

博士論文

論文題目

子宮内膜症患者における血清ビタミンD値および
子宮内膜症間質細胞に対する1,25-dihydroxy vitamin D₃の
効果についての検討

氏名 宮下真理子

目次

目次	1
要旨	2
序文	3
研究目的	8
方法	8
結果	18
考察	24
まとめ	31
おわりに	31
謝辞	32
引用文献	33
図表	40
略語一覧	69

要旨

子宮内膜症は慢性炎症疾患である。ビタミンD (VD) は近年、免疫系に作用すると報告がある。重症子宮内膜症患者の血清VD値が非子宮内膜症、軽症子宮内膜症患者に比べて有意に低いことを示した。子宮内膜症間質細胞においてVDの刺激により、IL-1 β やTNF- α に誘導されたIL-8 mRNA発現および蛋白産生の減少、IL-1 β に誘導されたPGE₂産生とPGE₂合成酵素 mRNA発現の減少および分解酵素 mRNA発現の増加、細胞数減少、DNA合成抑制、およびMMP-2、MMP-9 mRNA発現の減少が示され、これらはNF κ B経路の不活性化による可能性が示唆された。VDが新たな治療薬となる可能性が示唆された。

序文

子宮内膜症は生殖可能年齢女性の6-10 %に認められるエストロゲン依存性の慢性炎症疾患であり、病理学的には、子宮内膜類似組織が子宮外に認められる疾患である¹⁻³。本邦における患者数は約13万人と推定されており、発症年齢は平均31.1歳と報告されている⁴。症状として月経困難症や骨盤痛、排便痛、下血、性交痛、不妊症を呈することが知られており、骨盤痛を認める10代女性の50-60 %、不妊女性の50 % 程度に子宮内膜症を認めると報告されており²、生殖可能年齢女性の健康を著しく害するものである²。子宮内膜症の病態に炎症や免疫反応 (Interleukin-8; IL-8 などのサイトカイン産生やプロスタグランジン産生など)、浸潤 (Matrix Metalloproteinase; MMP) が関与しているとされるが^{5,6}、これらの反応を制御することは十分に解明されていない。

IL-8 は、炎症性サイトカインの刺激により白血球をはじめとして、線維芽細胞や内皮細胞など種々の細胞から産生される白血球遊走因子 (leukocyte chemotactic factor) である。*in vivo*、*in vitro* において好中球、T細胞、好塩基球に対するさまざまな生物活性が認められている。例えば、好中球への代表的な作用は走化性活性 (chemotaxis) および好中球の脱顆粒・酵素放出 (exocytosis) であり、生体における炎症形成の重要なメディエーターと考えられる。子宮内

膜症患者の腹水中ではIL-8 濃度が有意に高く、さらにそれは子宮内膜症の重症度と相関する。また、子宮内膜症間質細胞にIL-8 を添加すると、細胞数やDNA合成が増加することより、子宮内膜症の病態形成にIL-8 が関与することが示唆されている⁷。子宮内膜症患者の腹水において好中球の走化性が活性化されていること⁸や、子宮内膜症病変において炎症性好中球が存在すること⁹からも病態形成へのIL-8 の関与が強く示唆されている。プロスタグランジンE₂(PGE₂) はアラキドン酸を前駆体とする炎症性物質で、子宮内膜症を悪化させる働きをしていることは既に報告がある¹⁰。PGE₂ はアポトーシスを抑制し、増殖を亢進し、血管新生を促進して、病態形成を促進していることも知られている。子宮内膜症患者の腹腔内貯留液内PGE₂ 濃度が上昇していることも報告されている¹¹。また、PGE₂ はエストロゲンの一種であるエストラジオールを合成する酵素であるアロマターゼの発現を亢進させることが知られており、子宮内膜症の病態生理にプロスタグランジン経路が重要な役割を果たしていることが知られている¹²(図1)。MMP は、細胞外マトリックス (ECM) を分解し、組織破壊に関与する蛋白質分解酵素である。特にMMP-2 やMMP-9 は組織、細胞および血中に存在し、癌の浸潤、転移に関与していることが知られている。子宮内膜症でも血清中や組織中でMMP-2やMMP-9の高値が報告されている^{13,14}ことから、子宮内膜症病変の浸潤にMMPが関与している可能性が考えられる。

治療法としては、手術療法と薬物療法に限られる。薬物による子宮内膜症の治療戦略としては、GnRH (Gonadotropin releasing hormone) アナログ、低用量ピル、プロゲスチン製剤などのホルモン治療に限られており、排卵や卵胞発育を抑制するため、妊娠を望む患者は治療を受けることができない¹⁵。手術療法を選んだ場合にも術後に再発予防のためにこれらの薬が推奨されるが、妊娠を望む患者に用いることができない¹⁵。

ビタミンDは、多面的な分子であり、生体内で様々な活性を示す¹⁶。骨格形成や血清カルシウム濃度の制御に加えて、ビタミンDが免疫系に作用することが近年報告されている¹⁷。たとえば、*in vitro* において樹状細胞を寛容型樹状細胞に分化、誘導させたり^{18,19}、樹状細胞の分化や成熟を抑制したり^{20,21}、マクロファージの遊走や接着、サイトカイン産生を抑制したり^{22,23}、Tリンパ球の増殖、サイトカイン産生を抑制する^{24,25}。

体内のビタミンDの大半は皮膚において紫外線の照射によって生成される¹⁷。皮膚で生成されたビタミンDはvitamin D₃ であり、生体内では不活性型である。肝臓において25-hydroxy vitamin D₃ (25(OH)D₃) に変換され、腎臓において活性型である1,25-dihydroxy vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) に変換される (図2)。小児におけ

るビタミンD不足がくる病を引き起こすことはよく知られる²⁶。最近では、ビタミンD欠乏が関節リウマチ²⁷、炎症性腸疾患²⁸、および乳癌²⁹や口腔扁平上皮癌³⁰などの悪性腫瘍といった炎症性疾患と関連があることが注目されている。生殖医療の分野においても、ビタミンD低値が不育症³¹や体外受精における着床率の低さ³²と関連があることが指摘されている。

ビタミンDと子宮内膜症の関係についてはいくつか報告されている (表2)。血清ビタミンD値との関連の報告は4つあるが、結果は一致しない。子宮内膜症患者において血清25(OH)D₃ 値が高い³³、血清25(OH)D 値が変わらない^{34,35}、低い³⁶という報告がそれぞれあり、血清1,25(OH)₂D 値に関しては、子宮内膜症患者において血清1,25(OH)₂D₃ 値が変わらない³³、血清1,25(OH)₂D 値が高い³⁴、という報告がある。測定方法はビタミンD binding protein を用いたCompetitive protein binding assay (競合的結合蛋白測定法) やサンプルからの微弱発光を測定する化学発光検出法、抗体を用いたRadioimmunoassay やEnzyme immunoassay など、様々な方法が用いられている。血清ビタミンD 値は、日照時間によって変動することが知られている³⁷。また、月経周期や子宮内膜症の重症度が血清ビタミンD値に影響を与えている可能性も考えられる。そこで、本研究では日本人の子宮内膜症患者での血清ビタミンD値をRadioimmunoassay 法で測定することとし、

それらの影響をできるだけ少なくするために、血清を秋から冬にかけて採取し、患者の月経周期を増殖期のみと限定した。また近年、従来のイムノアッセイ法ではビタミンD代謝物を測りこんでしまう可能性があり、特異性が十分ではない³⁸、と指摘されているため、血清25(OH)D 値に関しては、液体クロマトグラフィー質量分析法でも測定を行った。

子宮内膜症に関する研究でビタミンDを用いたものは少ない。治療的な効果として、選択的ビタミンD受容体作動薬であるelocalcitol がマウスモデルで子宮内膜症病変を縮小させることが知られているが³⁹、機序は明らかではない。ビタミンDの抗炎症、抗増殖、抗浸潤効果については関節リウマチにおける滑膜線維芽細胞⁴⁰、乾癬における樹状細胞⁴¹および癌細胞⁴²での研究で示されている。そこで、今回ヒト子宮内膜症間質細胞を用いて、1,25(OH)₂D₃ の抗炎症、抗増殖、抗浸潤効果について*in vitro* 実験において明らかにすることとした。

研究目的

子宮内膜症患者における血清ビタミンD値を測定し、ビタミンD欠乏について検討した。ヒト子宮内膜症間質細胞に対する活性型ビタミンD (1,25(OH)₂D₃) の *in vitro*での抗炎症、抗増殖、抗浸潤効果を検討した。

方法

子宮内膜症患者および非子宮内膜症患者からの血清サンプルの採取

血清サンプルは37名の非子宮内膜症患者(年齢: 32.8 ± 1.05 , mean \pm SD、おもに非子宮内膜症性卵巣嚢腫患者)、17名のステージI、IIの子宮内膜症患者(年齢: 35.4 ± 1.64)および22名のステージIII、IVの子宮内膜症患者(年齢: 34.6 ± 1.53)から採取した。患者はすべて日本人であり、ビタミンD製剤やサプリメントの服用はしていなかった。すべての血清サンプルは1998年から2014年の、10月(秋)から3月(冬)に採取された。月経周期はすべて増殖期であった。子宮内膜症のステージ分類はthe revised American Society for Reproductive Medicine (ASRM) classificationによってなされた⁴³。

血清ビタミンD値の測定

手術前に採取された末梢血は遠心分離後に- 80 °Cに凍結保存された。

25-hydroxy vitamin D、1,25-dihydroxy vitamin D をRadioimmunoassay 法にて測定した。測定は株式会社エスアールエルに依頼し、25-hydroxy vitamin D を 25-Hydroxyvitamin D¹²⁵I RIA Kit (DiaSorin) を用い、1,25-dihydroxy vitamin D を 1,25(OH)₂D RIAキットTFB (Immunodiagnostic systems limited) を用いて測定された。前処理後の検体中の25(OH)D や1,25(OH)₂D と抗体試液中の抗体を反応させた後、¹²⁵I-25-(OH)D₃ や¹²⁵I-1,25(OH)₂D₃ を加え、競合反応を行い、次にB/F 分離剤(セルロース結合抗ヒツジIgG抗体)を加え、反応後の抗体を沈殿させ未反応のトレーサーを除去後、沈殿物の放射線量を測定した。2群間の比較に対し Mann-Whitney U-test を用いた。また近年、従来のイムノアッセイ法ではビタミンD代謝物を測りこんでしまう可能性があり、特異性が十分ではない³⁸、と指摘されているため、Radioimmunoassay 法による結果の妥当性を検証するために、さらに血清サンプルを非子宮内膜症患者および子宮内膜症患者から採取し、25-hydroxy vitamin D に関してRadioimmunoassay 法と液体クロマトグラフィー質量分析法でも測定を行い、相関を検討した。液体クロマトグラフィー質量分析法の測定は株式会社LSIメディエンスに依頼し、オリジナルの方法で測定された。

卵巣子宮内膜症組織のサンプル採取

卵巣子宮内膜症組織は、腹腔鏡下もしくは開腹下に切除された子宮内膜症性卵巣嚢胞より採取した (n=35, 年齢: 36.7 ± 6.42)。術前3カ月以内に性ステロイドホルモンやGnRH アゴニストを投与されていない患者より組織を得た。関節リウマチやSLE などの免疫学的異常に関連している疾患を合併している患者は除外した。子宮内膜症の診断は、病理学的に行った。培養実験には、子宮内膜症性卵巣嚢胞より無菌下に採取した嚢胞壁を卵巣子宮内膜症組織として用いた。

検体採取に関して東京大学倫理委員会の承認を受けており、血清サンプルおよび卵巣子宮内膜症組織については承認番号324である。手術前に患者より書面によるインフォームド・コンセントを得た。

子宮内膜症間質細胞の分離および培養

子宮内膜症間質細胞 (endometriotic stromal cells: ESC) は、以前に当研究室で報告した方法を用いた^{44,45}。卵巣子宮内膜症組織はカミソリを用いて細切した後、type I collagenase (0.25 %, WAKO, Tokyo, Japan), deoxyribonuclease I recombinant (15 IU/ml, WAKO, Tokyo, Japan), trypsin (0.006%, Gibco, Grand Island, NY)およびHEPES (0.02M, Gibco) を含んだDMEM/F12溶液 (Gibco) に入れ、37 °Cで1~2時間攪拌した。攪拌した溶液を、100 μ m のセルストレーナー (Becton Dickinson and

Co, Franklin Lakes, New Jersey) で2回濾過した後、70 μm のセルストレーナー (Becton Dickinson and Co) で1回濾過した。濾過液を250 x gで5分遠心分離して得られたペレットがESC である。ESC は、PBS (リン酸緩衝生理食塩水) で2回洗浄した後、5 % FBS (仔ウシ血清, Bio West, Nuaille, France) および抗生剤 (ペニシリン 100 U/ml、ストレプトマイシン 0.1 mg/ml、アンフォテリシンB 0.25 mg/ml) を含んだDMEM/F12 に懸濁し、100 mm ディッシュ (Iwaki, Asahi technology Co, Tokyo, Japan)で、5 % CO₂、37 °Cの条件で加湿培養した。1から2日後、0.25 % トリプシンEDTA 処理を行い、細胞の継代を行った。細胞は6穴、12穴、および24穴プレートに2 x 10⁵ 個/ml で、96穴プレートに1 x 10⁴ 個/ml で初回継代を行った。ESC の純度を確認するため、抗vimentin 抗体 (間質細胞)、抗cytokeratin 抗体 (上皮細胞)、抗CD45 抗体 (単球および他の白血球)を用いて、細胞免疫染色を行った。Vimentin 陽性細胞が98 %以上であること、cytokeratin およびCD45 陽性細胞が1 % 以下であることを確認した。

ESCの刺激

継代して2-3日後に、細胞密度がコンフルエントに近づいたときに実験を行った。

IL-1 β やTNF- α に誘導されたIL-8 mRNA 発現を検討するために、ESC に

2%FBS とともにIL-1 β (5 ng/ml) または TNF- α (10 ng/ml) と1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-7} M) を添加し、1、3、6、24時間培養した。用いる1,25(OH) $_2$ D $_3$ の濃度は、血清中の濃度とほぼ一致する 10^{-7} M ~ 10^{-6} M 以下とした。

IL-1 β に誘導されたCyclooxygenase-2 (COX-2)、microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1)、microsomal prostaglandin E synthase-2 (mPGES-2)、cytosolic prostaglandin E synthase (cPGES)、15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) mRNA 発現を検討するために、ESC に2%FBS とともにIL-1 β (5 ng/ml) と1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-7} M) を添加し、3時間培養した。

IL-1 β やTNF- α に誘導されたIL-8 とPGE $_2$ の産生を検討するために、ESC に2%FBS とともにIL-1 β (5 ng/ml) と1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-9} ~ 10^{-7} M) を添加し、24時間培養した。

ESC のDNA 合成や細胞数を検討するために、ESC に2%FBS とともに1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-6} M) を添加し、24時間培養した。

ESCのアポトーシスを検討するために、ESC に5%FBS とともに1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-6} M) を添加し、24時間培養した。

MMP-2、MMP-9 mRNA 発現を検討するために、ESC に2%FBS とともに1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-7} M) を添加し、24時間培養した。

NF κ B (nuclear factor-kappa B) 活性に対する影響を検討するために、TNF- α に

よりリン酸化、分解が誘導されるI κ B (inhibitor κ B) α の蛋白発現を調べた。ESC にTNF- α (10 ng/ml) を5、10、20、60分間添加し、細胞蛋白を回収した。次に、ESC に2%FBS とともに1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10 $^{-7}$ M) を添加し、24時間培養したのち、TNF- α (10 ng/ml) を添加し、5分間刺激した。

RNAの抽出、real-time quantitative PCR

培養細胞からのRNA 抽出はRNA easy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて、プロトコールに従って行った。抽出されたRNA をRT-PCR kit (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて、プロトコールに従ってcDNA に逆転写した。

IL-8、COX-2、mPGES-1、mPGES-2、cPGES、15-PGDH、MMP-2 およびMMP-9 の遺伝子発現を解析するために、SYBR Green I Master を用いてreal-time quantitative PCR を行った。測定はtriplicate にておこない、データ解析はLightCycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて行った。IL-8、COX-2、mPGES-1、mPGES-2、cPGES、15-PGDH、MMP-2 およびMMP-9 の遺伝子発現はGAPDH mRNA をinternal standard として標準化し、表1の通りのプライマーを用いた。PCR 条件は、以下の通りである。IL-8 は95 $^{\circ}$ C10秒、66 $^{\circ}$ C10秒、72 $^{\circ}$ C11秒を40サイクル行った。COX-2 は95 $^{\circ}$ C10秒、66 $^{\circ}$ C10秒、72 $^{\circ}$ C13秒を55サイクル行った。mPGES-1 は95 $^{\circ}$ C10秒、60 $^{\circ}$ C10秒、72 $^{\circ}$ C5秒を40サイク

