

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16821

研究課題名（和文）子宮内膜症におけるトロンボキサンの役割解明と治療応用

研究課題名（英文）Elucidation of the role of thromboxane in endometriosis and its therapeutic application

研究代表者

服部 響子（Hattori, Kyoko）

北里大学・医学部・助教

研究者番号：30566948

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）：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トロンボキサンの役割を調べた。トロンボキサン受容体シグナルを阻害すると、子宮内膜症病変に集積するトロンボキサン受容体シグナル欠損マクロファージが血管新生やリンパ管新生を促進させて子宮内膜症が進展することが分かった。子宮内膜症を軽減するためにトロンボキサン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

子宮内膜症の治療には、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、ホルモン療法や手術療法は挙児を希望する女性に対しては選択しにくい場合があり、より有効な治療法が望まれる。アゴニストによる選択的なTP受容体活性化が子宮内膜症の成長を抑制することを考えると、TP受容体シグナルを標的とすることは、子宮内膜症の治療にとって実行可能な選択肢である可能性がある。TP受容体シグナルを標的とした子宮内膜症進展の制御は、新たな子宮内膜症治療への足がかりとなり、子宮内膜症に悩む女性の治療の選択肢が広がることを期待される。

研究成果の概要（英文）：A mouse model of ectopic endometriosis was created to examine the role of endogenous thromboxane in the development of endometriosis. Inhibition of thromboxane receptor signaling induced the development of endometriosis and facilitated angiogenesis and lymphangiogenesis in endometriotic lesions through thromboxane receptor signaling deficiency in macrophages that accumulated in endometriosis lesions. The results suggest that targeting thromboxane receptors may lead to therapies to alleviate endometriosis.

研究分野：婦人科

キーワード：子宮内膜症 マクロファージ トロンボキサン

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。症状の慢性持続化は、患者のQOLを著しく損うため、有効な治療が望まれている。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。従って、その制御機構が解明されれば、子宮内膜症の治療につながる可能性がある。

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。

血管およびリンパ管新生の制御機構については、十分な解明はされていない。しかしながら、われわれはシクロオキシゲナーゼ由来のプロスタグランジンが血管新生を促進して子宮内膜症進展に関与し、また肉芽組織に集積したマクロファージがプロスタグランジン依存性にリンパ管新生を増強することを報告した。一方で、プロスタグランジンと同じくシクロオキシゲナーゼの働きにより合成されるトロンボキサンは、トロンボキサン受容体(Thromboxane prostanoid, TP受容体)を介して強力な血小板凝集作用や細動脈収縮作用を引き起こす。興味深いことに、申請者らは内因性TP受容体シグナルを遮断すると虚血組織における血管新生が減少し、炎症組織のリンパ管新生が抑制されることを見いだした。従って、子宮内膜症進展においても血管およびリンパ管新生をトロンボキサンが制御する可能性があるものと考えられる。

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、内因性トロンボキサン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. 研究の方法

実験動物には8週令の雌性野生型マウス(WT)C57BL/6マウスとトロンボキサン受容体ノックアウトマウス(TP^{-/-}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TP^{-/-}マウスへ、ドナーのWTマウスまたはTP^{-/-}マウスの子宮内膜移植片を移植した(以後、WT→WTおよびTP^{-/-}→TP^{-/-}と記載する)。一部の実験においてはWT WTに、選択的TXS阻害剤であるオザグレレル

(30mg/kg)を毎日経口投与した。

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った。遺伝子発現解析はRT-qPCRによった。血管新生促進因子(VEGF-A)、血管内皮マーカ(CD31、VEGFR2)、リンパ管新生促進因子(VEGF-C,D)、リンパ管内皮マーカ(LYVE-1,VEGFR3,Prox1)、マクロファージマーカ(F4/80)、マクロファージ表現形質マーカ(炎症性、TNF,IL-1,IL-6);抗炎症性(MR,Fizz1,IL-10)、ケモカイン(CCL2)などの測定をおこなった。蛋白発現は免疫染色によって解析した。血管新生はCD31抗体で移植片を染色し、CD31陽性血管数を測定した。結果は、1平方ミリメートルあたりの血管数(MVD/mm²)として示した。さらに、ImageJを用いて血管占有面積を求め、移植片の総面積に対する割合(血管面積(MVA)%)で示した。リンパ管新生はLYVE1抗体で染色し血管新生と同様に解析した。またマクロファージ集積はF4/80陽性細胞数をカウントし結果は1平方ミリメートルあたりのF4/80陽性細胞数で示した。マクロファージの表現形式がTP受容体シグナルによって転換される可能性を調べるために、WTマウスまたはTP^{-/-}マウスの骨髄細胞を培養しTP受容体アゴニストで刺激したときの変化を解析した。

