

学 位 論 文 題 名

Induction of Endometriosis and Adenomyosis by
Transvaginal Pituitary Transplantation in Mice
with and without Natural Killer Cell Activity

(経膣的子宮内下垂体移植法による子宮内膜症・腺筋症マウスモデル
の作製と NK-cell 活性の意義に関する研究)

学位論文内容の要旨

I. 緒 言

子宮内膜症・腺筋症は生殖年齢層の女性に好発する疾患であり、月経痛、過多月経ならびに不妊症の原因となる。近年、内膜症患者の腹水中に免疫学的異常〔マクロファージの増加、IL-1 活性の増加、activated T-cell の減少、natural killer (NK)-cell 活性の減少など〕が特異的に存在していることが明かとなり、特に NK-cell 活性の低下は内膜症発症の要因の一つとして注目されている。一方、腺筋症の発症にはホルモン異常が関与するが、免疫学的異常の関与については不明である。本研究では、局所免疫に影響を及ぼさない新たに開発した経膣的子宮内下垂体片移植法で内膜症・腺筋症発症のマウスモデルを作製することと、NK-cell/T-cell の欠損したマウスを用いてこれらの発症に与える NK-cell の影響について検討することを目的とした。

II. 対象と方法

実験動物には、BALB/c Slc, C3H/He Slc, C57BL/6 CrSlc, C57BL/6-bg^j, BALB/c nu/nu マウス (各々6週齢) を使用した。まず BALB/c マウス実験では、雌雄を殺処分し下垂体、顎下腺、視床下部を摘出、少量の培養液 (RPMI 1640) とともに同系雌の子宮内に移植した。移植に際し、1.25mg のペントバルビタールで経膣的に麻酔し、膣腔に耳鏡を挿入して、子宮口を露出した。20ゲージのソフトシリコンカテーテルに1mlの注射筒を装着し子宮腔内 (右子宮角) に経膣的に挿入し、0.05ml の培養液とともにそれぞれの1個体分の下垂体組織片を注入移植した。C3H/He, C57BL/6 マウスについても雄の下垂体、顎下腺を同系雌の子宮腔内に同様の方法で移植した。NK-cell 欠損マウスである C57BL/6-bg^j マウス、T-cell 欠損マウスである BALB/c nu/nu マウスでは雄の下垂体を同系雌の子宮に移植した。移植5週後より週1回、17 β エストラジオール 0.01mg を10週間腹腔内に投与した。移植20週後に移植マウスを殺処分し、子宮とその周囲の病変について、肉眼的ならびに病理組織学的に解析した。HE染色、Elastica van Gieson 染色にて組織染色した。肉眼的に内膜症所見である嚢胞、ポリープ、癒着の有無を調べ、病理組織学的に腺筋症の診断を行った。有意差の検定には Fisher exact test (p-value < 0.05) を使用した。

III. 結 果

嚢胞、子宮腺筋症病変は BALB/c マウスにおいては下垂体移植マウス24匹中、それぞれ

7匹 (29.2%) , 22匹 (91.7%) に認められ, 全て下垂体を移植した右子宮角に形成されていた。ポリープ, 子宮周囲の癒着は1匹 (4.2%) , 14匹 (58.3%) に存在した。一方, 顎下腺 (15匹) , 視床下部 (18匹) を移植した BALB/c マウスでは嚢胞, ポリープは形成されなかった。子宮周囲の癒着は顎下腺を移植した 4 匹 (26.7%) のみにしか認められず, 視床下部を移植したマウスには認められなかった。顎下腺移植の 1 匹 (6.7%) にのみ腺筋症が形成されていた。顎下腺・視床下部移植に比較して, 下垂体移植では嚢胞 ($p<0.05$), 癒着 ($p<0.001$), 子宮腺筋症 ($p<0.0001$) が高率に認められた。下垂体移植を行った C3H/He (40匹) マウスでも嚢胞, 癒着, 腺筋症が, 4 匹 (10.0%) , 13匹 (32.5%) , 35 匹 (87.5%) に, また8匹 (20.0%) にポリープが認められた。C57BL/6 (24匹) マウスでも同様に嚢胞 (9匹, 37.5%) , 癒着 (9匹, 37.5%) , 腺筋症 (21匹, 87.5%) が認められた。C3H/He, C57BL/6 マウスにおいて顎下腺移植に比較して, 下垂体移植で嚢胞 ($p<0.05$), 癒着 ($p<0.05$), 子宮腺筋症 ($p<0.0001$) が高率に認められた。これらのことから内膜症病変である嚢胞や癒着, ならびに子宮腺筋症が下垂体移植によって特異的に形成されることが示された。他のマウスに比較して BALB/c で癒着, 腺筋症の形成率が高く, C3H/He の嚢胞形成率が低い傾向が認められたが有意差はなかった。

