

論文の内容の要旨

論文題目

子宮内膜症における IL-4 による 3 β hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (HSD3B2) 発現の制御についての検討

浦田 陽子

<背景>子宮内膜症は、子宮内膜類似の組織が子宮外で発育する疾患であり、疼痛や不妊の原因になる。病因としては、腹腔内に逆流する月経血内の子宮内膜細胞が腹腔内に生着することで病変ができるという、逆流説が広く知られている。しかし月経血の逆流は広く認められることより、免疫学的異常や慢性炎症の存在が進展に必要であるとされている。

臨床的にはエストロゲン依存性の疾患であり、子宮内膜症局所でエストロゲン産生がされていることが報告されている。プロスタグランジン E2 (PGE2)がアロマターゼ(p450arom)を誘導していることが報告されているが、それ以外のエストロゲン合成に関する酵素についての報告はほとんどない。

Th1/Th2 免疫バランスという観点からは子宮内膜症は Th2 優位の疾患である。Th2 免疫物質である IL-4 が子宮内膜症組織に存在していること、IL-4 が子宮内膜症細胞の増殖を促し、炎症を促していることが分かっている。子宮内膜症間質細胞を IL-4 で刺激し、microarray 法にて網羅的に遺伝子発現を検討したところ、エストロゲン合成に重要な酵素である 3 β hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (HSD3B2) の遺伝子発現が増加していることがわかった。

本研究では子宮内膜症間質細胞における IL-4 による HSD3B2 発現の制御について検討した。

<方法及び結果>

東京大学倫理委員会の承認のもと、患者の文書同意を得て卵巣子宮内膜症組織、子宮内膜組織、卵胞洗浄液、胎盤組織を採取した。卵巣子宮内膜症組織より子宮内膜症間質細胞(ESCs)を、子宮内膜組織より子宮内膜間質細胞(NSCs)を、卵胞洗浄液より顆粒膜細胞(LGCs)を分離培養した。

まず、卵巣子宮内膜症組織における HSD3B2 と IL-4 発現局在を in situ hybridization 法(ISH 法)で検討した。HSD3B2 と IL-4 の発現は間質部分に認め、12 検体中それぞれ 5 検体ずつで確認された。

ESCs、LGCs および胎盤組織中の *HSD3B type 1* および *type 2* mRNA 発現を real-time PCR で検討した。HSD3B1 と HSD3B2 のポジティブ・コントロールのために、それぞれ胎盤組織と LGCs を用いた。ESCs は LGCs と同様に、*HSD3B type 2* 優位に発現しており、胎盤組織中では *HSD3B type 1* 優位に発現していた。

次に、ESCs における IL-4 の HSD3B2 発現誘導作用を確認した。ESCs と NSCs を IL-4 (0.1, 1, 10, 100 ng/ml)と PGE2 (10^{-7} M)で 5 時間刺激し、*HSD3B2* と *P450arom* の mRNA 発現を real-time PCR 確認した。ESCs では IL-4 刺激で濃度依存性に HSD3B2 mRNA 発現は増加し、PGE2 の同時添加で相乗的にさらに増加した。PGE2 刺激で *P450arom* mRNA 発現は増加したが、IL-4 刺激では変化しなかった。NSCs において、IL-4 と PGE2 の同時刺激で *HSD3B2* mRNA 発現は増加しなかった。

ESCs を IL-4 (10 ng/ml)と PGE2 (10^{-7} M)で 24 時間刺激し、細胞内の HSD3B2 蛋白発現をウェスタン・

ブロットニング法で確認した。IL-4 と PGE2 の同時刺激で HSD3B2 蛋白発現は増加した。

以上の結果より HSD3B2 発現は ESCs 特有の性質であると考えられ、続く実験は ESCs のみを用いて検討した。

次に、酵素活性を検討した。P450arom 酵素活性を評価するために、IL-4 (10 ng/ml) と PGE2 (10^{-7} M) で 24 時間刺激した後、androstenedione を添加し、24 時間後に細胞上清中 estrone 濃度を EIA で測定した。HSD3B2 酵素活性を評価する目的で、HSD3B2 と P450arom 酵素活性を同時に評価した。つまり、IL-4 と PGE2 で 24 時間刺激した後、dehydroepiandrosterone (DHEA) を添加し、24 時間後に細胞上清中 estrone 濃度を測定した。Androstenedione 添加後の estrone 濃度は PGE2 刺激で増加し、IL-4 刺激では増加しなかった。DHEA 添加後の estrone 濃度は PGE2 刺激で増加し、IL-4 と PGE2 同時刺激にて著明に増加した。以上より、IL-4 と PGE2 は HSD3B2 酵素活性を相乗的に増加させることがわかった。