ル行った。mPGES-2 は95°C10秒、66°C10秒、72°C8秒を40サイクル行った。
cPGES は95°C10秒、66°C10秒、72°C8秒を40サイクル行った。15-PGDH は95°C
10秒、55°C10秒、72°C6秒を40サイクル行った。MMP-2 は95°C10秒、62°C10秒、
72°C10秒を45サイクル行った。MMP-9 は95°C10秒、62°C10秒、72°C8秒を45サ
イクル行った。GAPDH は95°C10秒、64°C10秒、72°C18秒を30サイクル行った。
全てのPCR はmelting curve を確認した。

IL-8測定

培養上清を回収し、遠心分離後に- 80 °C にて凍結保存した。培養上清中の
IL-8濃度を特異的ELISA キット(R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いてプ
ロトコールにしたがって測定した。キットの測定下限は31 pg/ml、交差反応や
干渉は無かった。測定はquadruplicate にておこない、その平均を用いた。

PGE₂測定

培養上清中のPGE₂ 濃度を特異的EIAキット(Cayman, Ann Arbor, MI) を用いて
プロトコールにしたがって測定した。キットの測定下限は7.8 pg/ml、coefficient
variation はintra-assay で $8.8 \pm 3.2 \%$ (mean \pm SEM) 、inter-assay で $15.6 \pm 3.2 \%$ だ
った。測定はquadruplicate にておこない、その平均を用いた。

生細胞数測定

生細胞数測定にはCell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いてプロトコールにしたがって測定した。1,25(OH)₂D₃ で刺激後のESC に10 μl のcell counting kit solutions を培養液中に加えて、37 °C で2時間、培養を追加した。450 nm の吸光度をEpoch Microplate Spectrophotometer system (BioTek, Winooski, Vermont) を用いて測定した。測定はhexaplicate にておこない、その平均を用いた。

BrdU再取り込み法

DNA 合成を評価するために、Biotrak cell proliferation ELISA system (GE Healthcare, Piscataway, NJ) を用いてプロトコールにしたがって測定した。1,25(OH)₂D₃ で刺激後のESC に10 μl のBrdU solutions を培養液中に加えて、37 °C で2時間、培養を追加した。上清を取り除いた後、200 μl の固定剤を加え、ESC を固定し、DNA を変性させた。新しく合成されたDNA に再取り込みされたBrdU とperoxidase-labelled anti-BrdU が結合した複合体を検知し、450 nm の吸光度をEpoch Microplate Spectrophotometer system (BioTek) を用いて測定した。測定はhexaplicate にておこない、その平均を用いた。

アポトーシスの評価

アポトーシスを評価するために、the Annexin V-EGFP Apoptosis detection kit (Abcam, Cambridge, UK) を用いてプロトコールにしたがって測定した。ESC を 0.25 % Trypsin-EDTA 処理し、2回PBS で洗浄した後、1 x Binding Buffer で攪拌した。5 ml culture tube にうつし、2 μ l の annexin V-FITC と 2 μ l の propidium iodide (PI) を加え、遮光して、4 $^{\circ}$ C で10分間静置した。細胞集塊を除くために 40 μ m nylon mesh (BD Biosciences) で濾過した。フローサイトメトリー (FACS Calibur and Cell Quest Pro, BD Biosciences) にて分析した。Annexin V 陽性細胞をアポトーシス陽性細胞とし、10000細胞中のアポトーシス陽性細胞数を測定した。最低3回繰り返し実験を行い、平均を用いた。

ウエスタン・ブロッティング法

NF κ B 活性に対する効果を調べるためにTNF- α によりリン酸化、分解が誘導されるI κ B α の蛋白発現についてウエスタン・ブロッティング法にて調べた。6穴プレートで培養したESC より proteinase inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) を含むcell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Beverly, MA,) を用いて蛋白を抽出した。蛋白(20 μ g) を10 % SDS-PAGEにて電気泳動し、polyvinyl difluoride membrane (Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK) に転写させた。抗ヒトI κ B α

抗体 (1:1000; Cell Signaling Technology) を1次抗体として用い、4 °C overnight 反応させた。2次抗体として、anti-rabbit horseradish peroxidase antibody (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) を用い、室温 60分反応させた。ECL Western blotting system (Amersham) を用いて信号を検出した。

統計分析

データはJMP ソフトウェア (Ver. 10.0, SAS Institute Inc. Cary, North Carolina) を用いて解析した。多重比較の際にはANOVA 分析の後、post hoc test として Tukey's test を行った。2群間比較にはStudent's t test を行った。血清ビタミンD 値の解析には、Mann-Whitney U-test を用いた。 $P < 0.05$ を統計学的有意とした。

結果

重症子宮内膜症患者の血清ビタミンD値は非子宮内膜症患者、軽症子宮内膜症患者に比べて、有意に低かった。

子宮内膜症患者における低ビタミンD血症の程度を調べるため、非子宮内膜症患者、軽症子宮内膜症患者、および重症子宮内膜症患者における血清25-hydroxy vitamin D および1,25-dihydroxy vitamin D 値をRadioimmunoassay 法で測定し図3、4に示した。重症子宮内膜症患者における血清25-hydroxy vitamin D 値は 17.2 ± 1.1 ng/ml であり、非子宮内膜症患者 (21.8 ± 1.3 ng/ml)、軽症子宮内膜症患者 (21.5 ± 1.4 ng/ml) に比べて有意に低かった ($P < 0.05$)。また、追加して採取した血清サンプルの血清25-hydroxy vitamin D 値をRadioimmunoassay 法とともに液体クロマトグラフィー質量分析法 (LS-MS/MS) で測定したところ、強い相関を示した ($P < 0.001$ 、図5)。血清1,25-dihydroxy vitamin D 値に関しては、3群間で有意な差を認めず、非子宮内膜症患者と子宮内膜症患者との間で、明らかな傾向は認められなかった。重症子宮内膜症患者において、血中ビタミンDが欠乏している可能性が示唆された。

1,25-dihydroxy vitamin D₃ の刺激でESC によるIL-1 β に誘導されたIL-8 の mRNA 発現および蛋白産生は有意に減少した。

1,25(OH)₂D₃ のESC に対する抗炎症効果を調べるためにIL-1 β に誘導されたIL-8 の発現について調べた。ESC にIL-1 β とともに1,25(OH)₂D₃ を添加し、6時間培養したところ、IL-8 mRNA 発現がコントロールと比較し67.4 % に有意に減少し、24時間培養したところ、コントロールと比較し72.1 % に有意に減少した (n=5、*P*<0.05、図6)。また、ESC にIL-1 β とともに1,25(OH)₂D₃ を添加し、24時間培養したところ、1,25(OH)₂D₃ はIL-8 の蛋白産生を有意に抑えた (n=6、*P*<0.05、図7)。1,25(OH)₂D₃ はIL-1 β に誘導されたIL-8 の産生を抑えることが示された。

1,25-dihydroxy vitamin D₃ の刺激でESC によるTNF- α に誘導されたIL-8 の mRNA 発現および蛋白産生は有意に減少した。

1,25(OH)₂D₃ のESC に対する抗炎症効果を調べるためにTNF- α に誘導されたIL-8 の発現について調べた。ESC にTNF- α とともに1,25(OH)₂D₃ を添加し、6時間培養したところ、IL-8 mRNA 発現が80.0 % に有意に減少した (n=5、*P*<0.05、図8)。また、ESC にTNF- α とともに1,25(OH)₂D₃ を添加し、24時間培養したところ、1,25(OH)₂D₃ はIL-8 の蛋白産生を有意に抑えた (n=6、*P*<0.05、図9)。

1,25(OH)₂D₃ はTNF- α に誘導されたIL-8 の産生を抑えることが示された。

1,25-dihydroxy vitamin D₃ の刺激でESC によるIL-1 β に誘導されたPGE₂ の産生が有意に減少し、PGE₂ 合成酵素のmRNA 発現は有意に減少し、分解酵素のmRNA 発現は有意に増加した。

1,25(OH)₂D₃ のESC に対する抗炎症効果を調べるためにIL-1 β に誘導されたPGE₂ の産生について調べた。ESC にIL-1 β とともに1,25(OH)₂D₃ を添加し、24時間培養したところ、1,25(OH)₂D₃ はPGE₂ の産生を用量依存性に有意に抑制した (n=4、 $P<0.05$ 、図10)。また、ESCにIL-1 β とともに1,25(OH)₂D₃ を添加し、3時間培養したところ、1,25(OH)₂D₃ はPGE₂ の合成酵素であるCOX-2、mPGES-1 およびmPGES-2 のmRNA 発現を有意に減少し、PGE₂ の分解酵素である15-PGDH のmRNA 発現を有意に増加した (n=4、 $P<0.05$ 、図11)。その他の合成酵素であるcPGES のmRNA 発現には1,25(OH)₂D₃ による影響はなかった (n=4、図11)。1,25(OH)₂D₃ はPGE₂ 合成酵素の発現を抑制し、PGE₂ 分解酵素の発現を増加させ、PGE₂ の産生を抑えることが示された。

1,25-dihydroxy vitamin D₃ の刺激でESC の細胞数、DNA 合成を有意に抑制した。

1,25(OH)₂D₃ のESC に対する抗増殖効果を調べるために、1,25(OH)₂D₃ 添加後の細胞数、DNA 合成、アポトーシスについて調べた。ESC に1,25(OH)₂D₃ を添加し、24時間培養した。生細胞測定はhexaplicate にておこない、その平均を用いた。5名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に実験を行った中で典型的な結果を示した (図12)。5名の女性から得られた結果の平均で、コントロール群の値を100 % として比較したところ、1,25(OH)₂D₃ 添加群で90.0 % に有意に減少させ、2群間に有意差を認めた (n=5, P<0.05)。また、BrdU の再取り込みをhexaplicate にて測定し、その平均を用いた。11名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に実験を行った中で典型的な結果を示した (図13)。11名の女性から得られた結果の平均で、コントロール群の値を100 % として比較したところ、1,25(OH)₂D₃ 添加群で73.5 % に有意に減少させ、2群間に有意差を認めた (n=11, P<0.05)。Annexin 陽性細胞数の測定は、7名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に最低3回繰り返し実験を行い、平均、コントロール群に対する1,25(OH)₂D₃ 群の比をそれぞれ示した (n=7、表3)。実験結果にはばらつきがみられ、一定の傾向は得られなかった。1,25(OH)₂D₃ はBrdU の再取り込みを抑え、生細胞数を減少させることが示された。

1,25-dihydroxy vitamin D₃ はESC のMMP-2 およびMMP-9 のmRNA 発現を有意に減少した。

1,25(OH)₂D₃ のESC に対する抗浸潤効果を調べるためにMMP-2、MMP-9 の発現について調べた。ESC に1,25(OH)₂D₃ を添加し、24時間培養したところ、MMP-2 およびMMP-9 のmRNA 発現をそれぞれコントロールに比べて68.4 %、65.6 % に有意に抑制した (n=5、*P*<0.05、図14)。1,25(OH)₂D₃ はMMP-2 およびMMP-9 のmRNA 発現を抑え、抗浸潤効果をもつことが示された。

1,25-dihydroxy vitamin D₃ の刺激でTNF- α に抑制されたESC におけるI κ B α の蛋白発現に有意に増加させた。

1,25(OH)₂D₃ のESC におけるNF κ B 活性に対する影響を調べるためにTNF- α によりリン酸化、分解が誘導されるI κ B α の蛋白発現について調べた。ESC にTNF- α を5、10、20、60分間添加し、細胞蛋白を回収した。I κ B α 抗体を用いてウエスタン・ブロッティング法で蛋白を同定した。図15 (a) に代表的な結果を示した。TNF- α 添加5分後にかけてI κ B α 蛋白量が減少し、20分後以降回復した。次に、ESC に1,25(OH)₂D₃ を添加し24時間培養した後、細胞蛋白を回収した。I κ B α 抗体を用いてウエスタン・ブロッティング法で蛋白を同定した。図15 (b)

に代表的な結果を示した。コントロール群と1,25(OH)₂D₃ 添加群において、IκBα 蛋白量に違いを認めなかった。次に、TNF-α 添加5分後にIκBα 蛋白の分解が進むことを確認したため、ESC に1,25(OH)₂D₃ を添加し24時間培養した後、TNF-α を5分間添加した。図15 (c) に代表的な結果を示した。4名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に実験を行い、蛋白量を定量した。TNF-α 添加および1,25(OH)₂D₃ 非添加群ではIκBα の蛋白発現がコントロールに比べて34.0 % に減少するのに対し、TNF-α 添加および1,25(OH)₂D₃ 添加群では減少を有意に抑制した (n=4、P<0.05、図15 (d))。1,25(OH)₂D₃ はTNF-α によるIκBα の分解を抑制し、NFκB の核内移行シグナルの核への移行を抑制することが示された。

考察

本研究において、非子宮内膜症患者、軽症子宮内膜症患者に比べて、重症子宮内膜症患者において血清25-hydroxy vitamin D 値が有意に低いことが示された。次に、ESC を用いた*in vitro* 実験では、IL-8 発現、PGE₂ 産生、MMP mRNA 発現などのIL-1 β やTNF- α に誘導された炎症反応を1,25-dihydroxy vitamin D₃ が有意に抑制することが示された。さらに1,25-dihydroxy vitamin D₃ はESC の生細胞数を有意に減少させ、DNA へのBrdU 再取り込みを抑制したが、アポトーシスには結果にばらつきがみられ、一定の傾向は認めなかった。また、1,25-dihydroxy vitamin D₃ はESC におけるNF κ B 活性も有意に抑制することも示された(図16-18)。これらの結果からビタミンDの欠乏が子宮内膜症の病態形成に関与していることが示唆され、子宮内膜症の管理においてビタミンDの投与で治療的な効果が得られる可能性が示唆された。

低ビタミンD血症と子宮内膜症との関連については既に報告されているが³⁶、子宮内膜症患者において血清25-hydroxy vitamin D₃ 値が高い³³という報告や関連がない^{34,35}とした報告もあり、一定の見解は得られていない。これらは人種や居住地によるところも大きいと思われる。日照時間によって、血清ビタミンD値が変動することも知られており³⁷、季節の影響⁴⁶や月経周期、重症度などが影響し

ている可能性もある。本研究では、それらの影響を少なくするために、血清を秋から冬にかけて採取し、患者の月経周期を増殖期のみとした。また子宮内膜症を、ステージI、II 期を軽症とし、ステージIII、IV 期を重症とし、非子宮内膜症患者群とともに3群に分けて検討することとした。結果よりビタミンD欠乏が子宮内膜症の進行に寄与することが示唆された。しかし、1,25-dihydroxy vitamin D 値に関しては、非子宮内膜症患者と子宮内膜症患者との間、子宮内膜症の重症度で一定の傾向を認めなかった。1,25-dihydroxy vitamin D₃ は生体内において活性型ビタミンDとして代謝されることから、*in vitro* の実験で用いる場合は有用である。しかし、半減期が短いため、ビタミンDの体内動態を把握するには適していない⁴⁷。一方、25-hydroxy vitamin D₃ は非活性型とされるが、ビタミンD貯蔵を把握するのに有用とされる⁴⁸。たとえば、腎移植において、致死率や移植失敗率は血清25-hydroxy vitamin D 値とは関連を認めるが、血清1,25-dihydroxy vitamin D 値とは関連を認めない⁴⁹。子宮内膜症患者における血清1,25-dihydroxy vitamin D 値についての報告は少ないため、今回日本人患者において測定することで何らかの傾向が得られることが期待されたが、得られなかった。しかし、腎移植研究と同様に血清25-hydroxy vitamin D 値とは関連を認めるが、血清1,25-dihydroxy vitamin D 値とは関連を認めないことがわかったことは有意義であったと思われる。

1,25-dihydroxy vitamin D₃ の添加によりESC での炎症反応は著明に抑制された。ビタミンDがサイトカインの産生を抑えるという報告は産婦人科領域だとトロフォブラスト⁵⁰、胎盤⁵¹、脱落膜細胞⁵²および不死化平滑筋細胞⁵³などを用いて、流産、早産や妊娠高血圧症候群に関する研究でされている。本研究においても、子宮内膜症における炎症を生体内で1,25-dihydroxy vitamin D₃ が制御することが示唆された。

癌や気管支喘息などの炎症性疾患の領域でビタミンDがプロスタグランディン経路を制御するという報告は多数みられる。たとえば、1,25-dihydroxy vitamin D₃ が乳癌⁴²や前立腺癌細胞⁵⁴においてCOX-2 の発現を抑制し、乳がん細胞において15-PGDH の発現を高めると報告されている。他にも肺の線維芽細胞で1,25-dihydroxy vitamin D₃ がPGE₂ 産生やIL-1β に誘導されたmPGES-1 の発現を抑え、15-PGDH を高めることが知られている⁵⁵。本研究においても、1,25-dihydroxy vitamin D₃ がPGE₂ 産生やCOX-2、mPGES-1、mPGES-2 などのプロスタグランディン合成酵素のmRNA 発現を抑え、プロスタグランディン分解酵素である15-PGDH のmRNA 発現を高めることが示された。子宮内膜症の病態生理にプロスタグランディン経路が重要な役割を果たしており¹²、これらの結果がビタミンDによる子宮内膜症の進展制御の機序の解明につながるものと思

