

博士論文

子宮内膜症の進展における腹腔内マクロファージの役割

真壁友子

目次

目次	1
要旨	2
序文	3
研究目的	9
方法	10
結果	18
考察	28
まとめ	37
おわりに	38
謝辞	39
引用文献	40
図表	46
略語一覧	69

要旨

子宮内膜症は慢性炎症性疾患としての側面を持つ。本研究では子宮内膜症における腹腔内マクロファージを中心とする腹腔内環境に着目し研究を行った。子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージの性質として、抗原提示能が減弱していること、好中球や Th2 細胞免疫の誘導能が高いこと、血管新生作用や向炎症作用を有することが明らかとなった。これらの性質により子宮内膜症特有の腹腔内環境が形成され、病態がより進行することが示唆された。また、腹腔内マクロファージのこれらの性質は子宮内膜症間質細胞との持続的な相互作用により獲得されることが示唆された。さらにこの機序において PGE_2 が関与している可能性が示された。

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疾患であり、病理学的には子宮内膜類似組織が子宮外（卵巣や骨盤腹膜等）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、発症年齢は平均 31.1 歳と報告されている⁴。症状としては月経困難症や骨盤痛、排便痛、下血、性交痛、不妊症を呈し、頻度は稀であるが悪性化をきたすこともある。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する報告もあり²、生殖年齢女性の QOL を著しく低下させる疾患である²。

子宮内膜症の病態については未だ不明な点が多い。子宮内膜類似組織が卵巣や骨盤腹膜に生着する機序として最も支持されているのが 1900 年代初頭に Sampson により提唱された子宮内膜移植説⁵である。子宮内膜細胞を含む月経血が経卵管的に腹腔内に逆流し卵巣や骨盤腹膜に生着するというものであるが、月経血の逆流は多くの女性に一般的に見られる現象であり完全な説明とはならない。唯一明白なのはエストロゲン依存性に進行するという点であり⁶、低用量エストロプロゲスチンやプロゲスチン製剤、Gonadotropin releasing hormone (GnRH) agonist 等のエストロゲン阻害をターゲットとする治療が現在の主流である。しかしこれらの薬物療法は排卵を抑制す

るため妊娠を望む女性には行えず⁷、子宮内膜症治療における大きな障壁となっている。

近年、子宮内膜症が慢性炎症性疾患の側面を持つ^{8,9}ことが徐々に明らかにされ、今後の新たな治療ターゲットとして期待されている。以下に述べる様に子宮内膜症患者の腹腔内において各種免疫担当細胞の機能異常や炎症性サイトカイン等の異常分泌がみられ、慢性炎症の状態となり病態の進行をもたらすことが明らかにされてきた。

まず免疫担当細胞の機能異常についてであるが、子宮内膜症患者の腹腔内において大型の顆粒性リンパ球である **natural killer (NK)** 細胞の細胞障害能が低下しており、それにより経卵管的に逆流した子宮内膜症細胞を正常に排除できない可能性が示唆されている。その機序としては抑制型 **NK** 細胞の細胞表面レセプターである

KIR2DL1 陽性の **NK** 細胞が子宮内膜症患者の末梢血中、腹水中に多いことが示されている¹⁰。また、子宮内膜症患者の腹腔内貯留液中では好中球が増加していることが知られ、好中球は **Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)**、**Interleukin-8 (IL-8)** 等の産生を促進し炎症を持続させ子宮内膜症を進展させる¹¹⁻¹³。当研究室でも、**Th17** の分泌する **Interleukin-8 (IL-17)** が子宮内膜症間質細胞 (**Endometriotic stromal cells: ESC**) の増殖を亢進させること¹⁴、**IL17** の刺激を受けた **ESC** は、

Growth-regulated oncogene α (GRO α) の分泌を介して好中球の遊走を亢進させ子宮内膜症の進行に関与していること¹⁵、好中球を抑制した子宮内膜症マウスモデルで子宮内膜症病変が減少すること¹⁶を報告してきた。リンパ球に関しては、子宮内膜症では T 細胞は Th2 にシフトしていると考えられており¹⁷⁻¹⁹、腹腔内貯留液中の Interleukin-10 (IL-10) の上昇、Interferon gamma (IFN- γ) の低下、IL-4/IFN- γ 比の上昇が指摘されている。また、IL-17 を産生する Th17 も増加していることが報告されており^{14,20}、IL-17 は子宮内膜症細胞の増殖を促進し IL-8 や Cyclooxygenase-2 (COX2) の発現を上昇させ子宮内膜症を進展させる¹⁴。

免疫機構において中心的な役割を持つマクロファージについての研究もされてきた。マクロファージは病原体や異物等を貪食、処理するとともにサイトカインを産生し炎症応答を惹起する細胞である。近年、マクロファージがサイトカインにより M1 型 (classically activated) や M2 型 (alternatively activated) へ分化するマクロファージ活性化、分化機構が提唱されてきた。M1 型は IFN γ や Lipopolysaccharide (LPS) 等により誘導される古典的なマクロファージであり、Interleukin-12 (IL-12)、Interleukin-1 β (IL-1 β)、Tumor necrosis factor alpha (TNF α)、IL-6、Interleukin-23 (IL-23) 等の炎症性サイトカインを産生し炎症応答を惹起し、C-X-C

chemokine ligand 9 (CXCL9) や C-X-C chemokine ligand 10 (CXCL10) といったケモカインを発現し Th1 を誘導する。また、高い抗原提示能を持ち細胞内病原体を処理する。一方で M2 型は Th2 から放出されるサイトカインである Interleukin-4 (IL-4)、IL-10、Interleukin-13 (IL-13) により誘導される。M2 型はマンノースレセプター等の高発現により貪食能が高く、IL-10、Interleukin-1 Receptor Antagonist (IL-1RA) 等の抗炎症サイトカインを産生、さらなる Th2 の誘導をもたらす。そして寄生虫の除去や病原体の貪食、組織修復や免疫制御に働く²¹⁻²³ (図 1)。M2 型は炎症反応の終結、組織恒常性維持に重要であるが、血管新生や組織の線維化に関わるサイトカインを産生するため、M2 型への偏位は癌の進行やアトピー性皮膚炎、喘息等の疾患で病態の進行に関与していると報告されている²⁴。

子宮内膜症においては、腹腔内マクロファージの総数は子宮内膜症で上昇しており^{25, 26}、マクロファージ由来の IL-6²⁷ や IL-8²⁸、Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1)²⁹ といったサイトカイン濃度が上昇しているという報告や、子宮内膜症患者から単離されたマクロファージの貪食能が減弱しているという報告がある³⁰。また、子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージは M2 型の表面抗原を発現し、血管新生や線維化の中心的な役割を担うことが示唆されている³¹。

Prostaglandin E₂ (PGE₂) はアラキドン酸を前駆体とする生理活性脂質であり、特異的な細胞膜受容体を介して全身のさまざまな組織で多彩な作用を発揮する³²。急性炎症反応の主要な仲介因子と考えられていたが、近年慢性炎症においても仲介因子となることが明らかにされ、マクロファージや好中球、間質細胞、線維芽細胞等において EP2 受容体を介して正のフィードバック経路を形成し、炎症反応の増幅、慢性化をもたらす³³ といった報告がある。

PGE₂ は、子宮内膜症においては ESC や腹腔内マクロファージから産生されることが知られ、発症や進展に多方面から関与することが示されてきた³⁴⁻³⁸。PGE₂ は子宮内膜症患者の腹腔内に高濃度で存在し、特有の腹腔内環境の形成に寄与しているとされる³⁶。また、子宮内膜症患者の正所性子宮内膜細胞は PGE₂ の作用により増殖能およびアロマターゼの発現が高く局所でのエストロゲン濃度が上昇する。これにより子宮内膜症患者の正所性子宮内膜はアポトーシス抵抗性を有し排除されにくい性質となっているとする報告がある³⁷。さらに PGE₂ は子宮内膜症患者の疼痛や不妊等の症状にも密接に関与することが指摘されている³⁹。

子宮内膜症患者の腹腔内環境において各種免疫担当細胞の機能異常や炎症性サイトカイン等の異常分泌がみられ、これらによる慢性炎症状態が病態の進行をもたらす

可能性が徐々に明らかにされてきたが、断片的な報告が多い。炎症反応の中心的役割を担う腹腔内マクロファージが子宮内膜症の病態にいかに関与しているか、そして腹腔内マクロファージを中心とする免疫機構異常がいかにもたらされるかを明らかにした研究はなされていない。

研究目的

子宮内膜症の腹腔内環境に着目し、腹腔内の免疫機構の中心的役割を担う腹腔内マクロファージの子宮内膜症の進展における役割について検討することを目的とした。

子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージの性質と病態への関与、腹腔内マクロファージの性質獲得における子宮内膜症間質細胞（ESC）の関与とその機序について研究を行った。

方法

子宮内膜症患者および非子宮内膜症患者からの腹腔内貯留液サンプルの採取

腹腔内貯留液は、正常月経周期を持つ良性婦人科疾患に対して腹腔鏡下手術を行った患者を対象とし、腹腔鏡下手術の際に回収した。腹腔内貯留液を原液として可及的に回収した後に、生理食塩水 100ml で腹腔内を洗浄し、腹腔内貯留液として回収した。35 名の非子宮内膜症患者（年齢: 35.6 ± 2.31 歳, mean \pm SD）と 20 名の子宮内膜症患者（年齢: 34.5 ± 3.56 歳）から採取した。子宮内膜症患者については改訂版 American Society for Reproductive Medicine (rASRM) の分類で stage III – IV にあたる患者を対象とし、詳細を表 1 に示した。非子宮内膜症患者については、各実験に用いた検体の背景を表 2 に示した。腹腔内に炎症性疾患のある患者、術前 3 ヶ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た患者、免疫抑制剤の投与を受けている患者は除外した。腹腔内貯留液は、血液の混入を最小限にするため、手術開始直後にダグラス窩から採取し血液の混入が明らかな検体は対象から除外した。採取した腹腔内貯留液はヘパリンを加えた上で直ちに実験に使用した。さらに、フローサイトメトリー、マイクロアレイ分析およびマイクロアレイ分析の確証実験に用いた検体に関しては、排卵による修飾を避けるため月経周期の増殖期にある患者に限定した。

本研究は東京大学倫理委員会の承認を受けており、検体採取に関しては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。

腹腔内マクロファージの単離および培養

腹腔内貯留液は、300g にて 10 分間遠心分離し上清を除去した。沈殿はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS: phosphate buffered saline) に再懸濁し、Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences KK, Tokyo, Japan) の上に重層し、900g で 30 分間遠心した。中間層を回収し、これを腹腔内単核球 (PFMC: peripheral fluid mononuclear cell) とした。PMFC から、抗 CD14 抗体付磁気ビーズ (Miltenyl Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いた磁気細胞分離法により腹腔内マクロファージを単離した。

フローサイトメトリーに用いる際にはフローサイトメトリー用のバッファー (0.1%BSA bovine serum albumin) および 0.04%アジ化ナトリウム添加の PBS) に懸濁した。

培養実験においては RPMI1640 培地 (Gibco, Grand Island, NY) に 5×10^5 個/ml の濃度で、5%CO₂、37 °C の条件で加湿培養した。

フローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原の解析

腹腔内マクロファージの細胞表面抗原の解析のため、anti-CD14-FITC (Miltenyl Biotec)、anti-CD206-PE (Miltenyl Biotec)、anti-CD163-APC (Miltenyl Biotec) を用い染色した。各抗体に対するアイソタイプの抗体を染色してコントロールとした。染色した細胞は PBS で 2 回洗浄し、40 μ m のフィルターで濾過した後、フローサイトメトリー用のバッファーに懸濁した。フローサイトメトリーは BD FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) で行い、データの解析は FlowJo (Tree Star, Ashland, OR) で行った。

マイクロアレイ分析を用いた mRNA 発現の網羅的解析

非子宮内膜症患者 (CT)、子宮内膜症患者 (EM) より腹腔内マクロファージを 3 検体ずつ単離し、後述の方法で RNA を抽出した。各 RNA サンプルの吸光度が $OD_{260} / 280 = 1.8 \sim 2.0$ であることを確認した。各サンプルの RNA 濃度より、RNA 量が同等になるよう持ち込み量を決めて 3 検体ずつを懸濁し、CT (n=1)、EM (n=1) とした。分析に用いた検体の患者背景、RNA 濃度、持ち込み量を表 3 に示した。mRNA の網羅的解析は東レ株式会社に依頼した。

RNA は 2100Bioanalyzer (Agilent technologies, Santa Clara, CA) を用いた電気

泳動で rRNA の明瞭なバンドが検出され、分解がないことが確認された。mRNA サンプル CT、EM は Ambion Amino Allyl aRNA Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用い増幅し、Amersham Cy5 Mono-Reactive Dye (GE Healthcare, Piscataway, NJ) で CyDye 標識、精製した後、各 1 μ g を使用してハイブリダイゼーション (37°C、16h)を行った。DNA チップとして Human Oligo chip 25K が用いられた。ハイブリダイゼーションが終了したチップを洗浄後、3D Gene Scanner 3000 (TORAY, Tokyo, Japan) を用いて最適 PMT 値 (レーザー100%) にて画像を取得、数値化ソフトで数値化した。各チップの数値データからバックグラウンド値を減算した後、グローバルノーマライズ (チップ内シグナル強度の中央値を 25 に調整) により正規化した。パスウェイ解析は、GenMAPP Ver.2.1 (MAPP Finder) を用いて行った。

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=12, 年齢: 36.5 ± 5.37)。腹腔内に炎症性疾患のある患者、術前 3 ヶ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た患者、免疫抑制剤の投与を受け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、子宮内膜症性卵巢嚢胞より無菌下に採取した嚢胞壁を卵巢子宮内膜症組織として用いた。

検体採取に関しては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。

子宮内膜症性間質細胞の分離

ESC は、以前に当教室で報告した方法を用い分離および培養を行った^{15, 40}。卵巢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 (15IU/ml, WAKO, Tokyo, Japan), trypsin (0.006%, Gibco) 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 μ m 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 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 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。

1-2 日後、0.25 %トリプシン EDTA で処理を行い、実験に用いた。

腹腔内マクロファージと ESC の共培養

非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージを 12 ウェルプレートに 5×10^5 個/ml で培養し、1-2 日後に PBS で 1 回洗浄した後、ポアサイズが 0.4 μ m のトランズウェルインサート上に ESC を 2×10^5 個/ml で加え共培養を行った。共培養の際は、培地の量が 2 倍になる様にした。培地には RPMI1640 培地を用いた。共培養開始から 24 時間後に腹腔内マクロファージ、および培養上清を回収した。実験は duplicate で行った (図 2)。

