

令和 4 年 9 月 7 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09813

研究課題名(和文) 無菌性炎症からみた子宮内膜症発症メカニズムと新規治療法の開発

研究課題名(英文) Novel mechanism of endometrial ovarian cyst related to sterile inflammation

研究代表者

池田 真利子 (Ikeda, Mariko)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：10740988

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)：卵巣内膜症性嚢胞では獲得免疫系であるT細胞の活性化を認めるとともに、HMGB1レベルが有意に亢進していた。これは、子宮内膜症性の炎症に獲得免疫系が関与する可能性が示され、また子宮内膜症性の炎症増悪にHMGB1が関連している可能性が示唆された。また、卵巣内膜症嚢胞では免疫抑制能を有する制御性T細胞とM2マクロファージの集積も認められた。以上より子宮内膜症性ではHMGB1などのアラミンに起因した獲得免疫系の活性化と共に癌の発生母地となり得る抑制性の環境も構築されつつあることを示唆され更なる今後の研究に繋がる成果を得られたと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

月経困難症、過多月経、性交痛、不妊症など女性のライフオリティを著しく損なう疾患である子宮内膜症の未解明な病態について、免疫学的アプローチを行うことによりその発症や増悪因子の可能性を見出すことが出来た。今後、治療方針の究明などに繋げていくことが出来れば、子宮内膜症に悩む多くの女性患者の生活の改善に寄与することが出来ると考えている。また子宮内膜症を患う女性の年代は多くが30-40代である。職種を問わず、これらの年代の女性のライフオリティが上昇することは、社会の活性化に繋がる可能性も秘めていると思われる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate the involvement of high-mobility group box-1 (HMGB1) in an inflammatory milieu and the characteristics of immune cells in endometrial ovarian cyst (EOC). The cytoplasmic HMGB1 levels in dendritic cells (DCs), macrophages, and non-immune cells were analyzed by flow cytometry. We also evaluated the proportions of immune, T, NK, iNKT, NK, and regulatory T (Treg) cells. Results showed that the DCs, macrophages, and non-immune cells of EOC had significantly higher cytoplasmic HMGB1 levels than those of non-EOC (nEOC). The expression of CD69 and CD107a on CD8+ T and CD4+ T cells of EOC was also more enhanced than that of nEOC. Furthermore, the M2 macrophages and Tregs highly accumulated in EOC. These results indicate that HMGB1 may aggravate chronic inflammation related to T-cell activation and simultaneously facilitate development of the immunosuppressive milieu in EOCs.

研究分野：子宮内膜症

キーワード：子宮内膜症 自然免疫 獲得免疫 HMGB1 アラミン 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は月経困難症、過多月経、性交痛、不妊症など女性のライフオリティを著しく損なう疾患であり、その病態は慢性炎症を主体とするがその詳細は未だ不明な点が多い。子宮内膜症における炎症は、病原体感染を伴わない、いわゆる無菌性炎症 (sterile inflammation) であると考えられる。この概念は近年、心血管病変、糖尿病、代謝性疾患など様々な分野で注目されている。子宮内膜症に対する免疫学的アプローチは、マクロファージ (M $\phi$ ) や natural killer (NK) 細胞、制御性 T 細胞 (regulatory T cell: T reg) についての報告があるものの、基礎研究、臨床研究ともにまだまだ数は少ない。

## 2. 研究の目的

本研究では子宮内膜症を無菌性炎症に起因する疾患として捉え、その原因であるアラミン検索、これらより発動される免疫学的メカニズムを探索し、新たな子宮内膜症の疾患概念を提唱することを目的とする。本研究において子宮内膜症発症と無菌性炎症、免疫学的メカニズムが明らかになれば、この疾患に対してまったく新しいアプローチを提供することが出来る。特にアラミン等による無菌性炎症によって子宮内膜症が惹起・増悪するという仮説は、子宮内膜症の新しい疾患概念を提唱することになり、本研究の医学への大きな貢献が期待される。

