

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18196

研究課題名(和文) 子宮内膜症における自然リンパ球による免疫応答機構と病因病態への関与の解明

研究課題名(英文) Innate lymphoid cells in the endometrium of women with endometriosis

研究代表者

田中 佑輝子(Tanaka, Yukiko)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：50806297

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)：自然リンパ球(ILC)は自然免疫と獲得免疫へ影響を与える重要な免疫細胞である。ILCの割合を末梢血、腹水、正所性子宮内膜、子宮内膜症性嚢胞を採取し、フローサイトメトリーで検討した。子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者を比較して、血液と腹水では有意な差は認めなかった。非子宮内膜症患者と比べ、子宮内膜症患者の子宮内膜ではILC2、ILC3が有意に低下していた。また、子宮内膜症性嚢胞では非子宮内膜症患者の子宮内膜や子宮内膜症患者の子宮内膜と比較し、ILC1、ILC2、ILC3のすべてが増加していた。子宮内膜や卵巣子宮内膜症性嚢胞など局所の病態にILCsが関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

自然リンパ球(ILC)は最近発見された、免疫に大きく影響する細胞である。子宮内膜症は慢性炎症性疾患であるが、ILCの関わりについては報告がなかった。今回われわれが初めて子宮内膜症でのILCの変化を調べた。子宮内膜症患者においてILCは末梢血、腹水中で変化は認めず、腹腔内環境などILCの影響を示唆する所見は認めなかった。一方、子宮内膜や卵巣子宮内膜症性のう胞など局所の病態にILCsが関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Innate lymphoid cells (ILCs) control both innate and adapted immune system. The role of ILCs in endometriosis has not been investigated. The percentage of each ILC group in CD45+ cells was examined in the peripheral blood, peritoneal fluid, endometrium, and ovarian endometrioma obtained from women with and without endometriosis using flow cytometry. In the endometrium, patients with endometriosis had lower proportion of ILC2 and 3 compared to control specimens. There was no significant change in the peripheral blood or the peritoneal fluid between the two groups. Additionally, ovarian endometrioma increased the proportion of ILCs compared to the endometrium samples of patients with endometriosis and normal endometrium. Immunohistochemistry of IL-1 and IL-23, which are ILC3-inducing factors, significantly increase in ovarian endometrioma. The proportion of ILC2 and 3 was reduced in the endometrium of patients with endometriosis, and ILCs were increased in ovarian endometrioma.

研究分野：子宮内膜症

キーワード：子宮内膜症 自然リンパ球 炎症性サイトカイン 自然免疫

### 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は子宮内膜様組織が卵巣、腹膜、骨盤深部などで異所性に増殖する疾患である。月経痛、慢性骨盤痛、不妊、さらには癌化などにより女性の健康を著しく損なう疾患である。これまで内分泌療法をはじめとした各種治療法の進歩が認められるものの、その病因・病態機序がいまだ明らかではないため、理想的な治療法は確立していない。その発症機序については古くから議論されているが、月経血中の子宮内膜の一部が卵管を通過して腹腔内に逆流し生着するという「移植説」は有力な仮説である。しかしながら、ほとんどの女性に月経血の逆流が認められるきわめて一般的な現象であるにもかかわらず、子宮内膜症を発症するのは全体の5-10%に過ぎない。子宮内膜症の発症には、環境要因、遺伝的要因、正所性子宮内膜の変化、腹腔内局所環境因子、免疫学的因子などのさまざまな要因が関与していると考えられている。

我々は以前より子宮内膜症と免疫の関与について研究してきた。我々は制御性 T 細胞 (Treg) に注目し検討したところ、子宮内膜症患者の正所性内膜、子宮内膜症性嚢胞では、正常者の正所性内膜と比較して真に免疫抑制能を持つ activated Treg が減少していること、また子宮内膜症モデルマウスで Treg を一時的に減少させると子宮内膜症病巣が増悪することを報告した<sup>1)</sup>。さらに子宮内膜症患者で activated Treg が減少している原因を追究するため、子宮内膜症性卵巣嚢胞、子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者の正所性内膜を採取し、マイクロアレイを用いて activated Treg を分化・遊走させる因子について検討したところ、正所性内膜と比べて子宮内膜症性卵巣嚢胞で約 250 個の因子が有意差をもって増加していた。これらの因子を検討したところ、補体などの自然免疫に関わる因子が多く変化しており、とくに制御性 T 細胞の遊走・分化などに関わる因子については明らかな変化を認めなかった。また、子宮内膜症モデルマウスの病巣についてもマイクロアレイを行ったところ、ヒトの場合と同様に補体などの自然免疫に関わる因子が多く変化していた。我々ははじめ多くの研究者が子宮内膜症の免疫異常の本体は T 細胞を中心とした獲得免疫であるという考えのもと研究を進めていたが、これらのマイクロアレイの結果から、自然免疫の異常が子宮内膜症の発端であり、自然免疫が活性化することで獲得免疫の免疫細胞にも変化をもたらしている可能性があると考えた。また獲得免疫が発端ではないと考えるもう一つの理由として、T 細胞を活性化させる子宮内膜症の特異抗原について長年調査されるも明らかになっていない(図1)。