培養上清の準備、培養上清による ESC の刺激

腹腔内マクロファージに対する培養上清による刺激実験のために、以下の手順で培養上清を準備した。①RPMI1640 培地を 24 時間、5%CO₂、37 °Cの条件でおいた上清、②ESC を 2×10^5 個/ml で RPMI1640 培地に 24 時間、5%CO₂、37 °Cの条件で培養し、回収した上清、③前述の方法で非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージと ESC を 24 時間共培養し回収した上清を準備した。

非子宮内膜患者の腹腔内マクロファージを 12 ウェルプレートに 5×10^5 個/ml で培養し、1-2 日後に PBS で 1 回洗浄した後①、②、③の各上清を添加した。24 時間後腹腔内マクロファージを回収した。実験は duplicate で行った (図 3)。

PGE₂ 測定

培養上清中の PGE₂ 濃度を特異的 EIA キット (R&D systems, Minneapolis, MN) を用いてプロトコールに従って測定した。キットの測定下限は 39.0 pg/ml、交差反応や干渉は無かった。測定は triplicate で行いその平均を用いた。

PGE₂ による腹腔内マクロファージの刺激

非子宮内膜患者の腹腔内マクロファージを 12 ウェルプレートに 5×10^5 個/ml で培養し、1-2 日後に PBS で 1 回洗浄した後 PGE₂ (100nM, Cayman, Ann Arbor, MI) を添加した。24 時間後腹腔内マクロファージを回収した。実験は duplicate で行った。

添加する PGE₂ の濃度は、腫瘍随伴マクロファージに対し PGE₂ 1 μ M で刺激しマクロファージの性質変化を見た研究⁴¹や、筋芽細胞に対し PGE₂ 50nM で刺激し細胞増殖について調べた先行研究⁴²を参考に決定した。

腹腔内マクロファージの RNA 抽出、real-time quantitative PCR

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。マイクロアレイ分析には RNA を用いた。

網羅的解析の確証実験や培養実験においては、抽出された RNA は 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。

遺伝子発現の解析のために、SYBR green I Master を用いて real-time quantitative PCR を行った。データ解析は LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて行った。マイクロアレイ分析結果の確証実験において各遺伝子発現は Cyclophilin A (PPIA) mRNA を internal standard として標準化した。その他の実験においては GAPDH mRNA を internal standard として標準化した。表 4 の通りのプライマーを用いた。測定は duplicate で行いその平均を用いた。全ての PCR は melting curve を確認した。

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。Student's t test、Paired t test もしくは Wilcoxon の順位和検定で行い、 $P < 0.05$ を統計学的有意とした。

結果

子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者における腹腔内マクロファージの細胞表面抗原の解析

M2型マクロファージの細胞表面抗原とされるCD163とCD206の発現について、陽性率と mean fluorescence intensity (MFI) について評価し、非子宮内膜症群 (CT, n=5)、子宮内膜症群 (EM, n=6) で比較を行った。

腹腔内マクロファージは、抗 CD14 抗体付磁気ビーズを用いた磁気細胞分離法により単離し、CD14 陽性細胞の割合は $88.9 \pm 3.4\%$ (平均 \pm 標準誤差)であった (図 4 A)。

CD14、CD163、CD206 の発現についての代表的なフローサイトメトリー結果を示す (図 4 B)。CD163 陽性率は CT 群で $78.9 \pm 6.6\%$ 、EM 群で $72.4 \pm 6.9\%$ であり差を認めなかった。CD206 陽性率は CT 群で $58.8 \pm 6.3\%$ 、EM 群で $51.2 \pm 7.3\%$ であり差を認めなかった (図 4 C)。CD163 の MFI は CT 群で 16.8 ± 5.7 、EM 群で 13.0 ± 3.1 であり差を認めなかった。CD206 の MFI は CT 群で 4.4 ± 0.9 、EM 群で 4.2 ± 0.7 であり差を認めなかった (図 4 D)。

M2 型マクロファージの細胞表面抗原である CD163 と CD206 の発現の頻度と強度は子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者の間で差を認めなかった。

子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージの網羅的遺伝子解析

細胞表面抗原の解析では子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージに一定の性質は見出せなかった。そこで、子宮内膜症患者（CT）と非子宮内膜症患者（EM）の腹腔内マクロファージの網羅的遺伝子解析を行った。CT、EM の腹腔内マクロファージを 3 検体ずつ単離、RNA を抽出した。各検体からの持ち込み量が同等になるよう懸濁し、CT (n=1)、EM (n=1) とした。

全遺伝子の発現値と、発現比（EM / CT）の散布図を示した。横軸は CT における発現値を示し、縦軸は EM / CT の発現比を示した。特徴的な遺伝子については全遺伝子における発現の位置を示した（図 5）。

フローサイトメトリーで解析した M2 型マクロファージの細胞表面抗原である CD163、CD206 の結果を表に示した（表 5）。CD163、CD206 いずれの遺伝子発現も CT と EM で差を認めなかった。

EM で高発現していた遺伝子を、CT との変化率が高い遺伝子から順に表に示した（表 6）。最も差が大きかった遺伝子は Interleukin-6 (IL-6) で、EM において CT より 12.4 倍発現が高かった。IL-8 は 8.5 倍、C-X-C chemokine ligand 2 (CXCL2)、C-X-C chemokine ligand 3 (CXCL3) は 5.6 倍発現が高かった。IL-8 や CXCL2、

CXCL3 は M2 型に特徴的とされる遺伝子であり、IL-6 は M1 型に特徴的とされる遺伝子である。

EM で発現が低かった遺伝子について、CT との差が大きい遺伝子から順に表に示した (表 7)。抗原提示に関わる Granzyme K (GZMA)、Histocompatibility antigen, DR alpha chain (HLA-DRA)、Beta-2-microglobulin (B2M)、Histocompatibility antigen, alpha chain F (HLA-F) はそれぞれ 0.28 倍、0.28 倍、0.3 倍、0.37 倍に減弱を認めた。Th1 細胞の誘導に関わる CXCL10、C-C motif chemokine ligand 5 (CCL5)、CXCL9 はそれぞれ 0.33 倍、0.34 倍、0.39 倍と EM において発現が癌弱していた。HLA-DRA、CXCL9、CXCL10、CCL5 は M1 型に特徴的とされる遺伝子である。

EM で 2 倍以上発現が上昇した遺伝子で有意とされるパスウェイを表に示した (表 8)。Inflammatory Response Pathway や、Cytokines and Inflammatory Response Pathway、Focal Adhesion Pathway などが挙げられた。

EM で 2 倍以上発現が低下する遺伝子で有意とされるパスウェイを表に示した (表 9)。IL-3 Signaling Pathway、T cell Receptor Signaling Pathway などが挙げられた。

子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージには特徴的な遺伝子発現があり、病態形成

に関与する可能性が示唆された。

網羅的遺伝子解析結果の確証実験

マイクロアレイ分析において発現量に差のあった遺伝子に関し確証実験を行った。検体は新たに回収し、非子宮内膜症群 (CT、n=6)、子宮内膜症群 (EM、n=11) における遺伝子発現の差を RT-PCR で検討した。マイクロアレイ分析において子宮内膜症で発現の上昇していた遺伝子として IL-6、IL-8、CXCR4、CXCL2、CXCL3、VEGF、TNF α 、低下していた遺伝子として HLA-DRA、HLA-F、CXCL10、CXCL9、CCL5 の発現を検証した。House-keeping gene としてはマイクロアレイ分析で CT と EM 間で発現量の差が最も小さかった PPIA を用いた。

IL-6 の発現は EM 群で有意に高かった ($p < 0.01$)。IL-8 の発現は EM 群で有意に高かった ($p < 0.05$)。C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4) の発現は EM 群で有意に高かった ($p < 0.01$)。CXCL2 の発現は EM 群で有意に高かった ($p < 0.05$)。CXCL3 の発現は EM 群で有意に高かった ($p < 0.01$)。VEGF の発現は EM 群で有意に高かった ($p < 0.01$)。TNF α の発現は EM 群で有意に高かった ($p < 0.05$) (図 6)。

HLA-DRA の発現は EM 群で有意に低かった ($p < 0.01$)。CXCL10 の発現は EM 群で有意に低かった ($p < 0.05$)。CCL5 の発現は EM 群で有意に低かった ($p < 0.05$)。

HLA-F と CXCL9 については有意差を認めなかった (図 7)。

子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージの性質として、血管新生作用 (IL-8、VEGF) や向炎症作用 (IL-6、TNF α) が強い、好中球遊走作用 (CXCL2、CXCL3) が強いことが示唆された。また、抗原提示能 (HLA-DRA) が低い、Th1 細胞誘導能 (CXCL10、CCL5) が低下し Th2 細胞誘導能 (CXCR4) が上昇していることが示唆された。子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージは特有の性質を有し、病態の進展に関与する可能性が示唆された。

非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージと ESC の共培養

上述の実験により明らかになった子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージの性質がいかに獲得されるかを調べるために、非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージを ESC とトランズウェルチャンバーを用いて共培養し、IL-6、CXCL9、CXCL10 の遺伝子発現の変化を検討した (n=6)。これらの遺伝子は、腹腔内マクロファージによる向炎症作用や Th1 型免疫の減弱といった子宮内膜症特有の性質に関与する可能性がある遺伝子であり、これらの遺伝子発現の変化に着目した。

腹腔内マクロファージ単独で培養した際の IL-6 の mRNA 発現 (コントロール) を

1 とすると、ESC との 24 時間の共培養により非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージにおける IL-6 の mRNA 発現は、 2.57 ± 0.05 倍と有意に上昇した ($p < 0.01$)。

腹腔内マクロファージを単独で培養した際の CXCL9 の mRNA 発現 (コントロール) を 1 とすると、ESC との 24 時間の共培養により CXCL9 の mRNA 発現は、 0.54 ± 0.18 倍となりコントロールの 53.6%と有意に低下した ($p < 0.01$)。腹腔内マクロファージを単独で培養した際の CXCL10 の mRNA 発現 (コントロール) を 1 とすると、ESC との 24 時間の共培養により CXCL10 の mRNA 発現は、 0.48 ± 0.16 倍となり、コントロールの 47.8%に有意に低下した ($p < 0.05$) (図 8)。

ESC とのトランズウェルチャンバーを用いた共培養により、非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージは子宮内膜症に特有の性質に変化することが示唆された。そしてこの変化には直接の細胞間接着は必要ではなかった。

培養上清を用いた非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージの刺激実験

腹腔内マクロファージの病的な性質獲得に必要な因子をさらに調べるために培養上清を用いた刺激実験を行った。上清のみ、ESC の 24 時間培養上清、腹腔内マクロファージと ESC の 24 時間培養上清を用意し、非子宮内膜症患者の腹腔内マクロフ

ファージをこの3種類の上清で24時間刺激を行い、IL-6、CXCL9、CXCL10の遺伝子発現の変化を検討した(n=9)。

腹腔内マクロファージを上清のみで刺激したコントロールにおけるIL-6の発現を1とすると、ESCの培養上清による刺激でIL-6の発現は 1.29 ± 0.05 倍であり変化を認めなかった。共培養の培養上清による刺激でIL-6の発現はコントロールに対し 2.37 ± 0.36 倍となり有意に上昇した($p < 0.01$)。また、IL-6の発現においてESCの培養上清刺激と共培養の培養上清刺激の間に有意差を認めた($p < 0.05$)。

腹腔内マクロファージを上清のみで刺激したコントロールにおけるCXCL9の発現を1とすると、ESCの培養上清による刺激でCXCL9の発現はコントロールに対し 1.12 ± 0.20 倍と変化せず、共培養の培養上清による刺激においても 1.16 ± 0.19 倍と変化しなかった。

腹腔内マクロファージを上清のみで刺激したコントロールにおけるCXCL10の発現を1とすると、ESCの培養上清による刺激でCXCL10の発現はコントロールに対し 5.24 ± 2.48 倍と変化せず、共培養の培養上清による刺激においても 3.68 ± 2.07 倍と変化しなかった。(図9)。

ESCの培養上清による刺激で、非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージにおけるIL-6、CXCL9、CXCL10の発現は変化しなかった。腹腔内マクロファージとESC

の共培養上清による刺激で、非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージにおける IL-6 の発現は上昇したが、CXCL9、CXCL10 の発現は変化しなかった。子宮内膜症特有の腹腔内マクロファージの性質獲得は、ESC からの一方向の因子ではもたらされず、腹腔内マクロファージと ESC の持続的な相互作用が必要であることが示唆された。

培養上清中の PGE₂ 濃度

PGE₂ は子宮内膜症の病態において中心的な役割を持つことが知られている。また、他の炎症性疾患において PGE₂ がマクロファージにおける CXCL10 等のケモカインの発現を低下させ病態の進展に関与することが示されている。そこで、腹腔内マクロファージと ESC の持続的な相互作用によりもたらされる、マクロファージの性質を変化させる因子とし PGE₂ に着目した。

ESC の 24 時間培養上清、非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージと ESC の 24 時間共培養上清における PGE₂ 濃度の変化について検討を行った (n=5)。5 検体のうち 3 検体については腹腔内マクロファージ単独の 24 時間培養上清における PGE₂ 濃度も測定した。なお、共培養の際の培地の量は 2 倍になっており、細胞数に対応して

いる。

腹腔内マクロファージの培養上清の PGE_2 濃度は $33.0 \pm 7.4 \text{ pg/ml}$ (平均 \pm 標準誤差)、ESC の培養上清の PGE_2 濃度は $78.6 \pm 33.8 \text{ pg/ml}$ 、腹腔内マクロファージと ESC の共培養上清の PGE_2 濃度は $145.5 \pm 36.3 \text{ pg/ml}$ であった。各検体における PGE_2 濃度の比較では共培養上清で ESC 培養上清に対し有意に高かった ($p < 0.05$)。腹腔内マクロファージと ESC の持続的な相互作用により、 PGE_2 濃度が上昇する可能性が示唆された。

PGE_2 を用いた非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージの刺激実験

最後に PGE_2 刺激により腹腔内マクロファージの性質変化が起こるかについて検討した。非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージに対し PGE_2 (100nM) で 24 時間刺激を行い、遺伝子発現の変化を検討した ($n=6$)。

PGE_2 による刺激を行っていない腹腔内マクロファージにおける IL-6 の発現 (コントロール) を 1 とすると、 PGE_2 刺激により IL-6 の発現はコントロールに対し 1.61 ± 0.16 倍と有意に上昇した ($p < 0.05$)。 PGE_2 による刺激を行っていない腹腔内マクロファージにおける CXCL9 の発現 (コントロール) を 1 とすると、 PGE_2 刺激によ

り CXCL9 の発現は 0.72 ± 0.05 倍と有意に低下した ($p < 0.05$)。PGE₂ による刺激を行っていない腹腔内マクロファージにおける CXCL10 の発現 (コントロール) を 1 とすると、PGE₂ 刺激により CXCL10 の発現は 0.03 ± 0.01 倍と有意に低下した ($p < 0.01$)。 (図 11)。

