

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09502

研究課題名（和文）子宮内膜症進展における神経ペプチドCGRPの役割解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of neuropeptide CGRP in endometriosis progression

研究代表者

関口 和企（Kazuki, Sekiguchi）

北里大学・医学部・助教

研究者番号：90458810

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）：マウス異所性子宮内膜症モデルを作成し子宮内膜症進展における内因性CGRPの役割を調べた。CGRP受容体であるRAMP1受容体シグナルは、子宮内膜症病変に集積したマクロファージや線維芽細胞から血管新生促進因子やリンパ管新生促進因子を産生し、血管新生やリンパ管新生を増強させて子宮内膜症発育を促進させることが分かった。子宮内膜症を軽減するためにRAMP1受容体を標的にした治療法につなが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

子宮内膜症にともなう月経困難症には痛みや炎症により産生されるCGRPの関与がしさされた。さらにCGRP受容体阻害薬投与が血管およびリンパ管新生を減少させることで子宮内膜症進展を抑制する可能性を実験動物で示すことができた。子宮内膜症では鎮痛剤による対症療法、ホルモン療法、手術療法などがあるが、より有効な治療法が望まれる。RAMP1受容体シグナルを特異的に標的とすることが子宮内膜症治療のための有望な選択肢となる可能性があり、子宮内膜症に悩む女性の治療の選択肢が広がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of endogenous CGRP in the development of endometriosis in a mouse model of ectopic endometriosis. We found that RAMP1 receptor signaling, a CGRP receptor, enhances angiogenesis and lymphangiogenesis by producing pro-angiogenic/lymphangiogenic factors from macrophages and fibroblasts accumulated in endometriotic lesions, thereby promoting angiogenesis and lymphangiogenesis and contribute to endometriosis development. Targeting RAMP1 signaling may be an option for management of endometriosis.

研究分野：子宮内膜症

キーワード：子宮内膜症 神経ペプチド CGRP

## 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は生殖年齢女性の5~10%が罹患し不妊症、月経困難症などを合併する。特に月経困難症に伴う疼痛は日常生活や社会活動に及ぼす影響が強く、さらにその症状の慢性持続化は、患者のQOLを著しく損うこととなる。痛みや炎症などの侵害刺激は感覚神経の侵害受容器であるTRPV1(transient receptor potential vanilloid 1)を介した軸索反射により知覚神経終末から神経ペプチドであるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP, Calcitonin gene-related peptide)を遊離する。子宮内膜症は子宮内膜及び類似組織が、子宮内膜層以外の場所で増殖する疾患であるが、骨盤子宮内膜症ではCGRP陽性神経線維などを含む知覚神経が腹膜や子宮内膜病変に存在することが報告され、CGRPが子宮内膜症関連疼痛に関与していることが考えられる。

われわれは、これまでCGRPがその受容体サブタイプの一つである受容体活性調節蛋白1(RAMP1, Receptor activity modifying protein 1)に作用することで血管新生を増強して腫瘍増殖を促進することを報告した。このことは、癌性疼痛などでは痛みによりCGRP/RAMP1シグナルが活性化することで血管新生が増強して腫瘍増殖に関与することが考えられる。また、リンパ管は組織液の調節や免疫担当細胞の動員などに関わり、炎症時にはリンパ管は構造や機能変化をさせて、増殖新生する。申請者らは炎症時のリンパ管新生にマクロファージのRAMP1シグナルが関与することをみいだした。

子宮内膜症の原因には骨盤内の炎症、局所の免疫異常やエストロゲン産生などが示唆されるが、十分には理解されていない。最近になり子宮内膜症は異所性に内膜組織が発育・増殖するため、血管新生ならびにリンパ管新生が関与するという報告がある。これまで、われわれはマウス子宮内膜移植片を宿主マウスの腹膜に移植するマウス異所性子宮内膜症モデルを作成し検討を重ねてきた。その結果、マクロファージが血管内皮増殖因子(VEGF-A)を産生して血管新生を促進し、またリンパ管内皮を活性化するVEGF-C,Dを産生してリンパ管新生を増強するなどして子宮内膜症が進展することを報告した。さらにVEGF-A抗体による血管新生抑制や、VEGF-C,Dの受容体であるVEGFR3阻害薬によるリンパ管新生抑制は子宮内膜症発育を軽減させることを見いだした。これら結果から、血管ならびにリンパ管新生は子宮内膜症進展に重要な役割を果たしているものと推察される。