われる。

また、本研究では1,25-dihydroxy vitamin D₃ はアポトーシスには一定の傾向を認めず、DNA 合成を抑えることで、ESC の細胞数を著明に減少させた。正常細胞⁵⁶や癌細胞^{32,42,57}においてビタミンDがアポトーシスを誘導することが知られている。一方、子宮内膜症ではESC で抗アポトーシス因子であるBcl-2 の発現が高く、通常子宮内膜などでアポトーシスを誘導するIFN-r (interferon gamma) でESC のアポトーシスが誘導されない、アポトーシス抵抗性が以前より報告されている⁵⁸。同様に、子宮内膜に比べてESC ではアポトーシスが起こりにくく、抗アポトーシス蛋白であるsurvivin が子宮内膜に比べて、ESC で発現が高いことも報告されている。加えて、survivin をノックアウトするとアポトーシスが誘導されることも知られている⁵⁹。Survivin の遺伝子発現を何が制御しているかに関してはDNA のメチル化などのエピジェネティックな修飾が関与しているという報告もあるが、明らかになっていない⁶⁰。本研究では1,25-dihydroxy vitamin D₃ によるESC のアポトーシスへの誘導に対して検討を行ったが、一定の傾向を認めなかった。患者のプロファイルには有意な偏りを認めず、検体数を増やして、さらに検討を行ったが、一定の傾向を認めなかった。これは一部の検体において、アポトーシス抵抗性のために1,25-dihydroxy vitamin D₃ がアポトーシス

を誘導しなかった可能性があり、抗アポトーシス因子の発現の検討や、アポトーシスを誘導する物質とともに1,25-dihydroxy vitamin D₃ を添加し検討を行うなど、研究をすすめる必要がある。

ビタミンDは子宮体癌⁶¹や子宮筋腫⁶²において、MMP の発現を制御することが知られている。血清中や組織中でのMMP-2 やMMP-9 の高値が子宮内膜症の病態形成に関与しているという報告もある^{13,14}。子宮内膜症マウスモデルにおいて、ビタミンDの投与でMMP-9 の発現が下がるという報告もある⁶³。本研究においては、1,25-dihydroxy vitaminD₃ がMMP mRNA の発現を有意に減少させた。ビタミンDがMMP 産生を抑制し、抗浸潤効果をもつ可能性が示唆された。今後、抗浸潤効果についてさらに解明するためにはinvasive assay や移植モデルなどを用いて、研究をすすめる必要がある。

最後に本研究では、1,25-dihydroxy vitamin D₃ が子宮内膜症間質細胞において、NFκB の活性を抑えることを示した。NFκB はサイトカイン⁶⁴やプロスタグランディンの産生⁶⁴⁻⁶⁷、MMP の発現⁶⁸⁻⁷⁰、細胞増殖⁷¹などに関与している。不活性化NFκB は細胞質に優位に存在し、IκB と結合することにより活性を抑制されている。TNF-α などによりIκBα のセリン残基をリン酸化する酵素複合体である

I κ B キナーゼ (IKK) が活性化されると、I κ B α はプロテアソームにより分解を受ける。これによりNF κ B の核内移行シグナル (p65、p50) が露出し、核に移行し、標的遺伝子の転写を促進する (図18)。本研究では、1,25-dihydroxy vitamin D₃ がESC においてTNF- α によるI κ B α の分解を抑制し、NF κ B の核内移行シグナルの核への移行を抑制することが示唆された。ここから1,25-dihydroxy vitamin D₃ による抗炎症、抗増殖、抗浸潤効果がNF κ B 経路を介している可能性が示唆された。

IL-8、COX-2、MMP のプロモーター領域にはビタミンDレスポンスエレメント (VDRE) を認める (genomatix 社 Matinspector: <http://www.genomatix.de/>) が、そこに実際にビタミンDが結合しているか、またそれぞれの遺伝子発現の調節を行っているかどうかについての解析を行っている報告はない。また、IL-8、COX-2 のプロモーター領域にはNF κ B のbinding site を認める。一方、ビタミンDはVDR とp65 の複合体形成を誘導し、p65 の転写活性を抑制するなど、NF κ B に直接抑制するという報告が多数みられる⁷²。本研究で、炎症刺激により惹起されたIL-8、COX-2 などの発現上昇に対するビタミンDの抑制効果は、ビタミンDがこれらの遺伝子に対して直接作用したというよりは、炎症刺激によって惹起されたNF κ B などの細胞内シグナルがこれらの遺伝子の発現を亢進させる部分に間接的に作用していたものと考ええる。

ビタミンDがNFκB 活性を抑えるという報告は、早産における子宮筋細胞⁷³やクローン病における末梢血単球細胞⁷⁴、肥満患者における肥満細胞⁷⁵などであり、ビタミンDによる治療への可能性についても注目されている。

本研究において、体内におけるビタミンD欠乏と重症子宮内膜症の関係や、子宮内膜症間質細胞における1,25-dihydroxy vitamin D₃ の抗炎症、抗増殖、抗浸潤効果が示された。これらからビタミンD欠乏が子宮内膜症の進展を助長しており、ビタミンDの摂取が病態の管理に有用であることが示唆された。ビタミンDの摂取に関しては、クローン病²⁸、HIV 感染症⁷⁶、2型糖尿病^{77,78}、多嚢胞性卵巣症候群⁷⁹の患者などで効果があることも知られている。ビタミンDは排卵には影響を与えないことから、妊娠を望む子宮内膜症患者に対して、新たな治療法となり得る。さらなる評価も必要になると思われる。

この研究では、低ビタミンD血症が子宮内膜症との関連があり、ビタミンDが病態の進行を防ぐことを示した。ビタミンDの摂取が子宮内膜症の新たな治療戦略となり得ることが示唆された。

まとめ

1. 重症子宮内膜症患者の血清25-hydroxy vitamin D 値は非子宮内膜症患者、軽症子宮内膜症患者に比べて、低かった。
2. 1,25-dihydroxy vitamin D₃ の刺激で子宮内膜症間質細胞によるIL-1β やTNF-α に誘導されたIL-8 のmRNA 発現および蛋白産生が減少した。
3. 1,25-dihydroxy vitamin D₃ の刺激で子宮内膜症間質細胞によるIL-1β に誘導されたPGE₂ の産生が減少し、PGE₂ 合成酵素のmRNA 発現は減少し、分解酵素のmRNA 発現は増加した。
4. 1,25-dihydroxy vitamin D₃ の刺激により子宮内膜症間質細胞の細胞数は減少し、DNA 合成を抑制した。
5. 1,25-dihydroxy vitamin D₃ は子宮内膜症間質細胞のMMP-2 およびMMP-9 のmRNA 発現を減少した。
6. 1,25-dihydroxy vitamin D₃ の刺激でTNF-α に抑制された子宮内膜症間質細胞におけるIκBα の蛋白発現に著明に増加させた。

おわりに

本研究では、ビタミンDの血清レベルが重症子宮内膜症患者で低いことが示された。次に、子宮内膜症間質細胞において、1,25-dihydroxy vitamin D₃ が抗炎症

作用としてサイトカインやプロスタグランディンの産生を抑えることや抗増殖作用、抗浸潤作用をもつことが示された。またこれらの作用がNFκB 経路を介していることが示唆された。このことよりビタミンD欠乏をきたす子宮内膜症患者に対して、ビタミンDが新たな治療法となり得る可能性が示された。

今回の研究で留意すべき点は、卵巣子宮内膜症より分離した間質細胞をもちいていることと、*in vitro* でのみ行っていることである。子宮内膜症病変は卵巣だけでなく、腹膜、腸管など他にも見られるため、卵巣以外の部位においても検討を行うべきと考える。また、ビタミンDの投与に関しては、今後倫理委員会の承認後、子宮内膜症患者に対して行い、症状の経過や病変の推移などの検討を行っていきたい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導いただきました大須賀穰教授、藤井知行教授、甲賀かをり准教授、ならびに検体の収集にご協力いただいた諸先生方に心よりお礼を申し上げます。

引用文献

1. Eskenazi, B. & Warner, M.L. Epidemiology of endometriosis. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 24, 235-258 (1997).
2. Giudice, L.C. & Kao, L.C. Endometriosis. *Lancet* 364, 1789-1799 (2004).
3. Goldstein, D.P., deCholnoky, C., Emans, S.J. & Leventhal, J.M. Laparoscopy in the diagnosis and management of pelvic pain in adolescents. *The Journal of Reproductive Medicine* 24, 251-256 (1980).
4. Taketani, Y. [History and current understanding of endometriosis]. *Nihon rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine* 59 Suppl 1, 3-7 (2001).
5. Harada, T., Iwabe, T. & Terakawa, N. Role of cytokines in endometriosis. *Fertility and Sterility* 76, 1-10 (2001).
6. Lebovic, D.I. Mueller, M.D. & Taylor, R.N. Immunobiology of endometriosis. *Fertility and Sterility* 75, 1-10 (2001).
7. Iwabe, T. Pathogenetic significance of increased levels of interleukin-8 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Fertility and Sterility* 69, 924-930 (1998).
8. Leiva, M.C., Hasty, L.A., Pfeifer, S., Mastroianni, L., Jr. & Lyttle, C.R. Increased chemotactic activity of peritoneal fluid in patients with endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 168, 592-598 (1993).
9. Khorram, O., Taylor, R.N., Ryan, I.P., Schall, T.J. & Landers, D.V. Peritoneal fluid concentrations of the cytokine RANTES correlate with the severity of endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 169, 1545-1549 (1993).
10. Sacco, K., Portelli, M., Pollacco, J., Schembri-Wismayer, P. & Calleja-Agius, J. The role of prostaglandin E2 in endometriosis. *Gynecological Endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 28, 134-138 (2012).
11. De Leon, F.D. Peritoneal fluid volume, estrogen, progesterone, prostaglandin, and epidermal growth factor concentrations in patients with and without endometriosis. *Obstetrics and Gynecology* 68, 189-194 (1986).
12. Noble, L.S. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82, 600-606 (1997).

13. Malvezzi, H. Increased circulating MMP-2 levels in infertile patients with moderate and severe pelvic endometriosis. *Reproductive Sciences* 20, 557-562 (2013).
14. Singh, A.K., Chattopadhyay, R., Chakravarty, B. & Chaudhury, K. Altered circulating levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 and their inhibitors and effect of progesterone supplementation in women with endometriosis undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 100, 127-134.e121 (2013).
15. Vercellini, P., Vigano, P., Somigliana, E. & Fedele, L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nature reviews. Endocrinology* 10, 261-275 (2014).
16. Bouillon, R. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocrine Reviews* 29, 726-776 (2008).
17. Holick, M.F. Vitamin D deficiency. *The New England Journal of Medicine* 357, 266-281 (2007).
18. Ferreira, G.B. Vitamin D₃ Induces Tolerance in Human Dendritic Cells by Activation of Intracellular Metabolic Pathways. *Cell Reports* 10,711-725 (2015).
19. van Halteren, A.G., Tysma, O.M., van Etten, E., Mathieu, C. & Roep, B.O. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ or analogue treated dendritic cells modulate human autoreactive T cells via the selective induction of apoptosis. *Journal of Autoimmunity* 23, 233-239 (2004).
20. Wahono, C.S. Effects of 1,25(OH)₂D₃ in immune response regulation of systemic lupus erithematosus (SLE) patient with hypovitamin D. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 7, 22-31 (2014).
21. Bartels, L.E. Oral vitamin D₃ supplementation reduces monocyte-derived dendritic cell maturation and cytokine production in Crohn's disease patients. *Inflammopharmacology* 22, 95-103 (2014).
22. Riek, A.E. 25(OH) vitamin D suppresses macrophage adhesion and migration by downregulation of ER stress and scavenger receptor A1 in type 2 diabetes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 144 Pt A, 172-179 (2014).
23. Zhang, Y. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *Journal of Immunology* 188, 2127-2135 (2012).
24. Khoo, A.L. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits proliferation but not the suppressive function of regulatory T cells in the absence of antigen-presenting cells. *Immunology* 134, 459-468 (2011).

25. Zhong, H., Zhou, X.J. & Hong, J.G. The effects of vitamin D on allergen-induced expression of interleukin-13 and interleukin-17 in cord blood CD4(+)T cells. *Iranian Journal of Allergy, Asthma, and Immunology* 13, 93-97 (2014).
26. Moon, R.J., Harvey, N.C., Davies, J.H. & Cooper, C. Vitamin D and skeletal health in infancy and childhood. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 25, 2673-2684 (2014).
27. Zakeri, Z., Sandoughi, M., Mashhadi, M.A., Raeesi, V. & Shahbakhsh, S. Serum vitamin D level and disease activity in patients with recent onset rheumatoid arthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases* (2013).
28. Yang, L. Therapeutic effect of vitamin d supplementation in a pilot study of Crohn's patients. *Clinical and Translational Gastroenterology* 4, e33 (2013).
29. Imtiaz, S. & Siddiqui, N. Vitamin-D status at breast cancer diagnosis: correlation with social and environmental factors and dietary intake. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC* 26, 186-190 (2014).
30. Grimm, M. Serum vitamin D levels of patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) and expression of vitamin D receptor in oral precancerous lesions and OSCC. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal* 20 (2), e188-95 (2015).
31. Ota, K. Vitamin D deficiency may be a risk factor for recurrent pregnancy losses by increasing cellular immunity and autoimmunity. *Human Reproduction* 2, 208-219 (2014).
32. Polyzos, N.P. Vitamin D deficiency and pregnancy rates in women undergoing single embryo, blastocyst stage, transfer (SET) for IVF/ICSI. *Human Reproduction* 29, 2032-2040 (2014).
33. Somigliana, E. Vitamin D reserve is higher in women with endometriosis. *Human Reproduction* 22, 2273-2278 (2007).
34. Hartwell, D., Rodbro, P., Jensen, S.B., Thomsen, K. & Christiansen, C. Vitamin D metabolites--relation to age, menopause and endometriosis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 50, 115-121 (1990).
35. Agic, A. Relative expression of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor, vitamin D 1 alpha-hydroxylase, vitamin D 24-hydroxylase, and vitamin D 25-hydroxylase in endometriosis and gynecologic cancers. *Reproductive Sciences* 14, 486-497 (2007).

36. Harris, H.R., Chavarro, J.E., Malspeis, S., Willett, W.C. & Missmer, S.A. Dairy-food, calcium, magnesium, and vitamin D intake and endometriosis: a prospective cohort study. *American Journal of Epidemiology* 177, 420-430 (2013).
37. Macdonald, H.M. Contributions of sunlight and diet to vitamin D status. *Calcified Tissue International* 92, 163-176 (2013).
38. van den Ouweland, J.M., Beijers, A.M., Demacker, P.N. & van Daal, H. Measurement of 25-OH-vitamin D in human serum using liquid chromatography tandem-mass spectrometry with comparison to radioimmunoassay and automated immunoassay. *Journal of chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 878, 1163-1168 (2010).
39. Mariani, M. The selective vitamin D receptor agonist, elocalcitol, reduces endometriosis development in a mouse model by inhibiting peritoneal inflammation. *Human Reproduction* 27, 2010-2019 (2012).
40. van Hamburg, J.P. TNF blockade requires 1,25(OH)₂D₃ to control human Th17-mediated synovial inflammation. *Annals of the Rheumatic Diseases* 71, 606-612 (2012).
41. Karthaus, N. Vitamin D Controls Murine and Human Plasmacytoid Dendritic Cell Function. *The Journal of Investigative Dermatology* 5, 1255-64 (2013).
42. Krishnan, A.V. Tissue-selective regulation of aromatase expression by calcitriol: implications for breast cancer therapy. *Endocrinology* 151, 32-42 (2010).
43. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertility and Sterility* 67, 817-821 (1997).
44. Takamura, M. Interleukin-17A is present in neutrophils in endometrioma and stimulates the secretion of growth-regulated oncogene-alpha (Gro-alpha) from endometrioma stromal cells. *Fertility and Sterility* 98, 1218-1224.e1211-1212 (2012).
45. Urata, Y. IL-1beta increases expression of tryptophan 2,3-dioxygenase and stimulates tryptophan catabolism in endometrioma stromal cells. *American Journal of Reproductive Immunology* 72, 496-503 (2014).
46. Maeda, S.S. Seasonal variation in the serum 25-hydroxyvitamin D levels of young and elderly active and inactive adults in Sao Paulo, Brazil: The Sao Paulo Vitamin D Evaluation Study (SPADES). *Dermato-Endocrinology* 5, 211-217 (2013).
47. Kennedy, D.A. Vitamin d: pharmacokinetics and safety when used in conjunction with the pharmaceutical drugs used in cancer patients: a systematic review. *Cancers* 5, 255-280 (2013).

48. DeLuca, H.F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80, 1689s-1696s (2004).
49. Keyzer, C.A. Associations of 25(OH) and 1,25(OH)₂ vitamin D with long-term outcomes in stable renal transplant recipients. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100, 81-89 (2015).
50. Diaz, L. Calcitriol inhibits TNF-alpha-induced inflammatory cytokines in human trophoblasts. *Journal of Reproductive Immunology* 81, 17-24 (2009).
51. Noyola-Martinez, N. Calcitriol downregulates TNF-alpha and IL-6 expression in cultured placental cells from preeclamptic women. *Cytokine* 61, 245-250 (2013).
52. Evans, K.N. Effects of 25-hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on cytokine production by human decidual cells. *Biology of Reproduction* 75, 816-822 (2006).
53. Thota, C., Farmer, T., Garfield, R.E., Menon, R. & Al-Hendy, A. Vitamin D elicits anti-inflammatory response, inhibits contractile-associated proteins, and modulates Toll-like receptors in human myometrial cells. *Reproductive Sciences* 20, 463-475 (2013).
54. Moreno, J. Regulation of prostaglandin metabolism by calcitriol attenuates growth stimulation in prostate cancer cells. *Cancer Research* 65, 7917-7925 (2005).
55. Liu, X. Vitamin d modulates prostaglandin e₂ synthesis and degradation in human lung fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 50, 40-50 (2014).
56. Munetsuna, E. Anti-proliferative activity of 25-hydroxyvitamin D₃ in human prostate cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 382, 960-970 (2014).
57. Gonzalez-Pardo, V. Cell cycle arrest and apoptosis induced by 1alpha,25(OH)₂D and TX 527 in Kaposi sarcoma is VDR dependent. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (2013).
58. Nishida, M. Endometriotic cells are resistant to interferon-gamma-induced cell growth inhibition and apoptosis: a possible mechanism involved in the pathogenesis of endometriosis. *Molecular Human Reproduction* 11, 29-34 (2005).
59. Watanabe, A. The role of survivin in the resistance of endometriotic stromal cells to drug-induced apoptosis. *Human Reproduction* 24, 3172-3179 (2009).

60. Ma, A.N., Lu, J., Zhou, X.J. & Wang, Y.X. Histone deacetylation directs DNA methylation in survivin gene silencing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 404, 268-272 (2011).
61. Nguyen, H. Progesterone and 1,25-dihydroxyvitamin D(3) inhibit endometrial cancer cell growth by upregulating semaphorin 3B and semaphorin 3F. *Molecular Cancer Research : MCR* 9, 1479-1492 (2011).
62. Halder, S.K., Osteen, K.G. & Al-Hendy, A. Vitamin D3 inhibits expression and activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human uterine fibroid cells. *Human Reproduction* 28, 2407-2416 (2013).
63. Yildirim, B., Guler, T., Akbulut, M., Oztekin, O. & Sariiz, G. 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D3 regresses endometriotic implants in rats by inhibiting neovascularization and altering regulation of matrix metalloproteinase. *Postgraduate Medicine* 126, 104-110 (2014).
64. Lappas, M. NOD1 and NOD2 regulate proinflammatory and prolabor mediators in human fetal membranes and myometrium via nuclear factor-kappa B. *Biology of Reproduction* 89, 14 (2013).
65. Terra, X. Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NFkB signaling pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4357-4365 (2007).
66. Jung, Y.J., Isaacs, J.S., Lee, S., Trepel, J. & Neckers, L. IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17, 2115-2117 (2003).
67. Nakao, S. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced prostaglandin E2 release is mediated by the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription via NFkappaB in human gingival fibroblasts. *Molecular and Cellular Biochemistry* 238, 11-18 (2002).
68. Tobar, N., Villar, V. & Santibanez, J.F. ROS-NFkappaB mediates TGF-beta1-induced expression of urokinase-type plasminogen activator, matrix metalloproteinase-9 and cell invasion. *Molecular and Cellular Biochemistry* 340, 195-202 (2010).
69. Nagendraprabhu, P. & Sudhandiran, G. Astaxanthin inhibits tumor invasion by decreasing extracellular matrix production and induces apoptosis in experimental rat colon carcinogenesis by modulating the expressions of ERK-2, NFkB and COX-2. *Investigational New Drugs* 29, 207-224 (2011).

70. Oshiro, T., Shibasaki, Y., Martin, T.J. & Sasaki, T. Immunolocalization of vacuolar-type H⁺-ATPase, cathepsin K, matrix metalloproteinase-9, and receptor activator of NF-kappaB ligand in odontoclasts during physiological root resorption of human deciduous teeth. *The Anatomical Record* 264, 305-311 (2001).
71. Lundqvist, J., Yde, C.W. & Lykkesfeldt, A.E. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits cell growth and NF-kappaB signaling in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Steroids* 85, 30-35 (2014).
72. Tan, X., Wen, X. & Liu, Y. Paricalcitol inhibits renal inflammation by promoting vitamin D receptor-mediated sequestration of NF-kappaB signaling. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 19, 1741-1752 (2008).
73. Thota, C. Vitamin D regulates contractile profile in human uterine myometrial cells via NF-kappaB pathway. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 4, 347.e1-347.e10 (2013).
74. Stio, M. The Vitamin D analogue TX 527 blocks NF-kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells of patients with Crohn's disease. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 103, 51-60 (2007).
75. Mutt, S.J. Inhibition of cytokine secretion from adipocytes by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) via the NF-kappaB pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26, 4400-4407 (2012).
76. Chun, R.F. New perspectives on the vitamin D binding protein. *Cell Biochemistry and Function* 30, 445-456 (2012).
77. Al-Zahrani, M.K. A 3-month oral vitamin D supplementation marginally improves diastolic blood pressure in Saudi patients with type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 7, 5421-5428 (2014).
78. Zhou, J. [Effects of vitamin D supplementation on insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus]. *Zhonghua yi xue za zhi* 94, 3407-3410 (2014).
79. Firouzabadi, R., Aflatoonian, A., Modarresi, S., Sekhavat, L. & MohammadTaheri, S. Therapeutic effects of calcium & vitamin D supplementation in women with PCOS. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 18, 85-88 (2012).

図表と説明

	Primers	Fragment	Anneal (°C)	Elongation (s)	Cycles
IL-8	F: ACTTCCAAGCTGGCCGTGGCTCTCTGGCA R: TGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAATTCTC	294	66	11	40
COX-2	F: TTCAAATGAGATTGTGGAAAAATTGCT R: AGATCATCTGCCTGAGTATCTT	305	66	13	55
mPGES-1	F: GGAACGACATGGAGACCATCTAC R: TCCAGGCGACAAAAGGGTTA	81	60	5	40
mPGES-2	F: GTGCGCGAGGACCTCTAT R: CAGGGCTGGATGTGCGTGTGCT	179	66	8	40
cPGES	F: CTCTTCCGCGCGGTGCATTCT R: CAGGGGGACGGGCGAACTGG	181	66	8	40
15-PGDH	F: GCTGGAGTGAATAATGAGA R: GCTGAGCGTGTGAATCCAAC	221	55	6	40
MMP-2	F: ACCGCAAGTGGGGCTTCTGC R: CGTGGCCAAACTCGTGGGCT	247	62	10	45
MMP-9	F: CCGGCATTCAGGGAGACGC R: TGGAACCACGACGCCCTTGC	71	62	8	45
GAPDH	F: ACCACAGTCCATGCCATCAC R: TCCACCACCCTGTTGCTGTA	450	65	18	30

表1. 各プライマーの塩基配列とPCR条件

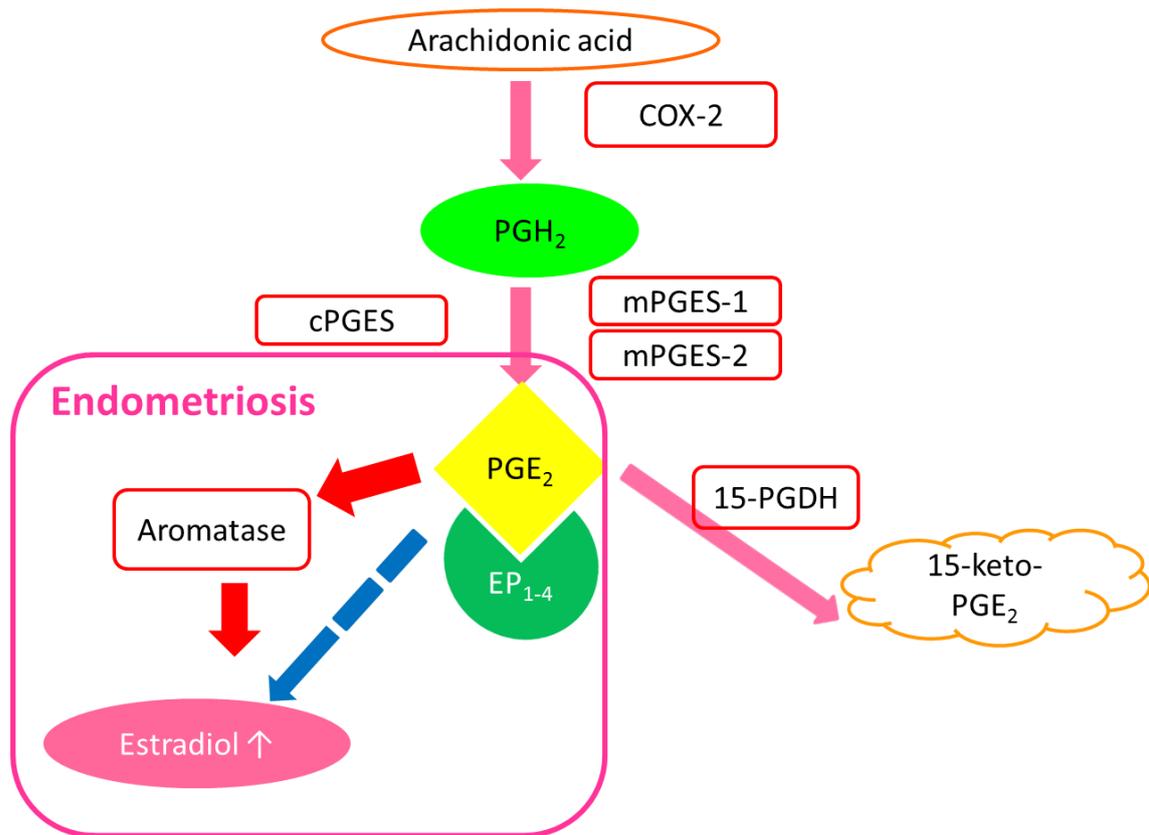


図 1. アラキドン酸カスケード

子宮内膜症では、PGE₂ が病態形成を促進していることも知られている。また、PGE₂ からエストロゲンの一種であるエストラジオールを合成する酵素であるアロマターゼの発現が亢進しており、子宮内膜症の病態生理にプロスタグランジン経路が重要な役割を果たしていることが知られている。

	Journal	Vitamin D	Season	Phase	N	Assay	Result
Hartwell (Denmark) 1990	Scand J Clin Lab Invest,	25(OH)D	Nov-Mar	NA	42	Competitive protein binding assay	=
Hartwell (Denmark) 1990	Scand J Clin Lab Invest,	1,25(OH) ₂ D	Nov-Mar	NA	42	Competitive protein binding assay	↑
Somigliana (Italy) 2007	Hum Reprod,	25(OH)D ₃	All seasons (corrected)	All phases (corrected)	87	Chemiluminescence	↑
Somigliana (Italy) 2007	Hum Reprod,	1,25(OH) ₂ D ₃	All seasons (corrected)	All phases (corrected)	87	Chemiluminescence	=
Agic (Germany) 2007	Reprod Sci,	25(OH)D	Apr-Sep	NA	46	Radio immuno assay	=
Harris (USA) 2013	Am J Epidemiol,	25(OH)D	NA	NA	1385	Enzyme immunoassay	↓

表 2. 子宮内膜症における血清ビタミン D 値に関する報告

血清ビタミン D 値との子宮内膜症に関する報告は 4 つあるが、結果は一致しない。

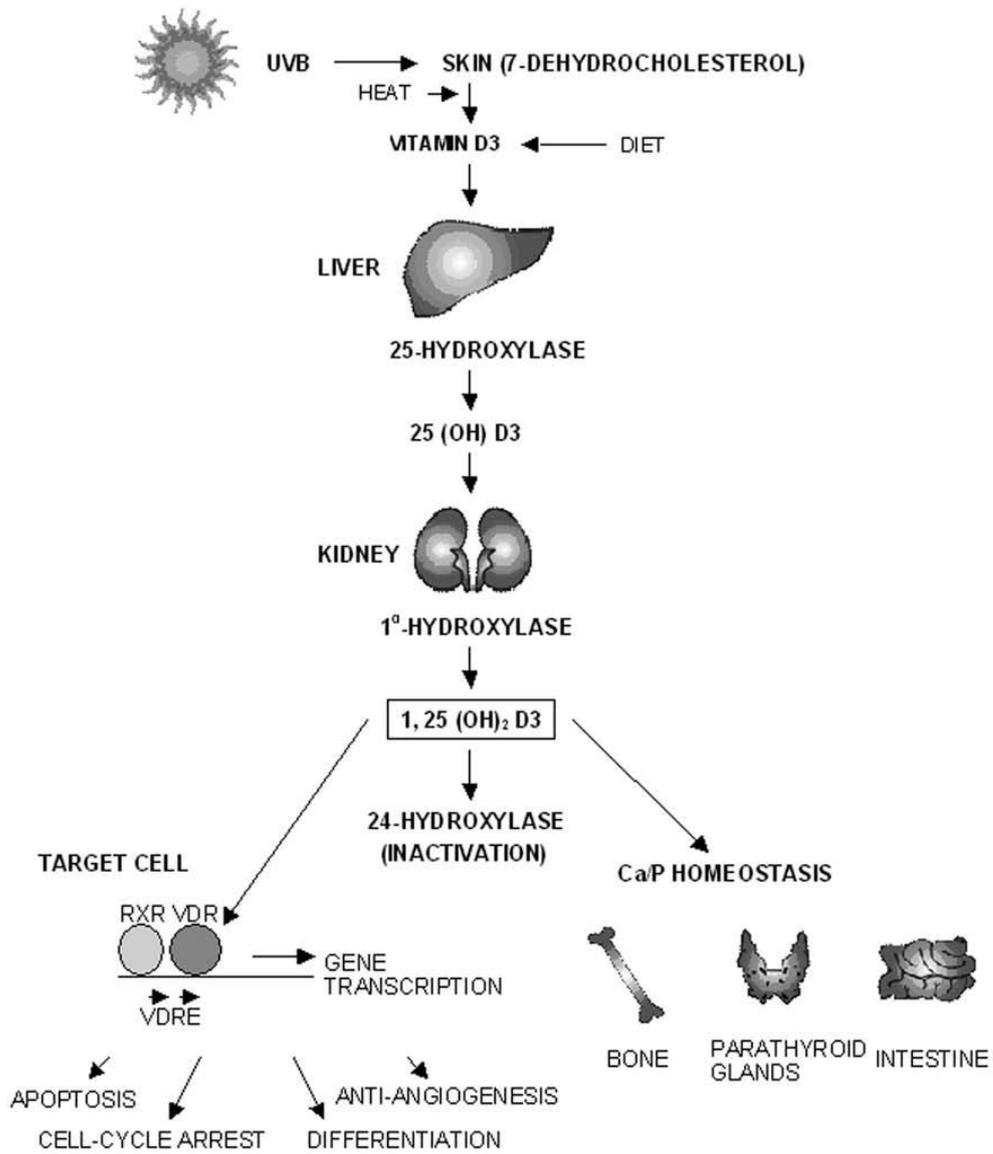


図 2. ビタミン D の代謝過程³⁵

体内のビタミン D の大半は皮膚において紫外線の照射によって生成される。皮膚で生成されたビタミン D は vitamin D₃ であり、生体内では不活性型である。肝臓において 25(OH)D₃ に変換され、腎臓において活性型である 1,25(OH)₂D₃ に変換される。

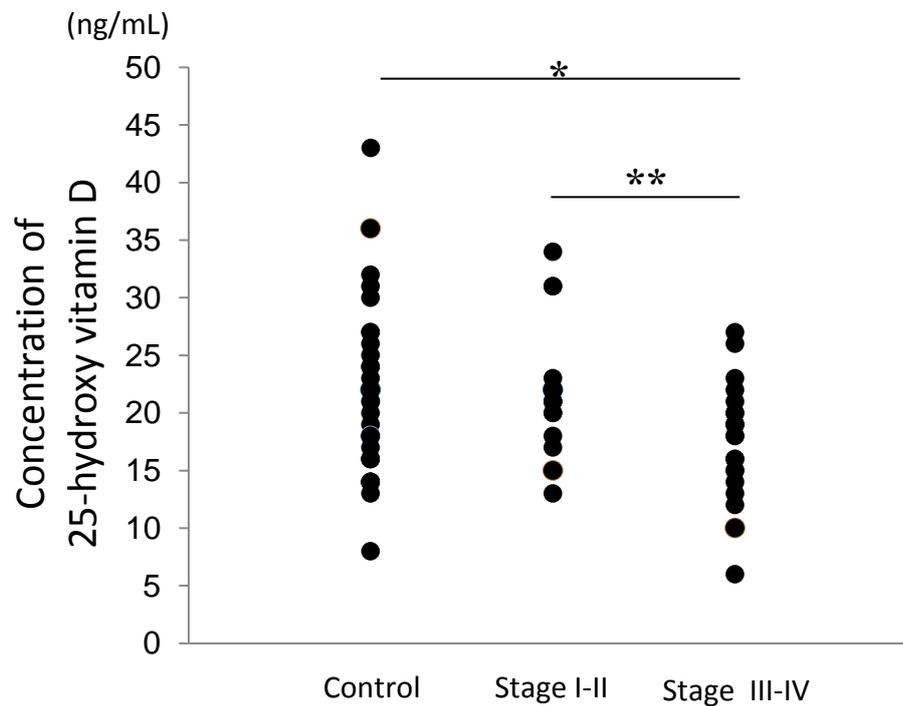


図3. 子宮内膜症患者における血清25-hydroxy vitamin D₃ 値

血清サンプルは37名の非子宮内膜症患者 (年齢: 32.8 ± 1.05 , mean \pm SD)、17名のステージI、II の子宮内膜症患者 (年齢: 35.4 ± 1.64) および22名のステージIII、IV の子宮内膜症患者 (年齢: 34.6 ± 1.53) から採取した。患者はすべて日本人であり、ビタミンD製剤やサプリメントの服用はしていなかった。すべての血清サンプルは1998年から2014年の、10月(秋)から3月(冬)に採取された。月経周期はすべて増殖期であった。2群間の比較に対しMann-Whitney U-test を用いた。 $*P < 0.05$ はControl 群と比較し、 $**P < 0.05$ はStage I-II 群と比較し、有意差を得た。

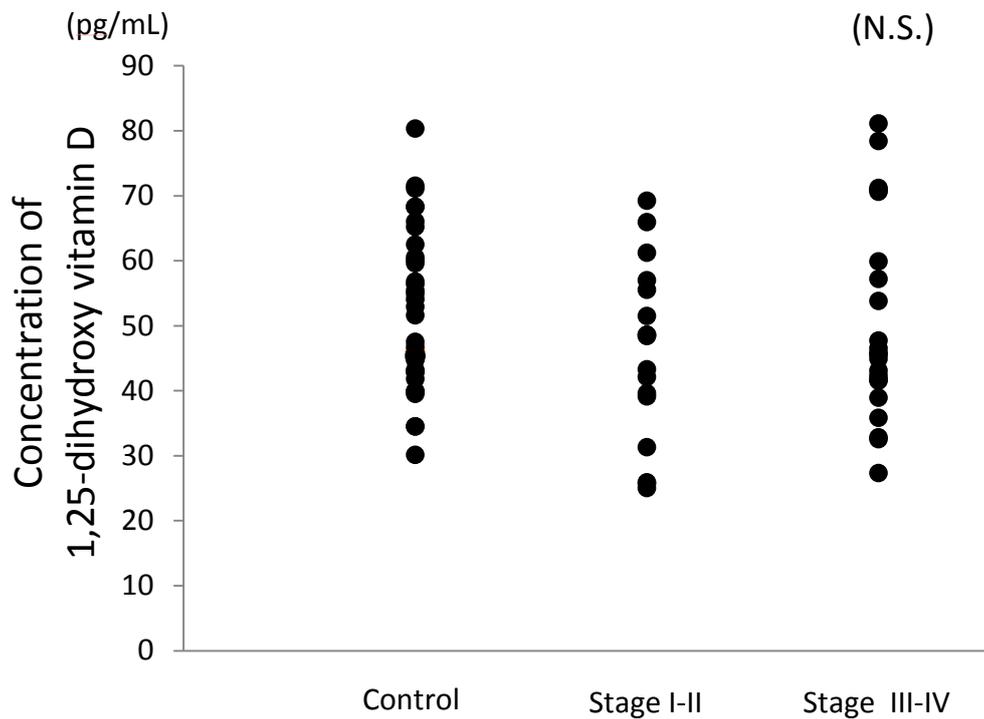


図4. 子宮内膜症患者における血清1,25-hydroxy vitamin D₃ 値

血清サンプルは37名の非子宮内膜症患者 (年齢: 32.8 ± 1.05 , mean \pm SD)、17名のステージI、II の子宮内膜症患者 (年齢: 35.4 ± 1.64) および22名のステージIII、IVの子宮内膜症患者 (年齢: 34.6 ± 1.53) から採取した。患者はすべて日本人であり、ビタミンD製剤やサプリメントの服用はしていなかった。すべての血清サンプルは1998年から2014年の、10月(秋)から3月(冬)に採取された。月経周期はすべて増殖期であった。各群間で有意差は認めなかった。

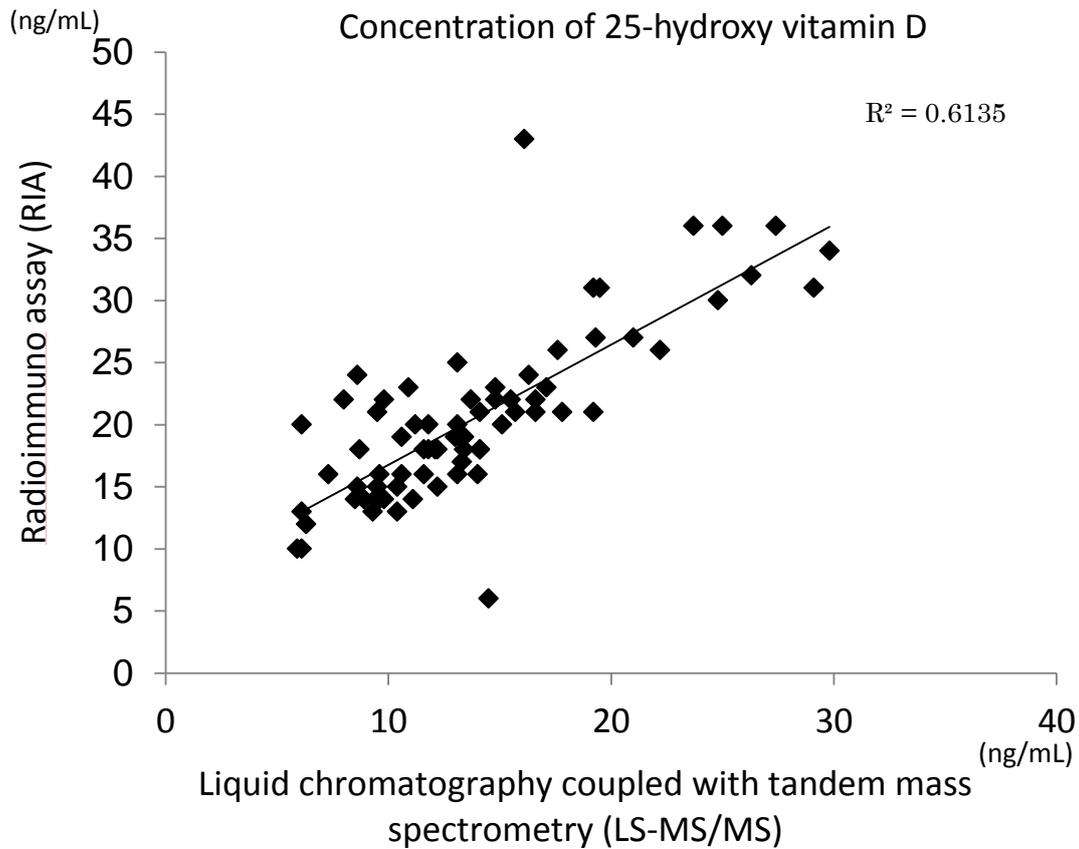
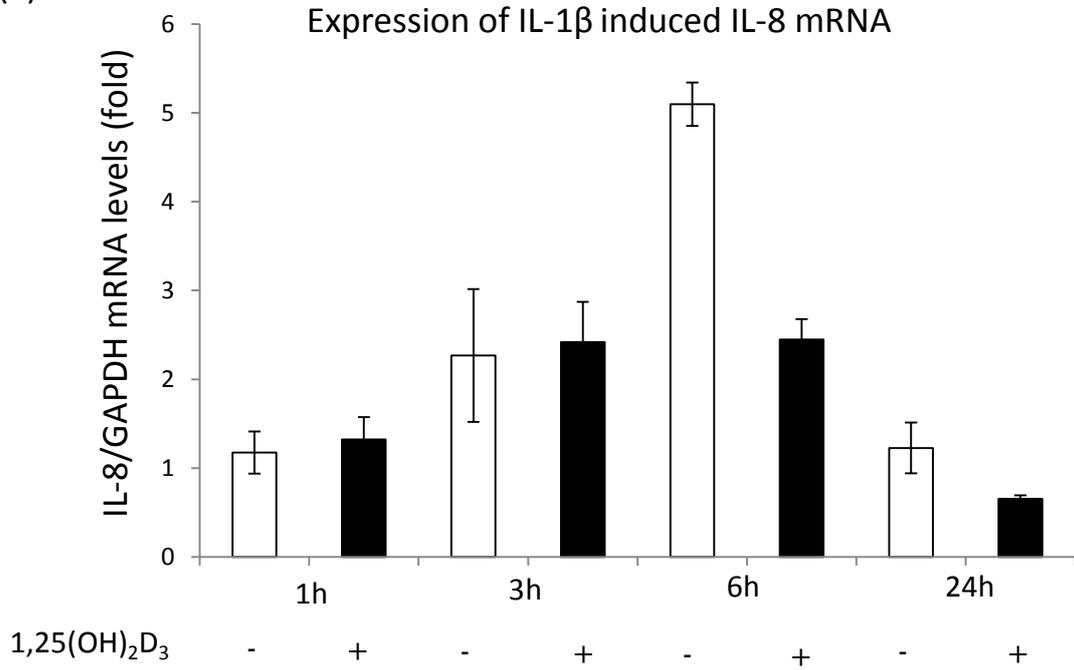


図5. Radioimmunoassay 法と液体クロマトグラフィー質量分析法による子宮内膜症患者、非子宮内膜症患者における血清25-hydroxy vitamin D 値の相関

血清サンプルは40名の非子宮内膜症患者および子宮内膜症患者から採取した。患者はすべて日本人であり、ビタミンD製剤やサプリメントの服用はしていなかった。相関係数は0.783であり、強い相関を認めた ($p < 0.001$)。

(a)



(b)

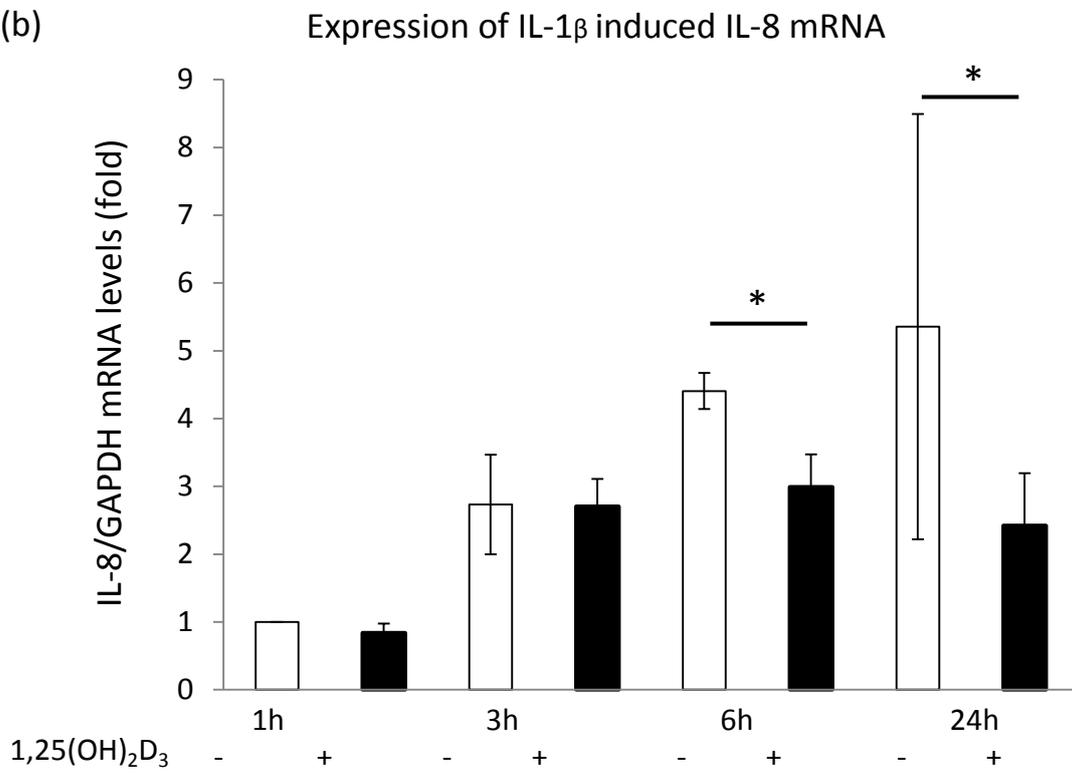


図6. ESC における IL-1 β に誘導された IL-8 の mRNA 発現に対する 1,25(OH) $_2$ D $_3$ の効果

ESCに2%FBS とともにIL-1 β (5 ng/ml) と1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-7} M) を添加し、1、3、6、24時間培養した。細胞からのRNA を抽出しcDNA に逆転写した。IL-8 の遺伝子発現を解析するためにreal-time quantitative PCR を行った。測定はtriplicateにておこない、その平均を用いた。(a) 5名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に実験を行った中で典型的な結果を示した。数値は平均 \pm 標準偏差である (b) 5名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に実験を行い、1時間培養したコントロール群の値を1として比較した。5名の女性から得られた結果の平均を示した。数値は平均 \pm 標準誤差であり、2群間の比較に対しStudent's t test を用いた。* は群間に有意差があることを示す ($P<0.05$)。

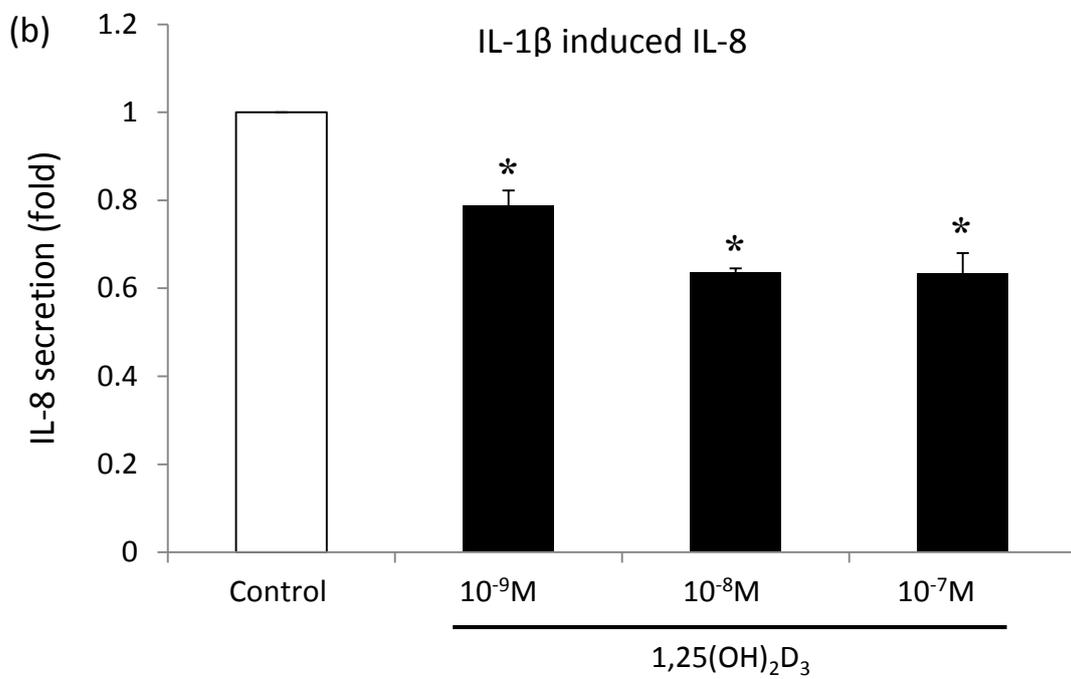
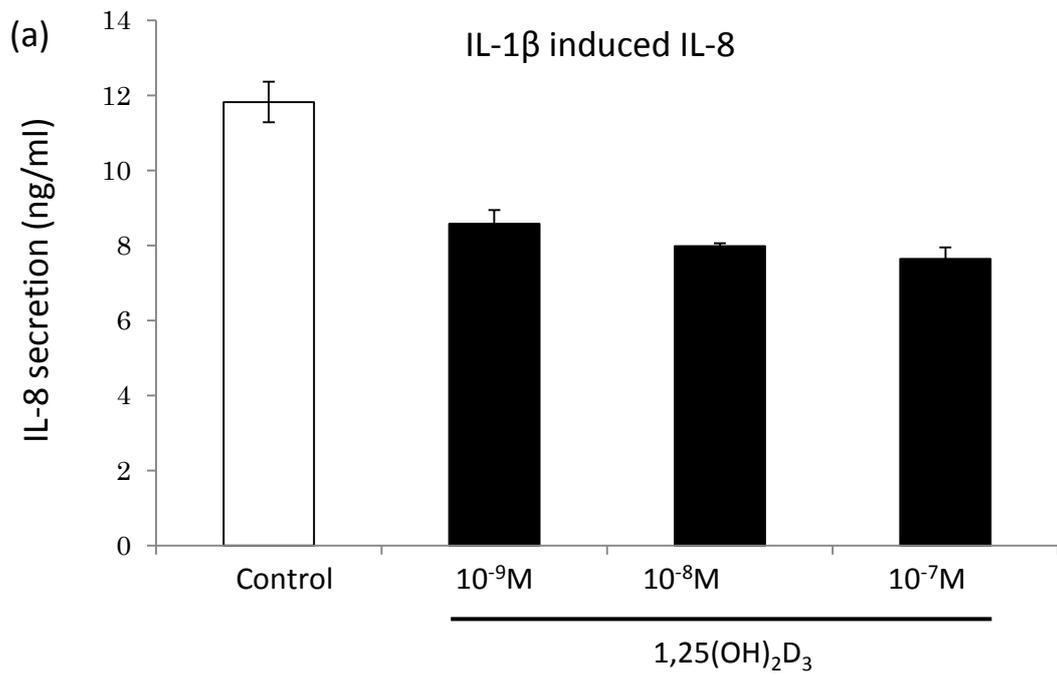