腹腔内マクロファージと ESC の共培養によりもたらされた、腹腔内マクロファージの子宮内膜症に特有な性質獲得と同様の変化が、PGE₂ 刺激によりもたらされることが示唆された。

考察

本研究では腹腔内マクロファージにより形成される腹腔内環境に着目し、子宮内膜症の病態解析を試み、新たな知見を得た。

はじめに子宮内膜症患者における腹腔内マクロファージの特徴を明らかにするために、細胞表面抗原の解析を行った。子宮内膜症の腹腔内マクロファージは M2 型に偏位しているとの報告があり³¹、M2 型マクロファージで高発現するとされる CD163、CD206 の発現^{43,44}について検討したが子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者で差を認めなかった。

この結果は、非子宮内膜症群が n=6、子宮内膜症群が n=5 と検体数が少ないことが影響している可能性が否定できない。しかし、表 4 に示した様に網羅的遺伝子解析結果でも CD163 と CD206 の遺伝子発現に差はみられず、これらの細胞表面抗原の発現は同等である可能性がある。

腹腔内マクロファージについて、本研究と同様にフローサイトメトリーで CD163 と CD206 の発現を調べた研究では、いずれの細胞表面抗原も子宮内膜症患者で有意に発現が高いとする報告がある³¹。一方で、免疫染色で CD163 の発現を調べた報告では子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者で発現に差を認めておらず⁴⁴結果は一致していない。また、卵巣癌の腫瘍随伴マクロファージは M2 型であり腫瘍の進展に関与するとされるが、CD163 の発現は M2 型特有の遺伝子発現と相関しないとする報告

もある⁴⁵⁾。

以上より、細胞表面抗原の発現の検討だけではマクロファージの極性や性質の評価は行えない可能性があると考えられた。

子宮内膜症の腹腔内マクロファージは病態の進行に関与する性質を持っているのか、そして M2 型に偏位していると言えるのかを調べるため、腹腔内マクロファージの遺伝子発現の網羅的解析、その確証実験を施行した。

網羅的解析で子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージにおいて GZMA、HLA-DRA、B2M、HLA-F 等の抗原提示に関わる遺伝子^{46, 47)}の発現低下が示唆され、確証実験でも HLA-DRA は有意に発現が低下した。また、網羅的解析で Th1 細胞誘導をもたらす CXCL9、CXCL10、CCL5^{48, 49)}の発現低下が示唆され、確証実験で CXCL10 と CCL5 の発現低下が明らかとなった。これらは M1 型とは反する性質と考えられた。

M2 型で発現が増強するとされる、組織修復、血管新生に関わる IL-8 や VEGF^{50, 51)}は子宮内膜症の腹腔内マクロファージにおいて有意な発現増強を認め、好中球遊走作用を有す CXCL2、CXCL3 の発現や Th2 細胞誘導に関わる CXCR4⁵²⁾についても有意な発現増強を認めた。一方で、M2 型の特徴であるとされる IL-10、IL-1RA 等の抗炎症サイトカインの発現については明らかな増強は見られず、マンノースレセプタ

一等の食食に関わる遺伝子の発現増強も見られなかった。以上より M2 型で典型的とされる遺伝子発現との合致は一部であった。

また、網羅的解析のパスウェイ解析において Inflammatory Response Pathway、Cytokines and Inflammatory Response Pathway が有意なパスウェイとして挙げられた。確証実験でも炎症性サイトカインである IL-6、TNF α の発現の増強を認め⁵³、子宮内膜症の腹腔内マクロファージは向炎症作用をもつことが示唆された。向炎症作用は本来 M1 型の役割と考えられているが、マクロファージが子宮内膜症上皮細胞からの刺激により M2 型となり IL-6 を高発現する様になり子宮内膜症細胞の遊走に関与するという報告⁵⁴もある。

これらの結果について図 12 に示した。子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージは抗原提示能が減弱している可能性、Th2 型優位の免疫を誘導、好中球を誘導、血管新生や線維化を促進する作用を有する一方で向炎症作用も有する可能性が示唆された。

当初、マクロファージがサイトカインにより M1 や M2 型に分化するというマクロファージ活性化、分化機構が提唱されたが²¹⁻²³、この概念はあくまで in vitro で骨髄由来マクロファージを IFN- γ や IL-4 で刺激した場合に成り立つものであり、in vivo の複雑な組織環境下においては、マクロファージは均一の細胞集団ではなく多彩な活

性化、分化様式により機能を獲得しているとの指摘がなされている^{55, 56}。実際、脱落膜マクロファージの性質を網羅的解析で調べた研究によれば、C-C motif chemokine ligand 18 (CCL18)、CD209、Insulin like growth factor 1(IGF-1)、CD206 等 M2 型で優位とされる遺伝子の増強が見られた一方で、M1 型でみられるとされる C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2)、C-C motif chemokine ligand 8 (CCL8) 等の向炎症性サイトカインの発現増強も見られた⁵⁷。また、一般的に M2 型であると考えられる腫瘍随伴マクロファージでは、癌種や腫瘍のステージで性質が異なり、より進行した癌において M2 型の性質をより多く獲得しているとされる⁵⁸。このように *iv vivo* の様々な環境下において、マクロファージの機能は多彩であり、単純に M1 型、M2 型の区別はできないことが多く、M2 like という表現で分類されることが妥当であることが多いことが様々な疾患における研究で示されてきている^{59, 60}。以上より、本研究で明らかになった子宮内膜症の腹腔内マクロファージの性質は M2 like であると言え、病態の進行に寄与していると考えられた。

つぎに、上述した子宮内膜症の腹腔内マクロファージの性質がいかに獲得されるかについて調べたために種々の培養実験における腹腔内マクロファージの IL-6、CXCL9、CXCL10 の発現について調べた。ESC とトランズウェルチャンバーを用い

た 24 時間の共培養により、非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージにおける IL-6 発現の上昇、CXCL9、CXCL10 の発現低下を認めた。しかしこれは ESC の培養上清や腹腔内マクロファージと ESC の共培養上清による刺激ではもたらされなかった。

様々な生理的、病的環境下において、間葉系間質細胞は、直接の細胞間接着やインドルアミン-2, 3-ジオキシゲナーゼ、PGE₂、一酸化窒素、IL-10 等の可溶性因子を介して、マクロファージを活性化、分化させる能力を持つことが明らかにされてきた⁶¹。創傷治癒のマウスモデルにおいて、歯肉由来の間質細胞とマクロファージの共培養によってマクロファージが M2 型の性質を有する様になるとする報告や⁶²、間質細胞の上清による刺激でも同様に M2 型へのマクロファージの分化が誘導されるとの報告がある⁶³。単球から分化させたマクロファージを関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞と共培養すると CXCL9 や CXCL10 の発現が低下し、線維芽細胞の培養上清による刺激でも同様の発現低下が見られ、何らかの可溶性因子によるとされる報告もある⁶⁴。

子宮内膜症においては、腹腔内マクロファージの子宮内膜症特有の性質獲得には、ESC と腹腔内マクロファージ直接の細胞間接着は必要ではなく、何らかの可溶性因子を介した持続的な相互作用が必要であると考えられた。

PGE₂が子宮内膜症の発症、進展に関わることは知られ、ESC や腹腔内マクロファージからの分泌により子宮内膜症の腹腔内に高濃度に存在していることが知られている³²⁻³⁶。そこで、腹腔内マクロファージの性質獲得に必要な可溶性因子としてPGE₂が関与するとの仮説のもとに研究を行った。

培養上清中の PGE₂ 濃度を調べたところ、腹腔内マクロファージと ESC の共培養上清において、ESC の培養上清と比較し PGE₂ 濃度が有意に上昇していた。そして非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージに対し PGE₂ で刺激を行うと、IL-6 発現の上昇、CXCL9、CXCL10 の発現低下を認め、共培養の際と同様の変化を認めた。CXCL10 の発現抑制効果は、共培養実験より大きかったが、これは検体数が少ないことや刺激に用いた PGE₂ の濃度が高い可能性、共培養では様々な因子が作用することによると可能性が考えられた。

PGE₂ がマクロファージの分化に関与するとする報告は散見される。乳癌の腫瘍随伴マクロファージにおいて COX-2 は高発現しており、PGE₂ は M2 型への誘導、維持に必要である。腫瘍随伴マクロファージは腫瘍を増殖、腫瘍細胞の COX-2 発現を増強させ、それがさらに M2 型への偏位をもたらし正のフィードバック効果で病態を進行させるとされる⁴¹。敗血症の研究においては、骨髄間質細胞から分泌される PGE₂ がマクロファージを分化させ IL-10 の発現を増強させることで病態を改善させると

する報告がある⁶⁵。また、動脈硬化は向炎症作用が病態に関与するとされるが、血管内皮細胞は PGE_2 を介してマクロファージにおける CXCL10 の発現を低下させ病態を改善させるとされる⁶⁶。

PGE_2 は子宮内膜症の病態において様々な機序からの関与が示唆されているが、本研究では、腹腔内マクロファージの子宮内膜症特有な性質獲得への関与が示唆された。今後、 COX-PGE_2 系の阻害薬によりマクロファージの性質獲得が阻止できるかについて検討を行う予定である。

今回、腹腔内マクロファージの性質獲得について調べたために種々の培養実験における腹腔内マクロファージの IL-6 、 CXCL9 、 CXCL10 の発現について調べた。 IL-6 高発現は向炎症作用に関与し、 CXCL9 、 CXCL10 の低発現は Th1 型免疫誘導能の低下に関与しており、これらの遺伝子発現の特徴は子宮内膜症に特有のものであると考えられる。その他の子宮内膜症の腹腔内マクロファージに特徴的な遺伝子の発現変化についても今後検討が必要である。

今回の研究により示唆される子宮内膜症の発症、進展の機序についてまとめる。機能性月経困難症患者の腹腔内 PGE_2 濃度は高く^{32, 67, 68}、将来子宮内膜症を発症する

割合が高いと言われている^{69,70}。PGE₂には、子宮内膜間質細胞のアポトーシスを抑制する作用があるため、機能性月経困難症等で腹腔内に PGE₂ が高濃度に存在する環境下においては、逆流月経血中の子宮内膜間質細胞が処理されにくい可能性がある³⁷。腹腔内に排除されずに残存した子宮内膜間質細胞は、高濃度の PGE₂ 下で腹腔内マクロファージとの相互作用により腹腔内マクロファージを子宮内膜症に特有の性質に偏位させる。異常に偏位した腹腔内マクロファージは Th2 型免疫を誘導、好中球を誘導し腹腔内を慢性炎症状態にし、過剰な血管新生作用や線維化作用により組織の癒着をおこす。このような腹腔内環境の形成により子宮内膜症は進展し、様々な症状を呈するようになる可能性が示唆された(図 13)。

子宮内膜症患者の疼痛に対して COX2-PGE₂ 系の阻害薬である NSAIDs や COX inhibitor は有効であることが多いが、これらの薬剤は疼痛緩和の効果だけではなく、子宮内膜症の発症や進展の抑制効果を有する可能性がある。大腸癌や乳癌の研究においては PGE₂ の受容体である EP2 や EP4 の阻害により腫瘍細胞の増殖抑制効果や、腫瘍随伴細胞における VEGF 等のサイトカイン産生抑制効果が、マクロファージ等の免疫担当細胞への効果により病態制御が可能となり新たな治療戦略となり得る可能性が示唆されている^{71,72}。子宮内膜症においても ESC における EP 受容体の発現に関する研究⁷³や EP 受容体阻害剤の有効性を検証した研究⁷⁴はある。今後は子宮

内膜症の腹腔内マクロファージにおける EP 受容体の発現や役割についての研究を進め、腹腔内マクロファージを中心とした腹腔内環境の改善が治療ターゲットになり得るかについての研究が期待される。

まとめ

1. M2 型マクロファージの細胞表面抗原である CD163 と CD206 の発現は、子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者で差を認めなかった。
2. 子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージは、抗原提示能 (HLA-DR) が低下し Th1 型細胞の遊走能 (CXCL10、CCL5) が低下している。一方で、好中球遊走作用 (CXCL2、CXCL3) や血管新生作用 (IL-8、VEGF)、向炎症作用 (IL-6、TNF α) が強く、M2 like な性質に偏位している。
3. ESC とのトランズウェルチャンバーを用いた共培養により、非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージにおける CXCL9 の発現が低下、CXCL10 の発現が低下、IL-6 の発現が上昇した。
4. ESC の培養上清や ESC と腹腔内マクロファージの共培養上清による刺激では、非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージにおける CXCL9、CXCL10、IL-6 の発現は変化しなかった。
5. ESC と腹腔内マクロファージの共培養上清において、ESC の培養上清と比較し PGE₂ の濃度が高かった。
6. PGE₂ の刺激により非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージにおける CXCL9 の発現が低下、CXCL10 の発現が低下、IL-6 の発現が上昇した。

おわりに

本研究ではこれまで断片的にのみ明らかにされていた子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージを中心とした免疫異常について明らかにした。子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージは、抗原提示能の低下、Th1型細胞の遊走能の低下、好中球遊走作用の増強、血管新生作用の増強、向炎症作用の増強といった性質を有し、M2 like な性質に偏位し、子宮内膜症の病態進展に寄与していると考えられた。そして腹腔内マクロファージが子宮内膜症に特有の性質を獲得する機序として、ESCとの持続的な相互作用が示唆された。さらにこの相互作用ににおいてPGE₂が関与している可能性が示唆された。

本研究で留意すべき点は腹腔内貯留液中のマクロファージをもちいていることである。ESCとの相互作用、病態の進行の点においては、卵巣子宮内膜症等の病変局所に存在するマクロファージについても今後検討が必要であると考えられる。

PGE₂は子宮内膜症の病態に様々な面で関与することが知られてきたが、腹腔内の免疫異常においても関与している可能性が示された。今後、新たな治療ターゲットになり得ることが示唆された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導頂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頂いた諸先生方に心より御礼申し上げます。

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. J. A. Sampson. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *American Journal of Pathology*, 3, 93-110 43 (1927).
6. Giudice, L.C., Kao, L.C. Endometriosis. *The Lancet*. 364, 1789-1799 (2004).
7. Vercelli, P., Vigano, P., Somigliana, E. & Fedele, L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nature reviews. Endocrinology* 10, 261-275 (2014).
8. D. I. Lebovic, M. D. Mueller, and R. N. Taylor. Immunobiology of endometriosis. *Fertility and sterility*, 75, 1-10 (2001).
9. M. Y. Wu, and H. N. Ho. The role of cytokines in endometriosis. *American journal of reproductive immunology*, 49, 285-96 (2003).
10. Maeda N. Increased Killer inhibitory receptor KIR2DL1 expression among natural killer cells in women with pelvic endometriosis. *Fertility and sterility*, 77, 297-302 (2002).
11. Tariverdian N, Siedentopf F, Intraperitoneal immune cell status in infertile women with and without endometriosis. *Journal of reproductive immunology*, 80, 1-2, 80-90 (2009).
12. Sikora J, Smycz-Kubanska M. Abnormal peritoneal regulation of chemokine activation-The role of IL-8 in pathogenesis of endometriosis. *American journal of reproductive immunology*, 77, 375-86 (2017).
13. Na YJ, Yang SH. Effects of peritoneal fluid from endometriosis patients on the release of vascular endothelial growth factor by neutrophils and monocytes. *Human Reproduction*, 21, 1846-55 (2006).
14. T. Hirata, Y. Osuga. Interleukin (IL) -17A stimulates IL-8 secretion, cyclooxygenase-2 expression, and cell proliferation of endometriotic stromal cells. *Endocrinology*, 149, 1260-7 (2008).

