

論文内容の要旨

論文題目 子宮内膜および子宮内膜症における p38MAPK の意義

指導教官 武谷 雄二

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

吉野 修

近年、受精卵の着床現象は一種の炎症反応と考えられており、着床を子宮内膜における炎症として解析することは重要である。また、不妊症や月経痛の原因とされる子宮内膜症も近年、炎症性疾患と捉えられている。炎症性サイトカインが子宮内膜症細胞の増殖を促進することから、炎症の制御を行なうことで子宮内膜症の進展を抑制することができる可能性がある。本論分では子宮内膜および子宮内膜症における炎症をサイトカイン・プロスタグランジンなどのケミカルメディエーターの産生調節という視点で解析を行った。

生命現象を理解する上で、細胞内シグナル伝達機構の解明が不可欠である。MAP キナーゼ(Mitogen-activated protein kinase: MAPK) カスケードは、細胞外の情報を核に伝える細胞内シグナル伝達経路の主要なものの一つである。MAPK のうち、p38MAPK は、特に炎症応答において重要な役割を果たすことが知られている。

本論文では、1. 正所性子宮子宮内膜における生理的炎症、特に着床に関与する MAPK の調節機構 2. 異所性子宮内膜における MAPK の調節機構についての検討を行い、特に炎症に関与する p38MAPK を抑制することが子宮内膜症の新たな治療法になりうるかを 3. マウス子宮内膜症モデルを作成し、検討を行った。

1. 正所性子宮子宮内膜における p38 MAPK

IL-1 β は着床期において子宮内膜に浸潤してくる絨毛細胞より分泌されることが知られている。IL-1 β による炎症性反応は、サイトカイン・プロスタグランدينを増加させることで、組織のリモデリングを惹起し胚細胞浸潤に有利な環境を形成すると考えられる。一方、胚細胞が子宮内膜への浸潤を停止するためには、このような炎症性反応は抑制される必要がある。胚の着床時、子宮内膜はプロゲステロン作用により脱落膜化することが知られている。すなわち、プロゲステロンは着床時に脱落膜化を起こすことで、過度の炎症を抑制している可能性がある。そこで我々は、脱落膜化変化に重要な cAMP/PKA が、IL-1 β 添加による p38MAPK のリン酸化を抑制しているという仮説をたてた。手術時に同意のもと得られた子宮内膜より子宮内膜間質細胞を分離後、エストラジオール(10ng/ml)およびプロゲステロン(100ng/ml)下で 9 日間培養し脱落膜化を誘導後、IL-1 β を添加し、培養上清中の IL-6 IL-8 MCP-1 濃度を ELISA 法にて測定した。また、培養細胞より蛋白および mRNA を抽出し、それぞれ p38 MAPK、プロスタグランدين合成酵素である COX-2 の発現レベルを検討した。ホルモン非存在下に 8-bromo-cAMP(1mM)添加による脱落膜化誘導後にも同様の実験を行った。

IL-1 β は、子宮内膜間質細胞の p38 リン酸化を活性化することを認めた。また、IL-1 β により COX-2 mRNA 発現および IL-6 IL-8 MCP-1 の分泌が増加し、この効果は p38 MAPK 阻害剤である SB202190 (10 μ M) により抑制された。プロゲステロンにより脱

脱落膜化した子宮内膜間質細胞では IL-1 β による COX-2 発現及び IL-6 IL-8 MCP-1 の分泌促進効果が有意に減少しており、この作用はプロゲステロンによる p38 MAPK リン酸化の抑制によるものであった。プロゲステロンは脱落膜化の過程において cAMP を誘導することが知られている。8-bromo-cAMP にて前処理された子宮内膜間質細胞では IL-1 β による、p38 MAPK リン酸化の活性化が抑制された。

子宮内膜におけるプロゲステロンの抗炎症作用の機序として、プロゲステロンにより誘導された cAMP が炎症性サイトカインによる p38 活性化を抑制することが示唆された。今回、正所性子宮内膜で得られた、炎症性サイトカインの産生および COX-2 の発現に p38MAPK が関与しているという知見は子宮内膜症の病態の解明および新たな治療に応用できる可能性がある。そこで異所性子宮内膜細胞を用い実験を行なった。

2 異所性子宮内膜における MAPK の調節機構についての検討

患者の同意の下に得られた子宮内膜症性卵巣嚢胞より、子宮内膜症性間質細胞を分離・培養した。子宮内膜症性間質細胞を IL-1 β (5ng/ml), TNF- α (100ng/ml), H₂O₂ (4mM) で 15 分刺激し各 MAPK のリン酸化及び総蛋白の発現を Western blot で調べた。IL-1 β 刺激下に各 MAPK の特異的阻害剤(ERK 阻害剤:PD98059 25 μ M, p38 阻害剤: SB202190 10 μ M, JNK 阻害剤:SP600125 10 μ M) を添加し、刺激 4 時間後の PG 合成酵素 COX-2 mRNA の発現を定量的 PCR で、24 時間後の培養上清中 IL-6,IL-8 濃度を ELISA 法にて測定した。

IL-1 β , TNF- α , H₂O₂ 各々の刺激により、ERK, p38, JNK すべてのリン酸化が認められ、IL-1 β 刺激において最も強くリン酸化が認められた。IL-1 β は COX-2 mRNA 発現と IL-6,IL-8 産生を刺激した。この IL-1 β による刺激作用は各種 MAPK 阻害剤により抑制され、COX-2 mRNA 発現においては p38>ERK>JNK 各阻害剤の順で効果が認められ

た（各々10%, 20%, 50%に抑制）。IL-8 産生に対する抑制作用は、p38>ERK=JNK 各阻害剤の順（30%, 70%, 70%）で、IL-6 産生に対しては p38>JNK>ERK 各阻害剤の順（40%, 90%, 100%）であった。子宮内膜症性細胞において ERK, p38, JNK すべてのリン酸化が炎症性物質の産生を介して子宮内膜症の進展に寄与していることが示唆され、なかでも p38 MAPK を介する経路が最も重要であると推測された。そこでマウス子宮内膜症モデルを用いて p38MAPK 阻害剤の効果につき検討を行った。

3 マウス子宮内膜症モデルを用いた検討

マウスを用いた子宮内膜症モデルを作成した。ミンチした子宮内膜を同系マウスの腹腔内に投与することで、子宮内膜症様病変を誘導することができた。また、病変はエストロゲン依存性に増大することを認めた。

本モデルに p38 MAPK 阻害剤である FR167653 (藤沢薬品 30mg/kg)を投与したところ、コントロールと比べ有意に子宮内膜症病巣の縮小を認めた。さらに腹腔内サイトカインを検討した結果、FR167653 投与群において、IL-6・MCP-1 濃度の減少を認めたことより、FR167653 の効果は子宮内膜症に伴う腹腔内の炎症反応を抑制することにより発揮されている可能性が示唆された。

本実験はエストロゲンの投与を行っており、エストロゲン存在下においても子宮内膜症の進展を阻止できる p38 MAPK 阻害剤は、子宮内膜症の新たな治療薬としての可能性が期待できる。

本研究により、着床などの生理的現象および、子宮内膜症などの病理的現象において、MAPK のうち、特に p38MAPK が重要な役割を担っていることが示唆された。