図7. ESC におけるIL-1 β に誘導されたIL-8 の産生に対する1,25(OH) $_2$ D $_3$ の効果

ESC に2%FBS とともにIL-1 β (5 ng/ml) と1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-9} ~ 10^{-7} M) を添加し、24時間培養した。細胞培養上清中のIL-8濃度を特異的ELISA で測定した。測定はquadruplicate にておこない、その平均を用いた。(a) 6名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に実験を行った中で典型的な結果を示した。数値は平均 \pm 標準偏差である。(b) 6名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に実験を行い、コントロール群の値を1として比較した。6名の女性から得られた結果の平均を示した。数値は平均 \pm 標準誤差であり、2群間の比較に対しStudent's t test を用いた。* はコントロール群と比較し有意差があることを示す ($P<0.05$)。

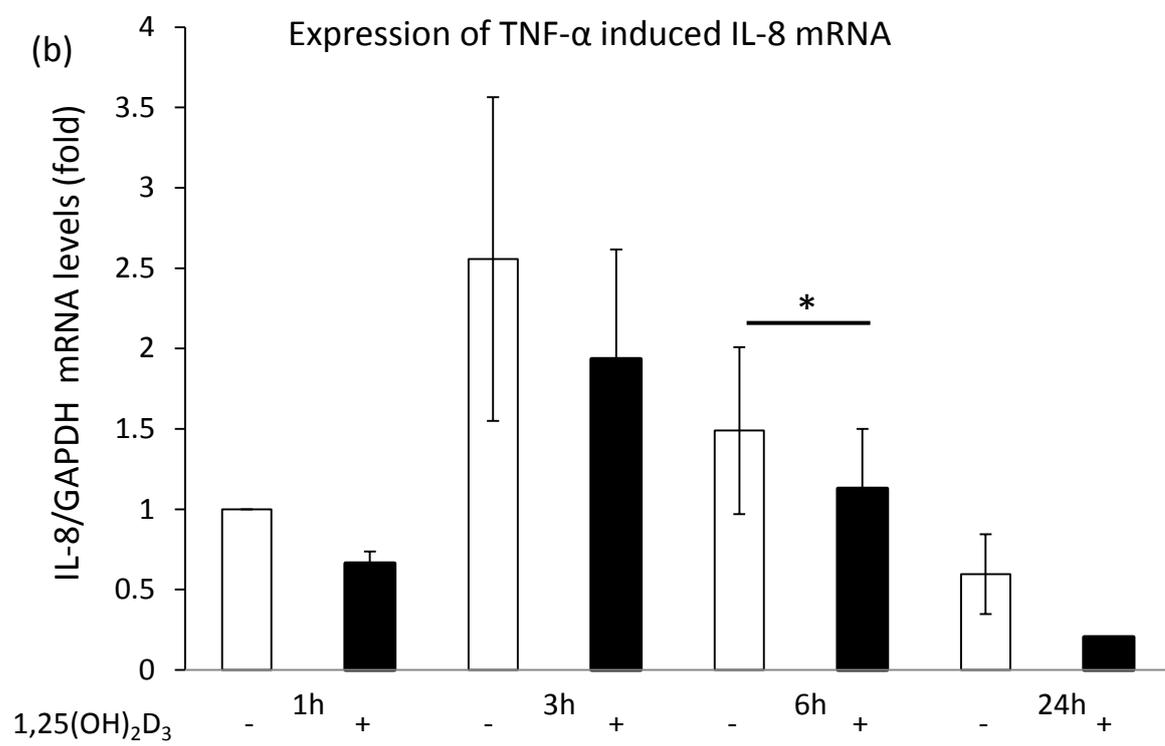
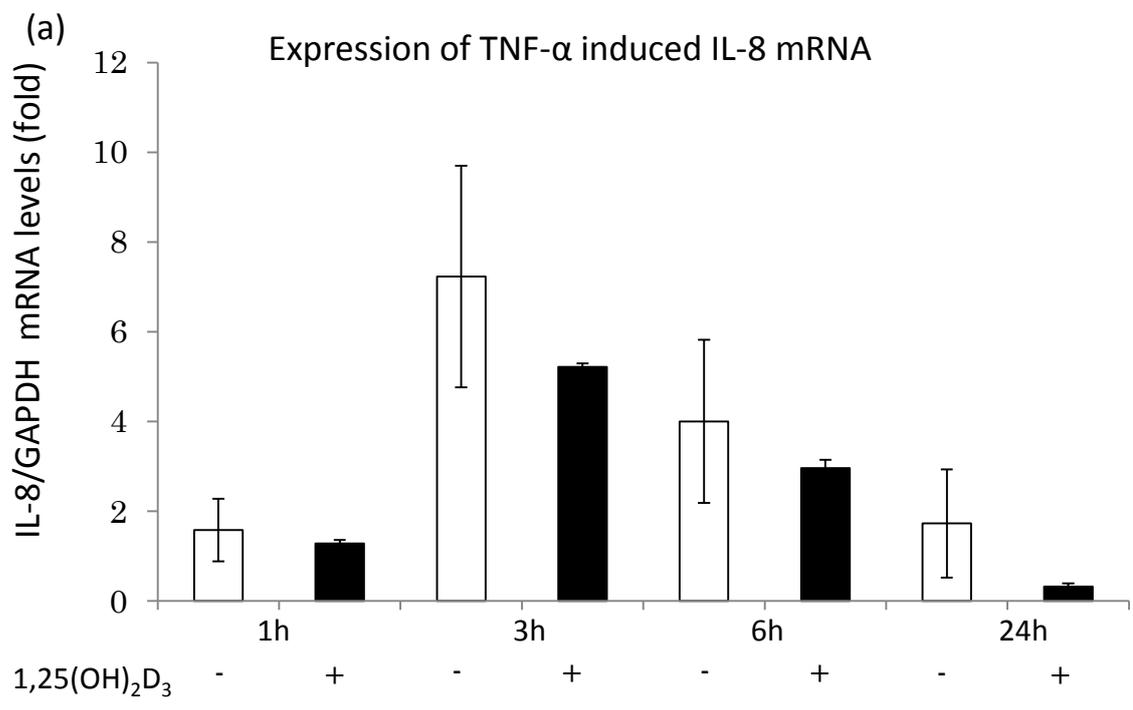


図8. ESC における TNF- α に誘導された IL-8 の mRNA 発現に対する 1,25(OH) $_2$ D $_3$ の効果

ESC に2%FBS とともにTNF- α (10 ng/ml) と1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-7} M) を添加し、1、3、6、24時間培養した。細胞からのRNA を抽出しcDNA に逆転写した。IL-8 の遺伝子発現を解析するためにreal-time quantitative PCR を行った。測定はtriplicate にておこない、その平均を用いた。(a) 5名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に実験を行った中で典型的な結果を示した。数値は平均 \pm 標準偏差である。(b) 5名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に実験を行い、1時間培養したコントロール群の値を1として比較した。5名の女性から得られた結果の平均を示した。数値は平均 \pm 標準誤差であり、2群間の比較に対しStudent's t test を用いた。* は群間に有意差があることを示す ($P<0.05$)。

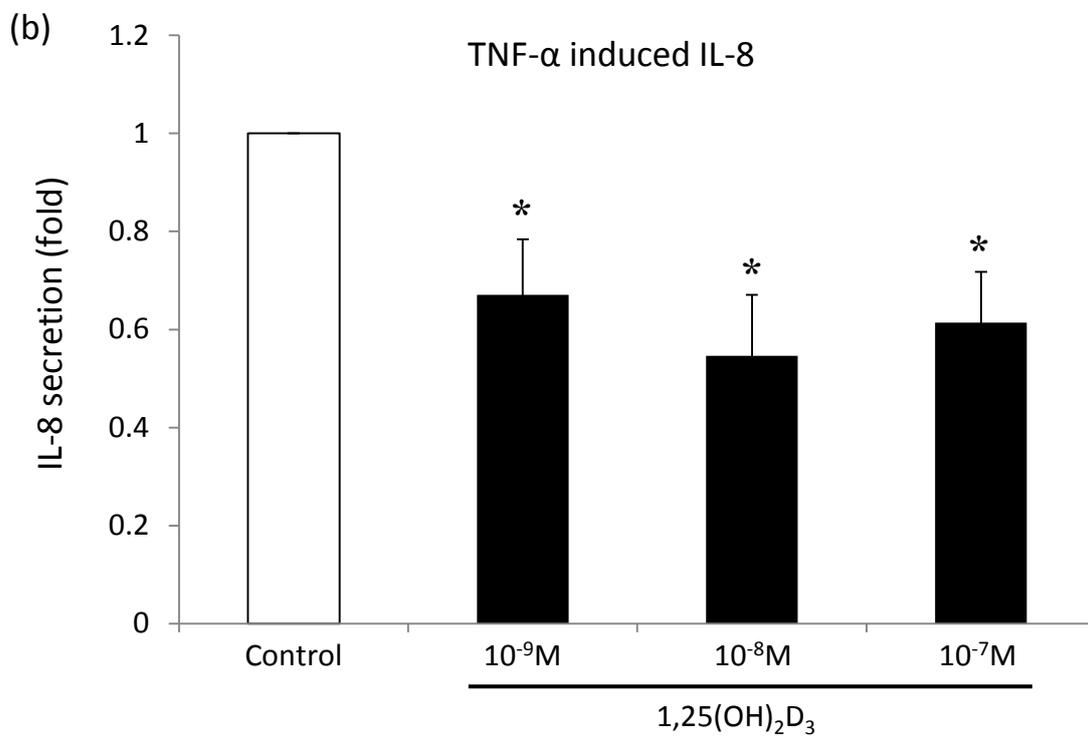
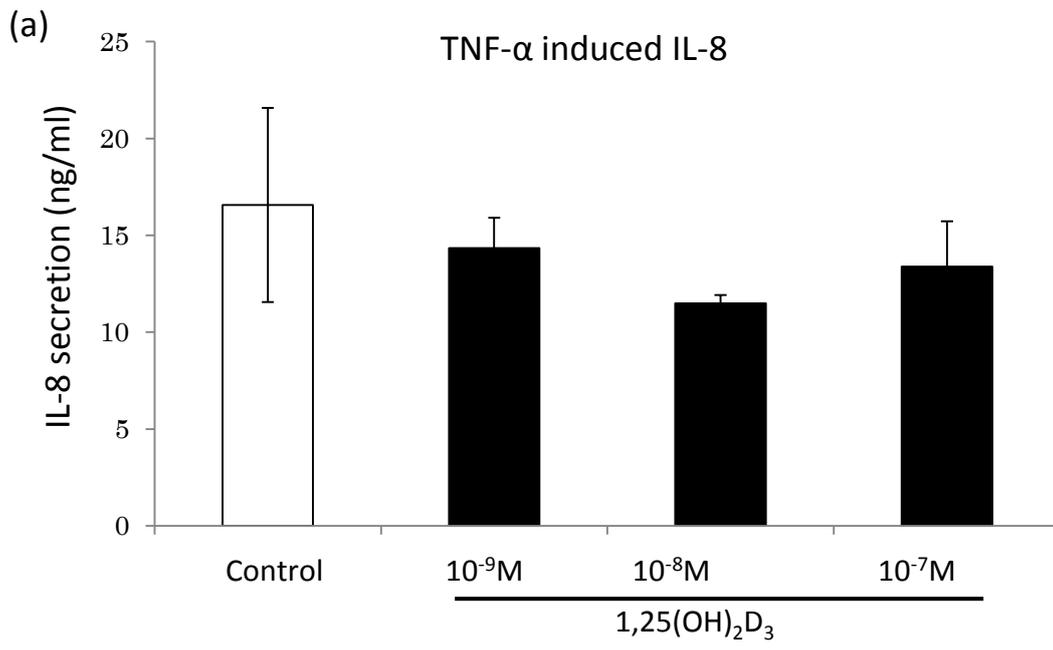


図9. ESC におけるTNF- α に誘導されたIL-8 産生に対する1,25(OH) $_2$ D $_3$ の効果

ESC に2%FBS とともにTNF- α (10 ng/ml) と1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-9} ~ 10^{-7} M) を添加し、24時間培養した。細胞培養上清中のIL-8 濃度を特異的ELISA で測定した。測定はquadruplicate にておこない、その平均を用いた。(a) 6名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に実験を行った中で典型的な結果を示した。数値は平均 \pm 標準偏差である。(b) 6名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に実験を行い、コントロール群の値を1として比較した。6名の女性から得られた結果の平均を示した。数値は平均 \pm 標準誤差であり、2群間の比較に対しStudent's t test を用いた。* はコントロール群と比較し有意差があることを示す ($P<0.05$)。

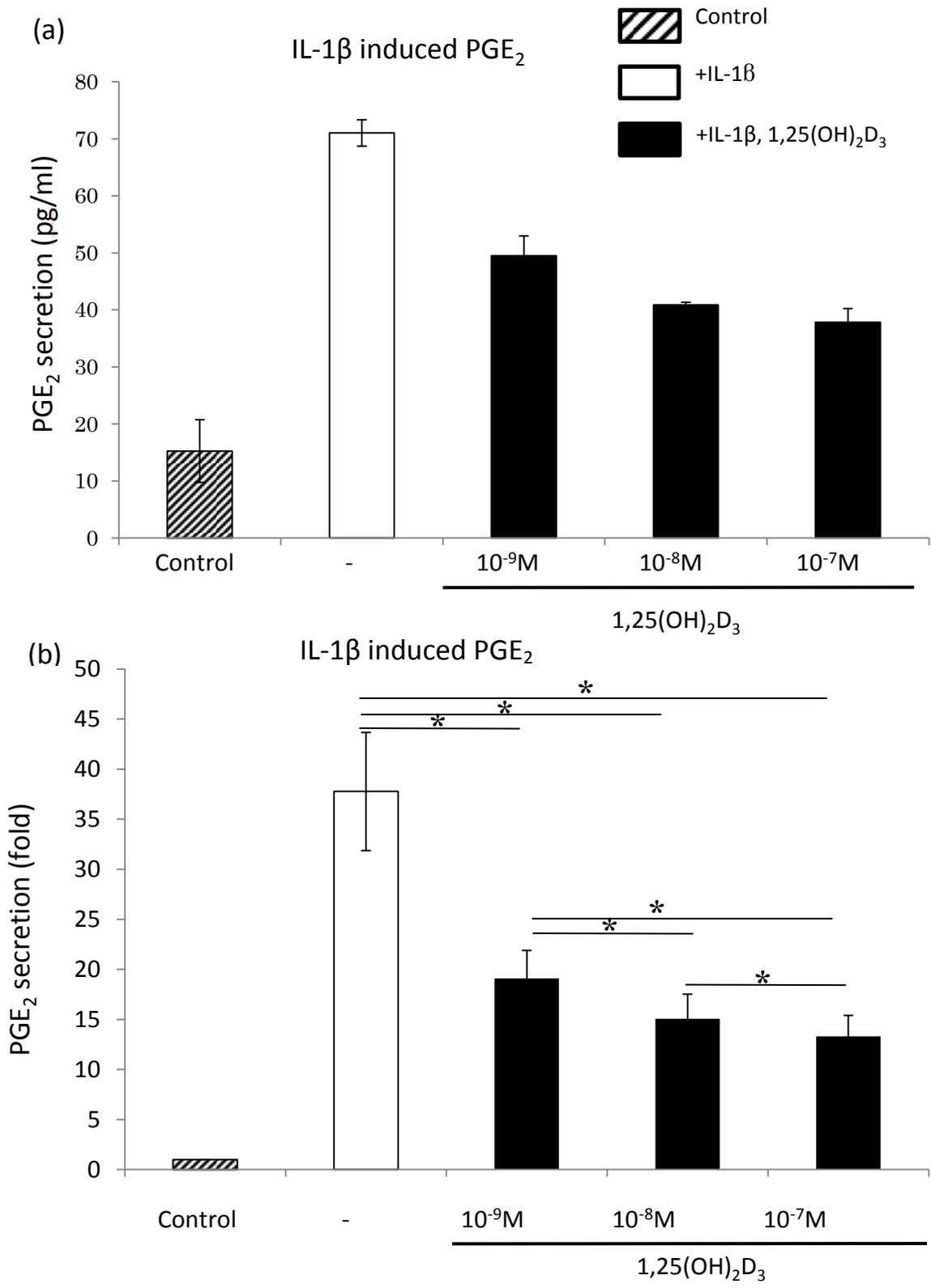


図10. ESC におけるIL-1 β に誘導されたPGE₂ の産生に対する1,25(OH)₂D₃ の効果

ESC に2%FBS とともにIL-1 β (5 ng/ml) と1,25(OH)₂D₃ (10^{-9} 10^{-7} M) を添加し、24時間培養した。細胞培養上清中のPGE₂ 濃度を特異的EIA で測定した。測定は quadruplicate にておこない、その平均を用いた。(a) 4名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に実験を行った中で典型的な結果を示した。数値は平均 \pm 標準偏差である。(b) 4名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に実験を行い、コントロール群の値を1として比較した。6名の女性から得られた結果の平均を示した。数値は平均 \pm 標準誤差であり、多群間の比較に対しANOVA 分析の後に、post hoc test としてTukey's test を用いた。* は群間で有意差があることを示す ($P<0.05$)。