15. M. Takamura, Y. Osuga. Interleukin-17A is present in neutrophils in endometriosis and stimulates the secretion of growth-regulated oncogene-alpha (Gro-alpha) from endometriotic stromal cells. *Fertility and sterility*, 98, 1218-24 (2012).
16. M. Takamura, K. Koga. Neutrophil depletion reduces endometriotic lesion formation in mice. *American journal of reproductive immunology*, 76, 193-198 (2016).
17. S. Podgaec, M. S. Abrao, J. A. Ensometriss: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Human Reproduction*, 22, 1373-9 (2007).
18. Y. S. Antsiferova, N. Y. Sotnikova. Changes in the T-helper cytokines profile and in lymphocyte activation at the systemic and local levels in women with endometriosis. *Fertility and sterility*, 84, 1705-11 (2005).
19. Y. Osuga, K. Koga. Lymphocytes in Endometriosis. *American journal of reproductive immunology*, 65, 1-10 (2011).
20. T. Hirata, Y. Osuga. Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL20 secreted from IL-1 beta-, TNF alpha- and IL17A-stimulated endometriotic stromal cells. *Endocrinology*, 151, 5468-76 (2010).
21. Biswas, S.K., Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. *Nature immunology*, 11, 889-896 (2010).
22. Bronte, V., Murray, P.J. Understanding local macrophage phenotypes in disease: Modulating macrophage function to treat cancer. *Nature medicine*, 21, 117-119 (2015).
23. Locati, M., Mantovani, A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Advances in immunology*, 120, 163-184 (2013).
24. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation*, 122, 787-95 (2012).
25. Bulun SE. Endometriosis. *New England Journal of Medicine*, 360, 268-79 (2009).
26. Halme J, Becker S. Increased activation of pelvic macrophages in infertile women with mild endometriosis. *American journal of Obstetrics and Gynecology*. 145, 333-7 (1983).
27. Koyama N, Matsuura K. Cytokines in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *International journal of Gynecological Obstetrics*, 43, 45-50

- (1993).
28. Arici A, Tazuke SI. Interleukin-8 concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis and modulation of interleukin-8 expression in human mesothelial cells. *Molecular Human Reproduction*, 2, 40-45 (1996).
 29. Yih S, Katabuchi H. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in peritoneal endometriotic cells. *Virchows Arch*, 438, 70-77 (2011).
 30. Chuang PC, Wu MH. Downregulation of CD36 results in reduced phagocytic ability of peritoneal macrophages of women with endometriosis. *Journal of Pathology*, 219, 232-41 (2009).
 31. Bacci, M., Capobianco, A. Macrophages are alternatively activated in patients with endometriosis and required for growth and vascularization of lesions in a mouse model of disease. *The American journal of pathology*. 175, 547-556 (2009).
 32. Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 11613-7 (2007).
 33. Okumura, T., Murata, Y. Effects of the selective ep4 antagonist, cj-023,423 on chronic inflammation and bone destruction in rat adjuvant-induced arthritis. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 60, 723-730 (2008).
 34. Wu, M.H., Lu, C.W. Prostaglandin e2: The master of endometriosis? *Experimental biology and medicine*, 235, 668-677 (2010).
 35. Wu, M.H., Shoji, Y. Endometriosis: Disease pathophysiology and the role of prostaglandins. *Expert reviews in molecular medicine*. 9, 1-20 (2007).
 36. Wu, M.H., Wang, C.A. Distinct regulation of cyclooxygenase-2 by interleukin-1beta in normal and endometriotic stromal cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 90, 286-295 (2005).
 37. Zeng, C., Xu, J.N. C-jun nh2-terminal kinase and p38 inhibition suppresses prostaglandin e2- stimulated aromatase and estrogen receptor levels in human endometriosis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 10. 2015-31 (2015).
 38. 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, 189094 (1986).
 39. Tanbo, T., Fedorcsak, P. Endometriosis-associated infertility: Aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* (2016).

40. Urata, Y. IL-1 β increases expression of tryptophan 2,3-dioxygenase and stimulates tryptophan catabolism in endometriotic stromal cells. *American Journal of Reproductive Immunology* 72, 496-503 (2014).
41. Hongzhong Li, Bing Yang. Cyclooxygenase-2 in tumor-associated macrophages promotes breast cancer cell survival by triggering a positive-feedback loop between macrophages and cancer cells. *Oncotarget*, 6, 29637-50 (2015).
42. Chenglin Mo, Ruonan Z. Prostaglandin E₂ promotes proliferation of skeletal muscle myoblasts via EP4 receptor activation. *Cell Cycle*. 65, 412-420 (2015).
43. Sica, A., Erreni, M. Macrophage polarization in pathology. *Cellular and molecular life sciences CMLS*. 72, 4111-4126 (2015).
44. Itoh, F., Komohara, Y. Possible involvement of signal transducer and activator of transcription-3 in cell-cell interactions of peritoneal macrophages and endometrial stromal cells in human endometriosis. *Fertility and sterility*. 99, 1705-1713 (2013).
45. Reinartz, S., Schumann, T. Mixed-polarization phenotype of ascites-associated macrophages in human ovarian carcinoma: Correlation of cd163 expression, cytokine levels and early relapse. *International Journal of Cancer*. 134, 32-42 (2014).
46. Fling, S. P., B. Arp, and D. Pious. HLA-DMA and -DMB genes are both required for MHC class II/peptide complex formation in antigen-presenting cells. *Nature* 368, 554–558 (1994).
47. Morris, P., J. Shaman. An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature*. 368, 551–554 (1994).
48. Belperio, J. A., M. P. Keane. Role of CXCL9/CXCR3 chemokine biology during pathogenesis of acute lung allograft rejection. *Journal of Immunology*. 171, 4844–4852 (2003).
49. Hancock, W. W., W. Gao. Donor-derived IP-10 initiates development of acute allograft rejection. *The Journal of Experimental Medicine*. 193, 975–980 (2001).
50. Laschke, M.W., Menger, M.D. Anti-angiogenic treatment strategies for the therapy of endometriosis. *Human reproduction update*. 18, 682-702 (2012).
51. Horie, S., Harada, T. Progesterone and progestational compounds attenuate tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 production via nuclear factor kappa b inactivation in endometriotic stromal cells. *Fertility and*

- sterility*. 83, 1530-1535 (2005).
52. Gulati K, Gangele K. Molecular cloning and biophysical characterization of CXCL3 chemokine. *International Journal of Biological Macromolecules*. 8130, 141-150 (2017).
 53. Harada T, Iwabe T. Role of cytokines in endometriosis. *Fertility and Sterility*, 76, 1-10 (2001).
 54. Woo, J.H., Yang, Y.I. Interleukin 6 secretion from alternatively activated macrophages promotes the migration of endometriotic epithelial cells. *Biol Reprod*. 97, 660-670 (2017).
 55. Davies LC, Jenkins SJ. Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology*, 14, 986-95 (2013).
 56. Wynn TA, Chawla A. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496, 445-55 (2013).
 57. Gustafsson, C., Mjosberg, J. Gene expression profiling of human decidual macrophages: Evidence for immunosuppressive phenotype. *PloS one*. 3, e2078 (2008).
 58. Coussens LM, Zitvogel L. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science*, 339, 231-237 (2013).
 59. Colegio, O.R., Chu, N.Q. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*. 513, 559-563 (2014).
 60. Liddiard, K., Taylor, P.R. Understanding local macrophage phenotypes in disease: Shape-shifting macrophages. *Nature medicine*. 21, 119-120 (2015).
 61. Zheng, G., Ge, M. Mesenchymal stromal cells affect disease outcomes via macrophage polarization. *Stem cells international*. 989473 (2015).
 62. Q.-Z. Zhang, W.-R. Su. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of M2 macrophages and enhance cutaneous wound healing. *Stem Cells*, 28,1856–1868 (2010).
 63. D. Jiang, Y. Qi, N. G. The effect of adipose tissue derived MSCs delivered by a chemically defined carrier on full- thickness cutaneous wound healing. *Biomaterials*, 34, 2501–2515 (2013).
 64. Donlin, L.T., Jayatilleke, A. Modulation of tnf-induced macrophage polarization by synovial fibroblasts. *Journal of immunology*. 193, 2373-2383 (2014).
 65. Nemeth K, Leelahavanichkul A. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E₂-dependent reprogramming of host macrophages to

- increase their interleukin-10 production. *Nature medicine*, 15, 42-9 (2008).
66. Takayama K, Garcia-Cardena G. Prostaglandin E₂ suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *Journal of Biological chemistry*, 277, 44147-54 (2002).
 67. De Sabctis V, Soliman A. Primary Dysmenorrhea in Adolescents: Prevalence, Impact and Recent Knowledge. *Pediatric Endocrinological Review*. 13, 512-20 (2015).
 68. Matsuzaki, S., Canis, M. Cyclooxygenase-2 expression in deep endometriosis and matched eutopic endometrium. *Fertility and sterility*. 82, 1309-1315 (2004).
 69. Harel Z. Dysmenorrhea in adolescents and young adults: etiology and management, 19, 363-71 (2006).
 70. Powell AM, Chan WY. Menstrual PGF₂ α , PGE₂ and TXA₂ in normal and dysmenorrheic women and their temporal relationship to dysmenorrhea. *Prostaglandins*. 29, 273-90 (1985).
 71. Xiaojun Ma, Tomohiro Aoki. Definition of Prostaglandin E₂-EP2 Signals in the Colon Tumor Microenvironment That Amplify Inflammation and Tumor Growth. *Cancer Research*, 75, 2822-32 (2015).
 72. Mousumi Majumber, Xiping Xin. Prostaglandin E₂ receptor EP4 as the common target on cancer cells and macrophages to abolish angiogenesis, lymphangiogenesis, metastasis, and stem-like cell functions. *Cancer Science*, 105, 1142-51 (2014).
 73. Banu, S.K., Lee, J. Selective inhibition of prostaglandin e₂ receptors ep2 and ep4 induces apoptosis of human endometriotic cells through suppression of erk1/2, akt, nf κ b, and beta-catenin pathways and activation of intrinsic apoptotic mechanisms. *Molecular endocrinology*. 23, 1291-1305 (2009).
 74. Joe A Arosh, JeHoon Lee. Molecular and preclinical basis to inhibit PGE₂ receptors EP2 and EP4 as a novel nonsteroidal therapy for endometriosis. *PNAS*. 1073, 1-6 (2016).

図表

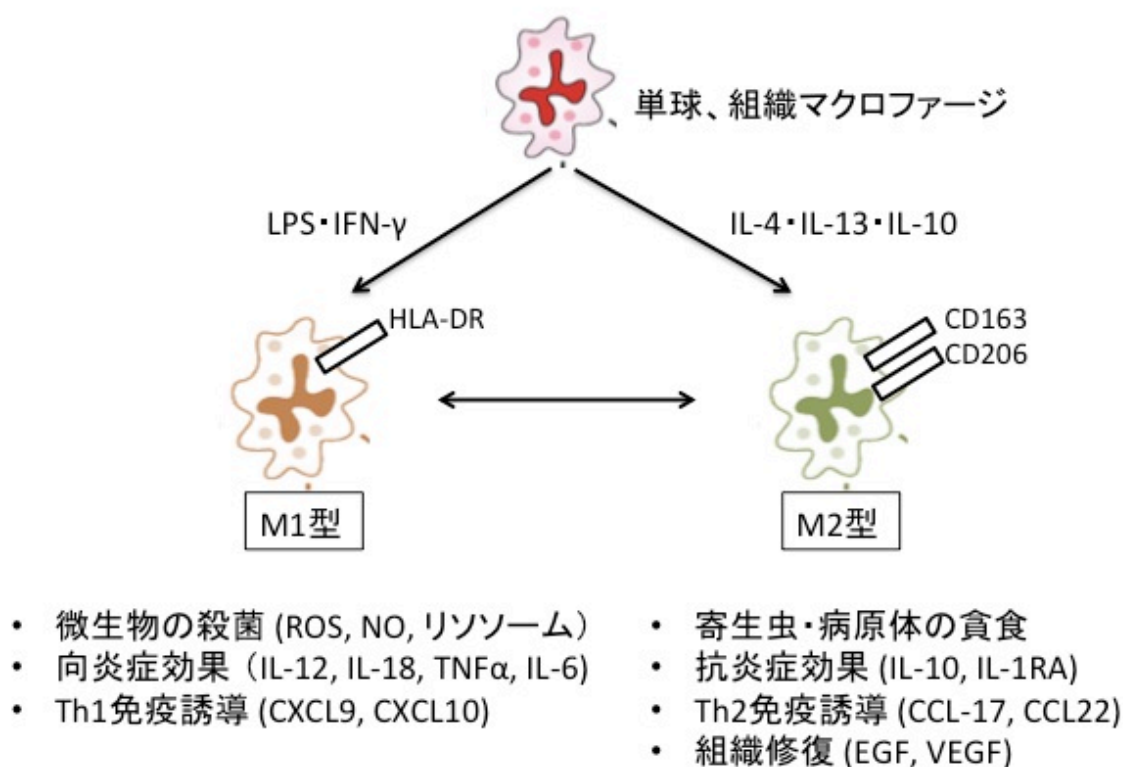


図 1. M1 型や M2 型マクロファージへの活性化、分化機構

M1 型は IFN γ や LPS 等により誘導される古典的なマクロファージであり、高い抗原提示能を持ち病原体を処理する。IL-12、IL-18、TNF α 、IL-6、IL-23 等の炎症性サイトカインを産生し炎症応答を惹起し、CXCL9 や CXCL10 といったケモカインを発現し Th1 を誘導する。M2 型は Th2 から放出されるサイトカインである IL-4、IL-10、IL-13 により誘導される。M2 型は CD206 (マンノースレセプター) 等の高発現により貪食能が高く、IL-10、IL-1RA 等の抗炎症サイトカインを産生、さらなる Th2 の誘導をもたらす。そして寄生虫の除去や病原体の貪食、組織修復や免疫制御に働く。

