研究のあゆみ 2007 (24) 32-35 査読無

(13) 原田美由紀、大須賀穰、武谷雄二 特集 中枢内分泌の最新知見とその異常 10. 神経性食欲不振症 産科と婦人科 2007 74(8) 959-963 査読無

〔学会発表〕(計 6 件)

(1) 原田美由紀、大須賀穰、平田哲也、大石元、藤本晃久、他 6 名 重度月経困難症を伴う子宮腺筋症を合併した長期不妊症患者における、長期 GnRH agonist

療法後の凍結胚移植 日本受精着床学会 2008.8.29.福岡

(2) 原田美由紀、廣井久彦、大須賀穰、藤本晃久、矢野哲、武谷雄二 腹腔鏡下手術にて卵巣を温存し得た Massive Ovarian Edema の一例 日本産科婦人科内視鏡学会 2008.7.31.横浜

(3) 原田美由紀、平田哲也、大石元、他 8 名 長期 GnRH agonist 療法後の凍結融解胚移植により妊娠し得た子宮腺筋症合併不妊症の 2 例 日本産科婦人科学会東京地方部会 2008.5.17. 東京

(4) M Harada, Y Osuga, T Hirata, T Yano, Y Taketani Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) may act as a therapeutic agent for endometriosis 2008.3.14. Melbourne, Australia

(5) 原田美由紀、大須賀穰 他 12 名 子宮鏡手術時の抗生剤使用に関する検討 第 47 回日本産科婦人科内視鏡学会 2007.3.20.大阪

(6) M Harada, Y Osuga 他 12 名 Antimicrobial prophylaxis in patients undergoing hysteroscopic surgery: effectiveness of oral levofloxacin 16th Annual Congress of International Society for Gynecologic Endoscopy 2007.3.19. Osaka. Japan

〔図書〕(計 2 件)

(1) 原田美由紀、武谷雄二 子宮内膜症これで安心 ホーム・メディカ安心ガイド 総頁 192 頁 2008・小学館・東京

(2) 原田美由紀、大須賀穰 子宮における機械的刺激とその生理・病理 Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2007 235-240 2007・中外医学社・東京

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原田 美由紀 (HARADA MIYUKI)
東京大学・医学部附属病院・医員
研究者番号 70451812

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし