

論文の内容の要旨

論文題目 子宮内膜症における proteinase-activated receptor 2 の発現調節についての検討

指導教員 武谷雄二教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 齊藤亜子

(背景)

子宮内膜症とは、子宮内膜またはそれに類似した組織が子宮以外の部位に異所性に発生発育する疾患である。月経痛、慢性骨盤痛、性交痛などの疼痛の原因となり、不妊をしばしば合併することで生殖能の低下を起こすとも考えられている。生殖年齢の約 10%、不妊患者の約 50%に発症するといわれている。

子宮内膜症の発生仮説として、月経時に経卵管的に月経血と共に子宮内膜細胞が腹腔内に逆流し、腹膜、卵巣などに移植され、そこで生着、増殖するという Samptom の仮説が広く受け入れられている。しかし、月経血の逆流は多くの婦人に起こることだが、そのすべての婦人が子宮内膜症を引き起こすわけではない。これには、腹腔内環境の変化、免疫学的要因など様々な因子が関与していると考えられている。腹腔内環境に注目すると、子宮内膜症患者の腹腔内貯留液には、活性化されたマクロファージ、肥満細胞、リンパ球、好酸球などの炎症細胞や、transforming growth factor (TGF)- β 、tumor necrosis factor (TNF)- α 、interleukin (IL)-1 β , IL-4, IL-6, IL-8 などの数多くの炎症性サイトカインの増加を認める。またこれらの炎症性細胞、サイトカンが複雑に関与しあい、子宮内膜症の発展、進展に寄与していると言われている。これらのことから子宮内悪症は慢性炎症性疾患と考えられている。炎症に関与する受容体として proteinase-activated receptor (PAR) 2 がある。これは肥満細胞や好中球から産生される特定のプロテアーゼや凝固因子 VIIa, Xa によって活性化される三量体 G タンパクと共役した 7 回膜貫通型受容体であり、様々な組織において向炎症的に働く

受容体である。プロテアーゼや凝固因子によって PAR2 分子の細胞外アミノ末端側ペプチド鎖を特定の部位で切断することにより新しいアミノ末端ペプチド鎖を露出させ、これが同じ受容体分子の細胞外第 2 ループに結合すると細胞内にシグナルが誘起される。実験系では合成されたペプチド(PAR2 agonist peptide, PAR2AP)を外来性に与えることにより、アミノ酸末端側ペプチドを切断することなく受容体の活性化を誘起することができる。PAR2 は生体内の様々な組織に発現し、種々の機能に関与しているが、子宮内膜症においては以下の報告がある。PAR2 は子宮内膜症細胞に発現していること、PAR2 を子宮内膜症性間質細胞(endometriotic stromal cell, EmSC)において活性化させると炎症性サイトカインである IL-6, IL-8 分泌が増加すること、また EmSC の細胞増殖が促進すること、子宮内膜症マウスモデルの実験では PAR2 欠損マウスにおいて病変数、病変重量が減少していることである。これらのことより、PAR2 は炎症的側面より子宮内膜症の増悪因子であると考えられている。しかし、これまで子宮内膜症において PAR2 の発現調節因子は明らかではなかった。他の疾患においては PAR2 は炎症性サイトカインによって増加することが知られており、PAR2 は向炎症反応や組織修復などの様々な観点から治療薬の新たな標的分子になる可能性があると考えられている。子宮内膜症においてもその発現調節因子を検索することは新しい治療に寄与する可能性があると考えられる。そこで子宮内膜症で重要なサイトカインにおいて、PAR2 の発現調節作用について検討した。

(方法)

書面によるインフォームドコンセントの上、手術時に子宮内膜症性卵巣嚢胞を採取した。検体は病的に子宮内膜症性と診断されたものを用いた。子宮内膜症性卵巣嚢胞から EmSC を分離培養し以下の実験に用いた。

EmSC に TGF- β 10ng/ml, IL-1 β 10ng/ml, TNF α 1ng/ml を 6 時間添加し、PAR2 mRNA 発現を RT-PCR にて測定した。TGF- β のみが反応を示したため、ここからは TGF- β についてのみ検討した。EmSC に TGF- β 10ng/ml を 0, 3, 6, 12, 24 時間添加し経時的反応を、TGF- β 0,1,5,10ng/ml を 6 時間添加し容量反応を調べた。PAR2AP が起こす EmSC からの IL-6 分泌に対して TGF- β の前投与が与える影響を調べるために、まず EmSC を TGF- β 10ng/ml, 24 時間で刺激し、その後 PAR2AP 30 μ M, 24 時間刺激し、上清中の IL-6 を ELISA にて測定した。TGF- β の type I receptor の阻害剤である SB431542 の PAR2 mRNA に対する影響をみるために、EmSC に SB431542 10 mM, TGF- β 10ng/ml 6 時間添加した。SB431542 の PAR2AP 刺激による IL-6 分泌に対する影響を調べるために、SB431542 10mM, TGF β 10ng/ml 24 時間添加、PAR2AP 30 μ M, 24 時間刺激した。また PAR2 siRNA を導入したうえで、TGF- β 10ng/ml, 24 時間で刺激し、その後 PAR2AP 30 μ M, 24 時間刺激し、上清中の IL-6 を測定した。TGF- β の細胞内シグナル伝達には Smad 経路と mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路が存在する。このうち MAPK 経路を調べるために、EmSC を p38 MAPK、p42/44 MAPK、stress-activated protein kinase /c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK)それぞれの阻害剤にて 30 分刺激し、その後 TGF- β 10ng/ml, 6 時間刺激した。また Smad 経路については Smad4 siRNA

