

内因性ホルモン分泌を維持する子宮内膜症治療

名古屋大学大学院医学系研究科 産婦人科学
准教授 大須賀智子

Key Words: 卵巣子宮内膜症性嚢胞、ランダム化比較試験、インフラマソーム
フソバクテリウム

はじめに

子宮内膜症は、月経周期、エストラジオール分泌によって増悪するため、内因性ホルモン分泌を抑制するホルモン療法が治療の主軸となっている。ホルモン療法は、低用量エストロゲン・プロゲステン（LEP）療法、黄体ホルモン療法、偽閉経療法などがあるが、いずれも排卵を抑制するため、現在の挙児希望とは両立できないという問題点がある。また、ホルモン療法施行中にも病変が増大したり、疼痛が改善しない症例もあり、ホルモン療法によりすべての子宮内膜症が解決するわけではない。一方、卵巣病変に対する温存手術である卵巣子宮内膜症性嚢胞摘出術では、施行後卵巣予備能の指標である AMH（Anti-Müllerian Hormone）が低下することが示されており、温存手術といっても卵巣にダメージを及ぼす。

当教室では、これら子宮内膜症治療の問題点の解決をめざし、卵巣機能の維持と両立する治療につながる臨床研究や基礎研究に取り組んできた。本稿では、その中でも特に三つの取り組みと成果について紹介する。

卵巣子宮内膜症性嚢胞（OE: Ovarian Endometriosis）摘出術後の卵巣予備能低下に対する周術期ホルモン療法の影響についての検討

卵巣子宮内膜症性嚢胞摘出術後に卵巣予備能が低下することは、残存卵胞数の指標である血中 AMH 値低下として、2010 年頃から複数の報告がみられるようになった⁽¹⁾⁽²⁾。最近では術後の AMH 低下を最小限にする工夫として、止血法の比較などの報告が散見される。我々は、周術期のホルモン療法の相違が術後の AMH 維持率に与える影響を検討するため、ランダム化比較試験を行った⁽³⁾。卵巣子宮内膜症性嚢胞摘出術前後 2 か月ずつ（計 4 か月）GnRH アゴニスト（ブセレリン酢酸塩、GnRHa）1.8mg/月または、ジエノゲスト（DNG）2mg/日を投与、投与開始時の血中 AMH 値を 1 とし、両群で術後の AMH 値維持率を術後 1 年後まで比較した。当研究は、該当倫理委員会申請承認ならびに、UMIN-CTR（UMIN000018569）、Japan Registry of Clinical Trials（jRCTs041180140）への登録のもと施行された。2016 年 6 月から 2020 年 5 月までの間に、57 人が参加し、ランダム化ののち、最終的に GnRHa 群 22 人、DNG 群 27 人が解析された。

結果、術後の AMH 維持率については、いずれの群においても、一旦低下するが、DNG 群では、術後半年後以降回復する例がめだち、術後 1 年の時点では DNG 群のほうが有意に高い維持率を示した(図 1A)。また、この要因として、薬剤投与終了時の血中サイトカインについて、サイトカインアレイを用いた検討を行ったところ、GnRHa 群で上昇、DNG 群で低下しているサイトカインを 5 種類認められた(図 1B)。この中で、とくに子宮内膜症との関連が指摘されている IL-6 についてエントリー時と薬剤終了時の血清中濃度の定量を行ったところ、DNG 群では血中 IL-6 が 50%以下に低下している症例が優位に多いことが示され、薬剤投与終了時の炎症性サイトカインが抑えられていることが、卵巢予備能の回復に寄与する可能性が示唆された(図 1C)³⁾。