表 1. 子宮内膜症患者の背景

		年齢	rASRM stage
フローサイトメトリー	1	36	Ⅳ
	2	30	Ⅳ
	3	31	Ⅲ
	4	42	Ⅲ
	5	28	Ⅲ
	6	29	Ⅳ
マイクロアレイ分析	1	41	Ⅲ
	2	36	Ⅳ
	3	26	Ⅲ
確証実験	1	37	Ⅲ
	2	44	Ⅲ
	3	41	Ⅳ
	4	36	Ⅳ
	5	40	Ⅳ
	6	26	Ⅲ
	7	31	Ⅲ
	8	32	Ⅳ
	9	37	Ⅳ
	10	30	Ⅲ
	11	35	Ⅲ

表 2. 非子宮内膜症患者の背景

		年齢	基礎疾患
フローサイトメトリー	1	28	卵巣嚢腫
	2	30	卵巣嚢腫
	3	31	卵巣嚢腫
	4	37	子宮筋腫
	5	34	子宮筋腫
マイクロアレイ分析	1	47	子宮筋腫
	2	28	卵巣嚢腫
	3	35	卵巣嚢腫
確証実験	1	36	子宮筋腫
	2	28	卵巣嚢腫
	3	47	子宮筋腫
	4	28	卵巣嚢腫
	5	28	卵巣嚢腫
	6	35	卵巣嚢腫
共培養	1	35	卵巣嚢腫
	2	40	子宮筋腫
	3	42	卵巣嚢腫
	4	37	子宮筋腫
	5	38	卵巣嚢腫
	6	28	卵巣嚢腫
培養上清刺激	1	34	子宮筋腫
	2	38	子宮筋腫
	3	40	卵巣嚢腫
	4	28	卵巣嚢腫
	5	37	子宮筋腫
	6	27	卵巣嚢腫
	7	32	卵巣嚢腫
	8	32	卵巣嚢腫
	9	42	卵巣嚢腫
PGE2刺激	1	40	子宮筋腫
	2	38	卵巣嚢腫
	3	36	子宮筋腫
	4	27	卵巣嚢腫
	5	40	卵巣嚢腫
	6	42	卵巣嚢腫

表 3. マイクロアレイ分析に用いた各検体の RNA 濃度・持ち込み量

			RNA濃度	持ち込み量	RNA量
CT	①	47歳 proliferative phase	339.8 ng/ μ l	4.4 μ l	各検体1.5 μ gずつ
	②	28歳 proliferative phase	468.4 ng/ μ l	3.2 μ l	
	③	35歳 proliferative phase	352.9 ng/ μ l	4.2 μ l	
EM	①	41歳 proliferative phase	214.5 ng/ μ l	9.3 μ l	各検体2 μ gずつ
	②	36歳 proliferative phase	288.9 ng/ μ l	6.9 μ l	
	③	26歳 proliferative phase	260.9 ng/ μ l	7.7 μ l	

表 4. 各プライマーの塩基配列

Primers	
GAPDH	F: TGGACCTGACCTGCCGTCTA R: CTGCTTCACCACCTTCTTGA
PPIA	F: CCCACCGTGTTCTTCGACATT R: GCACCCGTATGCTTTAGGATGA
IL-6	F: ACAAGCCAGAGCTGTGCAGATG R: GTGCCCATGCTACATTTGCCGA
CXCR4	F: ACTACACCGAGGAAATGGGCT R: CCCACAATGCCAGTTAAGAAGA
CXCL2	F: CGCCCAAACCGAAGTCAT R: GATTTGCCATTTTTTCAGCATCTTT
CXCL3	F: CGCCCAAACCGAAGTCATAG R: GCTCCCCTTGTTTCAGTATCTTTT
VEGF	F: TGGATGTCTATCAGCGCAGC R: CGGCTTGTCACATTTTTCTTGTCT
TNF α	F: TGCCTGCTGCACTTTGGAGTGAT R: TGGTTATCTCTCAGCTCCACGCCAT
HLA-DRA	F: AGTCCCTGTGCTAGGATTTTTCA R: ACATAAACTCGCCTGATTGGTC
HLA-F	F: TGGCCCTGACCGATACTTG R: GCAGGAATTGCGTGTCGTC
CXCL9	F: CCAGTAGTGAGAAAGGGTCGC R: AGGGTTGGGGCAAATTGTT
CXCL10	F: GTGGCATTCAAGGAGTACCTC R: TGATGGCCTTCGATTCTGGATT
CCL5	F: CCAGCAGTCGTCTTTGTCAC R: CTCTGGGTTGGCACACACTT

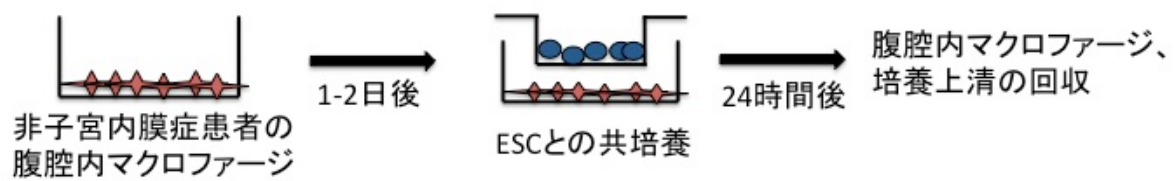


図 2. トランズウェルチャンバーを用いた ESC と腹腔内マクロファージの共培養

非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージを 12 ウェルプレートに 5×10^5 個/ml で培養し、1-2 日後に PBS で 1 回洗浄した後、ポアサイズが $0.4 \mu\text{m}$ のトランズウェルインサート上に ESC を 2×10^5 個/ml で加え共培養を行った。共培養開始から 24 時間後に腹腔内マクロファージ、および培養上清を回収した。

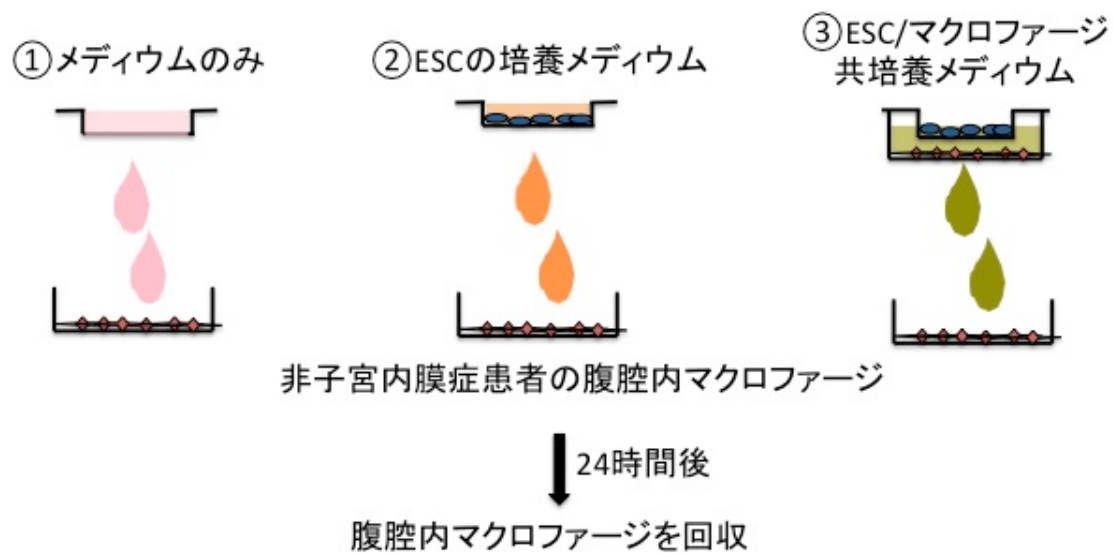
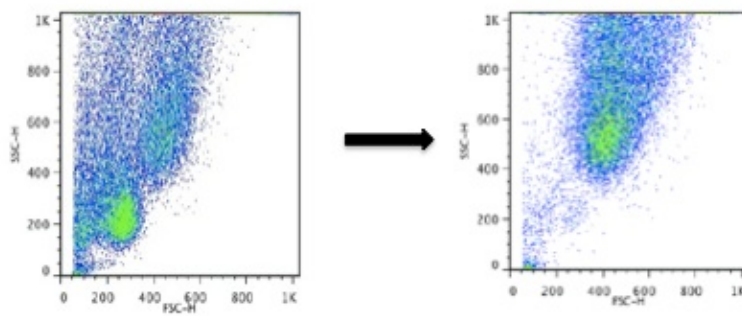


図 3. 培養上清による ESC の刺激

①RPMI1640 培地を 24 時間、5%CO₂、37 °C の条件でおいた上清、②ESC を 2×10^5 個/ml で RPMI1640 培地に 24 時間、5%CO₂、37 °C の条件で培養し、回収した上清、③非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージと ESC を 24 時間共培養し、回収した上清を準備した。非子宮内膜患者の腹腔内マクロファージを 12 ウェルプレートに 5×10^5 個/ml で培養し、1・2 日後に PBS で 1 回洗浄した後①、②、③の各上清を添加し 24 時間後に腹腔内マクロファージを回収した。

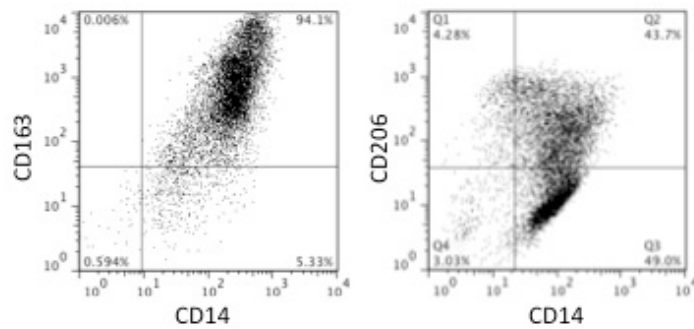
(A)

CD14 MACS separation



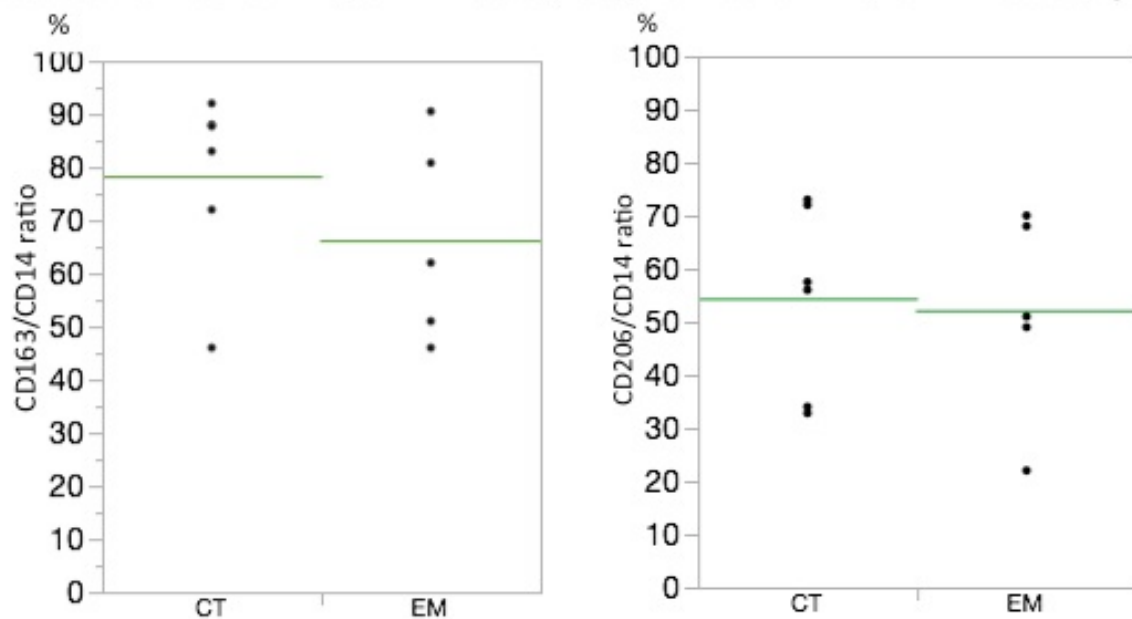
(B)

Representative results of CD163, CD206 expressions in CD14⁺ cells from peritoneal fluid



(C)

Ratio of CD163⁺CD14⁺/CD14⁺ cells (left), CD206⁺CD14⁺/CD14⁺ cells (right)



(D)

Mean fluorescence intensity (MFI) of CD163 (left) or CD206 (right)

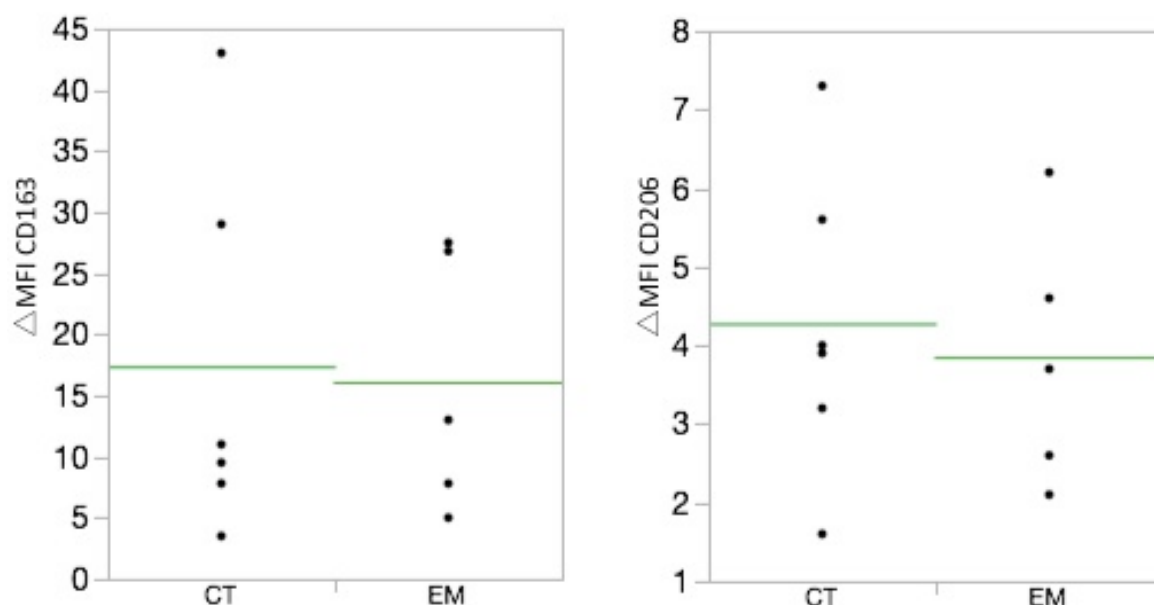


図 4. フローサイトメトリーを用いた腹腔内マクロファージの細胞表面抗原の解析

M2型マクロファージの細胞表面抗原とされる CD163 と CD206 の発現について、フローサイトメトリーを用いて解析を行った。非子宮内膜症群 (CT 群, n=6)、子宮内膜症群 (EM 群, n=5) で比較を行った。

