

令和 5 年 5 月 7 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09668

研究課題名(和文) ヒト臍帯由来間葉系細胞を用いた新規子宮内膜症治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel endometriosis treatment using human umbilical cord-derived mesenchymal cells

研究代表者

辻 俊一郎 (Tsuji, Shunichiro)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30601546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症は骨盤内の慢性炎症性疾患である。そこで、子宮内膜症自然発症サルに、免疫調節機能のあるヒト臍帯由来間葉系幹細胞(UC-MSC)を投与し、その治療効果を検討した。投与は静脈内投与、腹腔内投与およびその組み合わせで行った。評価はサルの腹腔鏡検査やCA125という子宮内膜症特有の血清マーカーで行った。その結果、静脈投与では一部軽快する所見も得られたが有意な変化ではなかった。一方、腹腔内投与を行うと顕著に子宮内膜症が増悪する所見を得られた。子宮内膜症の細胞治療としてMSCを使用する際には慎重な検討が必要であり、特に腹腔内投与は行うべきではないと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで子宮内膜症に対する細胞治療として、間葉系幹細胞がその治療資源として注目されてきた。試験管内による実験(in vitro)では、効果があるという報告と効果が期待できないという報告があり結論はでなかった。一方、げっ歯類を使用した子宮内膜症モデル動物では効果を認めたという報告が多い。ただ、これらの動物モデルは子宮内膜移植モデルの域を出ず、真の子宮内膜症の免疫機構としての性質を異にすることが懸念されてきた。そこで、今回子宮内膜症を自然発症したサルを用いることによって、最もヒトに近い動物種で本研究を行うことができたことは、学術的意義がとても高いことを意味している。

研究成果の概要(英文)：Endometriosis is a chronic inflammatory disease of the pelvis. We examined therapeutic effects of administration of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (UC-MSCs), which have immunomodulatory functions, against endometriosis using monkeys with spontaneous endometriosis. Administration was performed intravenously or intraperitoneally or combined. Evaluation was performed by monkey laparoscopy and CA125, a serum marker specific to endometriosis. As a result, some remission findings were obtained by intravenous administration, however, the findings were not significant. On the other hand, intraperitoneal administration significantly exacerbated endometriosis. It was considered that intraperitoneal administration should not be performed when MSCs are used as cell therapy for endometriosis.

研究分野：産婦人科

キーワード：子宮内膜症 間葉系幹細胞 ヒト臍帯由来間葉系細胞

1. 研究開始当初の背景

① 子宮内膜症は罹患率が高い骨盤内の慢性炎症性疾患であり未解決問題を有する。

子宮内膜症は子宮外で子宮内膜組織が存在する疾患として定義され、生殖可能年齢の女性 5-10%に発症すると言われる頻度の高い疾患であり、疼痛と不妊を主な主訴とする。その背景には、子宮内膜症による慢性的な骨盤内炎症の存在が示唆されている。我々も子宮内膜症が慢性子宮内膜炎と強い相関があることを報告してきた (Takebayashi A et al. PLoS One 2014)。子宮内膜症に対する治療法として、薬物療法 (ホルモン療法) や、手術療法 (腹腔鏡下手術) が存在する。しかし、重症例では尿管切除再吻合を必要とする症例や、消化管の切除を必要とするような症例が存在し、高度な手術侵襲を必要とする症例が存在する。また、腹腔鏡下手術後の再発率が 2 年で約半数と高い現状がある。そこで、腹腔鏡下手術後に薬物療法を併用することで、再発率を抑える報告が多数存在するが、薬物療法は排卵抑制作用も有し挙児希望症例には適さない。つまり、子宮内膜症の治療戦略において、挙児希望のある方への既存の治療が適さない、もしくは非常に高度な侵襲を要求する症例に対して新規治療法の開発が望まれている。

② ヒト臍帯由来間葉系細胞は抗炎症効果を有する。

共同研究者である長村らは、国内で初めてヒト臍帯由来間葉系細胞 (Umbilical cord derived-Mesenchymal stromal cells; UC-MSC) を豊富に採取できることを報告し (Ishige I et al. Int J Hematol. 2009)、UC-MSC が抗炎症作用を有していることを報告している (He H et al. Int J Hematol. 2015, Front Immunol. 2021)。長村らはすでに治療抵抗性重症急性移植片対宿主病に対する UC-MSC 輸注療法の医師主導治験 (第 1 相) を終了し、その安全性と一部有効性について報告している (Nagamura-Inoue et al, Int. J Hematol, 2022)。

