

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20995

研究課題名(和文) IL-9を標的とした増殖・炎症・免疫を制御しうる新たな子宮内膜症治療戦略

研究課題名(英文) A novel therapeutic strategy targeting IL-9 for endometriosis that regulate proliferation, inflammation, and immunity

研究代表者

垂水 洋輔 (Tarumi, Yosuke)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：90912288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症は子宮内膜様組織が異所性に増殖する疾患であり、その病態においてサイトカインは重要な役割を果たす。われわれはInterleukin(IL)-9に直目し、子宮内膜症患者の腹水中ではIL-9産生ヘルパーT細胞の割合が上昇し、子宮内膜症組織においてIL-9受容体の発現が正所性子宮内膜よりも上昇していることを明らかとした。さらに、子宮内膜症間質細胞においてIL-9はIL-8やCOX-2の発現を上昇させ、TNF- $\alpha$ 存在下ではIL-8の発現を相加的に上昇させることを明らかとした。以上からIL-9は子宮内膜症の炎症反応に重要な役割があり、新たな治療標的とな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

本研究結果により、子宮内膜症におけるIL-9産生ヘルパーT細胞の割合の変化が明らかとなり、IL-9がIL-8を介する子宮内膜症の炎症・進展において重要な働きを持つことが示唆された。IL-9は子宮内膜症の新たな治療対象となる可能性がある。しかし、in vitroの研究による限界も存在するため、今後in vivoでの検討およびIL-9の免疫応答に対する役割について検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Endometriosis is defined as the presence of endometrium-like lesions growing outside the uterus. The aberrant peritoneal environment of cytokines might be very closely linked to the pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. We investigated the functional roles of IL-9 on endometriosis. The proportion of CD4+IL-9+ T cells in the peritoneal fluid of patients with endometriosis was significantly higher than that of patients without endometriosis. The expression level of IL-9 receptor in ovarian endometrioma was significantly greater than that in endometrium of the uterus. Furthermore, in cultured stromal cells derived from ovarian endometrioma, IL-9 markedly elevated the expression of IL-8 and COX-2, and IL-9 additively stimulated IL-8 expression in the presence of TNF- $\alpha$ . This study revealed that IL-9 produced by helper T cells contributes to the inflammation in endometriosis. We provided therapeutic potential of IL-9 and IL-9-producing T cells in endometriosis.

研究分野：女性内分泌

キーワード：子宮内膜症 interleukin-9 免疫応答

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は子宮内膜様組織が子宮外で異所性に増殖・発育する疾患である。その罹患率は生殖年齢女性の5-10%とされ、不妊、骨盤痛などの症状により女性の生活の質を著しく低下させ、労働力や妊孕性の低下による社会的損失が問題となっている。子宮内膜症の発生機序として月経血に伴い子宮内膜組織が腹腔内に逆流・生着するという子宮内膜移植説が提唱され、子宮内膜症の進展には腹腔内の免疫細胞、サイトカイン環境が重要であることが報告されてきた。例えば Interleukin (IL) -8 は子宮内膜症病巣に作用し、細胞接着分子であるフィブロネクチンとの結合、細胞増殖、COX-2・PGE<sub>2</sub>の分泌を亢進させ、子宮内膜の生着・増殖を促進し、子宮内膜症による疼痛に關与する。IL-8 は子宮内膜症における有用な治療標的と考えられてきたが、IL-8 の作用を抑制しても病巣の進展抑制は困難である。そのため、サイトカインを標的とした治療戦略を考える上で、病巣への作用だけでなく、免疫応答を含めた子宮内膜症の病態を包括する役割を持つサイトカインの選択が重要と考えられる。

IL-9 はマクロファージの貪食能低下や Th17 細胞の分化誘導を引き起こすことが報告されているが、これらが子宮内膜症病巣の免疫反応ときわめて一致していることは大変興味深い。また、IL-9 はヘルパーT細胞、マクロファージ、自然リンパ球から分泌され、その発現レベルは気管支喘息、関節リウマチなどの炎症性疾患の重症度と相関し、*in vitro*では気管支平滑筋細胞において炎症性サイトカインの発現を亢進させることも知られている。近年、子宮内膜症患者の腹水中の interleukin (IL) -9 の上昇が子宮内膜症患者と正常患者を鑑別する因子のひとつであることが報告された。しかしながら、子宮内膜症における IL-9 の発現および機能については不明であった。本研究ではサイトカインのうち、IL-9 の作用に着目し、子宮内膜症における IL-9 の役割、治療標的としての可能性を検討した。

### 2. 研究の目的

子宮内膜症の病態として月経血とともに逆流した子宮内膜の生着、増殖には腹腔内のサイトカイン、免疫環境が重要とされる。子宮内膜症に対するサイトカインの作用については IL-1、IL-6、IL-17、IL-33、TNF などが細胞増殖、IL-8 を介した炎症反応の亢進、VEGF の発現亢進などに關与することが報告されてきた。近年、腹水中のサイトカインの網羅的解析によって子宮内膜症患者での特有のサイトカイン環境が報告され、子宮内膜症の腹水中での IL-9 濃度の上昇が明らかとなった。IL-9、IL-9 陽性ヘルパーT細胞は関節リウマチの病態と關与し、気管支喘息では IL-8、IL-13、eotaxin/CCL11 の分泌を亢進させることで気管支喘息の増悪に重要な役割を持つことが示されており、慢性炎症性疾患における IL-9 の役割が注目されている。本研究では、子宮内膜症における IL-9 の役割を解明し、IL-9 を標的とした治療の効果を検証することで、子宮内膜症の新たな治療法の分子基盤を確立させることを目的とした。また、抗 IL-9 受容体抗体 (エルロチニブ) の有効性については気管支喘息患者に対する第 I 相試験が行われており、IL-9 を標的とした治療戦略は、drug repositioning の概念からも将来的な子宮内膜症における臨床応用が大いに期待できる。

### 3. 研究の方法

本研究では、子宮内膜症患者の血液、腹水中の IL-9 濃度、IL-9 産生ヘルパーT細胞の割合の変化、IL-9 受容体発現の検討、IL-9 による子宮内膜症に対する炎症反応に対する作用とその機序、抗 IL-9 抗体の治療効果を検討するため、以下の項目を検証した。

腹水、末梢血中の IL-9 濃度を enzyme-linked immunosorbent assay を用いて、腹水、末梢血、

卵巣子宮内膜症性嚢胞における IL-9 陽性ヘルパーT細胞の割合を flow cytometry analysis を用いて評価した。

子宮内膜症病巣の IL-9 receptor の発現レベルについて免疫組織化学染色を用いて評価した。

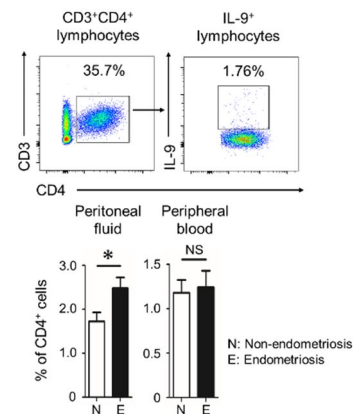
分離培養した子宮内膜症間質細胞に IL-9 を添加し、IL-8、COX-2 の発現を real-time RT-PCR を用いて *in vitro* で評価した。

子宮内膜症間質細胞における細胞内シグナル伝達系に対する IL-9 の作用を Western blotting を用いて *in vitro* で評価した。

子宮内膜症間質細胞における TNF- $\alpha$  存在下での IL-9 の IL-8 発現に及ぼす作用を real-time RT-PCR を用いて *in vitro* で評価した。

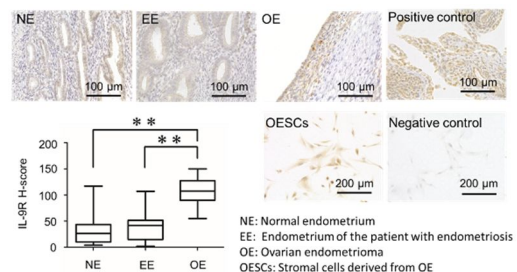
#### 4. 研究成果

子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者の腹水、末梢血中の IL-9 濃度を検討したところ、予想に反し、腹水、末梢血中において IL-9 濃度は両患者群で有意差を認めなかった。一方、腹水中の IL-9<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞 (IL-9 産生ヘルパーT細胞) の割合は子宮内膜症患者で増加していた (図1)。さらに、子宮内膜症病巣局所においても IL-9<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞が存在することを確認した。次に、子宮内膜症病巣における IL-9 受容体の発現レベルを検討したところ、子宮内膜症病巣では IL-9 受容体の発現は正所性子宮内膜と比較し上昇していた。また、子宮内膜症病巣から分離培養した OESCs においても IL-9 受容体の発現を確認した (図2)。

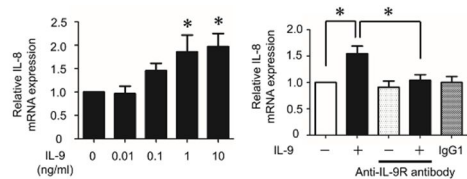


(図1) 子宮内膜症患者の腹水、末梢血中の IL-9 陽性ヘルパーT細胞の割合

子宮内膜症病巣に対する IL-9 の作用を *in vitro* で検討したところ、子宮内膜症間質細胞において IL-9 は濃度依存的に OESCs の IL-8、COX-2 の発現を亢進させ、その作用は抗 IL-9 receptor 抗体により抑制された (図3)。ERK1/2、p38-MAPK 経路の活性化は子宮内膜症において IL-8 の発現亢進に与ることが知られている。OESCs の細胞内シグナル伝達系に対する IL-9 の作用を Western blotting を用いて評価したところ、IL-9 は OESCs の ERK1/2、p38-MAPK のリン酸化を誘導した。TNF- $\alpha$  は子宮内膜症において IL-8 の分泌を亢進させる炎症性サイトカインであり、子宮内膜症患者の腹水中では TNF- $\alpha$  濃度が上昇していることが知られている。TNF- $\alpha$  存在下では IL-9 はそれぞれ単独よりも IL-8 の発現を相乗的に亢進させた。この結果は TNF- $\alpha$  濃度が上昇しているような子宮内膜症患者の腹腔内環境では、IL-9 は子宮内膜症間質細胞に対して IL-8 の発現を相乗的に亢進させることを示唆する。以上から、本研究により子宮内膜症患者の腹水中では IL-9 陽性ヘルパーT細胞が増加しており、IL-9 は子宮内膜症間質細胞において IL-8 の発現を亢進させることが明らかとなった。本研究の結果は IL-9 が IL-8 を介する子宮内膜症の炎症、進展において重要な働きを持つことを示唆し、IL-9 は子宮内膜症の新たな治療対象となる可能性が見出された。



(図2) 子宮内膜症における IL-9 受容体の発現亢進



(図3) 子宮内膜症間質細胞における IL-9、抗 IL-9 受容体抗体の作用

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Tani Akihiro, Tarumi Yosuke, Kakibuchi Akiyo, Aoyama Kohei, Kokabu Tetsuya, Kataoka Hisashi, Yoriki Kaori, Nagamine Michiko, Mori Taisuke	4. 巻 44
2. 論文標題 Giant retroperitoneal dedifferentiated liposarcoma mimicking ovarian cancer: A case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 101088 ~ 101088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gore.2022.101088	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 -
1. 著者名 Kokabu Tetsuya, Aoyama Kohei, Tarumi Yosuke, Kataoka Hisashi, Yoriki Kaori, Mori Taisuke	4. 巻 43
2. 論文標題 Successful nedaplatin desensitization therapy in a patient with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: A case report and literature review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 101065 ~ 101065
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gore.2022.101065	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 -
1. 著者名 Yoriki Kaori, Mori Taisuke, Aoyama Kohei, Tarumi Yosuke, Kataoka Hisashi, Kokabu Tetsuya, Kitawaki Jo	4. 巻 12
2. 論文標題 Genistein induces long-term expression of progesterone receptor regardless of estrogen receptor status and improves the prognosis of endometrial cancer patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-13842-6	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 -
1. 著者名 Kokabu Tetsuya, Masui Koji, Tarumi Yosuke, Noguchi Naoki, Aoyama Kohei, Kataoka Hisashi, Matsushima Hiroshi, Yoriki Kaori, Shimizu Daisuke, Yamazaki Hideya, Yamada Kei, Mori Taisuke	4. 巻 14
2. 論文標題 3D-Image-Guided Multi-Catheter Interstitial Brachytherapy for Bulky and High-Risk Stage IIB?IVB Cervical Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1257 ~ 1257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14051257	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 -