(A) 抗 CD14 抗体付磁気ビーズを用いた磁気細胞分離法により単離し、CD14 陽性細胞の割合は $88.9 \pm 3.4\%$ (平均 \pm 標準誤差) であった。(B) CD14、CD163、CD206 の発現についての代表的なフローサイトメトリー結果を示す。(C) CD163 陽性率は CT 群で $78.9 \pm 6.6\%$ 、EM 群で $72.4 \pm 6.9\%$ であり差を認めなかった。CD206 陽性率は CT 群で $58.8 \pm 6.3\%$ 、EM 群で $51.2 \pm 7.3\%$ であり差を認めなかった。(D) CD163 の MFI は CT 群で 16.8 ± 5.7 、EM 群で 13.0 ± 3.1 であり差を認めなかった。CD206 の MFI は CT 群で 4.4 ± 0.9 、EM 群で 4.2 ± 0.7 であり差を認めなかった。

検定には Student's t test を用いた。

Overall expression plots

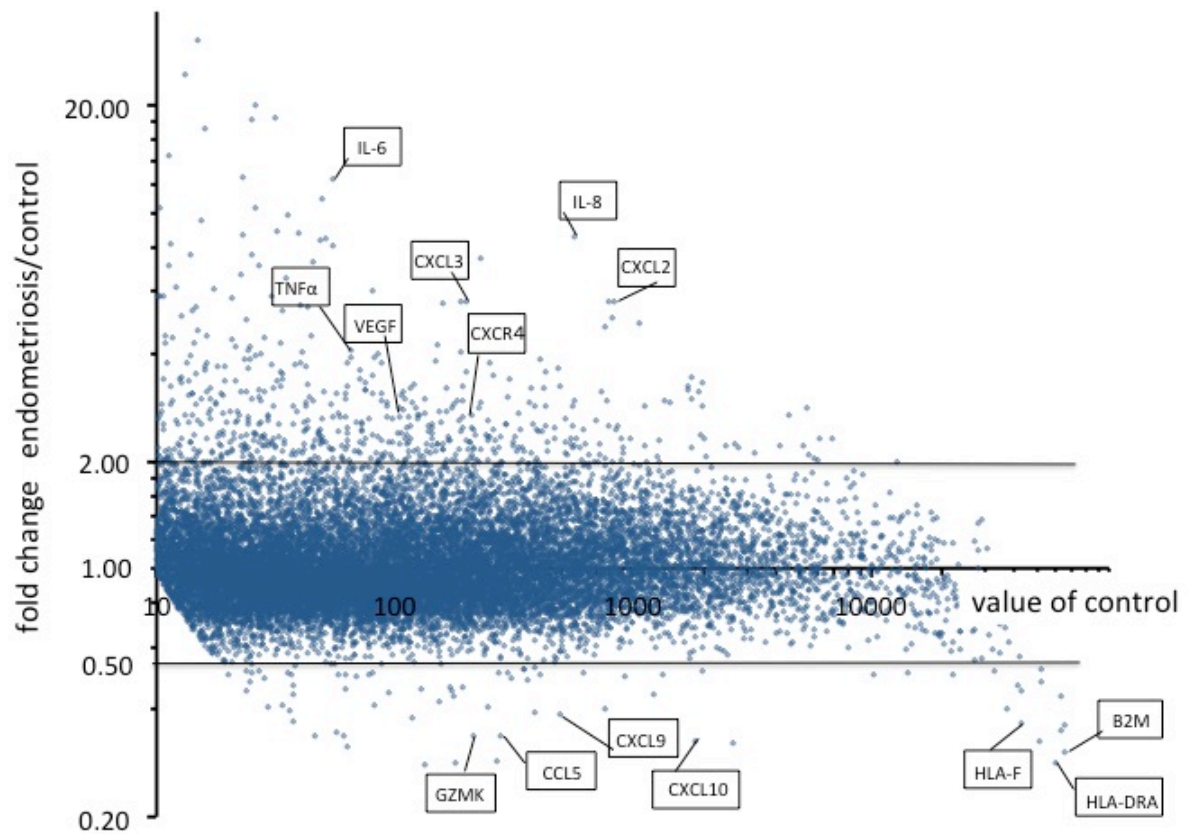


図 5. 全遺伝子の発現図

非子宮内膜症患者 (CT)、子宮内膜症患者 (EM) 由来の腹腔内マクロファージに対し、mRNA 発現の網羅的遺伝子解析を行った。横軸は CT における発現値を示し、縦軸は EM / CT の発現比を示し、全遺伝子の発現について図に示した。特徴的な遺伝子について示した。

表 5. 細胞表面抗原（CD163、CD206）の発現

非子宮内膜症患者（CT）と子宮内膜症患者（EM）における細胞表面抗原（CD163、CD206）の発現について表に示す。

gene name	control	EM	fold change
CD163	22020	25803	1.17
CD206	1801	2838	1.58

表 6. 子宮内膜症患者で発現比が高い遺伝子

子宮内膜症患者（EM）において非子宮内膜症患者（CT）と比較して発現が高い遺伝子を表に示す。

gene name	control	EM	fold change
IL6	55	683	12.4
SLPI	50	541	10.9
IL8	571	4857	8.5
TSPAN1	52	434	8.4
PAEP	55	443	8.1
EGR1	228	1698	7.4
KRT7	81	488	6.0
RP5-924G13.2	787	4446	5.6
CXCL2	829	4667	5.6
CXCL3	200	1124	5.6
VNN2	189	1058	5.6
OTUD1	160	890	5.6
RGS1	823	4139	5.0
GPR183	1064	5166	4.9
JUN	757	3597	4.8
AC009269.6	151	640	4.2
TNFRSF12A	65	268	4.1
AL008627.1	188	762	4.0
RP11-430L17.1	85	339	4.0
AP000476.2	82	320	3.9
SOCS3	66	255	3.9

表 7. 子宮内膜症患者において発現比が低い遺伝子

子宮内膜症患者（EM）において非子宮内膜症患者（CT）と比較して発現が低い遺伝子を表に示す。

gene name	control	EM	fold change
GZMA	179	51	0.28
HLA-DRA	59453	16780	0.28
TRBV7-2	266	77	0.29
B2M	65502	19878	0.30
TMEM176B	2621	842	0.32
CXCL10	1840	599	0.33
ACTG1	50858	16605	0.33
CCL5	278	94	0.34
GZMK	213	72	0.34
TMSB4X	62570	21861	0.35
FTL	65502	23628	0.36
HLA-F	42824	15703	0.37
CXCL9	497	193	0.39
ANKRD22	387	153	0.39

表 8. 子宮内膜症で発現が増強する遺伝子で有意なパスウェイ

子宮内膜症患者（EM）において非子宮内膜症患者（CT）と比較して 2 倍以上の発現増強を認める遺伝子で有意とされるパスウェイを表に示す。

		EM / CT		
		> 2.0		
		遺伝子数	Z Score	P値
1	Hs_Hypertrophy_Model_WP516_32131	6	4.42	0.00
2	Hs_Inflammatory_Response_Pathway_WP453_34499	8	4.39	0.00
3	Hs_Complement_and_Coagulation_Cascades_KEGG	11	4.38	0.00
4	Hs_Myometrial_Relaxation_and_Contraction_Pathways	19	2.84	0.01
5	Hs_Alpha6-Beta4_Integrin_Signaling_Pathway_WP244_35307	10	2.81	0.01
6	Hs_Cytokines_and_Inflammatory_Response(BioCarta)	5	2.58	0.03
7	Hs_Focal_Adhesion_WP306_35287	20	2.44	0.03
8	Hs_Matrix_Metalloproteinases_WP129_35327	5	2.19	0.06
9	Hs_Complement_Activation_Classical_Pathway	3	2.14	0.05
10	Hs_ACE_Inhibitor_Pathway_WP554_34805	2	2.01	0.09
11	Hs_Benzo(a)pyrene_metabolism_WP696_33411	2	2.01	0.09

表 9. 子宮内膜症で発現が低下する遺伝子で有意なパスウェイ

子宮内膜症患者 (EM) において非子宮内膜症患者 (CT) と比較して 2 倍以上の発現低下を認める遺伝子で有意とされるパスウェイを表に示す。

		EM / CT		
		< 0.5		
		遺伝子数	Z Score	P値
1	Hs_IL-3_Signaling_Pathway_WP286_35642	3	4.76	0.00
2	Hs_T_Cell_Receptor_Signaling_Pathway_WP69_20823	3	4.08	0.01
3	Hs_Regulation_of_Actin_Cytoskeleton_WP51_34470	3	3.90	0.01
4	Hs_EBV_LMP1_signaling_WP262_34653	1	3.73	0.06
5	Hs_Cytokines_and_Inflammatory_Response(BioCarta)	1	3.18	0.07
6	Hs_Inflammatory_Response_Pathway_WP453_34499	1	2.91	0.09
7	Hs_Striated_Muscle_Contraction_WP383_32666	1	2.55	0.12
8	Hs_N_Glycans_biosynthesis	1	2.24	0.12
9	Hs_Myometrial_Relaxation_and_Contraction_Pathways	2	2.17	0.09
10	Hs_Translation_Factors_WP107_35489	1	2.14	0.14
11	Hs_Id_Signaling_Pathway_WP53_35648	1	2.02	0.14

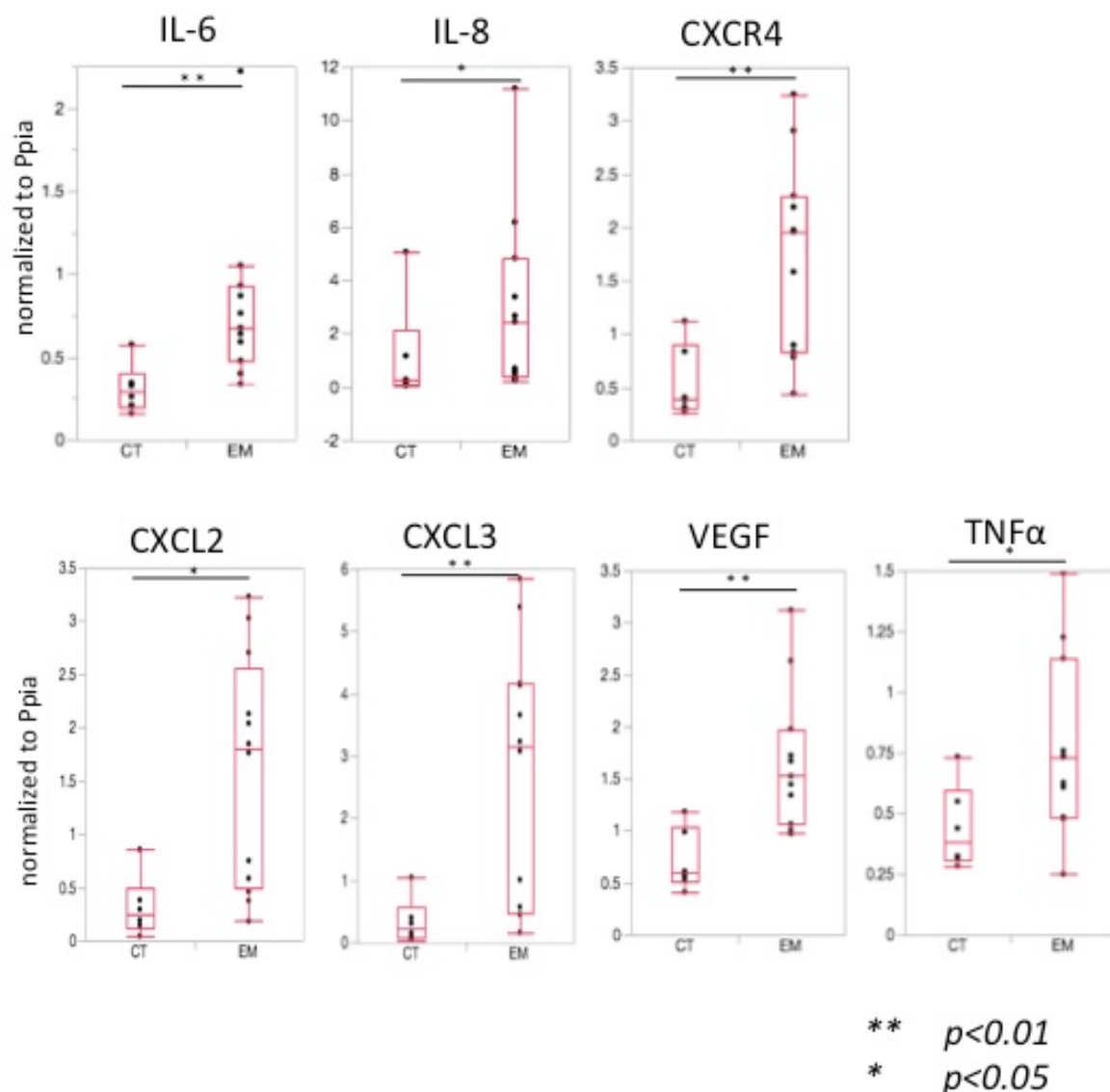


図 6. 子宮内膜症患者で発現比が高い遺伝子の確認実験

マイクロアレイ分析において子宮内膜症患者で発現量が高かった遺伝子に関し確認実験を行った。検体は新たに回収し、非子宮内膜症群 (CT 群、 $n=6$)、子宮内膜症群 (EM 群、 $n=11$) における遺伝子発現の差を RT-PCR で検討した。IL-6 の発現は EM 群で有意に高かった ($p < 0.01$)。IL-8 の発現は EM 群で有意に高かった ($p < 0.05$)。CXCR4 の発現は EM 群で有意に高かった ($p < 0.01$)。CXCL2 の発現は EM 群で有意に高かった ($p < 0.05$)。CXCL3 の発現は EM 群で有意に高かった ($p < 0.01$)。VEGF の発現は EM 群で有意に高かった ($p < 0.01$)。TNFα の発現は EM 群で有意に高かった ($p < 0.05$)。