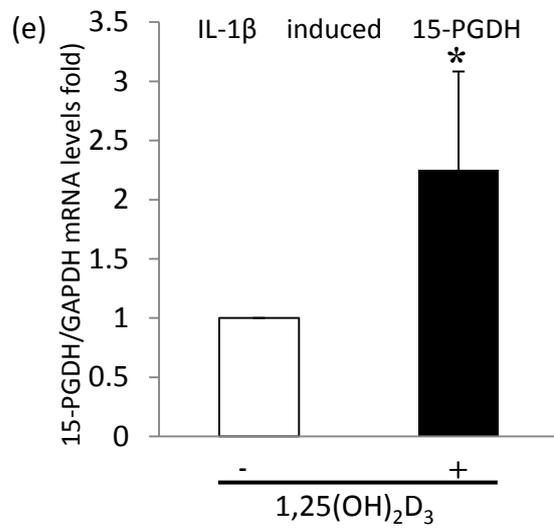
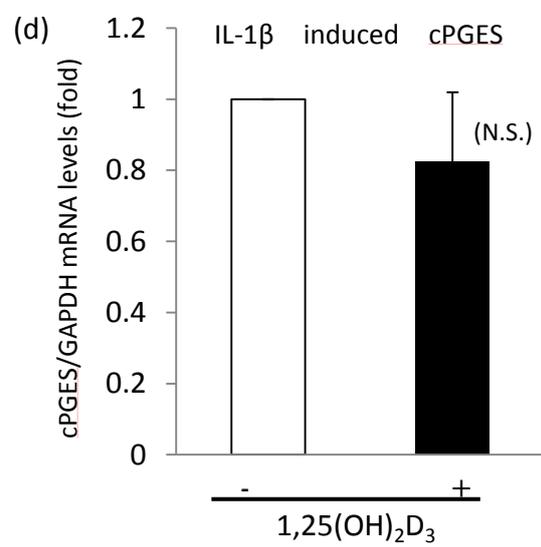
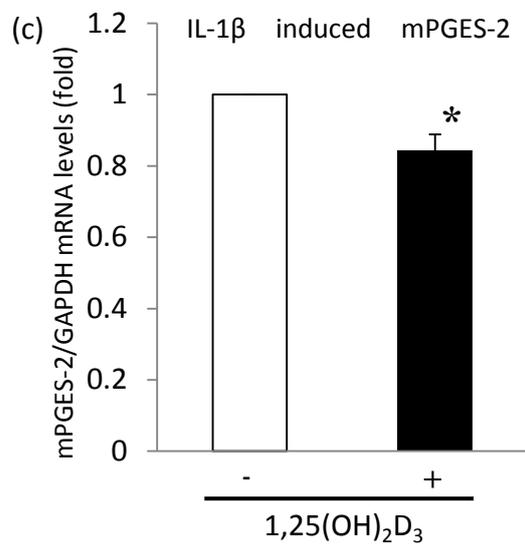
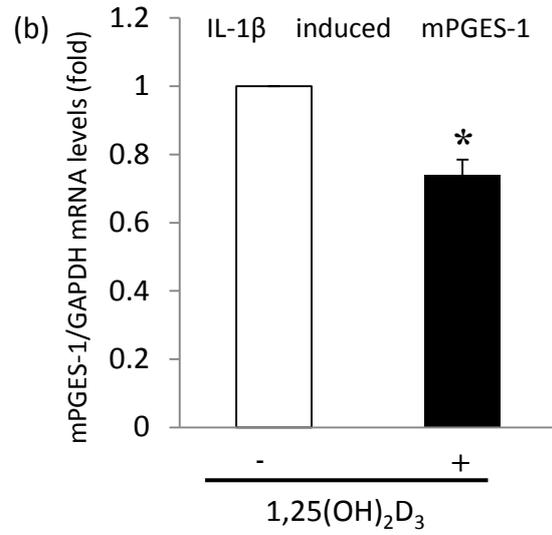
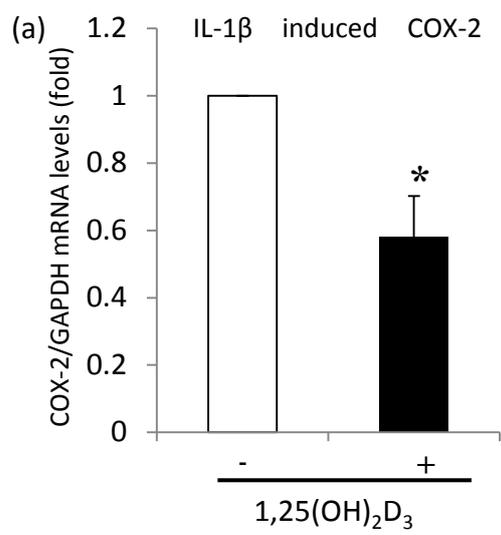


図11. ESC におけるIL-1 β に誘導されたCOX-2、mPGES-1、mPGES-2、cPGES、15-PGDH のmRNA 発現に対する1,25(OH) $_2$ D $_3$ の効果

ESC に2%FBS とともにIL- β (5 ng/ml) と1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-7} M) を添加し、3時間培養した。細胞からのRNA を抽出しcDNA に逆転写した。(a) COX-2、(b) mPGES-1、(c) mPGES-2、(d) cPGES、(e) 15-PGDH の遺伝子発現を解析するためにreal-time quantitative PCR を行った。測定はtriplicate にておこない、その平均を用いた。4名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に実験を行い、コントロール群の値を1として比較した。4名の女性から得られた結果の平均を示した。数値は平均 \pm 標準誤差であり、2群間の比較に対しStudent's t test を用いた。* は2群間に有意差があることを示す ($P<0.05$)。

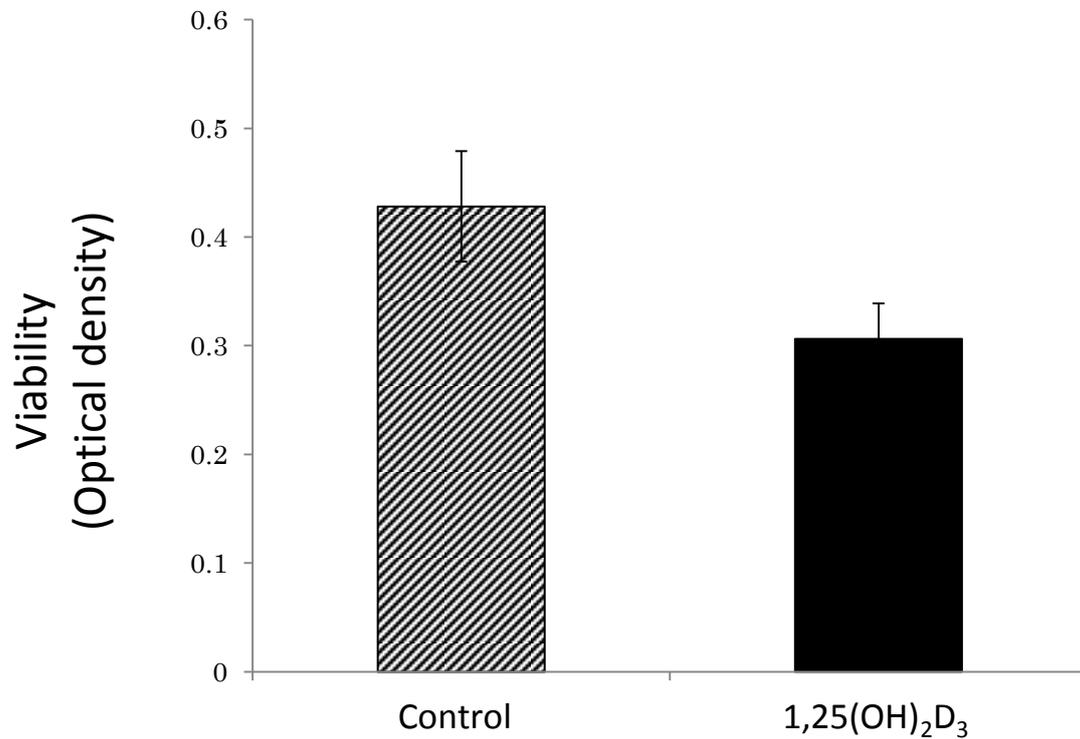


図12. 1,25(OH)₂D₃ のESC に対する細胞数の減少効果

ESCに1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁶ M) を添加し、24時間培養した。生細胞数をviable cell counting assay を用いて測定した。測定はhexaplicate にておこない、その平均を用いた。5名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に実験を行った中で典型的な結果を示した。数値は平均 ± 標準偏差である。コントロール群の値を1として比較した。5名の女性から得られた結果の平均で、2群間の比較をStudent's t test を用いて行い、2群間に有意差を認めた ($P<0.05$)。

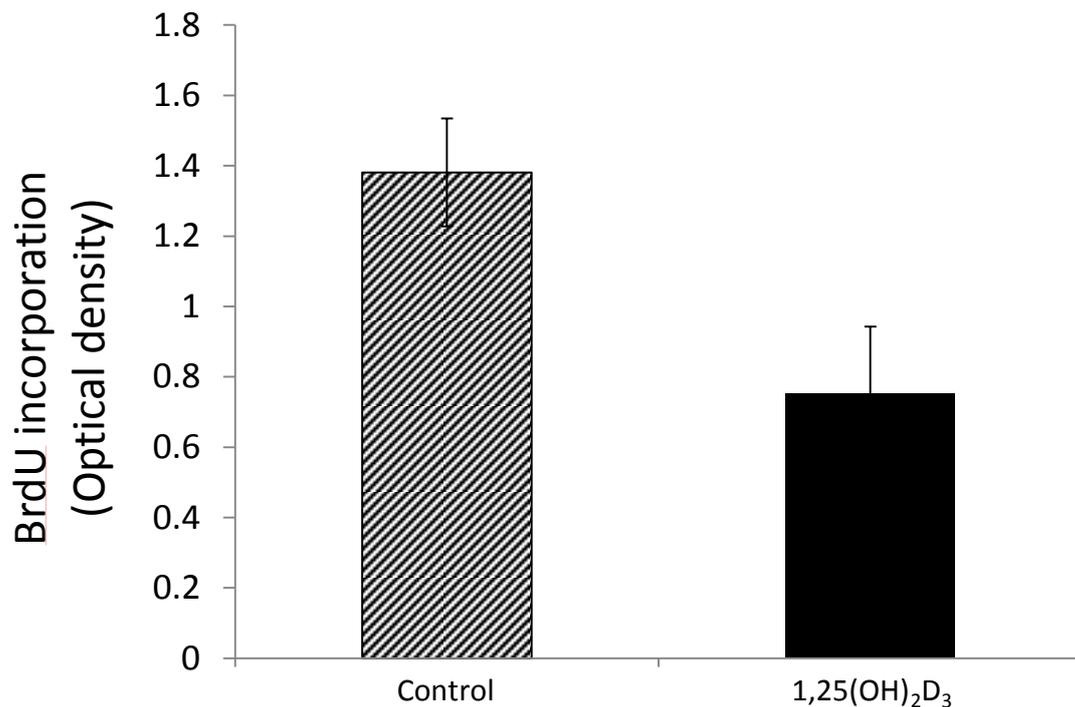


図13. ESC におけるBrdU 再取り込みに対する1,25(OH)₂D₃ の効果

ESCに1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁶ M) を添加し、24時間培養した。BrdU の再取り込みを Biotrak cell proliferation ELISA system を用いて測定した。測定はhexaplicate にておこない、その平均を用いた。11名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に実験を行った中で典型的な結果を示した。数値は平均 ± 標準偏差である。コントロール群の値を1として比較した。11名の女性から得られた結果の平均で、2群間の比較をStudent's t test を用いて行い、2群間に有意差を認めた ($P<0.05$)。

	Control	1,25(OH) ₂ D ₃	Ratio
a	4.2	8.3	2
b	18	25.3	0.71
c	11.7	9.3	0.79
d	5.3	1.7	0.32
e	3.3	7	2.12
f	3.7	12.7	3.43
g	85.3	71.7	0.84

(アポトーシス陽性細胞数/10000 細胞)

表3. ESC におけるアポトーシスに対する1,25(OH)₂D₃ の効果

ESC に1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁶ M) を添加し、24時間培養した。アポトーシス陽性細胞をフローサイトメトリーで10000細胞中のアポトーシス陽性細胞数を測定した。7名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に最低3回繰り返して実験を行い、平均、コントロール群に対する1,25(OH)₂D₃ 群の比を示した。実験結果にはばらつきがみられ、一定の傾向は得られなかった。

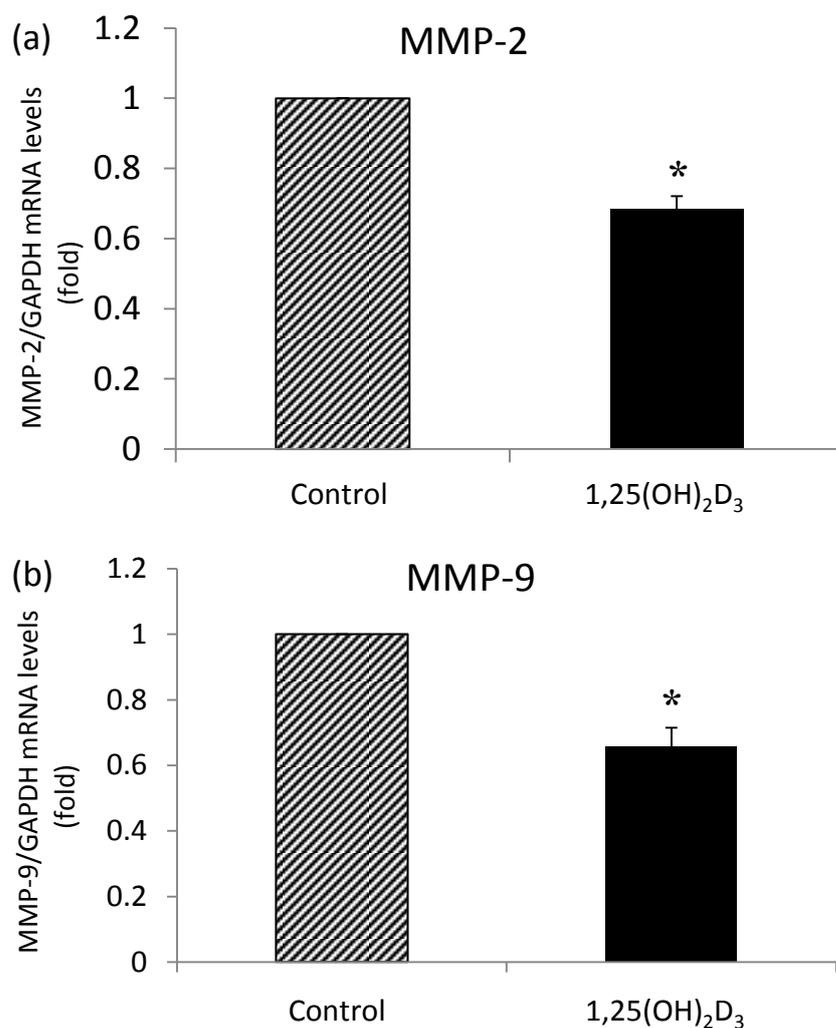


図14. ESC におけるMMP-2、MMP-9 のmRNA 発現に対する1,25(OH)₂D₃ の効果

ESC に1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M) を添加し、24時間培養した。細胞からのRNA を抽出しcDNA に逆転写した。(a) MMP-2、(b) MMP-9 の遺伝子発現を解析するためにreal-time quantitative PCR を行った。測定はtriplicate にておこない、その平均を用いた。5名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に実験