以上から子宮内膜症病巣にみられる知覚神経終末から放出されるCGRPが、RAMP1受容体シグナルを介して血管およびリンパ管新生を増強して子宮内膜症を進展する可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、マウス異所性子宮内膜症モデルを用い、内因性CGRPが血管およびリンパ管新生抑制作用により子宮内膜症軽減に関与することと、その制御機構を明らかにすることである。

## 3. 研究方法

実験動物には8週令の雌性野生型マウス(WT)C57BL/6マウスとRAMP1受容体ノックアウトマウス(RAMP1<sup>-/-</sup>マウス)を用いた。マウスにおける内因性エストロゲンの影響および月経周期の影響を排除するため、両側の卵巣を摘出し、卵巣摘出当日から、ドナーマウ

スおよび宿主マウス共に、エストラジオール吉草酸エステルを皮下投与した。卵巣摘出 7 日後に取得した子宮内膜移植片を宿主の腹膜に縫合固定することにより、子宮内膜片の移植を行った。ドナーマウスの摘出子宮から直径 3mm 大の円形の子宮内膜片を作成し、宿主マウスの腹壁の両側に一つずつ、移植した。宿主の WT マウスまたは RAMP1<sup>-/-</sup> マウスへ、ドナーの WT マウスまたは RAMP1<sup>-/-</sup> マウスの子宮内膜移植片を移植した（以後、WT→WT および RAMP1<sup>-/-</sup>→RAMP1<sup>-/-</sup>と記載する）。一部の実験においては WT WT に、CGRP 受容体阻害薬である CGRP8-37 を連日持続皮下注入投与した。

子宮内膜移植後 14 日目に、子宮内膜移植片を採取し、遺伝子発現と蛋白発現解析をおこない血管新生促進因子、血管内皮マーカー、リンパ管新生促進因子、リンパ管内皮マーカー、マクロファージ、線維芽細胞などの評価をおこなった。

#### 4. 研究成果

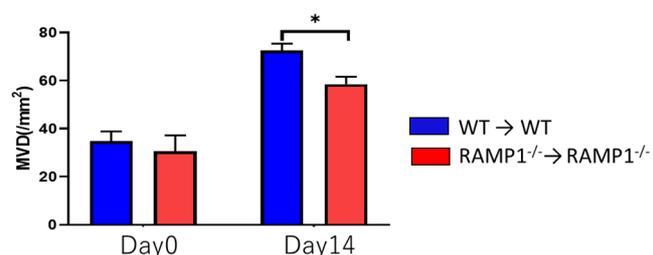
##### (1) 子宮内膜移植片における RAMP1 発現

Implant/Host で 4 通りの組み合わせで子宮内膜症モデルを作成し、RAMP1<sup>-/-</sup> RAMP1<sup>-/-</sup>の移植片が最小であった。移植片における RAMP mRNA1 発現レベルは Day14 にピークに達した。この結果から移植片および宿主側の RAMP1 シグナルが子宮内膜症進展に関与している可能性が示唆された。RAMP1 は、主に移植片の間質組織で発現し、蛍光二重染色では RAMP1 は CD11b および S100A4 と共発現していた。これはマクロファージまたは線維芽細胞がそれぞれ移植片の RAMP1 発現細胞であることを示唆している。一方、CGRP は神経系の後根神経節で産生される。そこで、L1-L5 椎骨後根神経節での CGRP 発現を評価すると CGRP の発現は WT WT および RAMP1<sup>-/-</sup> RAMP1<sup>-/-</sup>共に Day0 と比較して Day14 で増強した。また、CGRP 陽性神経線維が、腹壁から移植片内に伸長するように観察された。これらの結果から、CGRP は RAMP1 シグナル伝達経路を介して子宮内膜症の進行に関与することが示唆された。

