

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861472

研究課題名(和文)子宮内膜症における好中球の臨床的意義

研究課題名(英文)Clinical significance of neutrophils in the pathology of endometriosis

研究代表者

高村 将司 (Takamura, Masashi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40648565

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)：子宮内膜症モデルマウスにおいて、抗Gr-1抗体の投与による末梢血の好中球のみの除去効果と、抗NIMP-R14抗体にて病巣の好中球浸潤の抑制効果を確認した。好中球を病巣形成初期に除去した群では、病巣形成後やコントロール群に比べ、個数、総重量を抑制した。関連するサイトカイン濃度は有意差を示さなかった。プロバイオティクスを子宮内膜症モデルマウスに投与したところ、病巣形成後のプロバイオティクス投与により、子宮内膜症病巣形成に対する抑制効果を示した。そのメカニズムとしては好中球の遊走の抑制が影響する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We purified Anti Gr-1 antibody, and confirmed that intra peritoneal injection of this antibody to mice effectively depleted neutrophils from peripheral blood, without affecting other white blood cells. In endometriosis model mice, much less neutrophils were present at endometriotic lesions in depleted mice using NIMP14, a marker of neutrophils. The depletion of neutrophils suppressed the number and total weight of endometriosis at the initial phase, but not at the later phase. No significant difference were observed as to the concentration of inflammatory cytokines. Probiotics suppressed endometriotic lesion when administrated after the infusion of endometrium. Among white blood cell in the washed peritoneal fluid, only neutrophils were significantly decreased, which imply the mechanism of the suppression.

研究分野：子宮内膜症

キーワード：好中球 好中球除去 子宮内膜症 プロバイオティクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 子宮内膜症は子宮内膜類似組織が子宮外に発育・増殖する慢性増殖性疾患である。生殖年齢の約 10%が罹患するとされており、月経痛・慢性骨盤痛、不妊症、卵巣病変の悪性転化などにより著しく女性の QOL を低下させる疾患である。晩婚化に伴い増加しているといわれているものの、病態解明は進んでいない。

現行の治療法は、ホルモン治療が主流であるが、治療は挙児希望のある患者に使用できず、副作用が高頻度で出現するといった問題点を抱える。従って、ホルモンを介さない別の機序による治療の確立が強く望まれている。

(2) 子宮内膜症は、慢性炎症性疾患であり、種々の免疫細胞の異常が報告されている。我々は、子宮内膜症で IL-17A を分泌する好中球の存在を報告しており、好中球が、子宮内膜症の病態形成に深く関与していると考えている。

乳酸菌は、腸管免疫のみならず、全身の免疫系に影響を与えることから、ある種の慢性炎症性疾患に奏功するという報告があり、子宮内膜症に対しても有効に働く可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 子宮内膜症における好中球の役割を検証する。好中球の作用する時期や、どのような物質を介して、病変の形成に影響を与えるのか機序を検討する。

(2) 子宮内膜症における新たな治療ターゲットとして、好中球遊走に影響を与えるプロバイオティクスを経口投与し、病巣形成に与える影響をマウスモデルを用い考察する。

(3) 子宮内膜症は慢性炎症疾患であるが、炎症とエストロゲン産生との関連に関して不明な点があり、その関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 好中球を特異的に除去する中和抗体をハイブリドーマの培養から精製する。

子宮内膜症モデルマウスを作成し、好中球除去抗体で好中球除去による病変形成に与える効果をその抗体投与時期によってどのように変化が見られるか検証する。

(2) IL-17A 産生抑制作用を持つとされるアシドフィルス菌、カゼイ菌、ピフィズス菌、サーモフィルス菌のプロバイオティクス混合物を経口投与する。投与期間は、子宮内膜症作成前 3 週間投与する群と、子宮内膜症作成後から 2 週間投与する群、両時期に投与する群と、投与なしのコントロール群の 4 種類のマウス群を作成し、プロバイオティクスの効果を検証する。

(3) 手術によって得られる卵巣子宮内膜症より、間質細胞を分離培養する。IL-4 で刺激した際の HSD3B2 の発現を定量的 PCR 法にて解析した。JAK3 阻害剤を添加した際の発現量より、その機序を検討した。

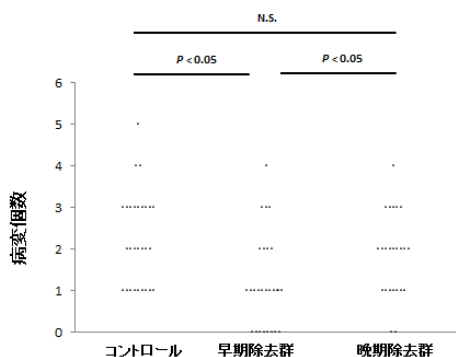
IL-4 と PGE2 との共刺激で HSD3B2 の発現変化を定量的 PCR 法にて検討した。

