

## 論文の内容の要旨

論文題目 子宮内膜症に対する  $\omega$ 3 脂肪酸の病変抑制作用に関する研究

氏名：富尾 賢介

### 【序文】

子宮内膜症は、子宮内膜およびその類似組織が、おもに子宮以外の卵巣、ダグラス窩、腹膜等の場所で発育する慢性炎症性疾患である。罹患者数の最も多い婦人科疾患のひとつであり、月経困難症、性交痛、不妊症などを引き起こし、近年では子宮内膜症性卵巣嚢胞が卵巣がんのリスク因子としても注目され、女性の QOL の低下につながっている。病因として、卵管経由に逆流した月経血中の子宮内膜細胞が腹膜上に生着する“移植説”等が知られているが、いまだ発生や進展の全容は解明されていない。

$\omega$ 3 脂肪酸は、哺乳類では体内で独自に生合成することの出来ない必須脂肪酸である。代表的なものにエイコサペンタエン酸（以下 EPA）、ドコサヘキサエン酸（以下 DHA）が知られている。 $\omega$ 3 脂肪酸の研究は、1970 年代に Dyerberg らによって報告された、 $\omega$ 3 脂肪酸が豊富なアザラシ肉を主食とするエスキモーに心血管系イベントが少ないことについての疫学調査に端を発する。その後の基礎研究から抗炎症作用を有することが明らかとなったが、分子レベルでの作用機序については未解明な点も多い。

$\omega$ 3 脂肪酸の抗炎症作用については、 $\omega$ 6 脂肪酸のアラキドン酸（以下 AA）からプロスタグランジン（PGs）やロイコトリエン（LTs）などの“炎症性メディエーター”が産生されるカスケードにおいて、EPA や DHA が AA に拮抗することで炎症が抑えられる機序が考えられてきた。さらに近年、EPA や DHA の代謝物として同定されたレゾルビンやプロテクチン等が、過度の炎症反応を抑制し、積極的に炎症を“収束”に導く働きがあることが明らかとなり、新規の“抗炎症性メディエーター”として注目されている。

このような  $\omega$ 3 脂肪酸の抗炎症作用は、慢性炎症性疾患である子宮内膜症に対しても抑制効果を示す可能性があるが、これまでいくつかの臨床効果の報告はあるものの、明確なエビデンスは得られていない。また動物モデルでも EPA に

よって抗炎症作用を認め、病変の進展を抑制することが示されたとする報告等があるが、 $\omega$ 3 脂肪酸とその代謝物の動向も含めた作用機序の詳細を、十分に検証した基礎研究の報告はない。

そこで本研究では、子宮内膜症に対する $\omega$ 3 脂肪酸の病変抑制効果について、 $\omega$ 3 脂肪酸とその代謝物の動向に着目しつつ、子宮内膜症に与える影響とそのメカニズムを解明し、さらには新規治療法への応用を探索することを目的とした。

## 【方法】

本研究では、腹腔内に子宮内膜症病変を発生させるマウスモデルを導入して、 $\omega$ 3 脂肪酸の病変抑制効果の検証を行った。

$\omega$ 3 脂肪酸の効果を検証するためのマウスとして、*fat-1* トランスジェニックマウス（以下 *fat-1* マウス）を使用した。 $\omega$ 6 脂肪酸から $\omega$ 3 脂肪酸への変換酵素をコードする *fat-1* 遺伝子を全身性に発現するマウスで、食餌中の $\omega$ 6 脂肪酸をもとに、全身で $\omega$ 3 脂肪酸を高発現することが可能となる。これまでも肝炎や腸炎などの炎症性疾患モデルで抗炎症効果が示されている。

子宮内膜症マウスモデルには、エストロゲン投与で腫大させたドナーマウスの子宮を細切し、レシピエントマウスの腹腔内に注入する方法を用いた。この方法では腹腔内に嚢胞状の病変が形成され、ヒトの子宮内膜症の病態に類似した動物モデルと考えられている。

*fat-1* マウスはヘテロで継代し、同腹仔で *fat-1* 遺伝子をもたないマウス（以下 **Wild Type** マウス）をコントロール群として使用した。子宮を摘出するドナーマウスとして 2 匹、摘出した子宮を細切して腹腔内に注入するレシピエントマウスとして 4 匹、計 6 匹を 1 群として、同一群はすべて同じ種類のマウスで構成した。マウスの食餌には高 $\omega$ 6 脂肪酸含有食を使用した。EPA を経口摂取させる群には、5%の EPA を添加して与えた。

エストロゲンの皮下投与 2 週間後にドナーマウスの子宮を摘出細切して、レシピエントマウスの腹腔内に注入した。さらに 2 週間後に屠殺、腹腔洗浄液を回収、腹腔内病変を観察、病変の摘出を行った。形成された嚢胞性病変の個数と重量を計測した。

AA や EPA、DHA 等の脂肪酸の代謝経路は、COX、5-LOX、12/15-LOX などの酸化酵素を介して始まり、その下流には様々な脂肪酸代謝物のネットワークが形成される。本研究では、採取した病変と腹腔洗浄液を用いて、これらの脂肪酸とその代謝物の網羅的な解析（以下、メタボローム解析）を行った。それぞれの検体から脂肪酸代謝物を固相抽出したのち、高速液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリー（LC-MS/MS）を用いて検出を行った。