1. 著者名 Tarumi Yosuke, Mori Taisuke, Shimura Koki, Izumi Yuko, Okimura Hiroyuki, Kataoka Hisashi, Kokabu Tetsuya, Ito Fumitake, Koshiba Akemi, Khan Khaleque N, Kusuki Izumi, Kitawaki Jo	4. 巻 107
2. 論文標題 Progesterone Receptor Status of Epithelial Cells as a Predictive Marker for Postoperative Recurrence of Endometriosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 1552 ~ 1559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/clinem/dgac118	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 -

1. 著者名 Tarumi Yosuke, Mori Taisuke, Okimura Hiroyuki, Maeda Eiko, Tanaka Yukiko, Kataoka Hisashi, Ito Fumitake, Koshiba Akemi, Kusuki Izumi, Kitawaki Jo	4. 巻 86
2. 論文標題 Interleukin 9 produced by helper T cells stimulates interleukin 8 expression in endometriosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 e13380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aji.13380	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 垂水洋輔、伊藤文武、沖村浩之、高岡 宰、古株哲也、小芝明美、楠木 泉、森 泰輔
2. 発表標題 当院における婦人科ロボット支援下手術導入時の成績と工夫
3. 学会等名 第13回京都婦人科鏡視下手術研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 垂水洋輔、青山幸平、片岡 恒、古株哲也、寄木香織、森 泰輔
2. 発表標題 卵巣癌初回化学療法前における審査腹腔鏡の有用性
3. 学会等名 第64回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 垂水洋輔、志村光揮、高岡 宰、片岡 恒、伊藤文武、小芝明美、カーンカレク、楠木 泉、森 泰輔、北脇 城
2. 発表標題 子宮内膜症上皮のプロゲステロンレセプターの発現レベルは 子宮内膜症再発に関与する
3. 学会等名 第43回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 垂水洋輔、前田英子、青山幸平、大谷真弘、片岡 恒、古株哲也、寄木香織、村島京子、千代延友裕、森 泰輔
2. 発表標題 子宮体癌を含む4臓器の異時性重複癌を認めたポリメラーゼ校正関連ポリポースの1例
3. 学会等名 第7回産科婦人科遺伝診療学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yosuke Tarumi, Taisuke Mori, Akemi Koshiba, Koki Shimura, Hiroyuki Okimura, Hisashi Kataoka, Fumitake Ito, Khaleque Khan, Izumi Kusuki, Jo Kitawaki
2. 発表標題 Low expression of progesterone receptor acts as a predictive factor for recurrence of ovarian endometrioma
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会 Congress Encouragement Award (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yosuke Tarumi, Taisuke Mori, Fumitake Ito, Akemi Koshiba, Hisashi Kataoka, Eiko Maeda, Hiroyuki Okimura, Takuya Sugahara, Koki Shimura, Kanae Ogawa, Maya Fujii, Izumi Kusuki, Khaleque Khan, Jo Kitawaki
2. 発表標題 Interleukin-9 produced by helper T cells induces inflammatory responses in endometriosis
3. 学会等名 14th World Congress on Endometriosis (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 垂水 洋輔
2. 発表標題 ヘルパーT細胞から分泌されたinterleukin-9は子宮内膜症のinterleukin-8の発現を亢進させる
3. 学会等名 第29回鴨和腫瘍カンファレンス(招待講演)
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