##### (2) 子宮内膜移植片の血管新生は、RAMP1<sup>-/-</sup> RAMP1<sup>-/-</sup>で抑制された

移植片を血管内皮マーカー CD31 で染色したところ、血管新生の指標である CD31 陽性細胞数 (MVD, 血管密度) は WT WT に比較して RAMP1<sup>-/-</sup> RAMP1<sup>-/-</sup>で減少した。血管新生関連マーカー CD31、VEGFR2 発現は RAMP1<sup>-/-</sup> RAMP1<sup>-/-</sup>で抑制され、血管新生因子 VEGF-A とその受容体 VEGFR1 発現も抑制された。

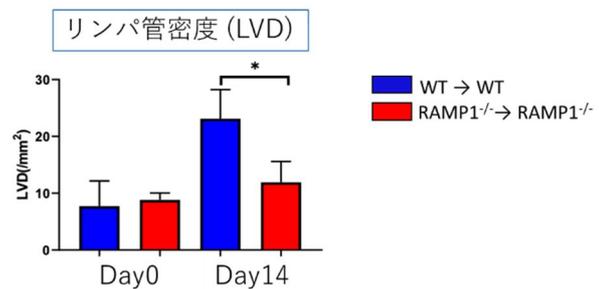
一方、RAMP1 と CD31 の蛍光二重染色では共発現せず、RAMP1 は VEGF-A と共発現した。このことから、RAMP1 シグナルは直接血管内皮を増殖させるのではなく、VEGF-A を産生することにより血管新生が促進することが示唆された。



##### (3) 子宮内膜移植片のリンパ管新生は RAMP1<sup>-/-</sup> RAMP1<sup>-/-</sup>で抑制された

リンパ管内皮マーカーの LYVE-1 陽性細胞数は WT WT に比較して RAMP1<sup>-/-</sup> RAMP1<sup>-/-</sup>で減少した。またリンパ管新生関連因子 LYVE-1、VEGFR3 および Prox1mRNA も、RAMP1<sup>-/-</sup>

RAMP1<sup>-/-</sup>で抑制された。リンパ管新生促進因子であるVEGF-CおよびDの発現も同様の結果であった。一方、RAMP1とLYVE-1の蛍光二重染色では共発現せず、RAMP1発現はVEGF-CおよびDと共発現することがわかった。これらの結果からRAMP1シグナルはリンパ管内皮を直接刺激して増殖・新生するのではなく、VEGF-CおよびDの発現を誘導することによりリンパ管新生を促進させることを示唆している。



#### (4) 移植片内のマクロファージと線維芽細胞の動員

移植片における、CD11b 陽性細胞 (マクロファージ) 数と S100A4 陽性細胞 (線維芽細胞) 数は、CD11b 陽性細胞数、S100A4 陽性細胞数とも WT WT に比較し RAMP1<sup>-/-</sup> RAMP1<sup>-/-</sup> で抑制された。

#### (5) マクロファージおよび線維芽細胞は、血管およびリンパ管新生のサイトカインを発現する

Day14 の WT WT 移植片における蛍光二重染色をおこなうと、マクロファージと線維芽細胞それぞれは VEGF-A、C および D と共発現した。マクロファージと線維芽細胞は、VEGF-A、C および D の産生に関与することが示唆された。

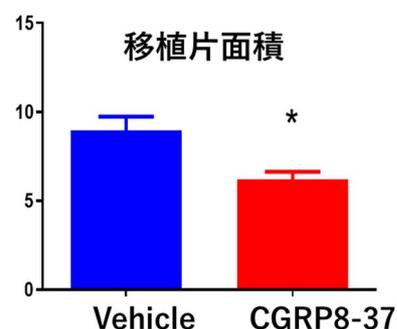
#### (6) 培養マクロファージおよび培養線維芽細胞における VEGF の発現