を導入し、TGF- β 10ng/ml, 6 時間刺激し、PAR2 mRNA を測定した。

(結果)

EmSCにおいてTGF- β はPAR2 mRNAを約2倍に増加させたが、IL-1 β , TNF- α はその作用を示さなかった。IL-1 β , TNF- α はEmSCに添加するとIL-8を分泌することが知られている。上記と同じ検体においてIL-1 β , TNF- α 刺激でIL-8 mRNA増加しており、これらのサイトカンが作用していることを確認した。TGF- β のPAR2 mRNAに対する作用をさらに詳細に検討したところ、経時的な変化では6時間後にピークを認め約3.2倍に増加した。またTGF- β は濃度依存性にPAR2 mRNAを増加させ、1ng/ml以上で対照に比し有意差が認められた。EmSCにおいてPAR2AP刺激によってIL-6が分泌されることが報告されている。TGF- β 前投与はこの作用をさらに増強した。この増強作用はTGF- β の濃度依存性にみられた。PAR2AP刺激のみではIL-6分泌はPAR2AP刺激前と比べ2.8倍であるが、TGF- β 10ng/ml前投与によりこの比は約9.8倍となった。TGF- β のtype I受容体阻害剤であるSB431542はTGF- β によるPAR2 mRNA発現を抑制した。また、TGF- β がPAR2APによるIL-6分泌を増強させる効果も抑制した。PAR2 siRNAはEmSCにおけるPAR2 mRNA発現を約6%に抑制した。この条件下において、TGF- β がPAR2APによるIL-6分泌を増強させる効果を抑制した。このことよりTGF- β 添加、PAR2AP添加条件下でのIL-6分泌はPAR2を介していると考えられた。TGF- β の細胞内シグナル伝達経路についての検討で、Smad経路とMAPK経路のどちらの経路を介しているか調べるために、Smad4 siRNA導入またはMAPK阻害剤を使用した。MAPK阻害剤のうちp38 MAPKの阻害剤とp42/44 MAPKの阻害剤がTGF- β によるPAR2 mRNA発現を抑制した。Smad4 siRNA導入によりSmad4 mRNAは約22%に抑制され、Smad4のタンパク量の減少も認められたが、この条件下ではTGF- β によるPAR2発現は抑制を受けなかった。

(考察)

EmSCにおいてTGF- β はPAR2 mRNA発現を増加し、PAR2刺激によるIL-6分泌作用を促進することを示した。IL-1 β , TNF- α はその作用を示さなかった。TGF- β type I受容体阻害剤、PAR2 siRNAはその作用を抑制した。TGF- β の細胞内シグナル伝達経路においてp38 MAPKとp42/44 MAPK阻害剤はTGF- β のPAR2 mRNA増加作用を抑制し、Smad4 siRNAはこの作用に影響を与えなかった。

PAR2発現調節についてはこれまで他の細胞において報告がある。変形性膝関節症の軟骨細胞ではIL-1 β , TNF- α , TGF- β がPAR2発現を増加させ、皮膚の線維芽細胞においてはTGF- β が、ヒト臍帯静脈内皮細胞ではIL-1 β , TNF- α がPAR2を増加させる。今回の結果では子宮内膜症間質細胞においてはIL-1 β , TNF- α ではPAR2発現は変化せず、これらのうちTGF- β のみがPAR2 mRNA発現を増加させた。以上よりPAR2発現調節の反応は細胞によって異なると考えられた。

TGF- β は広く生体内に分布している、多機能のサイトカンであり、細胞増殖、分化、アポトーシス、血管新生などの役割を様々な組織において果たす。癌、線維症、免疫疾患、血

管病変、骨軟骨疾患などの疾患で治療のターゲット候補として研究が進められている。子宮内膜症においては腹腔内貯留液、子宮内膜症性卵巣嚢胞内容液にその濃度の増加がみられ、免疫染色では子宮内膜症組織に発現を認める。機能としては腹膜中皮細胞に子宮内膜上皮細胞が侵入する細胞侵入モデルにおいてその作用を促進するという報告があり、子宮内膜症を増悪させる重要なサイトカインと考えられている。本研究では、TGF- β が PAR2 を介して IL-6 分泌を増加させることを示した。IL-6 は子宮内膜症患者の腹腔内貯留液に増加して、その増悪、また子宮内膜症に関連する不妊の要因となるサイトカインであると考えられている。これより、TGF- β が IL-6 分泌を増加させることは子宮内膜症の進展、また不妊の一因になる可能性を有する。

TGF- β の細胞内シグナル伝達経路には Smad 経路と non-smad 経路が存在し、それらは crosstalk があるといわれている。今回、p38MAPK, p42/44MAPK 阻害剤により、TGF- β の PAR2 増加作用は阻害されたが、Smad4 siRNA はその作用に影響を与えなかった。IL-1 β も MAPK を動かすが、EmSC において IL-1 β 刺激では PAR2 発現は変化しなかった。また、EmSC において MAPK 阻害剤による抑制率は低かった。これらのことより、TGF- β による PAR2 発現において MAPK の活性化は十分条件ではなく、smad 経路との crosstalk やその他の non-smad 経路が関連する可能性が考えられる。

本研究では TGF- β が PAR2 のシステムを介し、子宮内膜症の増悪に関与していることを示した。本研究以外にも TGF- β が子宮内膜症の増悪因子であるという報告があり、治療のターゲットになる可能性がある。しかし、TGF- β は広く生体内に分布し、多彩な作用を持つため、すぐに治療に結びつくものではなく、さらなる検討が必要である。本研究で明らかにした TGF- β が PAR2 を増加させ IL-6 分泌作用を増強するという知見は、子宮内膜症の病態解明の一助になると考えられる。