③ 子宮内膜症は霊長類にのみ自然発症する。

月経血は卵管を通じて骨盤内に逆流していることが知られている。子宮内膜症はその逆流する月経血中の子宮内膜組織が骨盤内に生着することで発症しているという、いわゆる Sampson の月経血逆流説、というのが広く受け入れられている。それゆえ、月経血の骨盤内逆流を生じる霊長類にのみ自然発症する。一方、げっ歯類では子宮内膜症は発症しないことが知られている。そこで、子宮内膜症の治療効果の検討を行う際には、子宮内膜を人為的に腹腔内に移植する、子宮内膜移植モデルのげっ歯類で行うのではなく、ヒト子宮内膜症の免疫学的背景を模倣していると考えられるサルで行うことが望ましいと考えられる。

2. 研究の目的

子宮内膜症に対する既存の治療は、薬物療法と手術療法である。前者は継続した投与の必要性和排卵を抑制するため加療中は妊娠が望めないこと、後者は高い再発率が問題点として指摘されている。そこで本研究の目的は、**妊孕能を温存したまま子宮内膜症を加療する全く新しい治療法を、抗炎症効果を有する UC-MSC を用いて確立すること**である。

3. 研究の方法

① 子宮内膜症罹患サルの選定と倫理的配慮

現在、子宮内膜症患者における腹腔鏡検査所見を基にした重症度分類が、アメリカ生殖医学学会分類改訂版 (R-ASRM 分類) として広く受け入れられている。また、子宮内膜症の血清学的マーカーとして CA125 が一般臨床で汎用されている。近年、カニクイザルにおいても腹腔鏡検査や CA125 が子宮内膜症の評価に有用であることが報告された (A Nishimoto-Kakiuchi et al. 2018)。そこで、滋賀医科大学動物生命科学センターが保有するカニクイザルに対して腹腔鏡検査を行い、子宮内膜症罹患サルを 7 頭選定し、CA125 を測定した。

本研究は、ヒトに最も近縁な実験動物であるサル類を用いた実験である。滋賀医科大学動物生命科学センターにおける動物実験倫理委員会の承認を受け本研究は行った。実施にあたっては、「動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年法律第 105 号、平成 24 年 9 月改正)」「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年 6 月文部科学省告示第 124 号)」及び日本学術会議策定の「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (平成 18 年 6 月)」に基づき、科学的合理性、動物愛護への配慮、環境の保全及び研究者の安全確保の観点から、適正に実施した。

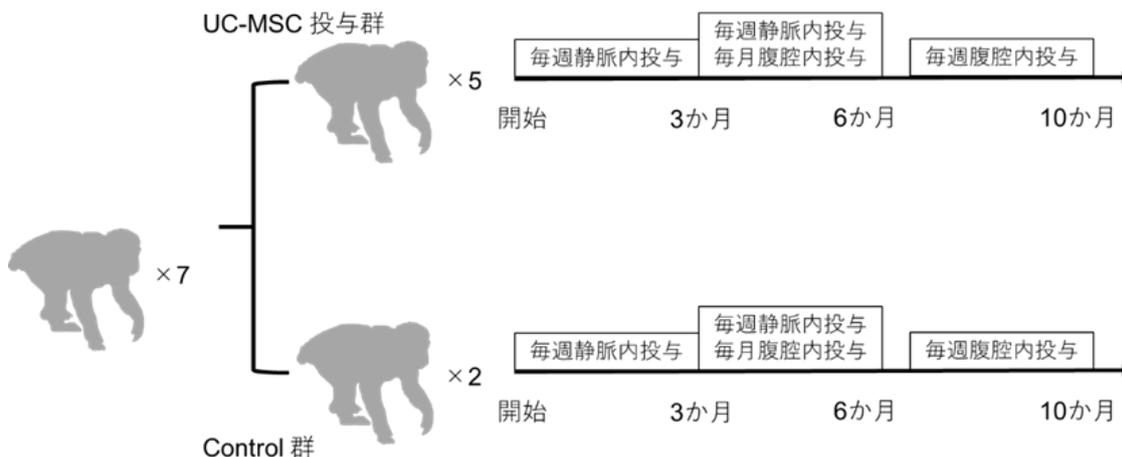
腹腔鏡検査は下記の手順で行った。ケタミン (5mg/kg) およびキシラジン (1mg/kg) を投与し、臍下に腹腔鏡挿入ポートを作成し、右下腹部に鉗子挿入用トロッカーポートを作成する。二酸化炭素ガスを用いて気腹し、腹腔鏡を挿入する。腹腔鏡には CCD カメラを取り付け、手術映像を DVD に録画した。