## 3. 研究の方法

手術で得られた卵巣子宮内膜症性嚢胞 (endometrial ovary cyst: EOC 群、n=14) の一部を数 mm 小塊で採取し、蛍光色素抗体で表出抗原を標識、FACS 法を用いて樹状細胞 (dendritic cell: DC)、M $\phi$ 、NK 細胞、natural killer T (NKT) 細胞、T 細胞などの免疫細胞の動態を解析した。またそれぞれのサブタイプ (炎症型、抗炎症型の M $\phi$  や樹状細胞のサブタイプ検索、NK 細胞のサブタイプ検索)、活性化マーカーである CD69 や共刺激因子 CD86 表出も検討し、病変部の炎症状態を評価した。なお皮様嚢腫および嚢胞性卵巣嚢腫など、悪性所見を認めない非卵巣子宮内膜症性病変 (non-endometrial ovary cyst: nEOC 群、n=8) を比較対象とした (表 1)。本研究ではアラミン群が子宮内膜症発症、増悪因子になるという仮説を立て、その検証を行った。代表的なアラミンである high-mobility group box 1 (HMGB1) は細胞障害により産生される内因性抗原であり、本研究では子宮内膜病変の細胞内 HMGB1 を FACS 法および免疫染色法を用いて評価した。

表1. 卵巣子宮内膜症性嚢胞解析・患者背景

	EOC (n = 14) 卵巣子宮内膜症性嚢胞	nEOC (n = 8) 非卵巣子宮内膜症性嚢胞	p value
Age (years) <sup>a</sup>	36.00 (31.75–40.25)	35.5 (25.5–41.5)	0.65 <sup>b</sup>
Nulliparity (n)	85.7 % (12)	75.0 % (6)	0.60 <sup>c</sup>
Gravity <sup>a</sup>	0.0 (0.0–0.25)	0.0 (0.0–1.75)	0.33 <sup>b</sup>
Parity <sup>a</sup>	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.75)	0.43 <sup>b</sup>
r-ASRM CA125	59.0 (46.75–80.25) 55.00 (38.50–157.1)	– –	– –
Postoperative pathological diagnosis	Endometrial cyst (14)	Dermoid cyst (6)  Serous cystadenoma (2)	–
Greatest tumor dimension (mm) <sup>d</sup>	73.3 ± 26.6	66.9 ± 17.2	0.749 <sup>b</sup>
Preoperative therapy	Dienogest (n = 4)	None	–
Phase of the menstrual cycle at surgery <sup>e</sup>	Secretory phase (n = 8)  Luteal phase (n = 2)	Secretory phase (n = 7)  Luteal phase (n = 1)	–

EOC: endometrial ovarian cyst, nEOC: non-endometrial ovarian cyst, r-ASRM: revised American Society for Reproductive Medicine.

<sup>a</sup> Data are presented as median (interquartile).

<sup>b</sup> Data are compared using Mann–Whitney U test.

<sup>c</sup> Data are compared using chi-square test.

<sup>d</sup> Data are presented as the mean ± SD.

<sup>e</sup> Patients who were administered dienogest were excluded.

## 4. 研究成果

### 4-1. 免疫細胞解析: 卵巣子宮内膜症性病変では、獲得免疫系による炎症が主体となる

FACS 法を用いて CD8<sup>+</sup> T 細胞、CD4<sup>+</sup> T 細胞、NK 細胞の分布および表面マーカーの解析を行ったところ、その細胞数の割合には EOC 群と nEOC 間で有意な差は認めなかったものの、獲得免疫系の CD8<sup>+</sup> T 細胞、CD4<sup>+</sup> T 細胞に発現する活性化マーカー CD69 および脱顆粒マーカー CD107a の発現は、概ね EOC

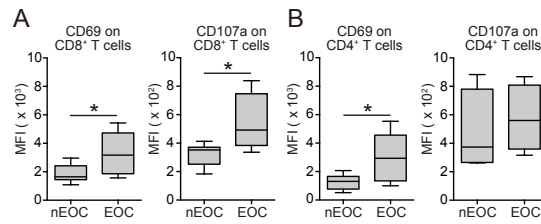


図1. CD8<sup>+</sup> T細胞(A)、CD4<sup>+</sup> T細胞(B)上の活性化マーカー CD69および脱顆粒マーカーCD107aの発現。

群で有意に亢進していた(図 1)。自然免疫系の NK 細胞、NKT 細胞上の CD69、CD107a 発現には有意差を認めなかった。以上より、子宮内膜症性病変では、獲得免疫系を主体とする慢性炎症が関与することが示唆された。

### 4-2. 卵巣子宮内膜症性病変では、細胞内 HMGB1 の細胞内放出が高い

次に上記の獲得免疫系が亢進している原因を検査するため、一般的に無菌性炎症のトリガーとして知られている HMGB1 に着目した。HMGB1 は細胞障害に応じて核内から細胞質、細胞外に放出されるアラミンの一つで、生体に強力な無菌性炎症を惹起する。細胞のアポトーシスに伴う受動的放出、DC や Mφ から能動的放出が知られている。我々は子宮内膜症性病変ではなんらかの細胞障害が生じ、アラミンの放出亢進による炎症の増悪が生じていると仮説を立てた。そこで DC、Mφ、CD45 陰性