を行い、コントロール群の値を1として比較した。5名の女性から得られた結果の平均を示した。数値は平均 ± 標準誤差であり、2群間の比較に対しStudent's t test を用いた。* は2群間に有意差があることを示す ($P<0.05$)。

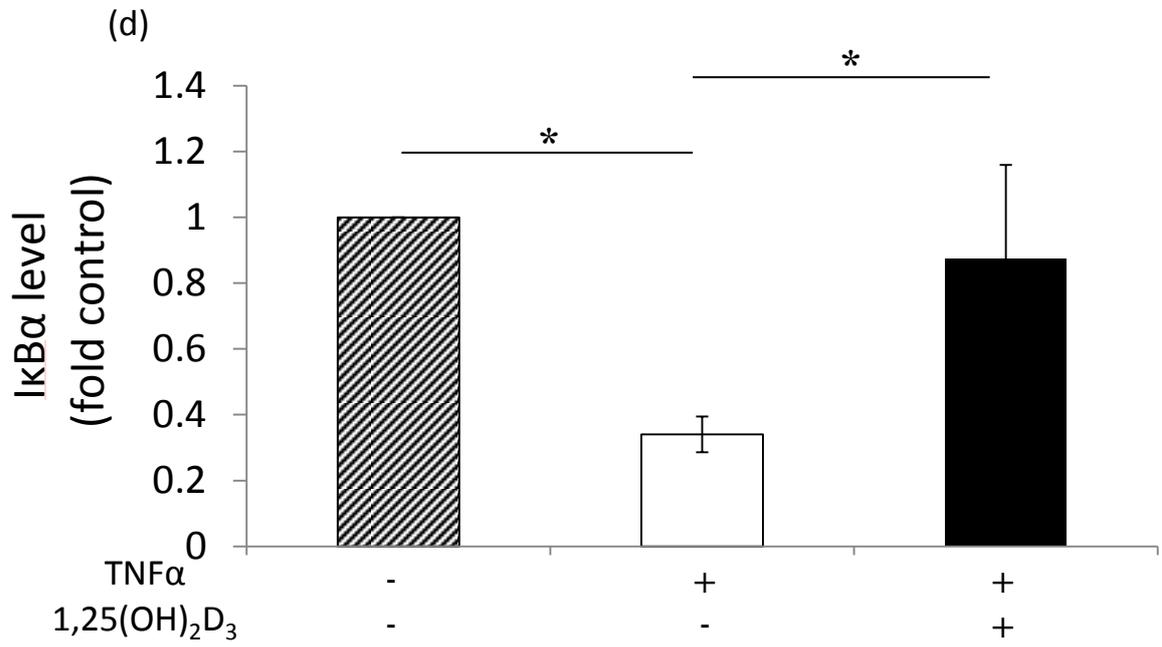
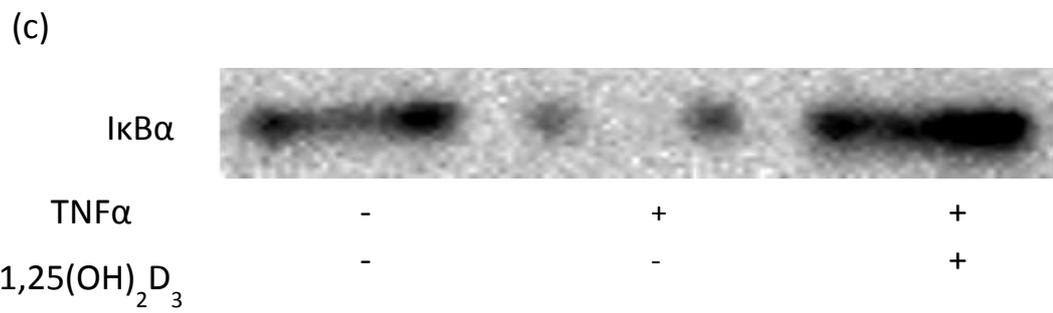
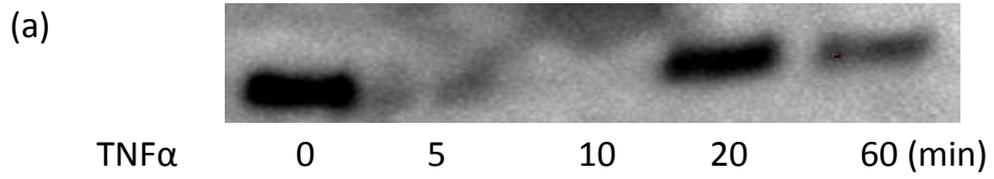


図15. ESC におけるTNF- α に誘導されたI κ B α に対する1,25(OH) $_2$ D $_3$ の効果

(a) ESC にTNF- α (10 ng/ml) を5、10、20、60分間添加し、細胞蛋白を回収した。I κ B α 抗体を用いてウエスタン・ブロッティング法で蛋白を同定した。代表的な結果を示した。TNF- α 添加5分後にかけてI κ B α 蛋白量が減少し、20分後以降回復した。(b) ESC に1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-7} M) を添加し、24時間培養したのち、細胞蛋白を回収し、I κ B α 抗体を用いてウエスタン・ブロッティング法で蛋白を同定した。コントロール群と1,25(OH) $_2$ D $_3$ 添加群でI κ B α 蛋白量に違いは認めなかった。(c) ESC に1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-7} M) を添加し、24時間培養したのち、TNF- α (10 ng/ml) を添加し、5分間刺激した。細胞蛋白を回収し、I κ B α 抗体を用いてウエスタン・ブロッティング法で蛋白を同定した。5分後の代表的な結果を示した。(d) 4名の女性から得られた異なる検体を用いてそれぞれ別個に実験を行い、蛋白量を定量した。数値は平均 \pm 標準誤差であり、2群間の比較に対しStudent's t test を用いた。* は群間に有意差があることを示す ($P < 0.05$)。

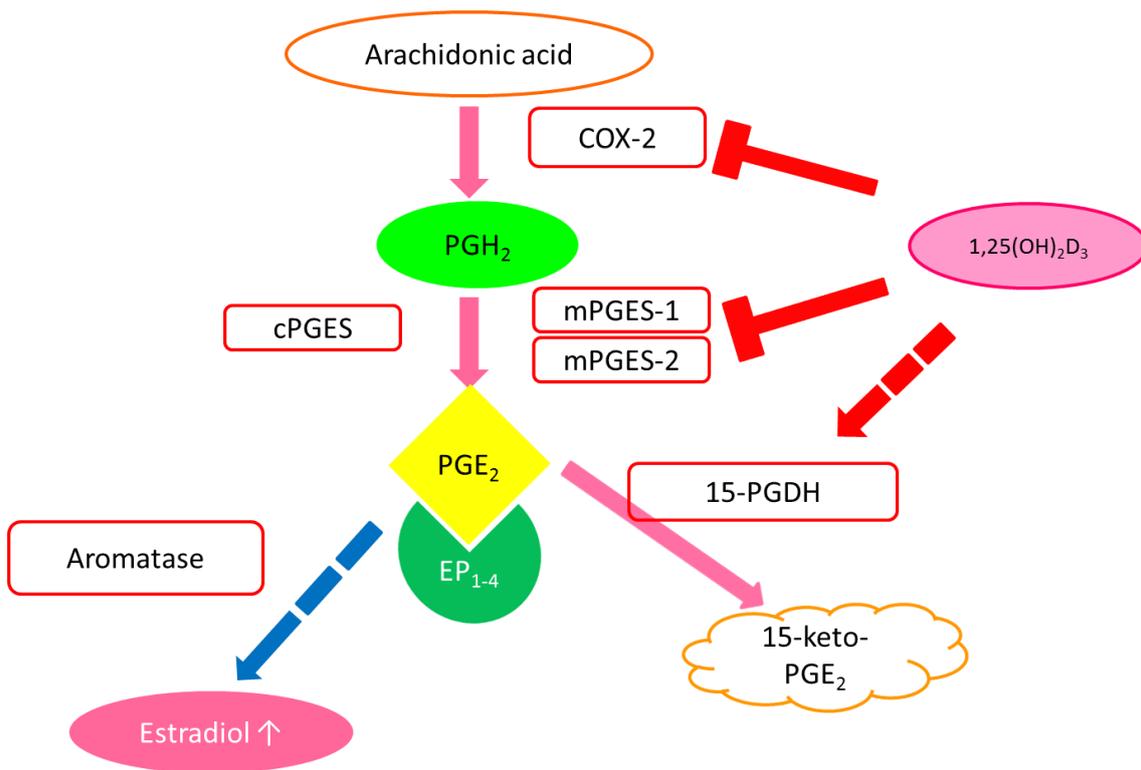


図16. ESC におけるアラキドン酸カスケードへの1,25(OH)₂D₃ の効果

1,25(OH)₂D₃ がPGE₂ 産生やCOX-2、mPGES-1、mPGES-2 などのプロスタグランディン合成酵素のmRNA 発現を抑え、プロスタグランディン分解酵素である15-PGDH のmRNA 発現を高めることが示された。

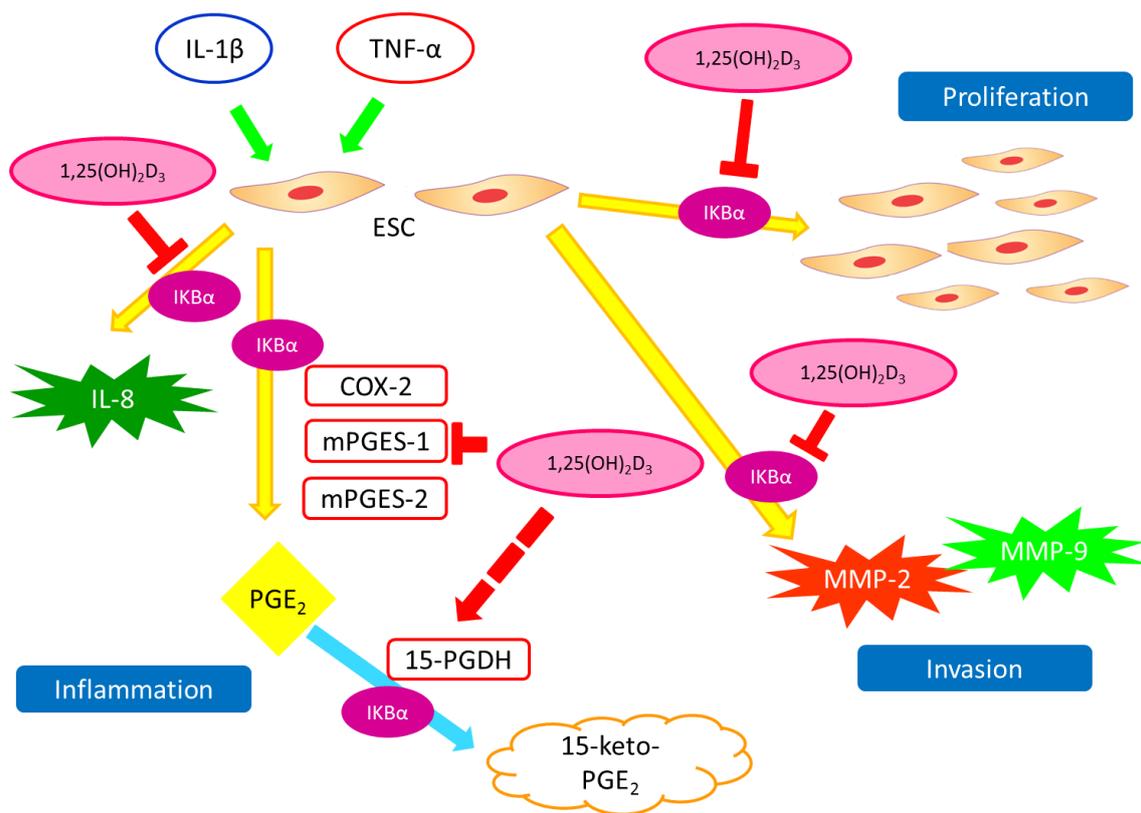


図17. ESC における $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の効果

ESC を用いた*in vitro* 実験では、MMP mRNA 発現や、IL-8 発現、 PGE_2 産生、などの $\text{IL-1}\beta$ や $\text{TNF-}\alpha$ に誘導された炎症反応を $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が有意に抑制することが示された。さらに $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ はESC の生細胞数を有意に減少させ、DNA へのBrdU 再取り込みを抑制した。また、 $1,25\text{-dihydroxy vitamin D}_3$ はESC における $\text{NF}\kappa\text{B}$ 活性も有意に抑制することが示された

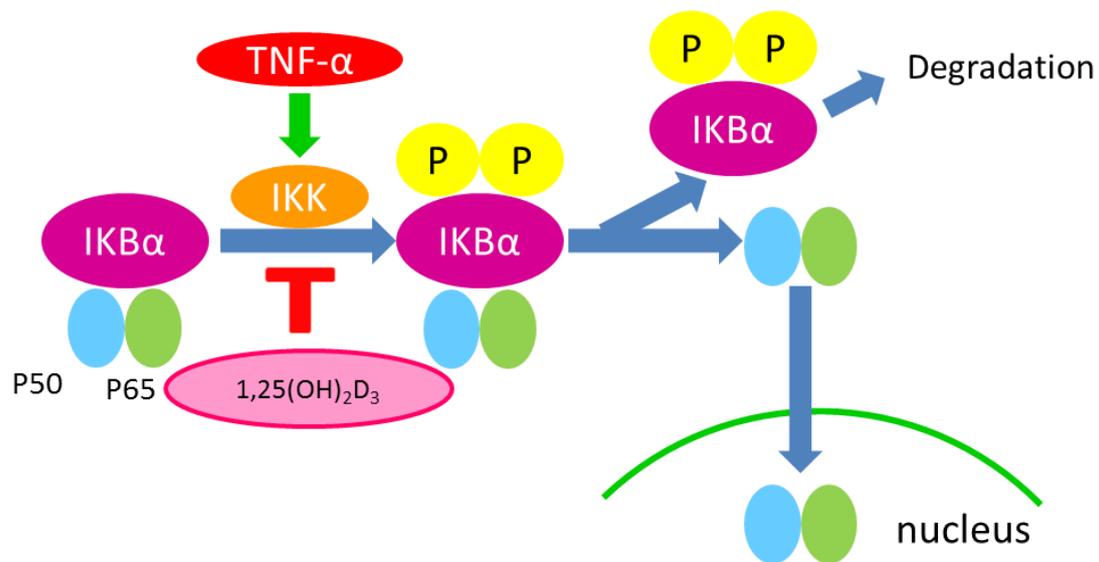


図18. NFκB 経路における1,25(OH)₂D₃ の効果

不活性なNFκB は細胞質に優位に存在し、IκB と結合することにより活性を抑制されている。TNF-α などによりIκBα のセリン残基をリン酸化する酵素複合体であるIκBキナーゼ (IKK) が活性化されると、IκBα はプロテアソームにより分解を受ける。これによりNFκB の核内移行シグナル (p65、p50) が露出し、核に移行し、標的遺伝子の転写を促進する。本研究では、1,25(OH)₂D₃ がESC においてTNF-α によるIκBα の分解を抑制し、NFκB の核内移行シグナルの核への移行を抑制することが示唆された。

略語一覧

VD: ビタミン D

IL-8: Interleukin-8

PGE₂: プロスタグランディン E₂

MMP: Matrix Metalloproteinase

GnRH: Gonadotropin releasing hormone

25(OH)D: 25-hydroxy vitamin D

25(OH)D₃: 25-hydroxy vitamin D₃

1,25(OH)₂D: 1,25-dihydroxy vitamin D

1,25(OH)₂D₃: 1,25-dihydroxy vitamin D₃

ESC: Endometriotic stromal cells

COX-2: Cyclooxygenase-2

mPGES-1: microsomal prostaglandin E synthase-1

mPGES-2: microsomal prostaglandin E synthase-2

cPGES: cytosolic prostaglandin E synthase

15-PGDH : 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase

NFκB: Nuclear factor-kappa B

IκB: Inhibitor κB

IFN- γ : Interferon gamma

IKK: I κ B キナーゼ