4. 研究成果

(1) 精製された抗 Gr-1 抗体の投与により、末梢血中の好中球は抗体投与 24 時間後及び 48 時間後に除去状態であることが確認され、単球及びリンパ球には影響が少ないことを確認した。また、子宮内膜症モデルにおいて、通常認められる病巣に浸潤する好中球が減少することを好中球に特異的なマーカーで確認した。

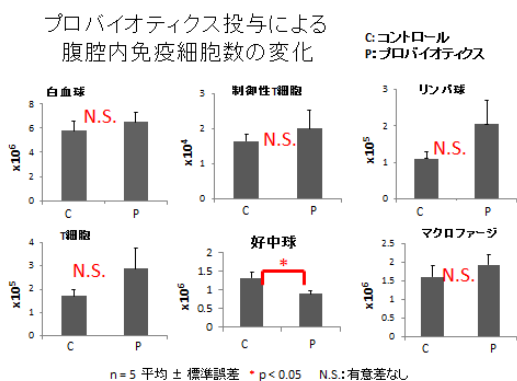
好中球除去抗体を病変形成前から 5 日間投与する群と、病変形成後に投与する群、コントロール群の 3 群で子宮内膜症病変形成に与える影響について検証したところ、早期除去群では、他の群に比べて、個数、総重量の減少を認めた ($p < 0.05$)。

(下記は各群の病変個数を示す)



(2) プロバイオティクスを子宮内膜症モデルマウスに経口投与したところ、病巣形成前のプロバイオティクス投与は、病変形成に影響を与えなかった。一方で病巣形成後のプロバイオティクス投与は病変の形成を抑制した。個数には影響を与えなかった。プロバイオティクスは性周期への影響を与えなかった。

プロバイオティクス投与中マウスの腹腔内貯留液中の免疫細胞の数をフローサイトメトリー法にて解析し、好中球数のみの減少を確認した。



腹腔内貯留液のサイトカイン、増殖因子濃度は IL-6、MIP2、MCP1、VEGF など、有意差はないもののプロバイオティクス投与群で減少傾向を示し、炎症の抑制が病変の機序と関連することが示唆された。

(3) 摘出したヒト卵巣子宮内膜症より得られた間質細胞に対して、IL-4 刺激したところ、3-ヒドロキシステロイド脱水酵素 (HSD3B2) の発現を亢進させた。この亢進作用は JAK3 阻害剤で阻害された。

IL-4 と PGE2 との共刺激で相乗的に HSD3B2 の発現を亢進し、エストロン産生を亢進させた。これは、局所の炎症がエストロゲン産生を亢進させるメカニズムの一つであると推測された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

Urata Y, Koga K, Takamura M, Fujii T, Osuga Y, IL-1 β increases expression of tryptophan 2,3-dioxygenase and stimulates tryptophan catabolism in endometrioma stromal cells, Am J Reprod Immunol., 査読有, Vol 72, No.5, 2014, pp.496-503, doi: 10.1111/aji.12282.

Urata Y, Osuga Y, Takamura M, Koga K, Kozuma S, Interleukin-4 and prostaglandin E2 synergistically up-regulate β 3-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in endometrioma stromal cells. J Clin Endocrinol Metab., 査読有, Vol 98, No.4, 2013, pp. 1583-90, doi: 10.1210/jc.2012-3475.

[学会発表] (計 13 件)

浦田陽子 高村将司, 子宮内膜間質細胞において IL-4 と PGE2 は beta hydroxysteroid dehydrogenase type2 を相乗的に誘導する 第 58 回日本生殖医学会・学術講演会 2013 年 11 月 15 日 兵庫県神戸市国際会議場

浦田陽子 高村将司, Interleukin(IL)-4 and prostaglandin(PG)E2 synergistically increase the expression of β 3-hydroxysteroid dehydrogenase type2(HSD3B2) in endometrioma stromal

cells、第66回日本産婦人科学会学術講演会、
2013年5月10日 北海道札幌市ロイトン札幌

〔図書〕(計2件)

高村 将司、甲賀 かをり、大須賀 穰、医
歯薬出版、医学のあゆみ 子宮内膜症 術後薬
物療法による子宮内膜症の長期管理
p1289-1292

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高村 将司 (TAKAMURA, Masashi)

東京大学・医学部付属病院女性外科・助教

研究者番号：40648565

(2) 研究分担者

特になし

(3) 連携研究者

特になし