

主論文の要旨

**Effectiveness of NLRP3 Inhibitor as a Non-Hormonal
Treatment for ovarian endometriosis**

〔 卵巣子宮内膜症に対する非ホルモン治療薬としての
NLRP3阻害剤の有効性の検討 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：梶山 広明 教授)

村上 真由子

【緒言】

子宮内膜症は、エストロゲン依存性の慢性炎症性疾患であり、生殖年齢にある女性の約10%が罹患する。卵巣子宮内膜症は、子宮内膜症における最も一般的な病変であり、月経困難症に加え、不妊症の原因となる。治療は、手術と、ホルモン製剤や鎮痛のための非ステロイド性抗炎症薬などによる薬物療法が一般的である。手術療法は痛みを改善し、妊孕性を高めるが、再発率は5年で40~50%と高く、再発を防ぐためには、ホルモン療法が推奨される。しかし、ホルモン療法は卵胞の発育と排卵を抑制するため、妊娠を希望する女性における治療は難しい。

慢性炎症は子宮内膜症の特徴の一つである。炎症応答の活性化を担っているインフラマソームは、Nod-like receptor (NLR) ファミリーと呼ばれる危険信号を認識するパターン認識受容体を含むタンパク質複合体である。NLR family proteins, leucine-rich repeat, and pyrin domain-containing (NLRP) 1b、NLRP3、NLR family caspase recruitment domain-containing protein (NLRC) 4 などを組み込み、病原体や障害に伴う危険シグナルに応答し、カスパーゼ1を活性化することで、炎症性サイトカイン interleukin-1 beta (IL-1 β) や IL-18 を成熟型に変換する。これまでの研究で、NLRP3 インフラマソームを介し IL-1 β が子宮内膜症の進行に関連している可能性が報告されている。そこで、NLRP3 に高い特異性を持つ低分子化合物である MCC950 に着目し、これを用いて、IL-1 β を抑制し、子宮内膜症を治療することができるのではないかと考えた。

【方法】

卵巣子宮内膜症患者の嚢胞病変 (ovarian endometriosis; OE) および正所子宮内膜 (eutopic endometrium with endometriosis; eEM)、非患者の正所子宮内膜 (eutopic endometrium without endometriosis; nEM) 手術検体における NLR の発現を評価、さらに、細胞を分離培養し、初代培養細胞 (それぞれ Primary human endometriotic cyst-derived stromal cells; CSCs、Primary human endometrial stromal cells, obtained from patient with endometriosis; ESCs、Primary human endometrial stromal cells, obtained from patient without endometriosis; ESCsn) として、NLRP3 阻害剤を添加し、細胞数および関連タンパク質の変化を検証した。さらに、卵巣子宮内膜症モデルマウスを作成し、MCC950 または PBS を4週間腹腔内投与後にマウスを解剖し、病変及び、卵巣への影響を評価した。

【結果】

OE、eEM および nEM における NLRP3 の発現を quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) とウェスタンブロット分析で検出した。図 1A-C に示すように、NLRP3 の遺伝子発現およびタンパク質レベルは、e/nEM と比較して OE で有意に増加していた。eEM および nEM に有意差はなかった。IL-1 β を活性化するカスパーゼ-1 の経路に関与する他のインフラマソームの mRNA を比較すると、eEM と比較して OE でより高い発現を認めた。また、OE において NLRP3 は他のインフラマソームよ

り高発現していた(図 1D)。

初代培養細胞でも NLRP3 mRNA 発現量は ESCs/ESCsn と比較し CSCs で有意に高かった。また、ESCs と ESCsn の間に有意差は認められなかった(図 2A)。NLRP3 タンパク質レベルも、ESCs と比較し、CSCs で有意に増強していた(図 2B, C)。NLRP1 および NLRC4 の発現量は、CSCs および ESCs では差はなく、CSCs で比較すると、NLRP3 は NLRP1、NLRC4 に比し亢進を認めた(図 2D)。

次に、初代培養細胞に MCC950 を添加し、24 時間後の細胞生存率を比較した。CSCs では MCC950 非添加群と比較し 100 μ M 添加群において 73 %と有意に減少した。一方、ESCs の生存率について有意な変化は認められなかった(図 3A)。

MCC950 による IL-1 β 産生抑制効果を確認するために蛍光免疫染色を行った。初代培養細胞に MCC950 100 μ M を添加し、16 時間後の NLRP3 および IL-1 β 二重標識細胞の数を比較した。CSCs では ESCs と比較し、二重標識細胞の割合が有意に高く、さらに、MCC950 で処理すると減少を認めた(図 3B)。

初代培養細胞培養上清中の IL-1 β の分泌量を調べたところ、MCC950 添加後 16 時間の変化率において、ESCs と比較し CSCs は有意な減少を示した。(図 3C)。同じく NLRP3-カスパーゼ-1 経路で活性化される IL-18 においても同様の結果が得られた(図 3D)。

内膜症モデルマウスを用いた動物実験では、MCC950 投与群で、病変の体積が有意に減少していた(図 4C)。病変部の上皮細胞の増殖活性を Ki67 免疫染色にて評価したところ、MCC950 投与群において陽性細胞数は有意な減少を認めた(図 4D)。次に、IL-1 β 発現に対する MCC950 の効果を免疫染色にて評価した。上皮における IL-1 β 陽性領域の割合は、正所子宮内膜よりも内膜症性嚢胞において増大しており、内膜症性嚢胞と比較すると MCC950 投与群において有意に減少していた(図 4E)。

【考察】

IL-1 β を子宮内膜症の治療ターゲットとした既報には、IL-1 β 受容体抗体を用いた報告もあるが、一方で IL-1 β に対するモノクローナル抗体の投与による感染症などの有害事象の報告もある。本研究で、卵巣子宮内膜症では NLRP3 の発現量の上昇を認めたが、NLRP1、NLRC4 の発現は後進しておらず、NLRP3 を特異的に阻害する MCC950 を用いることで、主要な抗菌性インフラマソームである NLRP1、NLRC4 を阻害せず、細菌感染に対する必須応答を残しつつ子宮内膜症における IL-1 β 産生を抑制することが可能と考えられる。

また、正所子宮内膜では子宮内膜症の有無に関わらず NLRP3 の発現に差がなく、NLRP3 は卵巣内膜症性嚢胞内の炎症や内容物に起因して上昇していることが示唆される。そのため NLRP3 阻害剤は正所子宮内膜には影響を与えないと考えられ、不妊治療中の使用に有用であると思われる。

【結論】

以上のことから、卵巣子宮内膜症では NLRP3 の発現が亢進しており、阻害剤は卵巣子宮内膜症治療薬として期待できることが示唆された。