② UC-MSC の樹立

UC-MSC は、CD73, CD90, CD105 を発現し CD11b/19, CD34, CD45, HLA-DR を発現しないという細胞表面マーカーとしての特徴を持つ接着性細胞であり、脂肪、軟骨および骨に分化するという特徴を持つ細胞集団として定義されている。そこで、研究で使用する UC-MSC がこれら定義を満たすかを確認した。樹立した細胞は、細胞凍結保存液とともに 1 本あたり 2×10^6 個/ml となるように、クライオチューブに入れ凍結保存した。

③ UC-MSC のサルへの投与。

子宮内膜症罹患サル 7 頭に UC-MSC の投与を 5 頭に行い、2 頭に生理食塩水の投与とし control 群とした。投与は下記の 3 段階によって行った。投与は 2×10^6 cells/kg で計算し投与した。



④ 治療効果の検討

サルの体重の推移、および治療開始前と治療開始後の CA125 の値、腹腔鏡観察にて得られた所見を、アメリカ生殖医学学会分類改訂版 (R-ASRM 分類) を用いて行った。R-ASRM 分類は、病巣の大きさと癒着の程度をそれぞれサイズによって評価し、その合計点数で評価する。右図は日本産婦人科医会による邦文訳の引用であるが、上段が病巣の大きさを、下段が癒着の程度の評価を示している。

ヒトでは重症度は I~IV 期に分類されており、I 期は 1~5 点、II 期は 6~15 点、III 期は 16~40 点、IV 期は 41 点以上と分類されており、点数が高いほど重症である。

また病変の色調から、赤色、黒色、白色と区別されており、赤色は時間的経過の比較的短い活動性病変を示し、黒色は時間的経過の長い活動性病変を示し、白色は陳旧性の病変を示す。

病巣		~1cm	1~3cm	3cm~	points
腹膜	表在性	1	2	4	
	深在性	2	4	6	
卵巣	右	表在性	1	2	4
		深在性	4	16	20
	左	表在性	1	2	4
		深在性	4	16	20
癒着		~1/3	1/3~2/3	2/3~	points
卵巣	右	フィルム様	1	2	4
		強固	4	8	16
	左	フィルム様	1	2	4
		強固	4	8	16
卵管	右	フィルム様	1	2	4
		強固	4 *	8 *	16
	左	フィルム様	1	2	4
		強固	4 *	8 *	16
Douglas 高閉鎖	一部	4			
	完全	40			

