

## 論文の内容の要旨

論文題目：「子宮収縮による子宮内膜機能の調節機構に関する研究」

指導教官：武谷 雄二 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月 入学

医学博士課程 生殖・発達・加齢医学専攻

氏名：原田 美由紀

### 要旨：

【背景】分娩時の陣痛に代表されるように、妊娠時に子宮が収縮運動をすることは以前より知られているが、近年の超音波等の装置の発達により、非妊時においても子宮は収縮運動を示すことが知られるようになってきた。その収縮は月経周期に応じて変化し、月経期に最も高頻度で振幅も最大であるが、全周期を通じて観察される。また、種々の病的状態において、子宮運動異常が観察されている。例えば、子宮内膜症患者では月経期の子宮収縮が増強しており、さらに蠕動運動の方向が正常の子宮体部→頸部方向ではなく、頸部→体部方向へと逆転していることが報告されている。また、不妊症と密接に関係する粘膜下筋腫を有する患者においては、筋腫の近傍のみならず子宮全体において、健常女性で認められる規則的な蠕動運動が消失していることが報告されている。さらに体外受精を施行した患者において、胚移植時の子宮収縮が頻回であるほど、着床率、妊娠率が低下するという報告もある。

一方、近年、臓器の運動という機械的な刺激が単に物理的作用をもたらすのみでなく、その臓器の構成細胞において生化学的なシグナルに変換され、種々の生理、病理的状态に関与していることが明らかになってきた。例えば、肺の呼吸運動は、肺胞上皮細胞に伸展刺激をもたらし、炎症性サイトカインの一つである interleukin-8 (IL-8)の産生を促進するため、人工換気時の肺傷害の病因に関わる。他にも、心筋細胞、血管平滑筋細胞をはじめ種々の細胞においてこのような現象は観察されており、また及ぼす作用も向炎症作用のみ

でなく、増殖、分化など多岐にわたっている。

そこで私は、非妊娠子宮の運動が月経血の排出、精子や胚の輸送等の物理的作用のみではなく、その運動によりもたらされる子宮内膜への機械的刺激が生化学的シグナルに変換されることにより、子宮内膜における生理、病理的現象に関わる、という生化学的作用を持つのではないかと考えた。そして、子宮内膜における現象として、1. 炎症、2. 分化の2つに特に注目した。炎症は、正常子宮内膜の周期的剥脱である月経の本態であると考えられており、また疾患との関連においては、子宮内膜症の病態に深く関わっていることが知られている。分化は、子宮内膜の構成成分である子宮内膜間質細胞が脱落膜化することが胚の着床に不可欠であることが知られている。私は、*in vitro* の系において、子宮内膜間質細胞を用いて、1. 月経、子宮内膜症など子宮内膜における炎症を本態とする現象において重要な役割を果たす炎症性サイトカインである IL-8 の産生、2. 子宮内膜間質細胞の分化（分化マーカーとして insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) を用いた）に対して、機械的刺激の与える影響を検討した。

【実験方法】患者の同意のもと手術時に得られた子宮内膜より子宮内膜間質細胞（ESC）を分離培養し、用いた。周期的伸展刺激の添加には、Flexercell tension system FX-4000T を用いた。これは、可動性のある培養プレート底部を吸引力を用いて牽引、伸展させる装置で、その強さ、周期はコンピューターにより制御されている。

1. ①伸展刺激を加え、ESC における IL-8 mRNA 発現、IL-8 蛋白分泌の経時的変化を各々定量的 RT-PCR 法、ELISA 法を用いて検討した。②Western blot 法を用いて、伸展刺激による ESC での extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) のリン酸化の変化を検討し、また ERK1/2 経路の阻害実験により、伸展刺激による IL-8 産生に与える影響を ELISA 法を用いて検討した。③自己分泌/傍分泌機構の関与を検討するために、伸展刺激を 24 時間添加した ESC の培養上清を静置した ESC に添加し、静置 ESC での IL-8 mRNA、IL-8 蛋白分泌に与える影響を各々定量的 RT-PCR 法、ELISA 法を用いて検討した。④卵巢ホルモンの、伸展刺激による IL-8 産生に与える影響をエストラジオール (E)、プロゲステロン (P)、またはその両方を伸展刺激開始 1 時間前に添加し、24 時間伸展刺激後培養上清中の IL-8 濃