WT 由来骨髄マクロファージを CGRP で刺激すると VEGF-A、C および D の mRNA レベルは増加した。RAMP1<sup>-/-</sup> 由来骨髄マクロファージは増加しなかった。これは、培養マクロファージが RAMP1 に依存して VEGF-A、C および D を増強することを示している。

一方、培養 L929 線維芽細胞における VEGF-AmRNA レベルは、CGRP によりわずかに抑制され、CGRP 受容体アンタゴニスト CGRP8-37 の添加により回復した。また VEGF-C/DmRNA レベルは、CGRP により増加し、CGRP8-37 の添加により VEGF-C は減少し、VEGF-D には影響しなかった。これらの結果は、培養線維芽細胞は CGRP 受容体シグナルを介して VEGF-C を増加させたことを示唆する。

#### (7) CGRP 受容体障害は、移植片の成長と血管新生/リンパ管新生を抑制する

子宮内膜症における CGRP / RAMP1 シグナルの役割を、CGRP 受容体拮抗薬である CGRP8-37 を用いて確認した。CGRP8-37 を移植後 2 週間、持続投与した WT WT における子宮内膜移植片のサイズは vehicle 投与に比較して減少し、また移植片の血管新生/リンパ管新生も抑制した。CGRP8-37 投与下では、CD31、VEGF-A および VEGFR2 の mRNA レベルを低下させ、さらに VEGF-C、VEGF-D、VEGFR3、LYVE-1 および Prox1 の発現も低下させた。



## ( 8 ) まとめ

本研究では、マウス異所性子宮内膜症モデルを用いて RAMP1 シグナルが子宮内膜移植片の血管新生/リンパ管新生を促進させ、子宮内膜症が進展することを示した。さらに RAMP1 陽性マクロファージと線維芽細胞が内膜移植片間質に集積することが、子宮内膜症の進展と血管新生/リンパ管新生にい役割を果たすことが示された。さらに、CGRP の阻害は、移植片の成長と血管新生およびリンパ管新生を抑制した。これらは、RAMP1 シグナル遮断が子宮内膜症の治療のための有望な戦略になる可能性を示唆している。

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 1件）

1. 著者名 Furue A, Hattori K, Hosono K, Tanabe M, Sato E, Honda M, Sekiguchi K, Ito Y, Majima M, Narumiya S, Kato K, Amano H	4. 巻 28(4)
2. 論文標題 Inhibition of TP signaling promotes endometriosis growth and neovascularization.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mol Med Rep	6. 最初と最後の頁 192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2023.13079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古江 明子、伊藤 義也、服部 響子、関口 和企、本田 雅子、山下 敦、長田 真由子、田邊 美奈、細野 加奈子、畑中 公、馬嶋 正隆、天野 英樹
2. 発表標題 トロンボキサンの子宮内膜症における役割解明
3. 学会等名 第146回日本薬理学会年関東部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古江 明子、伊藤 義也、本田 雅子、服部 響子、関口 和企、山下 敦、長田 真由子、田邊 美奈、細野 加奈子、畑中 公、馬嶋 正隆、加藤 一喜、天野 英樹
2. 発表標題 トロンボキサンA2受容体シグナルは子宮内膜症の血管およびリンパ管新生を抑制する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本田雅子、伊藤義也、服部響子、関口和企、吉野修、海野信也
2. 発表標題 RAMP1受容体シグナルによる子宮内膜症進展制御機構
3. 学会等名 第73回日本産婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 服部響子、伊藤義也、本田雅子、関口和企、海野信也
2. 発表標題 子宮内膜症におけるリンパ管新生を制御するVEGFR1シグナルの役割
3. 学会等名 第73回日本産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
研究分担者	伊藤 義也  (Yoshiya Ito)  (40203187)	北里大学・医学部・准教授    (32607)	

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