日本産婦人科医会 H.P. より引用

4. 研究成果

① 研究に使用したサルについて

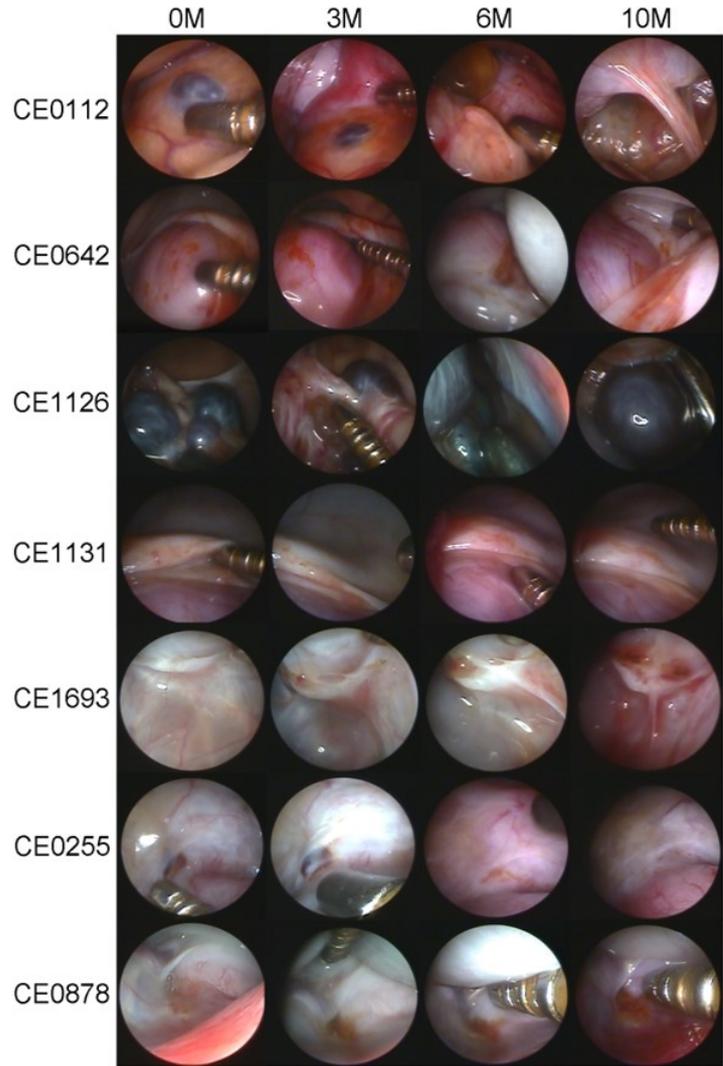
方法①で選定したサルの一覧を下記に示す。

	Identification number	Origin	Age (years)	Body weight (kg)	B Virus
Intervention group	CE112	RCALS	17.9	4.1	—
	CE642	Indonesia	17.2	2.4	—
	CE1126	Vietnam	17.1	2.9	—
	CE1131	Vietnam	16.2	3.4	—
	CE1693	Vietnam	11.1	3.6	—
Control group	CE255	China	20.9	4.1	—
	CE878	Vietnam	14.2	3.2	—

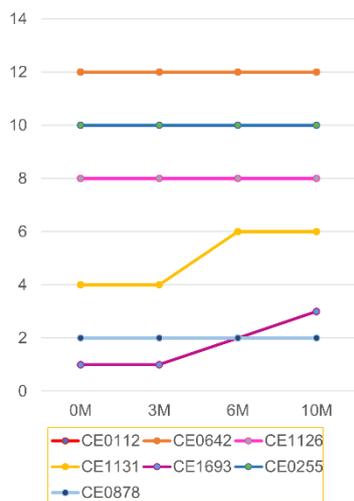
RCALS: Research Center for Animal Life Science at Shiga University of Medical Science

② 腹腔鏡による観察結果

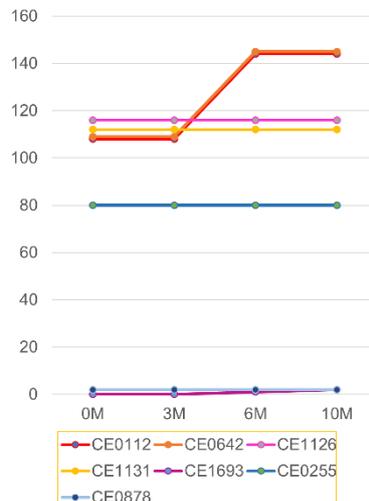
腹腔鏡によるそれぞれの時点での所見を右図に示し、それぞれの解説を以下に行う。CE0112では子宮底付近を示した像であり、研究開始時には認めていた黒色病変は3か月後も軽快した様子はなかった。6か月後には子宮底周囲の癒着が明らかに進行し、10か月では癒着のために病巣まで腹腔鏡を挿入できず観察が困難な状態であった。CE0642も同じく子宮底付近の像を示している。子宮漿膜面には赤色病変が散在していた。しかし、腹腔内投与を始めると子宮底部付近の癒着がひどくなり、鉗子にて癒着部位を移動させないと子宮底周囲の十分な観察が行えなかった。CE1126では、右附属器周囲(右卵巣・卵管周囲)を示している。チョコレート嚢腫様病変を3つ認めていたが、2つは3か月後には縮小を認めた。しかし、その後腹腔内投与を行ったところ、次第に増大するようになった。腹腔内投与後はひとつの視野で病巣の全体を捉えることは困難なほど増大した。CE1131は膀胱子宮窩を示す。実験開始前は、茶色病変の散在を認めた。治療経過とともに病変の拡大を認めた。CE1693はダグラス窩の所見を示している。研究開始前の茶色病変は少量であったが、次第に増悪していった。特に、腹腔内投与を開始した時点からの増悪が顕著であり、腹膜も線維化による引き連れを著名に認めた。CE0255, CE0878はコントロール群であった。図ではいずれも膀胱子宮窩を示しているが、研究期間を通じて大きな変化は認めなかった。



