

## 論文の内容の要旨

論文題目 The significance of Interleukin-4 in endometriosis

和訳 子宮内膜症における IL-4 の意義の検討

指導教官 矢野 哲 准教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 欧陽 卓

### 【緒言】

子宮内膜症（Endometriosis）は、生殖年齢にある女性の健康を悪化させる謎の病気である。生殖年齢の女性の少なくとも 5% に、子宮内膜症があるという統計がある。最も広く信じられている病因論は、月経時に子宮内膜の一部が逆流し、腹腔内で生残り、成長増殖するというものである。しかしながら、逆流した子宮内膜組織がなぜ子宮内膜症として発症するかは未知のままである。この点に関して多くの証拠により、異常な免疫反応及び炎症反応が子宮内膜症の発症と関係していることが示唆されている。中でもいくつかの証拠は、Th2 細胞の免疫反応が子宮内膜症の発症に密接に関連することを示している。さらに、子宮内膜症に罹る女性は自己免疫疾患を合併しやすい傾向もある。アレルギーと喘息などの自己免疫疾患は、子宮内膜症で高い罹患率で報告されている。

インターロイキン 4 (IL-4) は、Th2 細胞が分泌する代表的なサイトカインであり、B 細胞と T 細胞の増殖促進を含む多くの生物学的役割を持っている。IL-4 が自己免疫とアレルギーにおいて重要な分子であることも知られている。子宮内膜症患者ではヒト末梢血単核細胞と腹腔内貯留液の中で IL-4 の発現量が増加しているという証拠

により、IL-4 が子宮内膜症の病態生理において重要な役割を果たすことは推測されているが、IL-4 の子宮内膜症発症機序の中での具体的な作用はまだ不明である。

ケモカイン (Chemokine) は、小さな分泌タンパクである。Eotaxin (CC Chemokine ファミリーの新しいメンバー) は好酸球、好塩基球及び Th2 リンパ球などに対する有力な化学遊走物質 (Chemoattractant) である他に、炎症の促進、免疫反応の増強、線維性癒着の誘導、血管新生の誘発などの多機能の生物学的作用を持っている。また、Eotaxin はアレルギー反応にも関わっている。Eotaxin と子宮内膜症の関係についてみると、Eotaxin が正所性子宮内膜組織及び子宮内膜症組織の上皮細胞で産生され、腹腔内貯留液中の Eotaxin の蛋白質濃度は子宮内膜症で高値になることが報告されているが、本症への関与は不明である。

#### 【目的】

子宮内膜症の発症機序において免疫が重要であることが示唆されている。子宮内膜症にアレルギー性の疾患が合併しやすいことなどから、Th2 細胞の関与が示唆されているものの、これまで詳細は不明であった。我々は Th2 細胞の主要な特異的サイトカインである IL-4 について、子宮内膜症の進展における役割を明らかにしようとした。また、子宮内膜症において IL-4 が他の細胞因子とどのような相関関係を持つかをみるために、我々は IL-4 の ESC からの Eotaxin 分泌に与える影響を検討した。さらに、Eotaxin は子宮内膜症の病態生理において何らかの役割を演じることが推測されるため、子宮内膜症組織で Eotaxin の局在を検討した。

#### 【対象と検体】

平均年齢 35.2 才、III 期または IV 期の子宮内膜症患者 32 名。インフォームドコンセントのもと、腹腔鏡手術時に卵巣子宮内膜症検体を採取した。一部は、凍結切片を作成し免疫組織染色を行った。他は、組織より子宮内膜症間質細胞(ESC)を分離培養した。

## 【方法と結果】

### (1) 子宮内膜症組織における IL-4 及び Eotaxin の局在

卵巣子宮内膜症検体で連続凍結切片を作成し、IL-4 及び Eotaxin の免疫組織化学染色を行った。子宮内膜症組織の間質に IL-4 陽性細胞が認められ、その頻度は約 14%であった。これらの細胞は CD3 との蛍光抗体法二重染色によって Th2 細胞であることが確かめられた。