の非免疫細胞の細胞質に放出された HMGB1 を FACS 法にて測定したところ、概ね EOC 群で有意に亢進していることを見出した(図 2A)。また免疫染色においても、DC および一部の Mφ に発現する CD11c 陽性細胞と HMGB1 の染色が一致する所見が得られ、さらに核外への HMGB1 の存在も認められた(図 2)。以上の所見より、卵巣子宮内膜症性病変では HMGB1 の放出が亢進していることが示唆され、腫瘍内の炎症に寄与している可能性がある。

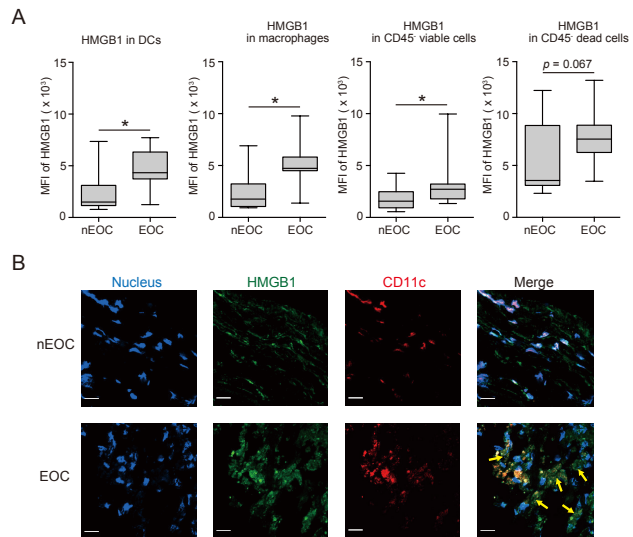


図2. HMGB1の核外放出。(A) FACS法によるDC、Mφ、非免疫細胞(生細胞、死細胞)中の細胞内HMGB1の測定。(B) 免疫組織染色。矢印(黄)は核外に放出されたHMGB1。スケールバー: 20 μm。

### 4-3. HMGB1 は T 細胞の脱顆粒マーカー発現を亢進させる(ex vivo)

上記より、HMGB1 が獲得免疫系を活性化させ卵巣子宮内膜症性病変内の慢性炎症に寄与している可能性が示唆された。そこで次の ex vivo 実験を行った。nEOC から病変を採取、赤血球を濃度勾配法で除去した後単核細胞を HMGB1 とともに培養、24 時間後に CD8<sup>+</sup> T 細胞、CD4<sup>+</sup> T 細胞上の CD69 と CD107a 発現を FACS 法にて解析した。その結果、HMGB1 の添加により CD69 発現には有意な変化は認めなかったものの、CD107a 発現は HMGB1 の存在により有意に亢進した(図 3)。以上の結果より、HMGB1 は T 細胞に作用して炎症を惹起/増悪させる可能性が示唆された。

### 4-4. 卵巣子宮内膜症性病変では、免疫抑制性 M2-Mφ、Treg が集積している

ここまでの検討で、内膜症性病変では慢性炎症の亢進が示唆された。しかしながら最近の子

宮内膜症における免疫学的知見として、月経時に逆流した子宮内膜組織の“断片:debris”を除去できない、すなわち腹腔内の免疫抑制が子宮内膜症発症に関与するという概念が構築されつつある(Capobianco(2013), Thiruchelvam(2015), Khan(2019))。そこで EOC および nEOC における M2-M $\phi$  と Treg を検索したところ、EOC においてこれら免疫抑制性の細胞が有意に集積していることが認められた(図4)。さらにこれら細胞は、HMGB1 値に正の相関を示し、腹腔内の炎症の増悪とともに免疫抑制系も同時に亢進している可能性が示唆された。