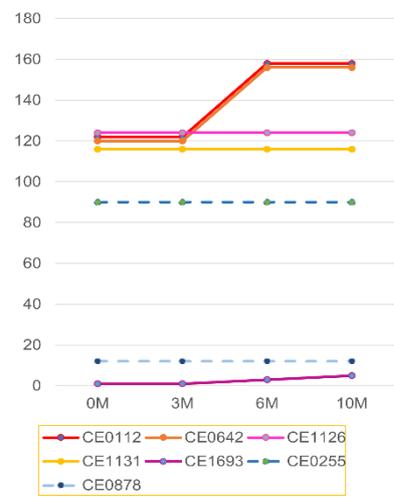
上記の腹腔内所見を R-ASRM 分類にて示す。



病巣のサイズスコア



癒着スコア

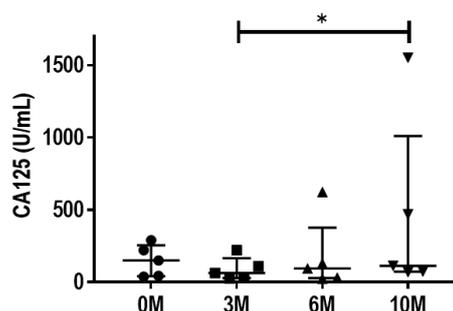


全体のスコア

全体のスコアを 1-way ANOVA による統計学的解析を行い、多重比較として Dunn test を行ったが、有意な差は得られなかった。しかし、全体的な所見として、腹腔内投与を行うと所見が増悪している印象がある。静脈内投与にて軽快と捉える所見も一部あったが、少なくとも効果を得る印象はなかった。

③ CA125 の推移

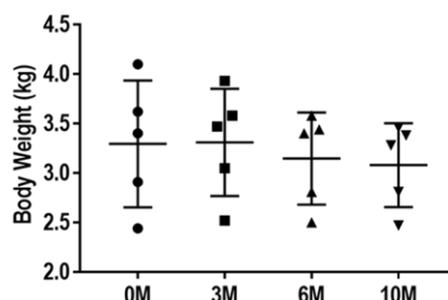
UC-MSC 投与群における CA125 の推移を右図に示し、1-way ANOVA による統計学的解析を行い、多重比較として Dunn test を行った。静脈内投与を行った後には全例 CA125 は低下したが、統計学的有意差は得られなかった。しかし、静脈内投与を終えた 3 か月後と腹腔内投与を終えた 10 か月後の CA125 の値は統計学的な有意な差を認めた($p=0.0197$)。これらは腹腔鏡検査で得られた所見とも合致していた。



④ 体重の推移

UC-MSC 投与群における体重変化の結果を右図に示す。腹腔内投与を開始した頃から有意差は得られないものの、サル体重がやや減少しているようにも捉えられる。

サルの子宮内膜症では、子宮内膜症が進行すると食欲が低下する報告がある (Nishimoto-Kakiuchi A et al. Hum Reprod. 2018)。今回の検討では腹腔内投与を開始すると、食欲不振が誘引されていることから、腹腔内投与にて子宮内膜症が増悪した可能性があると考えられた。



まとめ

従来、子宮内膜症に対する間葉系幹細胞の治療効果については、細胞培養を用いた実験 (in vitro) やげっ歯類を用いた実験 (in vivo) にて行われてきた。In vitro では効果が期待できるという報告と期待できないという報告があった。また in vivo では効果が期待できるという報告があった。今回我々は世界で初めて、子宮内膜症を自然発症したサルを用いて臍帯由来の間葉系細胞を用いて治療効果を検討した。静脈投与では治療効果を期待できる側面もあったが、直接効果を期待して投与した腹腔内投与により明らかに子宮内膜症病巣は増悪した。その機序を明らかにすることは今回の検討ではできなかったが、UC-MSC が産生する TGF- β などのサイトカインが腹腔内の免疫寛容に働き異所性子宮内膜の生着の促進、および腹膜の線維化の促進などに寄与したことが推測され、子宮内膜症の病勢を結果として増悪させた可能性が考えられた。以上のことから、少なくとも子宮内膜症に MSC を治療資源として使用する際には、腹腔内投与はすべてきでないと考えられた。

これらの結果については現在論文を執筆中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	村上 節 (Murakami Takashi) (20240666)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	
研究分担者	井上 登紀子 (Inoue Tokiko) (70240736)	東京大学・医科学研究所・准教授 (12601)	
研究分担者	林 香里 (Hayashi Kaori) (70569251)	滋賀医科大学・医学部・助教 (14202)	

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