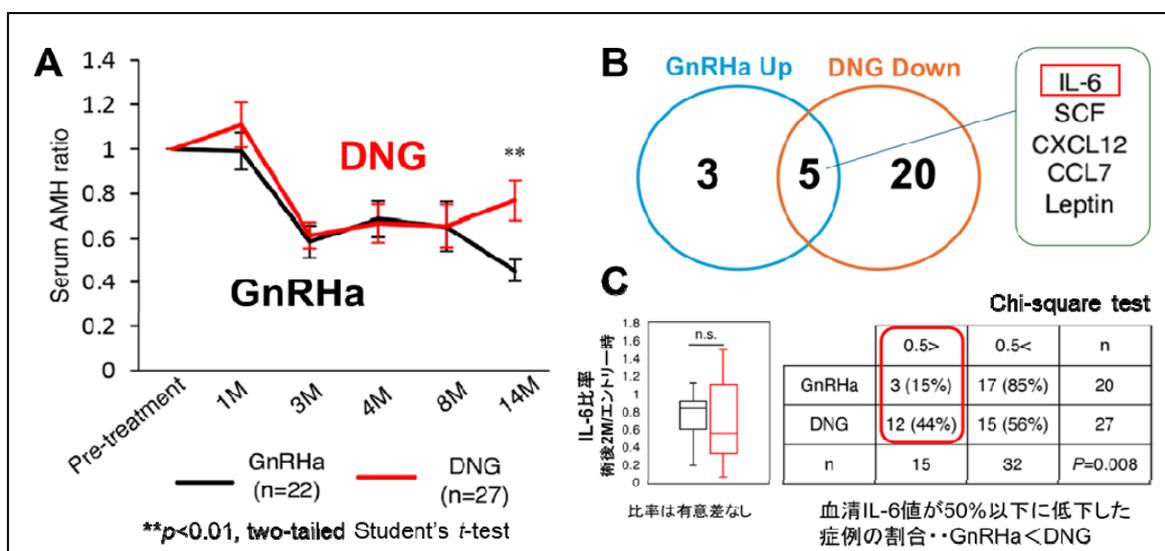


図 1 卵巢子宮内膜症性嚢胞摘出術前後のホルモン療法の相違が術後卵巢予備能に及ぼす影響 (文献 3 より改変)

正所性内膜に影響を与えない卵巢子宮内膜症性嚢胞に対する非ホルモン性治療

現在の挙児希望のある子宮内膜症患者では、排卵を抑制せず、かつ着床の場である内膜の増殖には影響しない治療法が望まれる。子宮内膜症の成因は不明であるが、Sampson の逆流説が現在有力な説の一つと考えられている⁴⁾。正所性の内膜が卵管を通じて腹腔内に逆流し、腹腔内で接着、増殖することが子宮内膜症の成因であるとする同説を基にした基礎研究では、子宮内膜症のない患者の子宮内膜、子宮内膜症のある患者の正所性子宮内膜、卵巢子宮内膜症性嚢胞を比較し、後者 2 つで発現が増加している分子に着目した解析が行われることが多い。一方で、そのような分子を治療ターゲットとし、増殖を抑制する薬剤を治療薬とした場合には、非ホルモン性治療であっても、正所性内膜の増殖を抑制し、着床環境に影響を与える可能性も危惧される。

そこで、子宮内膜症病変でのみ発現が亢進している分子として、我々は NLRP3

インフラマソームに着目した。NLRP3 インフラマソームは、子宮内膜症を模したマウスモデルにおいて、病変での亢進が報告されていた分子⁽⁵⁾である。NLRP3 インフラマソームは、リウマチやアテローム性動脈硬化症などの慢性炎症疾患との関連が指摘されている。NLRP3 インフラマソームは病原体のほかに、ストレスや組織損傷によって放出される DAMPs (damage-associated molecular patterns) によって活性化され、炎症性サイトカインである IL-1 β や IL-18 の成熟と分泌に寄与する⁽⁶⁾。IL-1 β は子宮内膜症進展との関与が指摘されており、IL-1 β 阻害薬を治療法として検討している報告もあるが、すべての IL-1 β 下流のシグナルが抑制されることは、感染時等に必要なシグナルも抑制されることから、望ましくない。そこで、より特異的な治療ターゲットとして、NLRP3 インフラマソームに着目した検討を行った⁽⁷⁾。