今回我々が注目した自然リンパ球 (innate lymphoid cell; ILC) は 2010 年ころより新たに提唱された免疫細胞群であり、産生する炎症性サイトカインおよびその発生と機能を制御する転写因子により大きく 3 つのグループ (ILC1, ILC2, ILC3) に分類される。ILC は T 細胞と同様の炎症性サイトカインを産生するが、T 細胞とは異なりクローナルな増殖は必要とせず刺激に対して速やかに反応し獲得免疫の発動に寄与する。ILC の割合は T 細胞と比べ少ないが、1 つの細胞当たりのサイトカインの分泌量は数倍から数百倍とされ免疫に与える影響は大きいと考えられる。ILC1 はインターフェロン や TNF になどの炎症性サイトカインを産生し、NK 細胞を含む集団であり弱い細胞障害性を持つ。ILC2 は IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 などの炎症性サイトカインを産生し、リンパ球の特定臓器への分配に関わる。ILC2 の発見により、これまで知られていた T 細胞、B 細胞、IgE を介したアレルギー反応とは異なる ILC2 を介した自然アレルギーが存在することが明らかになっている。ILC3 は IL-17A や IL-22 を産生し、自己免疫疾患に関与している。ILC は全身に分布しているが、正常者の子宮内膜に存在していることも報告されている<sup>2)</sup>。子宮内膜症では、IL-4, IL-9, IL-17 などの炎症性サイトカインが増加すること、またアレルギーや自己免疫疾患と類似した側面もあるため、ILC2 や ILC3 が子宮内膜症の病態に関与している可能性がある。子宮内膜症での ILC の報告は全く認めないため、我々が初めて子宮内膜症での ILC の変化について検討する。この研究によって長年不明であった子宮内膜症における免疫学的病態機序を明らかにし、新規療法開発への方向性を明確にする。

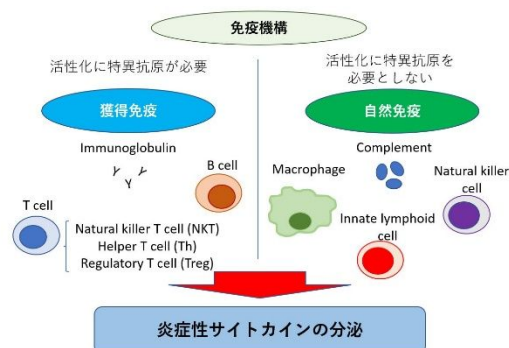


図1 子宮内膜症の獲得免疫・自然免疫の概念図

### 2. 研究の目的

本研究では、自然リンパ球 (ILC) による子宮内膜症への関与を明らかにすることで子宮内膜症発症・進展についての病態メカニズムを解明する。子宮内膜症での ILC の報告は全く認めないため、我々が初めて子宮内膜症での ILC の変化について検討する。

### 3. 研究の方法

子宮内膜症患者では非子宮内膜症患者に比べ炎症性サイトカインが増加しているが、その原因として自然リンパ球が関わっているかどうかを検証する。まず、子宮内膜症患者、非子宮内膜

症患者より血液、腹水、正所性子宮内膜、子宮内膜症性卵巣嚢胞を採取し、ILCの分画(ILC1, ILC2, ILC3)に変化があるかどうかをフローサイトメトリー法で調べる。変化があった ILC を誘導する炎症性サイトカインについて、免疫組織化学法によって検討する。