C3H/He マウスで嚢胞, 癒着ならびに腺筋症の形成について, 下垂体移植後6週から25週にかけて連続的に観察した結果, 17週以前では子宮に病変は認められず, 20週から25週ではそれらの形成率に変化は観察されなかった。

NK-cell を欠損する C57BL/6-*bg* マウスでの下垂体移植実験 (20匹) の結果, 嚢胞, 癒着, 腺筋症がそれぞれ7匹 (35.0%) , 8匹 (40.0%) , 18匹 (90.0%) に形成され, T-cell を欠損する BALB/c *nu/nu* マウス (20匹) では, 嚢胞 (4匹, 25.0%) , 癒着 (4匹, 25.0%) , 腺筋症 (14匹, 87.5%) が認められた。これらの頻度は, wild type である C57BL/6, BALB/c と比べて差異は無かった。

IV. 考 察

子宮内膜症は卵巣, 卵管, 腹膜などの子宮外における内膜細胞の異所性分化・増殖に特徴をもち, 子宮腺筋症は子宮筋層における内膜細胞と間質線維芽細胞の異常増殖を特徴とする。TeLinde and Scott は, 1950年にサルで子宮内膜症モデルを世界で初めて作製し, 内膜症発症機構として卵管逆流説を唱えた。しかしながら, サルモデルは研究用に実用的では無く, またサルの免疫学的特性も不明な点が多いなどの問題点があった。子宮内膜症マウスモデルとして, 内膜組織を腹膜に直接移植する方法が近年考案されたが, 子宮腺筋症病変を誘導することは不可能であり, 侵襲的な外科的手法を用いるため局所免疫に影響を与え, 免疫学異常に関する解析には不適當であった。一方, 外科的手法を用いた経腹的な子宮への下垂体移植法によって, 子宮内膜症・腺筋症マウスモデルはすでに確立されていた。

本研究においては, 経膣・子宮頸管性に子宮腔内に下垂体組織片を移植する非侵襲的な方法を開発し, 子宮内膜症・腺筋症マウスモデルを作製することに世界で初めて成功した。このマウスモデルには以下の特徴が確認された。1) 嚢胞内の異所性子宮内膜組織, 子宮筋層内への内膜細胞と間質線維芽細胞の増殖および筋層破壊, 漿膜浸潤が認められ, ヒトと同様な病理組織病変をもつ。2) 子宮内膜症と子宮腺筋症を併発する。3) 子宮内膜症・子宮腺筋症病変を効率良く (高頻度に) 誘導できる。4) 侵襲的な外科手法を用いていないため, 特に腹腔内癒着病変の同定と局所の免疫学的解析に適している。

子宮内膜症・腺筋症の発症機構における免疫学的異常の関与を調べるために, NK-cell/T-cell 活性の欠損したマウスに対して, 新たな経膣的子宮内下垂体移植法を用いて実験を行った。その結果, 嚢胞, 癒着, 子宮腺筋症の形成率は wild type と変わらず, NK-cell/T-cell 活性の欠損は, 内膜症, 腺筋症の発症を促進できなかった。したがってNK-cell 活性の低下は内膜症病変の進展に関与する可能性はあるが, 発症には関連しないことが初めて示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 小野江 和 則
副 査 教 授 藤 本 征一郎

学 位 論 文 題 名

Induction of Endometriosis and Adenomyosis by Transvaginal Pituitary Transplantation in Mice with and without Natural Killer Cell Activity

(経膣的子宮内下垂体移植法による子宮内膜症・腺筋症マウスモデルの作製と NK-cell 活性の意義に関する研究)