度を ELISA 法を用いて検討した。2. ESC を E+P にて 12 日間処理し、脱落膜化間質細胞 (DSC) に分化させ、以下の実験に用いた。①伸展刺激を加え、DSC における IGFBP-1 蛋白分泌の経時的变化を ELISA 法を用いて検討した。②自己分泌/傍分泌機構の関与を検討するために、伸展刺激を 24 時間添加した DSC の培養上清を静置した DSC に添加し、静置 DSC での IGFBP-1 蛋白分泌に与える影響を ELISA 法を用いて検討した。③自己分泌/傍分泌因子として prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) を想定し以下の実験を行った。Cyclooxygenase 阻害剤 indomethacin を伸展刺激開始 1 時間前に添加し、24 時間伸展刺激後培養上清中の PGE<sub>2</sub>、IGFBP-1 濃度を各々 EIA 法、ELISA 法を用いて検討した。④伸展刺激による DSC における IGFBP-1 mRNA 発現の経時的变化を定量的 RT-PCR 法を用いて検討した。また、転写阻害剤 actinomycin D を伸展刺激開始 1 時間前に添加し、伸展刺激の IGFBP-1 分泌促進作用に及ぼす影響を ELISA 法を用いて検討した。⑤ERK1/2 経路の阻害剤 PD98059、protein kinase A (PKA) 阻害剤 H89 の前処理による伸展刺激の IGFBP-1 分泌促進作用に及ぼす影響を ELISA 法を用いて検討した。

【結果】 1. ①伸展刺激は ESC における IL-8 mRNA 発現を増加させ、その効果は 4 時間で最大であり、対照群と比較し 12.5 倍であった。伸展刺激により ESC からの IL-8 分泌は 8 時間から有意に増加し、24 時間まで経時的に増加した。24 時間後の上清中 IL-8 濃度は対照群の 4.4 倍であった。②伸展刺激により ESC における ERK1/2 のリン酸化が増加し、その効果は 5 分で最大であった。PD98059 前処置により、伸展刺激による IL-8 分泌促進作用は抑制された。③伸展刺激を 24 時間添加した ESC の培養上清は、伸展刺激を添加しなかった ESC の培養上清に比し、静置 ESC における IL-8mRNA 発現、IL-8 分泌を有意に促進した。④P は E の有無に関わらず、伸展刺激による IL-8 分泌促進を有意に抑制した。2. ①伸展刺激により DSC からの IGFBP-1 分泌は 8 時間から有意に増加し、24 時間まで経時的に増加した。24 時間後の上清中 IGFBP-1 濃度は対照群の 25 倍であった。ESC ではこの効果は見られなかった。②伸展刺激を 24 時間添加した DSC の培養上清は、伸展刺激を添加しなかった DSC の培養上清に比し、静置 DSC における IGFBP-1 分泌を有意に促進した。③EP 存在下で DSC からの IGFBP-1 分泌を促進し、非存在下では促進しないという点にお

いて、伸展刺激と PGE<sub>2</sub> は共通しているため、伸展刺激により DSC から分泌され、自己分泌/傍分泌機構を介して DSC からの IGFBP-1 分泌を促進する液性因子は PGE<sub>2</sub> ではないかと考えた。伸展刺激は DSC からの PGE<sub>2</sub> 分泌を促進し、indomethacin はこれを抑制したが、IGFBP-1 分泌に変化はなかった。④伸展刺激により IGFBP-1 mRNA 発現は 6 時間より有意に増加し、その後経時的に 24 時間まで増加した。Actinomycin D 前処理により伸展刺激による IGFBP-1 分泌促進効果はほぼ完全に抑制された。⑤PD98059、H89 は伸展刺激による IGFBP-1 分泌促進作用に影響を与えなかった。

【考察】 1. 子宮内膜への機械的刺激と炎症についての検討により、伸展刺激により ESC における IL-8 蛋白分泌、IL-8 mRNA 発現が促進されることが示された。この過程には、MAPK カスケードの一つである ERK1/2 の関与と ESC 自身の自己分泌/傍分泌機構の関与が示された。またこの促進効果はプロゲステロンの存在下で抑制された。正常有経女性において月経期は子宮運動が最も亢進している時期であり、また子宮内膜において炎症性サイトカイン IL-8 発現が最も亢進している時期でもある。本研究の結果を踏まえると、月経期に子宮筋運動が単に月経血の排出という物理的作用のみならず、子宮内膜における IL-8 発現調節を介して、月経の調節因子として働くことが示唆される。また、子宮内膜症患者では、子宮内膜において IL-8 発現が亢進していることが報告されているが、子宮内膜症患者で観察される異常子宮収縮は逆流血を増加させるのみではなく、子宮内膜の IL-8 発現の調節を介して子宮内膜症の病態に関与すると考えられる。 2. 子宮内膜への機械的刺激と分化についての検討により、伸展刺激により DSC からの IGFBP-1 蛋白分泌が促進されることが示された。この過程には、DSC 自身の自己分泌/傍分泌機構と転写調節の関与が示された。これまで子宮蠕動運動は精子、胚の移動を補助し、また運動の減少により着床、妊娠の成立に関わることが想定されてきた。本研究により、子宮蠕動は子宮内膜の脱落膜化の制御を介して着床現象に関わっている可能性が示唆された。

本研究により、非妊時の子宮運動により子宮内膜にもたらされる機械的刺激は、物理的作用のみでなく、子宮内膜において生化学的シグナルに変換され、子宮内膜における炎症、分化に関わるという生化学的作用を持つ可能性が示唆された。