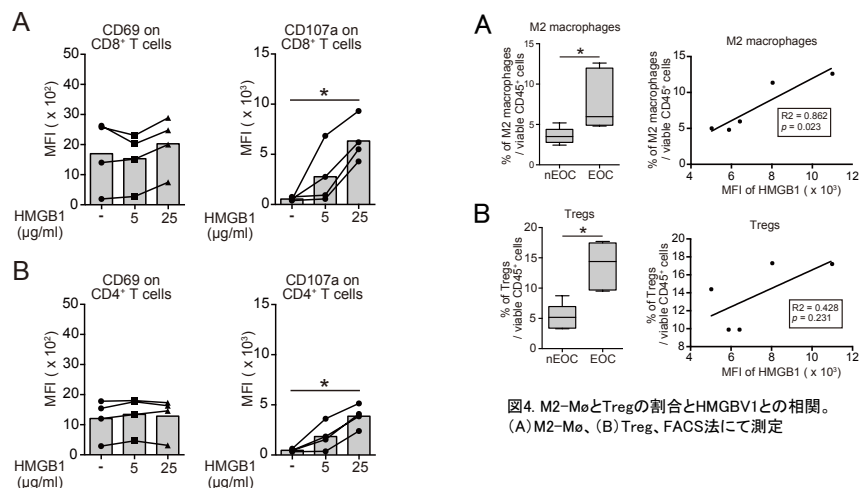


図3. nEOCから分離した単核細胞とHMGB1との24時間共培養。(A) CD8<sup>+</sup> T細胞上のCD69、CD107a発現、(B) CD4<sup>+</sup> T細胞上のCD69、CD107a発現。FACS法にて測定。

図4. M2-M $\phi$ とTregの割合とHMGB1との相関。(A) M2-M $\phi$ 、(B) Treg、FACS法にて測定

#### 4-5. まとめ

本研究により、卵巣子宮内膜症病変では、

- ①T 細胞主体の慢性炎症が生じている
- ②HMGB1 がその炎症のトリガー／増悪因子となる
- ③M2 や Treg などの免疫抑制系細胞が集積している

が見出された。

一般には子宮内膜症では腹腔内の慢性炎症の存在が指摘されており、本研究ではその担い手が T 細胞および HMGB1 などのアラームインが関与している可能性が示唆された。興味深いことに、上記の①および②と③は一見すると相反する結果である。すなわち①、②では腫瘍内の炎症亢進、③では炎症抑制が認められている点である。これに対して、我々は子宮内膜病変では子宮内膜 debris を排除できない「不適切な炎症:inappropriate inflammation」が生じているのではないかと推察している。このような不完全な炎症が時間経過とともに腫瘍の癌化に寄与するかもしれない。さらに本研究で着目した HMGB1 は、その酸化還元状態により機能が変化する。還元型 HMGB1 は T 細胞の活性化の誘導により炎症を惹起するが、酸化型 HMGB1 は M2-M $\phi$  や Treg を誘導し抗炎症作用を有する、すなわち HMGB1 は resolution associated molecular pattern: PAMPs)としても働く可能性がある。このような HMGB1 の違いも、腹腔内の炎症状態の変化に寄与する可能性がある。

以上より卵巣子宮内膜症性嚢胞では HMGB1 などのアラームインに起因した獲得免疫系の活性化と共に癌の発生源地となり得る抑制性の環境も構築されつつあることが示唆された。

#### 4-6. 今後の展開

本研究では卵巣子宮内膜症性嚢胞について各免疫細胞および細胞内に放出された

HMGB1 の動体を明らかにした。しかしながら HMGB1 は実際細胞外に放出されて初めて他の細胞、組織に作用する。今後は腹腔内、腹水中の HMGB1、さらに IL-33、IL-1 $\alpha$ 、s100 蛋白などのその他のアラミンにも対象を広げ、検討することを計画している。今後アラミンをターゲットとする子宮内膜症の新規治療戦略構築にむけて研究を推進している予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ikeda Mariko, Negishi Yasuyuki, Akira Shigeo, Morita Rimpei, Takeshita Toshiyuki	4. 巻 145
2. 論文標題 Inflammation related to high-mobility group box-1 in endometrial ovarian cyst	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 103292 ~ 103292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jri.2021.103292	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田真利子
2. 発表標題 卵巣内膜症性嚢胞における免疫細胞およびHMGB1の動態
3. 学会等名 エンドメトリオーシス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田真利子
2. 発表標題 無菌性炎症が関与する卵巣内膜症性嚢胞の病態- high mobility group box 1 (HMGB1)との関連
3. 学会等名 日本生殖免疫学会
4. 発表年 2021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 分 担 者	明樂 重夫  (Akira Shigeo)  (40231849)	日本医科大学・医学部・教授    (32666)	

6. 研究組織（つづき）

	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 分 担 者	根岸 靖幸  (Negishi Yasuyuki)  (50644580)	日本医科大学・医学部・准教授   (32666)	
研究 分 担 者	桑原 慶充  (Kuwabara Yoshimitu)  (40373013)	日本医科大学・医学部・准教授   (32666)	

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