さらにマイクロアレイ分析法を用いて、*fat-1* マウスおよび **Wild Type** マウスの病変組織における遺伝子発現比を比較検討した。

次いで腹腔洗浄液中の白血球構成の解析のため、各種抗体と反応後、フローサイトメトリー法を用いて観察を行った。さらに腹腔洗浄液中の細胞成分から CD11b 陽性マクロファージを単離回収し、腹腔マクロファージにおける遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて検討した。

## 【結果】

ω3 脂肪酸を高発現する fat-1 マウスでは、一個体あたりの病変の個数は有意に少なく ( $5 \pm 0.3$  個 vs  $2 \pm 0.3$  個  $p < 0.05$ )、病変一個あたりの重量も有意に小さく ( $17.5 \pm 0.6$  mg vs  $7.5 \pm 1.0$  mg  $p < 0.05$ )、病変の形成は有意に抑制された。

病変組織のメタボローム解析では、EPA の 12/15-LOX 系代謝物である 12/15-HEPE が、fat-1 マウスで最も有意な上昇を認めた。また AA の代謝物は、fat-1 マウスにおいて総じて低下し、12/15-HETE が fat-1 マウスで有意に低下を認めた。腹腔洗浄液のメタボローム解析でも、病変組織と同様に fat-1 マウスにおいて、EPA の代謝物の 12/15-HEPE が有意に高値を示し、AA の代謝物の 12/15-HETE は低下を認めた。以上の結果から、fat-1 マウスにおいて最も有意な増加を認めた代謝物として 12/15-HEPE が同定された。

12/15-HEPE と 12/15-HETE は、ともに 12/15-LOX 系代謝物であることから、次に 12/15-LOX ノックアウトマウス (以下 12/15-LOX KO マウス) と Wild Type マウスで、それぞれ EPA の経口摂取群と非経口摂取群における比較検討を行った。Wild Type マウスでは、EPA の経口摂取によって病変の個数は有意に減少したが、12/15-LOX KO マウスでは、EPA の経口摂取の有無で病変の個数に有意差は認められず、Wild Type マウスの非経口摂取群と同等の個数であった。腹腔洗浄液のメタボローム解析では、Wild Type マウスの経口摂取群において、12/15-HEPE が有意に高値を示し、さらに近年新規に同定され、“抗炎症性メディエーター”の一つであるレゾルビン E3 (以下 RvE3) も有意に高値を示した。これらの結果から、EPA による病変形成の抑制効果は 12/15-LOX 系代謝物に依存することが示された。

さらに病変組織におけるマイクロアレイ分析では、炎症性サイトカインの中でも IL-6 が、fat-1 マウスにおいて最も有意に発現が抑制されていた。IL-6 の産生源として腹腔洗浄液中のマクロファージを単離し、RT-PCR にて IL-6 の発現を比較したところ、fat-1 マウスの腹腔マクロファージでは Wild Type マウスと比較して 5 分の 1 に抑制されていた。

## 【考察】

本研究では、fat-1 マウスと Wild Type マウスの子宮内膜症モデルで検証を行い、脂肪酸代謝物のメタボローム解析を行った。fat-1 マウスで 12/15-HEPE の上昇を認めたことから、12/15-LOX 系代謝物に注目し、12/15-LOX KO マウスを用いて検討した。Wild Type マウスの EPA 経口摂取群で抑制効果を認めたが、このことは EPA そのもの、もしくは EPA 由来の代謝物のいずれかに抑制効果があることを示していた。12/15-LOX KO マウスの EPA 経口摂取群では、EPA の 12/15-LOX 系代謝物の上昇は認めず、抑制効果は解除された。一方、Wild Type マウスの経口摂取群では、EPA の 12/15-LOX 系代謝物である 12/15-HEPE および RvE3 が有意に上昇を示した。このマウスモデルの実験系においては、EPA そのものが単独で抑制効果の中心的役割を果たしている訳ではなく、EPA の 12/15-LOX 系代謝物こそが中心的役割を担っていると考えられた。

また、マウスにおいて 12/15-LOX を発現する細胞のほとんどは腹腔マクロフ

フェージであり、ヒトの子宮内膜症患者においても腹腔マクロファージが増加し、炎症性サイトカインの主たる産生源でもあることから、子宮内膜症の発生や進展にも関与すると考えられている。fat-1 マウスでは、腹腔マクロファージそのものが $\omega$ 3 脂肪酸とその代謝物を高発現していると考えられ、この代謝物の抗炎症効果によって病変形成が抑えられている可能性がある。

EPA の経口投与でも一定の抑制効果は認められたが、よりターゲットを絞った脂肪酸代謝物を同定することが出来れば、実際にその代謝物を投与する際の投与方法や投与経路も含めて今後の研究課題ではあるが、子宮内膜症の新規治療薬の開発につながる可能性がある。本研究では、マウスモデルを用いて子宮内膜症の病態における脂肪酸とその代謝物の動向を初めて検証し、その結果から EPA の 12/15-LOX 系代謝物が、子宮内膜症を抑制する鍵となるメディエーターとして示された。