

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16783

研究課題名（和文）子宮内膜症の進展におけるマクロファージの役割の解明と治療標的の探索

研究課題名（英文）Elucidating the Role of Macrophages in the Development of Endometriosis and Exploring Therapeutic Targets

研究代表者

真壁 友子（MAKABE, Tomoko）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50851086

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：当院で腹腔鏡手術を施行した子宮内膜症患者、非子宮内膜症患者（卵巣嚢腫や子宮筋腫で手術施行）の洗浄腹水から腹腔内単球成分（PFMC）を抽出した。マスサイトメトリーであるCyTOFを用いて、免疫細胞分画の分布を確認し、まずNK細胞に注目した検討を施行した。NK細胞の分化や活性化と代謝関連酵素の活性化を単一細胞レベルで検討し現在解析中である。今後はCyTOFで同定された子宮内膜症患者に特徴的なNK細胞分画を対象に、メタボローム解析を用いて代謝産物を定量化し、内膜症患者におけるNK細胞機能障害の原因となる代謝経路を同定し新たな治療戦略を探る予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖年齢の子宮内膜症患者における、病態の慢性化は、生活の質の低下のみならず不妊の原因となるとともに、癌化リスクの上昇も伴い、その病態解明や治療法の確立は喫緊の課題である。子宮内膜症の発生や進展には局所の免疫担当細胞が関与する。中でも、NK細胞は、子宮内膜症や子宮内膜症関連癌の病態に密接に関わっていると考えられ、NK細胞の活性化調整機構に着目することで子宮内膜症の病態解明のみならず治療法開発の糸口となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Intra-peritoneal monocyte components (PFMC) were extracted from the peritoneal fluid of endometriosis and non-endometriosis patients (operated for benign ovarian cysts and uterine leiomyoma) who underwent laparoscopic surgery at our hospital. The distribution of immune cell fractions was confirmed using CyTOF, a mass cytometric technique, and an examination focusing on NK cells was conducted first. Differentiation and activation of NK cells and activation of metabolic enzymes were examined at the single cell level and are currently being analyzed. In the future, we plan to quantify metabolites in the NK cell fractions identified by CyTOF, which are characteristic of endometriosis patients, using metabolomic analysis to identify metabolic pathways that cause NK cell dysfunction in endometriosis patients and to explore new therapeutic strategies.

研究分野：生殖医学

キーワード：子宮内膜症 免疫異常 腹腔内環境 NK細胞活性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生殖年齢の子宮内膜症患者における、病態の慢性化は、生活の質の低下のみならず不妊の原因となるとともに、がん化リスクの上昇も伴い、その病態解明や治療法の確立は喫緊の課題である。子宮内膜症の病態として、異所性子宮内膜組織の生着に伴う炎症や癒着が原因と考えられており、その発生や進展にはT細胞やNatural killer細胞(NK細胞)、マクロファージなどの免疫担当細胞が関与する。中でも、NK細胞は、子宮内膜症や子宮内膜症関連がんの病態に密接に関わっていると考えられ、NK細胞の活性化調整機構に着目することで子宮内膜症の病態解明のみならず治療法開発の糸口となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、子宮内膜症患者におけるNK細胞の活性度を網羅的に評価すると同時に、NK細胞の代謝調整機構も解析することで、子宮内膜症の病態解明を行うことを目的とした。本研究は、NK細胞の代謝に注目して酵素活性と代謝産物の両者に注目する。また、酵素活性の評価としては、マスサイトメトリー(CyTOF)を用いて、NK細胞の分画や活性度と代謝関連酵素の活性度を単一細胞レベルで検出・検討する点で独自性がある。CyTOFは、細胞を単一細胞レベルで高速に解析をするフローサイトメトリーと、元素の質量に基づいて物質を高次元、高分解能で解析できる誘導結合プラズマ-飛行時間型質量分析計を融合した単一細胞解析技術である。近年では、CyTOFを用いて免疫細胞単一細胞レベルでの代謝調整機構の評価が可能となり(Levin LS, Immunity, 2021)本研究でもCyTOFを用いて、NK細胞の分画や活性度と代謝関連蛋白の発現を単一細胞レベルで同時に検出・解析を行う。