子宮内膜症患者の腹水中に免疫学的異常が特異的に認められることが報告されるようになり、特に NK-cell 活性の低下は内膜症発症の要因の一つとして注目されている。本研究では、新たに開発した経膣的子宮内下垂体片移植法で内膜症・腺筋症発症のマウスモデルを作製すること、NK-cell/T-cell の欠損したマウスを用いて NK-cell の影響について検討することを目的とした。実験動物には BALB/c Sk, C3H/He Sk, C57BL/6 CxSk, C57BL/6 bgj, BALB/cnu/nu (6 週齢) を使用し、下垂体、顎下腺、視床下部を同系雌の子宮内に移植した。移植方法は腹腔内に耳鏡を挿入して子宮口を露出し、ソフトシリコンカテーテルを子宮腔内(右子宮角)に経膣的に挿入、それぞれの移植組織片を注入した。移植5週後より 17 β エストラジオール 0.01mg を 10 週間投与し、移植20週で殺処分し、肉眼的に内膜症所見である嚢胞、ポリープ、癒着の有無を調べ、病理組織学的に腺筋症の診断を行った。嚢胞、癒着、子宮腺筋症病変は BALB/c の下垂体移植で、29.2%、58.3%、91.7% に認められ、顎下腺、視床下部移植では嚢胞、ポリープは形成されず、癒着、腺筋症も顎下腺移植の 26.7%、6.7% にしか認められなかった。下垂体移植の嚢胞、癒着、子宮腺筋症は顎下腺、視床下部移植に対して有意に高率に認められた。C3H/He、C57BL/6 でも同様な結果で、顎下腺移植に対して、嚢胞 (C57BL/6 のみ)、癒着、子宮腺筋症の形成率に有意差が認められた。全て病変は右子宮角に形成されていた。これらのことから内膜症病変である嚢胞や癒着、ならびに子宮腺筋症が下垂体移植によって特異的に形成されることが示された。C57BL/6 bgj、BALB/cnu/nu での病変形成率は wild type と比べて差異は無かった。本研究においては、経膣・子宮頸管内に子宮腔内に下垂体組織片を移植する非侵襲的な方法を開発し、子宮内膜症・腺筋症マウスモデルを作製することに成功した。このマウスモデルには以下の特徴が確認された。1) 嚢胞内の異所性子宮内膜組織、子宮筋層内への内膜細胞と間質線維芽細胞の増殖および筋層破壊、炎症細胞の認められ、ヒトと類似な病理組織病変をもつ。2) 子宮内膜症と子宮腺筋症を併発する。3) 子宮内膜症・子宮腺筋症病変を効率良く(高頻度)に誘導できる。4) 侵襲的な外科手法を用いていないため、特に腹腔内癒着病変の同定と免疫学

的解釈に適している。

子宮内膜症・腺筋症の発症機構における免疫学的異常の関与を調べるために、NK cell/T cell 活性の欠損したマウスを用いて実験を行った。その結果、嚢胞、癒着、子宮腺筋症の形成率は wild type と変わらず、NK cell 活性の低下は内膜症病変の進展に関与する可能性はあるが、発症には関連しないことが示唆された。

口頭発表に際し、副査の小野江教授より、子宮内膜症の発症と免疫学的異常との関連、臨牀的に見られる免疫系の異常は子宮内膜症の原因ではなく結果とみてよいのか、近年の報告にある NK-T cell は C57BL/6bgj では低下しているのか、雄マウスの組織片を用いた理由、などについて質問があった。主査の吉木教授からはモデルマウスの病変とヒトの子宮内膜症病変との適合性、子宮内膜細胞の各病変における細胞同源性、モデルマウスの観察期間延長による病変形成の相違、内膜症の治療方法とその予後、などについて質問があった。また、副査の藤本教授からは、移植部位と病変部位との位置的関係、本実験条件における内膜細胞の卵管逆流の可能性、NK cell/T cell 活性の欠損マウスにおける病変の特色、エストロゲン投与による免疫能の低下の可能性などについて質問があった。いずれの質問に対しても申請者は、予備実験の結果、文獻的考察などを用いて、概ね妥当に回答した。

本研究は新たな技法を用いて子宮内膜症・腺筋症マウスモデルを開発し、子宮内膜症・腺筋症の発症機構における NK cell 活性の意義を明らかにしたもので、学問的に評価しうる。また、マウスモデルを用いることにより子宮内膜症、腺筋症の発症機構における様々な要素の役割についてさらに解明することができると期待できる。

審査員一同は、マウスモデルの作製と子宮内膜症発症における免疫学的影響の研究成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。