検体の採取に関しては、本学附属病院産婦人科において腹腔鏡下手術を受ける 20-45 歳の女性患者のうち自由意思による研究参加の意思を本人から文書で所得した患者を対象とした。子宮内膜症患者は術前に子宮内膜症と診断され、術後の病理検査結果でも子宮内膜症と確定した患者を対象とした。非子宮内膜症患者は、子宮筋腫、子宮内膜症以外の卵巣腫瘍などの良性疾患で腹腔鏡下手術を受ける患者を対象とした。妊娠中の女性、自己免疫疾患の既往がある女性、免疫細胞または内膜症病変に対して影響があると予想される薬剤を投与中の患者は除外した。

本研究では当科で確立してきたプロトコルを用いて検体よりリンパ球を分離し、抗体による染色を行いフローサイトメトリーにて ILC1, ILC2, ILC3 に分類した。染色する抗体は、Lineage mix(anti-CD3, anti-CD11c, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD34, anti-CD94, anti-CD123, anti-Fc R1), CD127, ckit, CRTH2 を用いた。Lineage mix 陰性細胞を gating することで、T 細胞、B 細胞、マクロファージ、樹状細胞などの免疫細胞を除外した。Lineage mix 陰性かつ、CD127 が陽性の細胞を ILCs とした。さらに ILCs を ckit と CRTH2 の発現によって ILC1, ILC2, ILC3 に分類した。

免疫組織化学法は、ILC3 を誘導する IL-1、IL-23 の抗体を用いて染色を行い、H-score を用いて評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 子宮内膜症患者(endometriosis; E)、非子宮内膜症患者(non-endometriosis; N)より血液(PB)、腹水(PF)、非子宮内膜症患者の正所性子宮内膜(NE)、子宮内膜症患者の正所性子宮内膜(EE)、子宮内膜症性卵巣嚢胞(OE)を採取し、フローサイトメトリー法で ILC の分画(ILC1, ILC2, ILC3)について検討した。患者背景は表 1 に示す通りで、非子宮内膜症群と子宮内膜症群ともに IRB の承認(ERB-C-1216)と、患者からの同意を得た。

子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者を比較し、血液と腹水では有意な差は認めなかった。NE と比較し、EE では ILC2, ILC3 の割合が有意に低下していた。EE と比較し、OE では ILC1, ILC2, ILC3 の割合が有意に増加していた(図 2, 3)。

Patient characteristics			
	Non-endometriosis (n = 15)	Endometriosis (n = 19)	P Value
Age(y)	32.8 ± 6.9	36.8 ± 6.9	0.12
BMI	21.4 ± 2.8	21.1 ± 3.2	0.82
rASRM	N/A	53.6 ± 32.3	N/A
CA125 (U/ml)	33.7 ± 28.0	69.1 ± 72.9	0.20
CA19-9 (U/ml)	29.5 ± 34.3	28.6 ± 26.7	0.94
Length of menstrual cycle (d)	28.6 ± 2.9	30.8 ± 5.8	0.48
Day after menstruation (d)	18.2 ± 8.5	20.1 ± 8.9	0.37
Gravidity	1.3 ± 1.6	0.4 ± 0.8	0.046*
Parity	0.7 ± 1.4	0.2 ± 0.7	0.45

mean ± SD, \* P < 0.05

Student t - Test  
Mann-Whitney U test

表1 患者背景 (フローサイトメトリー)

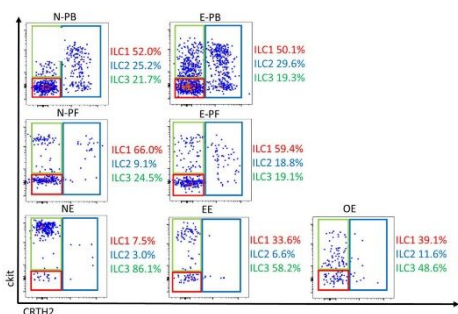


図2 各組織のILCの分布

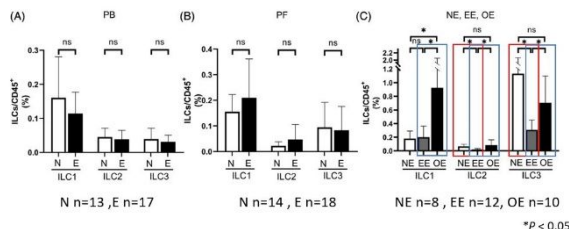


図3 各組織のILCの比較

(2) OE で ILC が増加していた原因を追究するために、ILC3 を誘導する IL-1, IL23 について免疫組織化学法で検討した。表 2 に示すように、非子宮内膜症群と子宮内膜症群の間に、有意差を認めなかった。Positive control として、IL-1 は卵管を、IL-23 は関節リウマチ患者の滑膜組織を用いた。