検定には Wilcoxon の順位和検定を用いた。

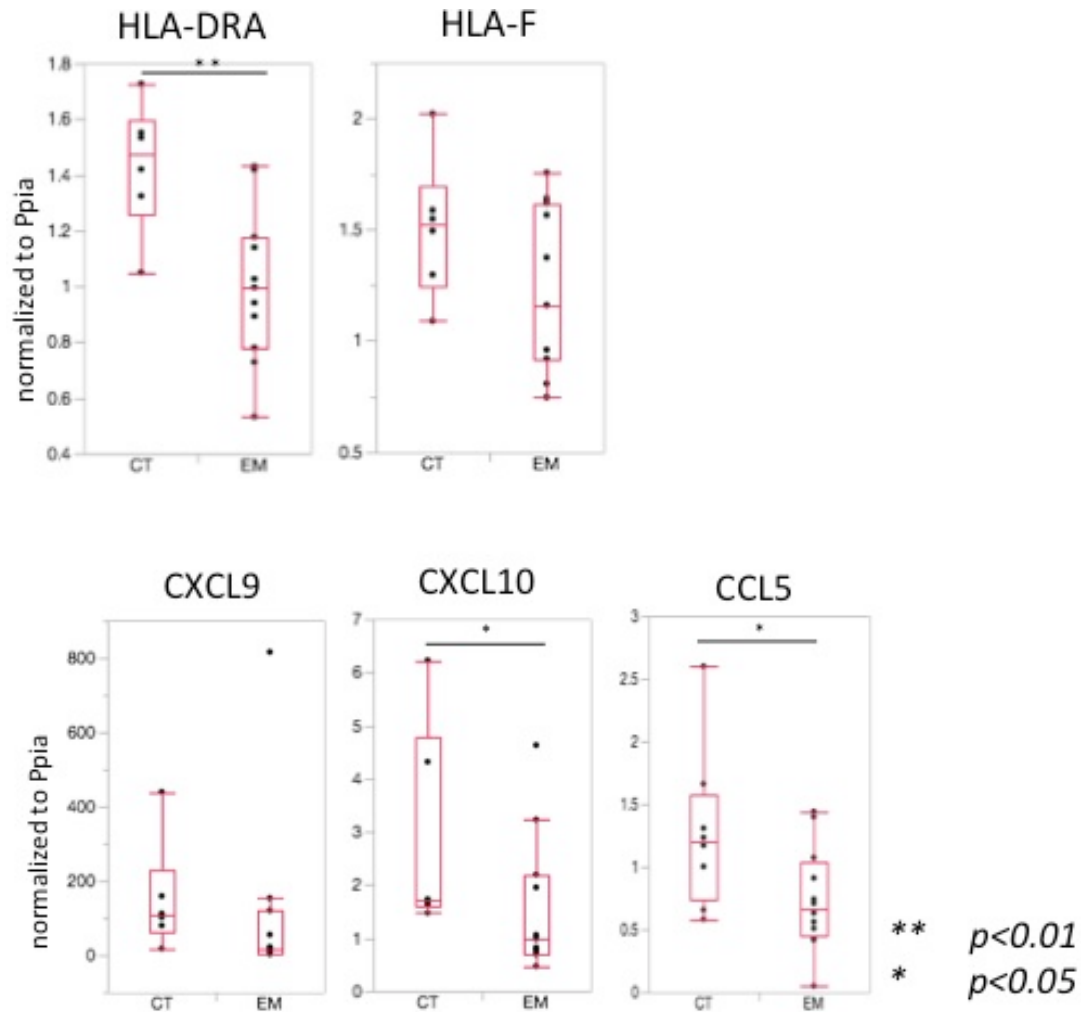


図 7. 子宮内膜症患者で発現比が低い遺伝子の確認実験

マイクロアレイ分析において子宮内膜症患者で発現量が低かった遺伝子に関し確認実験を行った。検体は新たに回収し、非子宮内膜症群 (CT 群、n=6)、子宮内膜症群 (EM 群、n=11) における遺伝子発現の差を RT-PCR で検討した。HLA-DRA の発現は EM 群で有意に低かった ($p < 0.01$)。CXCL10 の発現は EM 群で有意に低かった ($p < 0.05$)。CCL5 の発現は EM 群で有意に低かった ($p < 0.05$)。HLA-F と CXCL9 については有意差を認めなかった。

検定には Wilcoxon の順位和検定を用いた。

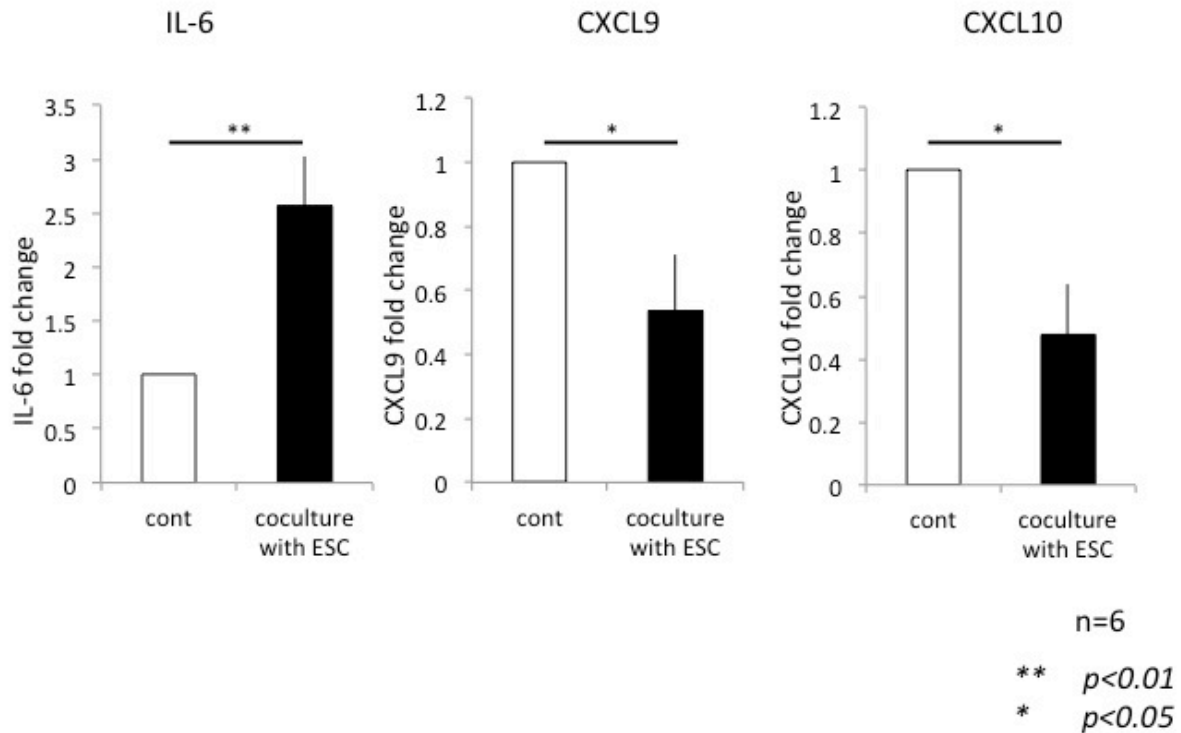


図 8. 非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージと ESC の共培養

非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージを ESC とトランズウェルチャンバーを用いて 24 時間共培養した。腹腔内マクロファージからの RNA を抽出し cDNA に逆転写した。IL-6、CXCL9、CXCL10 の遺伝子発現の変化を検討した ($n=6$)。

腹腔内マクロファージを単独で培養した際の IL-6 の mRNA 発現 (コントロール) を 1 とすると、ESC との 24 時間の共培養により非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージにおける IL-6 の mRNA 発現は、 2.57 ± 0.05 倍と有意に上昇した ($p < 0.01$)。

腹腔内マクロファージを単独で培養した際の CXCL9 の mRNA 発現 (コントロール) を 1 とすると、ESC との 24 時間の共培養により CXCL9 の mRNA 発現は、 0.54 ± 0.18 倍となりコントロールの 53.6%と有意に低下した ($p < 0.01$)。

腹腔内マクロファージを単独で培養した際の CXCL10 の mRNA 発現 (コントロール) を 1 とすると、ESC との 24 時間の共培養により CXCL10 の mRNA 発現は、 0.48 ± 0.16 倍となり、コントロールの 47.8%に有意に低下した ($p < 0.05$)。

検定には Wilcoxon の順位和検定を用いた。

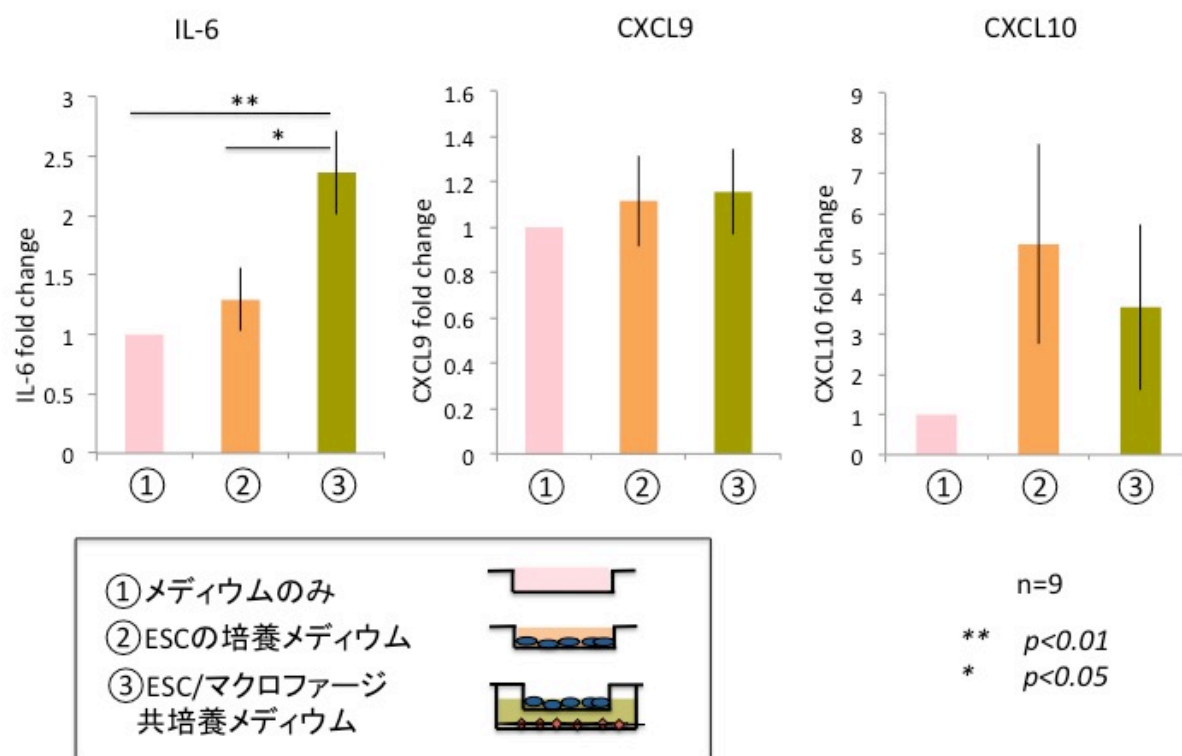


図 9. 非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージに対する培養上清による刺激

①上清のみ、②ESC の 24 時間培養上清、③腹腔内マクロファージと ESC の 24 時間培養上清を用意し、非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージをこの 3 種類の上清で 24 時間刺激を行った。腹腔内マクロファージからの RNA を抽出し cDNA に逆転写し IL-6、CXCL9、CXCL10 の遺伝子発現の変化を検討した (n=9)。

腹腔内マクロファージを上清のみで刺激したコントロールにおける IL-6 の発現を 1 とすると、ESC の培養上清による刺激で IL-6 の発現は 1.29 ± 0.05 倍であり変化しなかった。共培養の培養上清による刺激で IL-6 の発現はコントロールに対し 2.37 ± 0.36 倍となり有意に上昇した ($p < 0.01$)。また、IL-6 の発現において ESC の培養上清刺激と共培養の培養上清刺激の間に有意差を認めた ($p < 0.05$)。

腹腔内マクロファージを上清のみで刺激したコントロールにおける CXCL9 の発現を 1 とすると、ESC の培養上清による刺激で CXCL9 の発現はコントロールに対し 1.12 ± 0.20 倍と変化せず、共培養の培養上清による刺激においても 1.16 ± 0.19 倍と変化しなかった。

腹腔内マクロファージを上清のみで刺激したコントロールにおける CXCL10 の発現を 1 とすると、ESC の培養上清による刺激で CXCL10 の発現はコントロールに対し 5.24 ± 2.48 倍と変化せず、共培養の培養上清による刺激においても 3.68 ± 2.07 倍と変化しなかった。

検定には Wilcoxon の順位和検定を用いた。

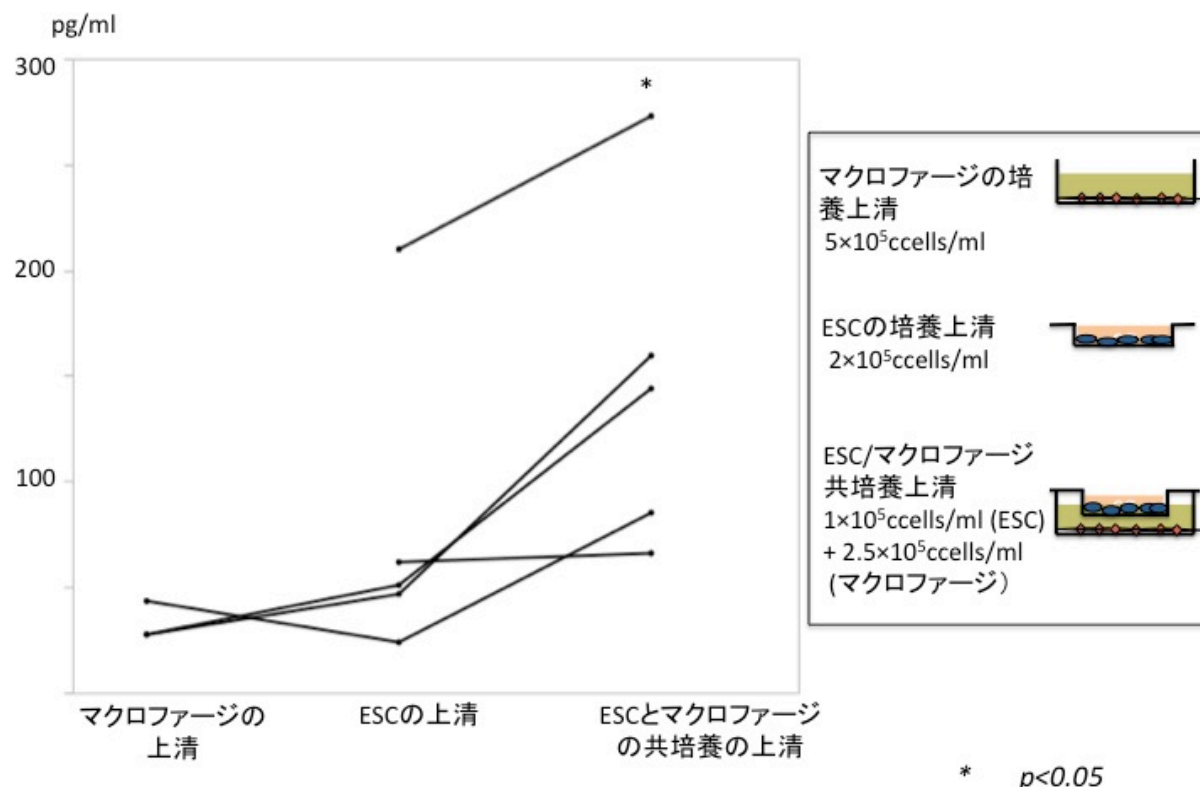


図 10. 培養上清中の PGE₂ 濃度

腹腔内マクロファージの 24 時間培養上清、ESC の 24 時間培養上清、腹腔内マクロファージと ESC の 24 時間共培養上清における PGE₂ 濃度の差について検討を行った。5 名の子宮内膜症患者から得られた異なる 5 検体の ESC に対し、5 名の非子宮内膜症患者から得られた腹腔内マクロファージを用いて共培養を行った上清と、ESC の上清における PGE₂ 濃度を、ELISA を用いて測定した。3 検体については共培養を行っていない腹腔内マクロファージの上清における PGE₂ 濃度を測定した。