まず、我々は、子宮内膜症患者検体を用いて、NLRP3 の発現を評価した。患者由来組織ならびに、子宮内膜組織、卵巣子宮内膜症性嚢胞間質由来の初代培養細胞での検討では、子宮内膜症の有無によって NLRP3 の発現に変化は見られず、一方 OE ではこれらに比し NLRP3 の発現亢進が認められた (図 2A, B)。初代培養細胞に NLRP3 インフラマソームの活性化を阻害する MCC950 を添加した検討では、OE 間質由来の細胞において、生存率の低下 (図 2B) ならびに IL-1 β 、IL-18 の分泌低下が認められた。さらに、OE マウスモデルに MCC950 を投与したところ、非投与群に比し、有意に OE 病変の縮小ならびに、OE モデルで減少する卵胞数の改善が認められた (図 2C)。以上より、OE における NLRP3 の亢進が確認され、さらに NLRP3 インフラマソームの阻害剤が正所性子宮内膜に影響を与えない OE 治療薬としての可能性が示唆された⁽⁷⁾。

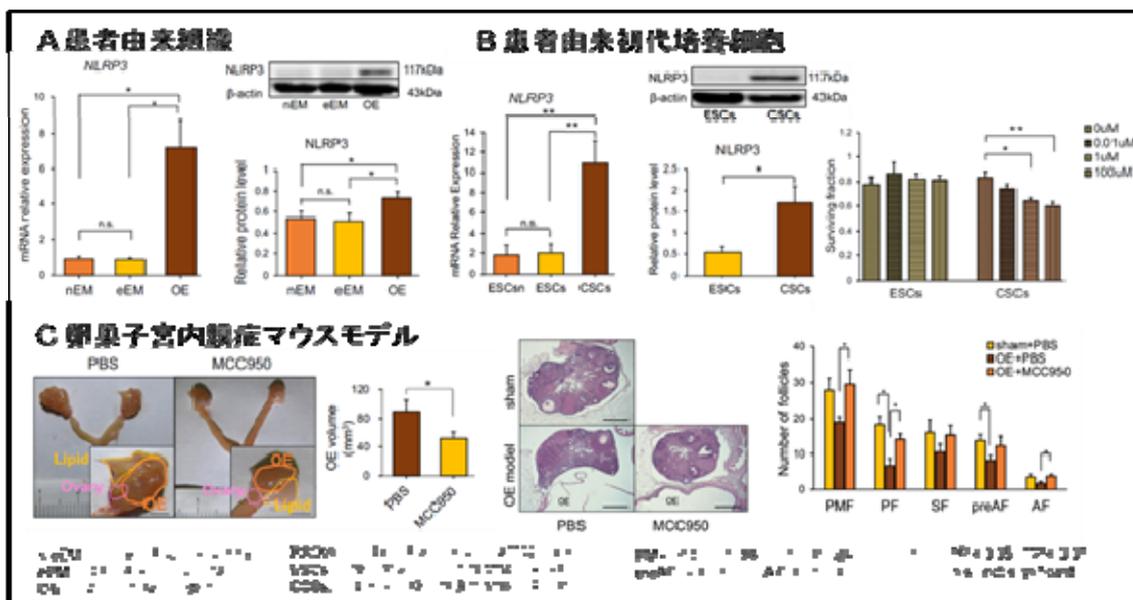


図 2 卵巣子宮内膜症病変における NLRP3 発現と阻害剤による病変の抑制効果 (文献 7 より改変)