子宮内膜症組織における Eotaxin は間質細胞と上皮細胞の 2 種類の細胞に発現していた。その頻度は約 19%であった。Eotaxin は蛍光抗体法により細胞質に存在することが示された。また、多くの Eotaxin 及び IL-4 陽性細胞はしばしば子宮内膜症組織で同じ血管を囲んで、分布していた。

### (2) IL-4 受容体の mRNA の発現

RT-PCR 法により ESC に、IL-4 受容体の遺伝子発現が確認された。

### (3) IL-4 の ESC からの eotaxin 分泌に与える影響

RT-PCR 法、Real-time quantitative PCR 法と ELISA 法による測定では、IL-4(0.1-10ng/ml)添加により 24 時間後、Eotaxin mRNA の発現量(5.5 fold)と蛋白質の発現量(8.7 fold)は用量依存性に有意に増加した。最大効果は 10ng/ml で観察された。

### (4) IL-4 が ESC 増殖に与える影響

Cell Counting kit -8 (48 時間) と BrdU Cell Proliferation Assay (72 時間) によると、IL-4(0.1-10ng/ml)添加により、ESC の細胞数と BrdU 取り込みは用量依存性に有意に増加した。この IL-4 の ESC 増殖作用は抗 IL-4 受容体中和抗体により抑制された。

### (5) IL-4 が ESC 増殖を促進することに関与する細胞内シグナル伝達経路

Western blotting 法により、我々は、ESC での p38 MAPK、SAPK/JNK と p42/44 MAPK のリン酸化状態を調べた。ESC で IL-4 は p38MAPK, JNK, ERK の各 MAP キナーゼのリン酸化を誘導した。次に各 MAP のキナーゼの阻害剤 (SB202190、P600125、PD98059) を添加し、IL-4 の ESC 増殖効果を検討した。各 MAP キナーゼの阻害剤は IL-4 の ESC 増殖作用を有意に抑制した。特に、これら 3 つの MAP キナーゼ阻害剤の同時添加は、IL-4 の ESC 増殖作用を強く抑えた。

## (6) ESC 増殖及び Eotaxin 分泌に関する IL-4 と TNF- $\alpha$ の協同作用

炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  は ESC 増殖を促進することが報告されている。今回の検討では IL-4 と TNF- $\alpha$  は ESC 増殖に関して、協同作用を示した。

### 【考察】

Th2 細胞は子宮内膜症組織において IL-4 を産生していた。IL-4 は IL-4 受容体により子宮内膜症の増殖を促進することが示唆された。IL-4 の ESC 増殖作用に関与する細胞内シグナル伝達経路は各 MAP のキナーゼであることが認められた。子宮内膜症では Th17 細胞が炎症を介して促進因子として作用していることが知られており、病巣における T 細胞系のネットワークを制御することが今後の治療戦略に重要かも知れない。

子宮内膜症組織における 2 種類の細胞：間質細胞と上皮細胞は Eotaxin を分泌していることが示唆された。多くの Eotaxin 及び IL-4 免疫反応細胞は同じ血管を囲んでいる発現しており、Eotaxin は子宮内膜症組織の血管新生に関わっている可能性が示唆される。さらに、IL-4 は Eotaxin を介して子宮内膜症組織の血管新生に影響を与えるかも知れない。また、IL-4 は用量依存性に ESC からの Eotaxin 分泌を促進する効果を示した。これらの所見から、Eotaxin が子宮内膜症の発展でいろいろな役割を演ずることが示唆される。すなわち、子宮内膜症の病態生理において、IL-4 が重要な役割を果たすことが考えられた。

今回の研究により、子宮内膜症の進展に免疫系が IL-4、Eotaxin、TNF- $\alpha$  などの因子を介して関与していることが示唆された。子宮内膜症の進展における免疫系の意義を明らかにするため、更なる検討が必要である。