腹腔内マクロファージの培養上清の PGE₂ 濃度は 33.0 ± 7.4 pg/ml (平均 \pm 標準誤差)、ESC の培養上清の PGE₂ 濃度は 78.6 ± 33.8 pg/ml、腹腔内マクロファージと ESC の共培養上清の PGE₂ 濃度は 145.5 ± 36.3 pg/ml であった。各検体における PGE₂ 濃度の比較では共培養上清で ESC 培養上清に対し有意に高かった ($p < 0.05$)。

検定には Paired t test を用いた。

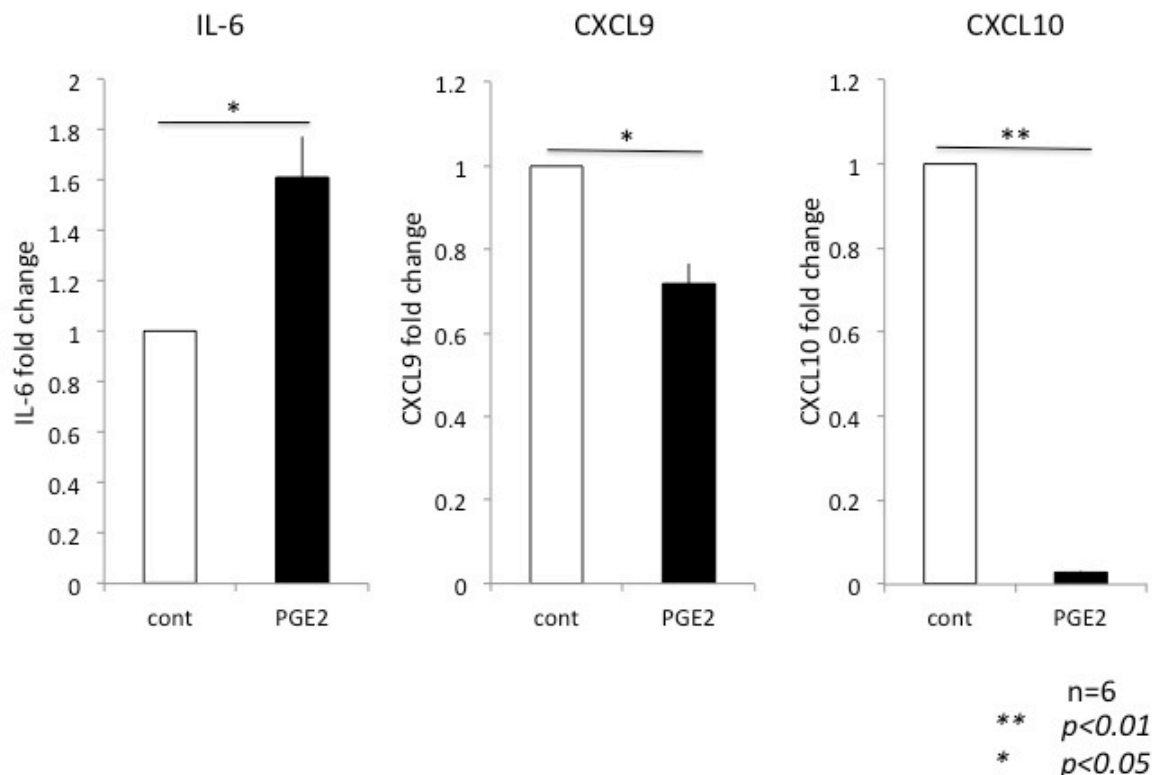


図 11. 非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージに対する PGE₂ による刺激

非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージに対し PGE₂ (100nM) で 24 時間刺激を行った。腹腔内マクロファージからの RNA を抽出し cDNA に逆転写し IL-6、CXCL9、CXCL10 の遺伝子発現の変化を検討した (n=6)。

PGE₂ による刺激を行っていない腹腔内マクロファージにおける IL-6 の発現 (コントロール) を 1 とすると、PGE₂ 刺激により IL-6 の発現はコントロールに対し 1.61 ± 0.16 倍と有意に上昇した ($p < 0.05$)。

PGE₂ による刺激を行っていない腹腔内マクロファージにおける CXCL9 の発現 (コントロール) を 1 とすると、PGE₂ 刺激により CXCL9 の発現は 0.72 ± 0.05 倍と有意に低下した ($p < 0.05$)。

PGE₂ による刺激を行っていない腹腔内マクロファージにおける CXCL10 の発現 (コントロール) を 1 とすると、PGE₂ 刺激により CXCL10 の発現は 0.03 ± 0.01 倍と有意に低下した ($p < 0.01$)。

検定には Wilcoxon の順位和検定を用いた。

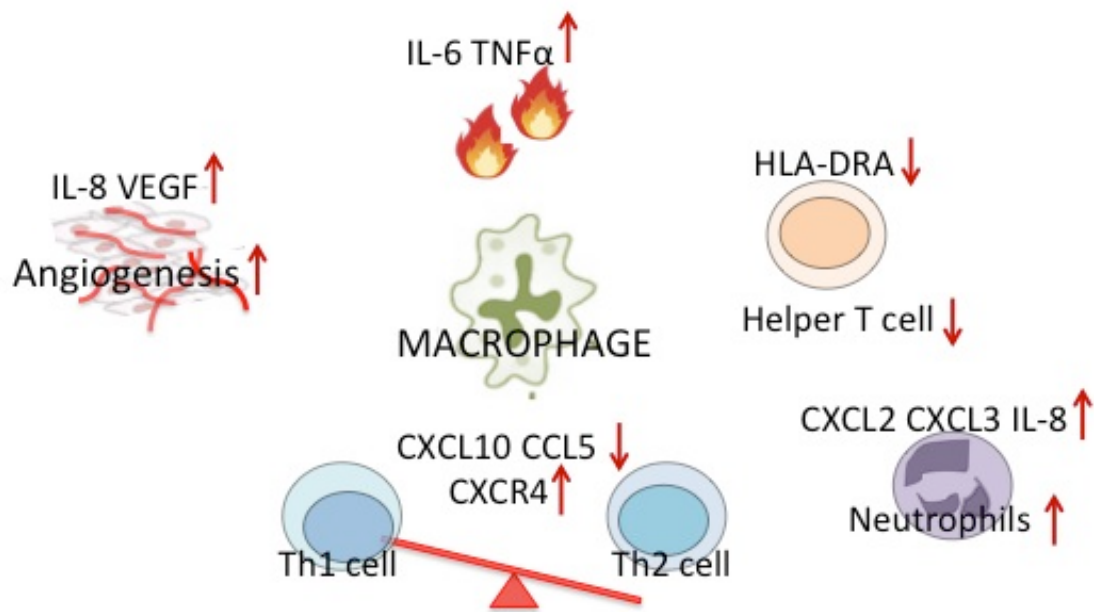


図 12. 子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージは M2 like に偏位している

子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージはにおいて HLA-DRA の発現が減弱しておりヘルパーT 細胞等への抗原提示能が減弱している。CXCL9 や CCL5 の発現が低下、CXCR4 の発現が増強しており、Th2 型優位の免疫へ偏位している。また、CXCL2、CXCL3、IL-8 の発現増強より好中球を誘導能が高く、VEGF の発現増強より血管新生作用が高い。一方で、IL-6、TNF α の発現増強も見られ向炎症作用を有する。

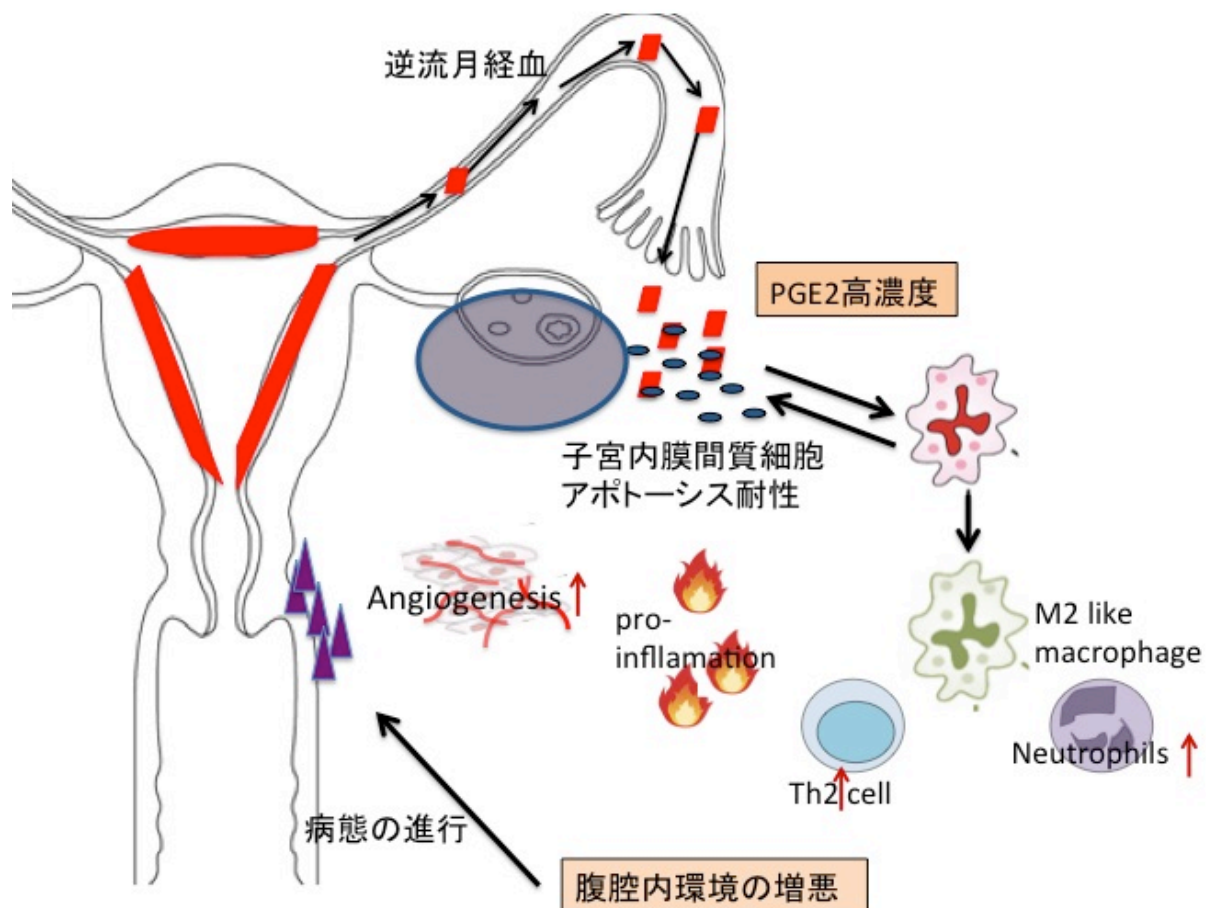


図 13. 本研究より示唆される内膜症発症・進展機序

機能性月経困難症等で腹腔内に PGE_2 が高濃度に存在する環境下においては、逆流月経血中の子宮内膜間質細胞がアポトーシス耐性となる。腹腔内マクロファージは、子宮内膜間質細胞との持続的な相互作用により子宮内膜症に特有な性質を獲得するようになる。子宮内膜症に特有な性質を獲得した腹腔内マクロファージは Th2 型免疫を誘導、好中球を誘導し腹腔内を慢性炎症状態にする。また、過剰な血管新生作用や線維化作用により組織の癒着をおこす。さらに、抗原提示能の減弱により正常に異物が排除できず、感染等を起こしやすくなり腹腔内環境をさらに増悪させる。増悪した腹腔内環境により、子宮内膜間質細胞はさらに処理されにくくなり、腹腔内マクロファージの性質は維持され、 PGE_2 濃度も高い状態となり、正のフィードバック効果で子宮内膜症が進展する。

略語一覧

GnRH : Gonadotropin releasing hormone

natural killer 細胞: NK 細胞

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

IL-8: Interleukin-8

IL-17: Interleukin-17

ESC: Endometriotic stromal cells

IL-10: Interleukin-10

IFN- γ : Interferon gamma

COX2: Cyclooxygenase-2

IL-12: Interleukin-12

IL-18: Interleukin-1beta

TNF α : Tumor necrosis factor alpha

IL-23: Interleukin-23

CXCL9: C-X-C chemokine ligand 9

CXCL10: C-X-C chemokine ligand 10

IL-4: Interleukin-4

IL-13: Interleukin-13

IL-1RA: Interleukin-1 Receptor Antagonist

MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein-1

PGE₂: Prostaglandin E₂

rASRM: revised American Society for Reproductive Medicine

PBS: phosphate buffered saline

PFMC: peripheral fluid mononuclear cell

BSA bovine serum albumin

PPIA: Cyclophilin A

MFI: mean fluorescence intensity

IL-6: Interleukin-6

CXCL2: C-X-C chemokine ligand 2

CXCL3: C-X-C chemokine ligand 3

GZMK: Granzyme K

HLA-DRA : Histocompatibility antigen, DR alpha chain

B2M: Beta-2-microglobulin

HLA-F: Histocompatibility antigen, alpha chain F

CCL5: C-C motif chemokine ligand 5

CXCR4: C-X-C chemokine receptor 4

CCL18: C-C motif chemokine ligand 18

IGF-1: Insulin like growth factor 1

CCL-2: C-C motif chemokine ligand 2

CCL-8: C-C motif chemokine ligand 8