子宮内膜症成立の根本的な要因の検討

これまで、OEを中心とした、成立後の子宮内膜症性病変の治療についての検討について紹介した。最後に、子宮内膜症成立の根本原因解明をめざした取り組みを示す⁽⁸⁾。まず、根本的原因を探索する糸口として、子宮内膜症のない患者の子宮内膜と、OEで発現の異なる遺伝子の抽出を行った。自経例の患者検体ならびに、既存公開データセット(GSE25628, GSE99949, GSE7305)の解析から、OEで発現上昇を示す10遺伝子を抽出した。これらの遺伝子発現につき、初代培養細胞を用いた検討を行い、非子宮内膜症患者の子宮内膜、子宮内膜症患者の子宮内膜、ならびにOE由来、それぞれの繊維芽細胞で階段状に発現が上昇する遺伝子として、TAGLNを同定した(図3A)。免疫染色においてもTAGLNの染色が同様に子宮内膜症患者由来検体にて亢進することを確認した(図3B)。TAGLNは筋繊維芽細胞のマーカー分子であることから、子宮内膜の間質において、繊維芽細胞が筋繊維芽細胞へ表現型変化を起こすことで、増殖能、遊走能、接着能を獲得し、正所性子宮内膜が腹腔内へ逆流した際に、子宮内膜症形成に寄与すると考えられた。当教室で樹立した非子宮内膜症患者の子宮内膜由来繊維芽細胞株(MC1, MC2)⁽⁹⁾、ならびに、OE由来繊維芽細胞株(SC8, SC10)について、TAGLNの発現を確認したところ、後者において、有意な発現増加が確認され、さらにTAGLNの発現抑制により、細胞増殖能(図3C)・遊走能・接着能が有意に抑制されることが示された。そこで次に、TAGLNを発現する筋繊維芽細胞への表現型変化のinducerとして、筋繊維芽細胞関連遺伝子の誘導因子であるTGF- β 1に着目し解析を行った。患者由来組織の免疫染色では、子宮内膜症患者由来の子宮内膜ならびにOE組織において非子宮内膜症患者の内膜に比し、TGF- β 1染色がTAGLN染色と同様に増強していることが示された(図3D)。次にTGF- β 1豊富な微小環境を呈する原因として、子宮内膜の細菌感染の関与を着想した。子宮内膜の細菌叢については、既報のデータセット⁽¹⁰⁾を再解析することで、子宮内膜症患者の子宮内膜において、非子宮内膜症患者の子宮内膜に比して有意な増加をみとめる細菌属として、上位5種類を抽出した。最上位であったエリジペロスリックス属は、患者由来組織を用いた定量PCR(Polymerase chain reaction)の検討で、十分な量を認めなかったため、2位のフソバクテリウム属の評価を行ったところ、患者OE組織における存在が確認された。フソバクテリウム属の中でも特に腔での存在が既報で指摘されていた*F. nucleatum*に着目した。FISH(Fluorescence in situ hybridization)法による評価では、フソバクテリウム属(FUS0)ならびに*F. nucleatum*について、OEや内膜症のある患者の子宮内膜では、正常内膜に比し、有意にspot数が多いことが示された(図3E)。次に、細菌感染によって遊走が惹起されるマクロファージの評価を行った。TGF- β 1を産生するCD163陽性M2マクロファージの浸潤が非子宮内膜症患者の子宮内膜に比し、子宮内膜症患者の子宮内膜やOEで有意に多いことを組織における免疫染色で確認した。また、*in vitro*の検討として、THP1をマクロファージへ分化させたdTHP1と*F. nucleatum*を共培養したところ、

CD163 陽性 M2 マクロファージへの分化と TGF-β1 産生を認めた。さらにこの共培養の無細胞上清を非内膜症患者由来繊維芽細胞株 MC2 に添加することで、TAGLN の発現が増加することを確認した。膣の常在菌である *Lactobacillus iners* と dTHP1 の共培養実験を行ったが、同様の変化は見られなかった。

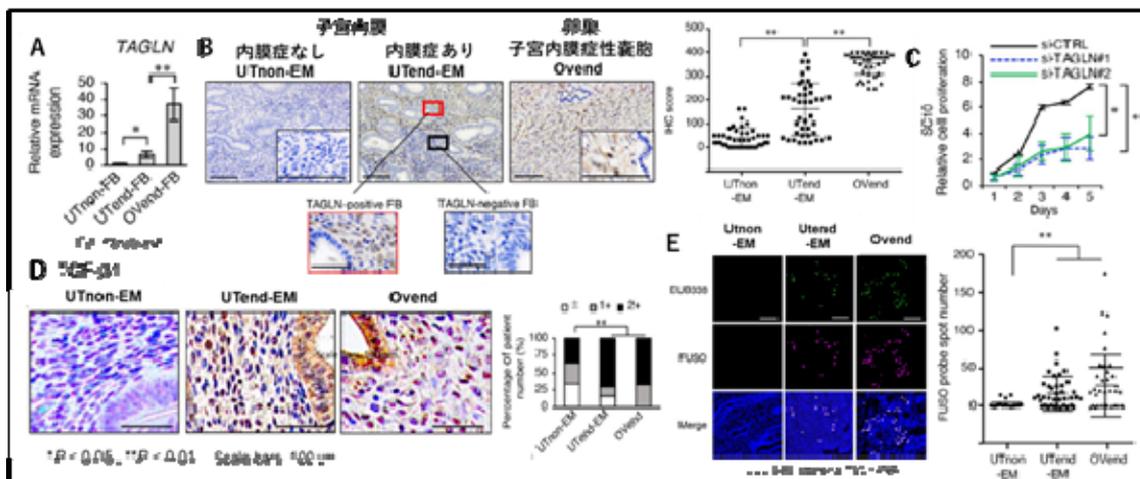


図3 子宮内膜症患者における TAGLN 発現とフソバクテリウムの存在 (文献9より改変)