3. 研究の方法

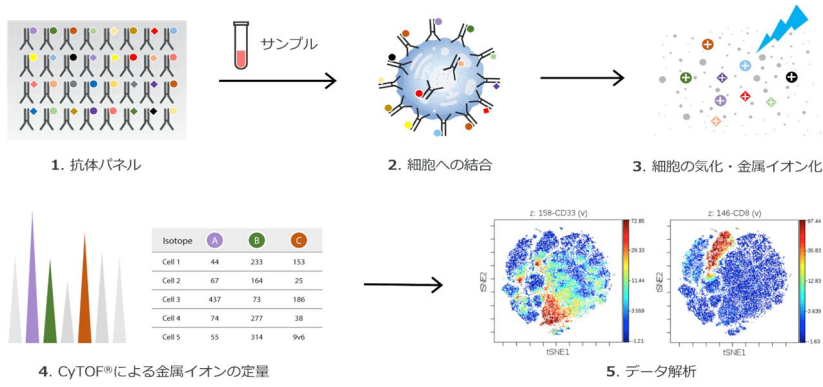
マスサイトメトリー(CyTOF)を用いて単一細胞解析を行う。腹腔鏡手術の際に、子宮内膜症患者、コントロール患者(良性卵巣腫瘍、子宮筋腫等)から腹腔内貯留液を採取し、単核球成分(PFMC)を抽出、免疫細胞分画の分布を確認し、患者の特にNK細胞分画の特徴を明らかにする。細胞内代謝マーカーについては、代謝産物ではなく、トランスポーターや代謝に関連する酵素活性度の評価を行う。子宮内膜症患者については、異なる年齢・病期での比較検討も行う。

- ・NK細胞分画マーカーとして、CD3, CD56, CD16, CD57を、
- ・NK細胞の活性化マーカーとして、KIR, LILR, NKG2A, NKRP1A, PD-1を、
- ・細胞内代謝マーカーとして、GLUT1, CD98(選択的アミノ酸トランスポーター)、CPT1a, CytoC, HIF1a, GAPDH, mTOR, pERK, pCREBをそれぞれ用いる。

4. 研究成果

当院で腹腔鏡手術を施行した子宮内膜症、期(月経前)の患者、期(月経後)の患者、コントロール患者(良性卵巣腫瘍や子宮筋腫等)の腹腔内貯留液、末梢血を回収した。検体数は20検体ずつとした。腹腔内貯留液、末梢血はRBC lysis buffetによりRBCを除去したのち、血球成分を遠心分離により回収した。続いてFicoll-Paqueを用いた比重遠心により単核球成分を単離し、細胞数は 1×10^5 - 1×10^6 となるよう調整した。単離した単核球をマスサイトメトリーを用いて単一細胞解析を施行した。

NK細胞分画マーカーとして、CD3, CD56, CD16, CD57を用いて単離した。NK細胞内代謝マーカーとして、GLUT1, CD98(選択的アミノ酸トランスポーター)、CPT1a, CytoC, HIF1a, GAPDH, mTOR, pERK, pCREBをそれぞれ設計した。現在結果の解析中であり、子宮内膜症の病気によるN



K 細胞活性の違いを明らかにし、子宮内膜症の発症や進展メカニズムについて更なる検討を進める予定である。

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 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tomoko Makabe	4. 巻 27
2. 論文標題 Use of selective PGE2 receptor antagonists on human endometriotic stromal cells and peritoneal macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular human reproduction	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/molehr/gaaa077	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 真壁友子
2. 発表標題 子宮内膜症専門医を目指して
3. 学会等名 第43回日本エンドメトリーシス学会（招待講演）
4. 発表年 2022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
---------	---------