HSD3B2 siRNA をトランスフェクション後に、IL-4 と PGE2 で 24 時間刺激した後に、DHEA を添加して、24 時間後の細胞上清中 estrone 濃度を測定した。HSD3B2 ノックダウンは、PGE2 と IL-4 同時刺激での estrone 濃度増加を抑制した。

IL-4 の細胞内シグナル伝達を検討した。ESCs に CP-690550 (Janus kinase 3 (JAK3) 阻害剤)、SB202190 (p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 阻害剤)、PD98059 (p42/44 MAPK 阻害剤)、SP600125 (stress-activated protein kinase/Jun amino-terminal kinase 阻害剤) で 1 時間刺激した後、IL-4 (10 ng/ml) で 5 時間刺激し、HSD3B2 mRNA 発現を real-time PCR で確認した。CP-690550 と SB202190 は IL-4 による HSD3B2 mRNA 発現増加を抑制したが、PD98059 と SP600125 は抑制しなかった。

PGE2 の細胞内シグナル伝達を検討した。ESCs に AH6809 (EP1/2 阻害剤)、AH23848 (EP4 阻害剤)、H89 (protein kinase A 阻害剤) を 1 時間添加した後、IL-4 (10 ng/ml) と PGE2 (10^{-7} M) で 5 時間刺激し、HSD3B2 と P450arom mRNA 発現を real-time PCR で確認した。AH6809 添加で、PGE2 による P450arom mRNA 発現増加は抑制されたが、HSD3B2 mRNA 発現は抑制されなかった。AH23848 添加で、HSD3B2 と P450arom 発現は抑制されなかった。H89 添加で P450arom mRNA 発現は変化しなかったが、IL-4 と PGE2 同時刺激での HSD3B2 mRNA 発現増加を抑制した。

CP-690550 と他の JAK3 阻害薬である WHI-P131 の酵素活性に対する効果を評価した。CP-690550 と WHI-P131 を 1 時間添加した後に IL-4 と PGE2 を添加し、その 24 時間後に DHEA を添加して、さらに 24 時間後の細胞上清中 estrone 濃度を測定した。CP-690550 と WHI-P131 は、DHEA から estrone への転換増加を抑制した。

<考察>

本研究において、ESCs では HSD3B1 よりも HSD3B2 が著明に発現していた。この発現様式は LGCs と同じであり、胎盤組織とは逆であった。NSCs では HSD3B1、HSD3B2 とともに発現が確認されず、IL-4 と PGE2 刺激下においても確認されなかった。以上より HSD3B2 発現は ESCs 特有の性質であると考えられ、本研究では HSD3B2 に注目した。卵巣子宮内膜症組織において HSD3B2 発現と IL-4 発現の発現を、ISH 法にて確認した。HSD3B2 発現と IL-4 発現は一部の検体の間質部分に認めため、IL-4 の HSD3B2 発現誘導は一部の病変におきていると考えられた。

本研究によって、子宮内膜症の進展における IL-4 の新たな作用が明らかになった。IL-4 が HSD3B

発現を誘導することは、他臓器でも報告がある。しかし、HSD3B2 が優位に発現している細胞において IL-4 が HSD3B2 発現を誘導する報告は、本研究が初めてである。IL-4 と PGE2 の相乗作用は珍しく、本研究は内分泌的反応に対する相乗的作用という点で特異である。

今回の結果の生物学的意義を考えると、炎症と Th2 免疫反応が協調的に作用して、子宮内膜症を誘導していると推測できる。子宮内膜症は慢性炎症性疾患であり、これまでも数多くの炎症性サイトカインが病巣や病巣周辺で増えていること、炎症物質が子宮内膜症病巣で PGE2 産生を誘導していると報告されている。PGE2 と IL-4 が HSD3B2 を相乗的に誘導することで、つまりは炎症と Th2 免疫応答がエストロゲン産生を誘導し、子宮内膜症を刺激する内分泌的作用に帰結すると考えられ、興味深い。

本研究では、CP-690550 (tofacitinib)は IL-4 が誘導した HSD3B2 mRNA 発現を濃度依存性に抑制し、IL-4 と PGE2 が誘導した DHEA から estrone への転換も抑制した。CP-690550 は JAK3 阻害剤として開発され、現在関節リウマチに対する治療薬として日本で発売されている。CP-690550 は子宮内膜症病巣でのエストロゲン産生を抑制することで、子宮内膜症に治療効果を発揮する可能性が考えられる。ただし、本研究は *in vitro* のみであり CP-690550 の有効性については *in vivo* 研究など更なる検討が必要である。本研究は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を行っており、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。