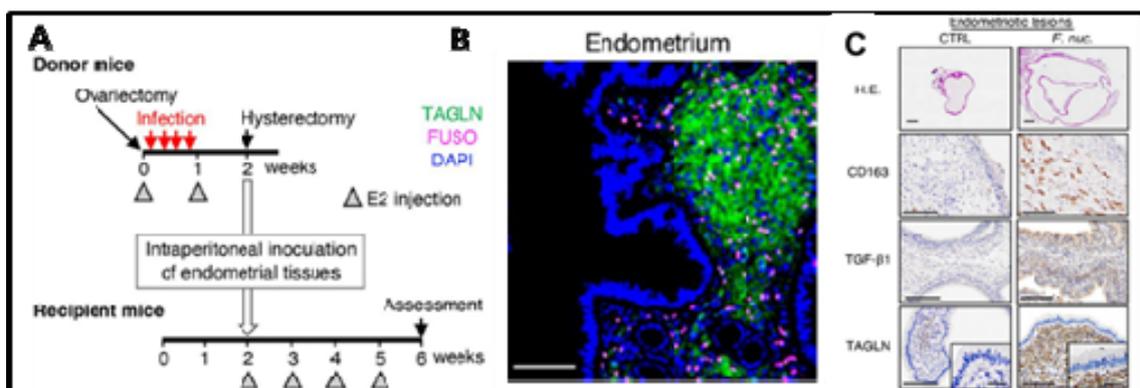


図4 *F. nucleatum* を感染させたドナーマウスを用いた子宮内膜症モデルマウス (文献9より改変)

次に、マウスモデルを用いた検討を行った。病変の形成を評価するのに適した腹膜病変モデルを用いた。正所性子宮内膜を模したドナーマウスの子宮内膜に対し、経膣的に *F. nucleatum* を感染させた後、子宮内膜組織を免疫染色で評価し、*F. nucleatum* の存在と TAGLN の発現を確認した (図 4A, B)。このドナー子宮をモデルとなるレシピエントマウスの腹腔内へ播種したところ、非感染子宮を播種させたモデルに比し、感染子宮を用いたモデルでは、有意な病変の増大、ならびに CD163 陽性 M2 マクロファージの浸潤、TGF-β1 ならびに TAGLN の染色増強を認めた (図 4C)。さらに、このモデルに対し、病変成立後に経口抗菌薬 (MZ: メトロニダゾール、CP: クロラムフェニコール) による治療を行ったところ、成立後の病変の縮小を認めた (図 5A, B)。さらに、感染ドナー子宮に対し移植前に経膣抗菌薬治療を行った後、レシピエントマウスに移植したところ、

