

論文の内容の要旨

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

1) 序文

子宮内膜症は、子宮内膜類似組織が子宮外に認められる疾患と定義され、エストロゲン依存性であり、慢性炎症性疾患的側面を持つ。月経困難症や不妊を呈することで、女性の健康、QOLを著しく害することが問題となっている。現在、薬物による子宮内膜症の治療戦略は卵巣機能を抑制するホルモン治療に限られており、妊娠を望む患者は治療を受けることができない問題がある。一方、本症の予防・治療のためにこれらを制御する戦略は試みられていない。

ビタミンDは、近年、骨代謝だけでなく免疫系にも作用することが知られるようになってきた。特にビタミンD欠乏が関節リウマチなどの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、血中ビタミンD値が不育症や体外受精における着床率の低い患者で低いことが指摘されている。

ビタミンDと子宮内膜症の関連についてはいまだ、一定の見解は得られていない。そこで、本研究では、まず子宮内膜症患者での血清ビタミンD値を測定し疾患との関係を明らかにし、次に子宮内膜症に対する1,25-dihydroxy vitaminD₃(1,25(OH)₂D₃)の効果をヒト子宮内膜症間質細胞(Endometriotic Stromal Cells, ESC)を用いた*in vitro*の実験において明らかにすることを目的とした。

2)方法と結果

子宮内膜症患者の血清ビタミンD値について

血清サンプルは37名の非子宮内膜症患者、17名のステージI、IIの子宮内膜症患者および22名のステージIII、IVの子宮内膜症患者から採取した。25-hydroxy vitamin D(25(OH)D)、1,25-dihydroxy vitamin D(1,25(OH)₂D)をRadioimmunoassay法にて測定した。重症子宮内膜症患者における血清25(OH)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。1,25(OH)₂D値には本症の有無、重症度による違いを認めなかった。

ESCに対する1,25(OH)₂D₃の効果について

卵巣子宮内膜症組織よりESCを分離・培養した。継代して、細胞密度がコンフルエントに近づ

いたところに、IL-1 β (5 ng/ml)または TNF- α (10 ng/ml)と1,25(OH) $_2$ D $_3$ 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。

・抗炎症作用

ESCにIL-1 β (5 ng/ml) またはTNF- α (10 ng/ml) とともに1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10 $^{-7}$ M)を添加し、6、24時間培養した。IL-8 mRNA 発現を定量的 real-time PCR (RT-PCR) 法で検討した。データ解析はLightCycler 480 (Roche Diagnostics) を用いて行った GAPDH mRNA を internal standard として標準化した。培養上清中の IL-8 濃度を特異的 ELISA キット (R&D Systems) を用いて検討した。

1,25(OH) $_2$ D $_3$ はESCにおけるIL-8 mRNA 発現を有意に減少させた。また、1,25(OH) $_2$ D $_3$ はIL-8 蛋白産生を有意に抑えた。

・プロスタグランジンE $_2$ (PGE $_2$) 経路への効果

ESCにIL-1 β (5 ng/ml) とともに1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10 $^{-7}$ M) を添加し、3時間培養し、PGE $_2$ の合成酵素(COX-2、mPGES-1、mPGES-2、cPGES)、分解酵素 (15-PGDH)のmRNA発現を定量的RT-PCR法で検討した。ESCにIL-1 β とともに1,25(OH) $_2$ D $_3$ を添加し、24時間培養し、上清中のPGE $_2$ 濃度を特異的EIAキット(Cayman)を用いて検討した。

1,25(OH) $_2$ D $_3$ はPGE $_2$ 産生を用量依存性に有意に抑制した。また、1,25(OH) $_2$ D $_3$ はCOX-2、mPGES-1 およびmPGES-2のmRNA発現を有意に減少し、15-PGDHのmRNA発現を有意に増加した。cPGES のmRNA発現に1,25(OH) $_2$ D $_3$ による影響はなかった。

・抗増殖、アポトーシス誘導作用

ESCに1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10 $^{-6}$ M)を添加し、24時間培養し、生存細胞数、BrdU再取り込み能、アポトーシス陽性細胞の割合を測定した。生細胞数測定にはCell Counting Kit-8 (Dojindo) を、DNA合成の評価にはBiotrak cell proliferation ELISA system (GE Healthcare) を、アポトーシスの評価にはthe Annexin V-EGFP Apoptosis detection kit (Abcam,)およびフローサイトメトリー (FACS Calibur and Cell Quest Pro, BD Biosciences)を用いて分析した。

1,25(OH) $_2$ D $_3$ は生存細胞数を有意に減少させ、BrdUの再取り込み能を有意に抑制した。アポトーシス陽性細胞の割合には一定の傾向を認めなかった。

・抗浸潤作用

ESCに1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10 $^{-7}$ M)を添加し、24時間培養し、MMP-2、MMP-9 mRNA発現を定量的 RT-PCR法で検討した。

1,25(OH) $_2$ D $_3$ はMMP-2およびMMP-9のmRNA発現を有意に抑制した。

・NF- κ B活性への効果

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western blotting法にて調べた。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。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) $_2$ D $_3$ (10 $^{-7}$ M)を添加し24時間培養した後、I κ B α 蛋白を同定したところ、コントロール群と1,25(OH) $_2$ D $_3$ 添加群において、I κ B α 蛋白量に違いを認めなかった。TNF- α 添加5分後にI κ B α 蛋白の分解が進むことを確認したため、次にESCに1,25(OH) $_2$ D $_3$ を添加し24時間培養した後、TNF- α を5分間添加した。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有意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。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。

3)考察

本研究よりビタミン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、1,25(OH)₂D₃がESCに対して、抗炎症、抗浸潤、抗増殖効果を持つことが示された。子宮内膜症に対して、ビタミンDの投与が治療的な効果をもつ可能性が示唆された。

25(OH)DはビタミンD貯蔵を把握するのに有用とされる。1,25(OH)₂Dは生体内で活性型とされ、半減期が短く、ビタミンDの体内動態を把握するには適していない。本研究では、重症子宮内膜症患者において血清25(OH)D値が有意に低いことが示され、ビタミンD欠乏が子宮内膜症の進行と関連することが示唆された。

ビタミンDがサイトカインの産生やPG経路を抑えるという報告は、これまでに多数みられる。本研究においても、ESCにおけるIL-8、PGE₂産生が1,25(OH)₂D₃によって制御されることが示された。IL-8やPGE₂は生体内で炎症形成の重要なmediatorと考えられ、子宮内膜症の病態形成に関与することが知られている。また、PGE₂はestradiol合成酵素であるaromatase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PG経路が重要な役割を果たしていることが知られている。本研究では、PGE₂合成酵素や分解酵素に1,25(OH)₂D₃が作用し、PGE₂産生が抑制されることが示され、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。

本研究では1,25(OH)₂D₃がESCにおいて、NFκBの活性を抑えることを示した。NFκBはサイトカインやPG産生、MMPの発現、細胞増殖などに関与している。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。ここから1,25(OH)₂D₃による抗炎症、抗増殖、抗浸潤効果がNFκB経路を介している可能性が示唆された。

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、ESCにおけるビタミンDの抗炎症、抗増殖、抗浸潤効果が示された。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、多嚢胞性卵巣症候群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、今後新たな治療法となることが期待される。ただし、本研究は*in vitro*のみで行われており、ビタミンDの有効性については実際の患者を対象とした臨床研究など更なる検討が必要である。また、卵巣子宮内膜症という重症子宮内膜症病変を用いて検討しており、子宮内膜症初期病変での検討を行っていない。これらのことを、今後の研究課題としていきたい。