図 4 に示す通り、OE では NE や EE と比較し、IL-1、IL-23 ともに強く発現していた。次に ILC が特に表層の免疫にかかわることから上皮組織の IL-1b、IL-23 の発現を H-score で評価した。NE、EE に比較して OE では IL-1、

Patient characteristics			
	Non-endometriosis (n = 15)	Endometriosis (n = 19)	P Value
Age(y)	41.0 ± 4.6	41.6 ± 2.5	0.73
BMI	23.4 ± 5.1	22.1 ± 3.0	0.41
rASRM	N/A	60.9 ± 37.9	N/A
CA125 (U/ml)	31.2 ± 32.2	114.0 ± 102.1	0.49
CA19-9 (U/ml)	N/A	53.3 ± 85.8	N/A
Menstrual phase	3 (21%)	4 (25%)	
Proliferative phase	3 (21%)	5 (31%)	
Secretory phase	8 (57%)	7 (43%)	
Gravidity	0.8 ± 0.8	0.9 ± 1.3	0.72
Parity	0.7 ± 0.8	0.6 ± 0.9	0.83

mean ± SD, \* P < 0.05

Student t - Test  
Mann-Whitney U test

表2 患者背景 (免疫組織化学法)

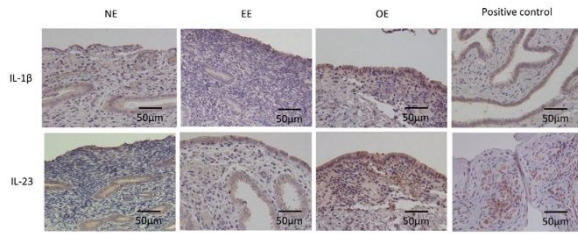


図4 IL-1β、IL-23の免疫染色

IL-23は有意に発現していた。NE、EEにおいてIL-1、IL-23の発現に有意な変化は見られなかった。

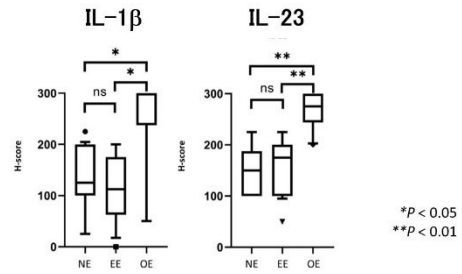


図5 NE、EE、OEにおけるIL-1β、IL-23の発現

(3) これらの結果より、血液や腹水での ILC に変化はなく、局所の NE, EE, OE では子宮内膜症群と非子宮内膜症群で有意な差を認めた。OE では NE, EE と比較し、ILC すべての分画が増加していた。OE では慢性炎症が活性化しているが、ILC が原因となっている可能性があると考えられた。ILC3 を増加させる IL-1、IL-23 が OE では強く発現していた。

ILC2 はアレルギー性炎症に強く関わっており、我々は NE よりも EE で ILC2 が増加していることを予測していたが、結果は逆であり EE では有意に ILC2 が低下していた。また、ILC3 も NE と比較し EE で低下していた。ILC3 欠失マウスでは妊娠ができず、ILC3 は妊娠初期に必須であると報告されており、ILC3 の低下は子宮内膜症患者の不妊に影響している可能性があると考えた<sup>3)</sup>。

#### <引用文献>

- 1) Exacerbation of endometriosis due to regulatory T cell dysfunction.  
Tanaka Y, et al. J Clin Endocrinol Metab. 2017; 102(9): 3206-3217.
- 2) Composition, Development, and Function of Uterine Innate Lymphoid Cells.  
Doisne JM, et al. J Immunol. 2015; 195(8): 3937-45.
- 3) Reduced innate lymphoid cells in the endometrium of women with endometriosis.  
Sugahara T, et al. Am J Reprod Immunol. 2022; 87(1): e13502



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sugahara Takuya
2. 発表標題 Reduced innate lymphoid cells in the endometrium of women with endometriosis.
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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------