非治療群に比し、有意に病変数が減少することが示され、感染子宮内膜への経膈抗菌薬治療が、病変の成立を抑制することが示された(図 5C, D)。

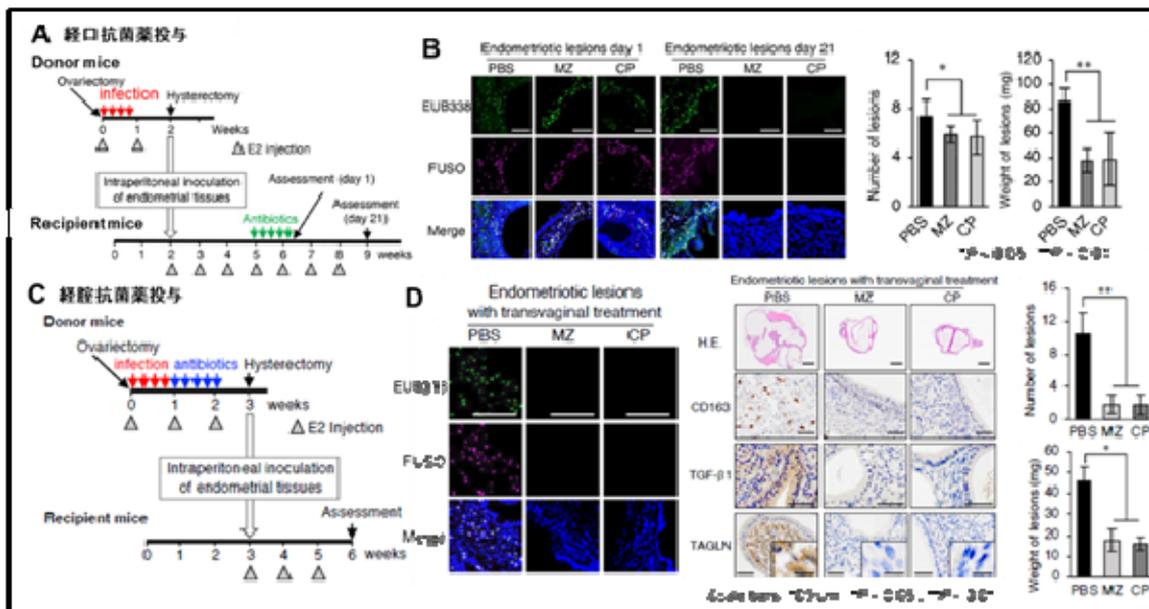


図 5 *F. nucleatum* 感染による子宮内膜症モデルマウスにおける抗菌薬投与の効果 (文献 9 より改変)

以上より、逆流説に基づく子宮内膜症の発生において、子宮内膜の細菌感染が成因となっていること、感染子宮内膜への抗菌薬治療が、子宮内膜症の発生を抑制する可能性が示唆された(8)。

おわりに

卵巣機能を維持することで、内因性ホルモン分泌や排卵機能と子宮内膜症治療の両立をめざした取り組みについて紹介した。子宮内膜症は性成熟期女性の約 10%に認めるとされる Common disease でありかつ、少子晩産化に伴い、不妊症との関連も重要視されている。今回紹介したような検討が、子宮内膜症や不妊に悩む女性に少しでも寄与することを願う。

【参考文献】

1. Iwase A, Hirokawa W, Goto M, Takikawa S, Nagatomo Y, Nakahara T, et al. Serum anti-Müllerian hormone level is a useful marker for evaluating the impact of laparoscopic cystectomy on ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2010;94:2846–9.
2. Raffi F, Metwally M, Amer S. The impact of excision of ovarian endometrioma on ovarian reserve: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:3146–54.
3. Muraoka A, Osuka S, Yabuki A, Bayasula, Yoshihara M, Tanaka H, et al. Impact of perioperative use of GnRH agonist or dienogest on ovarian reserve after cystectomy for endometriomas: a randomized controlled trial. *Reprod Biol Endocrinol*. 2021;19:1–9.
4. Serdar E, Bulun. Endometriosis. *New Engl J Med*. 2009;360:268–79.
5. Han SJ, Jung SY, Wu SP, Hawkins SM, Park MJ, Kyo S, et al. Estrogen Receptor β Modulates Apoptosis Complexes and the Inflammasome to Drive the Pathogenesis of Endometriosis. *Cell*. 2015;163:960–74.
6. Feldman N, Rotter-Maskowitz A, Okun E. DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. *Ageing Res Rev*. 2015;24:29–39.
7. Murakami M, Osuka S, Muraoka A, Hayashi S, Bayasula, Kasahara Y, et al. Effectiveness of NLRP3 Inhibitor as a Non-Hormonal Treatment for ovarian endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2022;20:1–12.
8. Muraoka A, Suzuki M, Hamaguchi T, Watanabe S, Iijima K, Murofushi Y, et al. Fusobacterium infection facilitates the development of endometriosis through the phenotypic transition of endometrial fibroblasts. *Sci Transl Med*. 2023;15:1–18.
9. Muraoka A, Osuka S, Kiyono T, Suzuki M, Yokoi A, Murase T, et al. Establishment and characterization of cell lines from human endometrial epithelial and mesenchymal cells from patients with endometriosis. *F S Sci*. 2020;1:195–205.
10. Chen C, Song X, Wei W, Zhong H, Dai J, Lan Z, et al. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat Commun*. 2017;8:875.