

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 真壁友子

【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に認められる疾患である。症状としては月経困難症や骨盤痛、排便痛、下血、性交痛、不妊症を呈し生殖年齢女性の QOL を著しく低下させる。子宮内膜症の病因病態については未だ不明な点が多い。

近年、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。マクロファージはサイトカインにより M1 型 (classically activated)、M2 型 (alternatively activated) に分化し異なる働きをする。M2 型は高い貪食能、抗炎症サイトカイン産生能、Th2 の誘導能をもち、炎症反応の終結、組織恒常性維持に重要である。しかし 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すると報告されている。子宮内膜症では、腹腔内マクロファージの総数の増加やマクロファージ由来の IL-6 や IL-8 等のサイトカイン濃度の上昇が報告されている。また、M2 型の表面抗原を発現し、血管新生や線維化をもたらすとする報告もあるが断片的である。炎症反応における中心的役割を担う腹腔内マクロファージの子宮内膜症における病態への関与や、免疫機構の異常がいかにもたらされ、子宮内膜症の発症や進展に関わるかを明らかにした研究はなされていない。

【目的】

子宮内膜症の腹腔内環境に着目し、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 (EM)、非子宮内膜症患者 (CT) より腹腔内貯留液を採取し、抗 CD14 抗体付磁気ビーズを用いた細胞分離法を用い腹腔内マクロファージを単離した。子宮内膜症間質細胞 (ESC) は卵巣子宮内膜症組織より単離した。

1. フローサイトメトリーを用い EM (n=6)、CT (n=5) の腹腔内マクロファージにおける CD163 と CD206 (共に M2 型マクロファージの細胞表面抗原とされる) の発現について陽性率、MFI 値について検討した。

2. マイクロアレイ分析を用い CT、EM の遺伝子発現を比較した。CT、EM の腹腔内マクロファージを 3 検体ずつ単離、RNA を抽出し各検体からの持ち込み量が同等になるよう懸濁し、mRNA 発現の網羅的解析を行った。
3. 2 で EM、CT 間で発現差のあった遺伝子に関し、新たに収集した検体 (EM: n=6、CT: n=11) を用いて PCR 法により確認実験を行った。
4. 非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージを、トランズウェルチャンバーを用いて ESC と共培養し 24 時間後に腹腔内マクロファージを回収した (n=6)。腹腔内マクロファージにおける IL-6、CXCL9、CXCL10 の発現を PCR 法にて測定した。
5. 非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージに対し、培養上清により刺激を行った (n=9)。培養上清は①培地のみ②ESC を 24 時間培養した培養上清③腹腔内マクロファージと ESC を 24 時間共培養した培養上清を用意し、非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージに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腹腔内マクロファージにおける IL-6、CXCL9、CXCL10 の発現を PCR 法にて測定した。
6. 腹腔内マクロファージと ESC の相互作用における PGE₂ の関与について調べるため、培養上清中の PGE₂ 濃度を ELISA 法で測定した (n=5)。ESC を 24 時間培養した培養上清、腹腔内マクロファージを 24 時間培養した上清、腹腔内マクロファージと ESC を 24 時間共培養した培養上清について比較した。
7. 非子宮内膜症患者の腹腔内マクロファージに対し PGE₂ (100nM) により刺激を行い 24 時間後に腹腔内マクロファージを回収、IL-6、CXCL9、CXCL10 の発現を PCR 法により検討した (n=6)。

【結果】

1. CD163 陽性率は CT 群で 78.9 ± 6.6%、EM 群で 72.4 ± 6.9% であり差を認めなかった。CD206 陽性率は CT 群で 58.8 ± 6.3%、EM 群で 51.2 ± 7.3% であり差を認めなかった。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。M2 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の間で差を認めなかった。
2. EM で高発現していた遺伝子のなかには IL-6 で、IL-8、CXCL2、CXCL3 等が含まれた。EM で発現が低かった遺伝子には抗原提示に関わる GZMA、HLA-DRA、B2M、HLA-F や Th1 細胞の誘導に関わる CXCL10、CCL5、CXCL9 が含まれた。
3. IL-6、CXCR4、CXCL3、VEGF の発現は EM 群で有意に高かった (p < 0.01)。IL-8、CXCL2、TNF α の発現は EM 群で有意に高かった (p < 0.05)。HLA-DRA の発現は EM 群で有意に低かった (p < 0.01)。CXCL10、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。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、Th2 細胞誘導能 (CXCR4) が上昇していることが示唆された。

4. 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 ($p < 0.01$)。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 ($p < 0.01$)。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 ($p < 0.05$)。

5. ESC の培養上清による刺激で IL-6、CXCL9、CXCL10 の発現はいずれも変化しなかった。腹腔内マクロファージと ESC の共培養上清による刺激で IL-6 の発現はコントロールに対し 2.37 ± 0.36 倍に有意に上昇した ($p < 0.01$)。一方で CXCL9、CXCL10 の発現は変化しなかった。腹腔内マクロファージの病的な性質獲得は、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。

6. 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、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 ($p < 0.05$)。腹腔内マクロファージと ESC の持続的な相互作用により、PGE₂ 濃度が上昇する可能性が示唆された。

7. 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 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 刺激により CXCL10 の発現は 0.03 ± 0.01 倍と有意に低下した ($p < 0.01$)。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病的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】

子宮内膜症の腹腔内マクロファージは抗原提示能が減弱し、Th2 型優位の免疫、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ことが明らかになった。典型的な M2 型にはあてはまらないものの M2 型の性質をより多く有しており M2 like であると言え、腹腔内マクロファージの偏位は子宮内膜症の進展に寄与することが示唆された。さらにこの腹腔内マクロファージの性質は、何らかの可溶性因子を介した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。そして共培養上清中の PGE₂ 濃度の上昇や、PGE₂ 刺激により共培養の際と同様の腹腔内マクロファージの性質変化がみられたことより、腹腔内マクロファージの M2 like な性質獲得に PGE₂ が関与している可能性が示唆された。

腹腔内マクロファージの特有な性質獲得を阻害することで腹腔内環境の改善、病態の制御を

可能にする可能性があると考えられるため、子宮内膜症の腹腔内免疫異常に対する PGE₂ の関与は今後の新たな治療ターゲットとなりうると考えられた。