4. 研究成果

(1) TP受容体シグナル阻害は子宮内膜症病変進展を促進した

移植片の成長に、TP受容体シグナルが関与するかを調べるため、WTまたはTP^{-/-}マウスの子宮内膜片をWTまたはTP^{-/-}の宿主マウスに移植した(図1)。子宮内膜移植片面積は移植後14日目に最大になることが以前の報告で明らかになっており、14日目の子宮内膜移植片面積を評価した。TP^{-/-}ドナーマウスの子宮内膜片をTP^{-/-}宿主マウスに移植すると(TP^{-/-}→TP^{-/-}マウス)移植片はWT→WTマウスよりも増大した。同様に、WT→TP^{-/-}マウスでも移植片の発育は促進された。しかし、TP^{-/-}→WTマウスとWT→WTマウスの間では、移植片の成長に統計学的に有意な差は認められなかった。これらの所見から、宿主に由来するTP受容体シグナルが移植子宮内膜片の成長を抑制していることが示唆された。従って、WT→WTマウスとTP^{-/-}→TP^{-/-}マウスにおける移植片の成長、ならびに血管新生およびリンパ管新生を、続く実験で評価した。

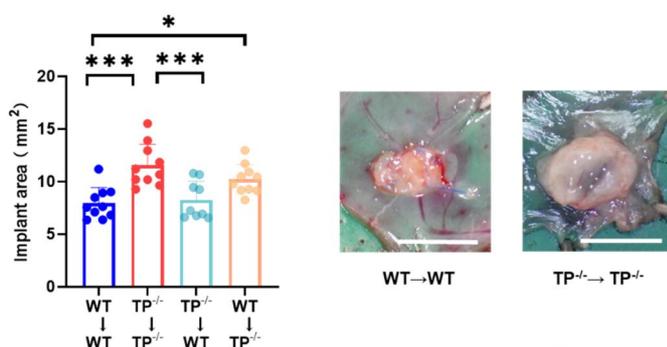


図1. 宿主由来するTP受容体シグナルが移植子宮内膜片の成長を抑制

(2) TP受容体シグナル阻害は子宮内膜移植片の血管新生およびリンパ管新生を増強した

子宮内膜移植片の成長は血管新生に依存することから、WT→WTマウスおよびTP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの移植片中のCD31陽性血管数を測定することにより、血管新生におけ

る TP 受容体シグナルの関与を調べた。TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの移植片の MVD と MVA%は、WT→WT マウスの移植片の MVD と MVA%よりも大きかった(図 2A)。さらに、CD31、VEGFR2、血管新生促進因子 VEGF-A の mRNA 発現レベルは、TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの移植片では、WT→WT マウスの移植片よりも高かった。

リンパ管新生における TP 受容体シグナルの役割を、LVD と LVA%を測定することによって調べた(図 2B)。TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの移植片における LVD と LVA%は、WT→WT マウスの移植片より増加した。TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの移植片における LYVE-1、VEGFR3、および Prospero-related homeobox 1 (Prox1) を含むリンパ管内皮マーカーの mRNA 発現レベルは、WT→WT マウスの移植片よりも高値であった。VEGF-C と VEGF-D の mRNA 発現レベルも TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの移植片で高値だった。これらの結果は、TP 受容体シグナル阻害が VEGF-C と VEGF-D を増強することでリンパ管新生を促進させることを示している。

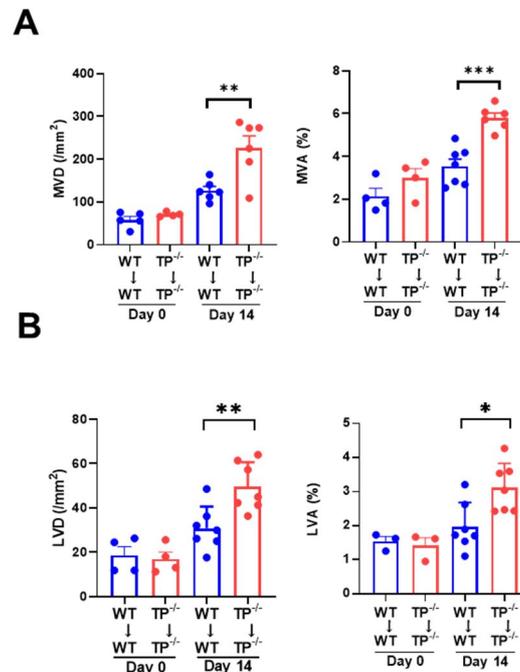


図2. TP受容体シグナル阻害は移植片内の血管新生(A)およびリンパ管新生(B)を増強した

(3) TXS 阻害は子宮内膜移植片の成長と血管新生およびリンパ管新生を増大した

子宮内膜症における TP 受容体シグナルの役割を確認するために、移植片の成長、血管新生、リンパ管新生に対する TXS 阻害薬であるオザグレルの効果調べた。オザグレルは、コントロールと比較して WT→WT マウスにおいて移植片面積を増大させ、移植片における血管新生とリンパ管新生を促進した。さらに、オザグレルは、WT→WT マウスにおいて CD31、VEGFR2、VEGF-A を含む血管新生関連遺伝子、および LYVE-1、VEGFR3、Prox1、VEGF-C、VEGF-D を含むリンパ管新生関連遺伝子の mRNA 発現レベルを増加させた。

(4) 移植片に集積したマクロファージの関与

マクロファージはマウス子宮内膜症進展における血管新生とリンパ管新生に関与している。子宮内膜移植片内の F4/80 陽性細胞数は、TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの移植片の方が WT→WT マウスの移植片よりも多く、F4/80 陽性細胞の集積が子宮内膜症にお

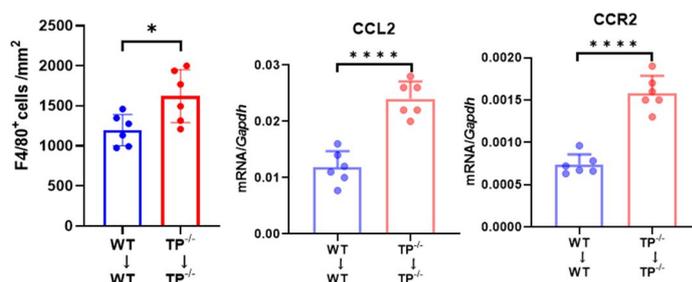


図3. TP受容体シグナル阻害は移植片内の集積マクロファージやCCL2・CCR2を増強した

ける血管新生とリンパ管新生に関係していることを示した。さらに、移植片における F4/80 陽性細胞の集積は、マクロファージのケモカインである CCL2 とその受容体である CCR2 の発現上昇と関連していた (図 3)。

マクロファージは、血管新生やリンパ管新生に極めて重要な役割を果たす血管新生促進因子 (VEGF-A) やリンパ管新生促進因子 (VEGF-C と VEGF-D) などの VEGF タンパク質ファミリー合成に関与する。そこで、移植片に集積したマクロファージが VEGF-A、VEGF-C、または VEGF-D を発現しているかどうかを調べた。移植 14 日目の WT→WT マウスの移植片では、蛍光免疫二重染色で F4/80 陽性細胞が VEGF-A だけでなく VEGF-C および VEGF-D を共発現していることが示された。これらの所見は、マクロファージが VEGF-A および VEGF-C、VEGF-D 発現を増強させて、子宮内膜移植片の血管新生およびリンパ管新生に関与していることを示唆している。

(5) 移植片に集積するマクロファージの特徴

子宮内膜症進展に関与するマクロファージの表現型式の特徴は、炎症性マクロファージ (M1 様マクロファージ) よりかは抗炎症性マクロファージ (M2 様マクロファージ) であることが報告されている。そこで、本モデルにおける移植片に集積するマクロファージの特徴を調べるため、炎症性マクロファージの関連因子である、tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)、interleukin (IL)-1 β 、IL-6 の mRNA 発現レベル、および抗炎症性マクロファージ関連因子である mannose receptor (MR)、Fizz1、IL-10 の mRNA 発現レベルを調べた。炎症性マクロファージに関連する mRNA 発現量は、WT→WT マウスと TP^{-/-}→TP^{-/-} マウスで大きな差はなかったが、抗炎症性マクロファージに関連する mRNA 発現量は、WT→WT マウスよりも TP^{-/-}→TP^{-/-} マウスの方が高かったことから、抗炎症性マクロファージが子宮内膜症の進展に関与していることが示唆された。

さらに、in vitro で培養骨髄マクロファージにおける TP 受容体シグナル阻害が、血管新生促進因子やリンパ管新生促進因子を制御するかどうかを調べた。培養骨髄マクロファージを TXA₂ アナログである U46619 で刺激すると、VEGF-A、VEGF-C、および VEGF-D の mRNA 発現レベルは、WT マウス由来の骨髄マクロファージでは低下したが、TP^{-/-} マウス由来の骨髄マクロファージでは変化しなかった。これらの所見から、培養骨髄マクロファージの VEGF-A、VEGF-C、および VEGF-D の発現が、TP 受容体シグナルを介して低下していることが示された。

(6) まとめ

本研究の結果から、TP 受容体シグナル阻害が、子宮内膜症病変における血管新生およびリンパ管新生を促進することにより、子宮内膜症進展を促進することが分かった。TP 受容体シグナル阻害は、抗炎症性マクロファージを子宮内膜病変へ集積させた。TP 受容体作動薬は、リンパ管新生関連遺伝子の発現を減少させた。したがって、子宮内膜症進展と血管新生およびリンパ管新生は、抗炎症性マクロファージにおける TP 受容体シグナル阻害によって引き起こされている可能性が高い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 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 無
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6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、服部響子、山下敦、本田雅子、関口和企、細野加奈子、鎌田真理子、畑中公、伊藤義也、加藤一喜、天野英樹
2. 発表標題 子宮内膜症進展における腹腔マクロファージの役割解明
3. 学会等名 第149回日本薬理学会年関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古江 明子、服部 響子、本田 雅子、関口 和企、細野 加奈子、鎌田 真理子、畑中 公、伊藤 義也、加藤 一喜、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148回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

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 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

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

〔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
---------	---------