

学位論文

「Inhibition of TP signaling promotes endometriosis
growth and neovascularization」

(トロンボキサン受容体シグナル阻害は子宮内膜症
進展および脈管形成を促進する)

DM20026 古江 明子

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程

臨床医科学群 産婦人科学

指導教授 加藤 一喜

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

【背景】

子宮内膜症は、子宮内膜組織が異所性すなわち子宮内腔および子宮筋層以外の場所に発育・増殖する慢性炎症性疾患である。子宮内膜症は生殖年齢女性の5～10%が罹患し、不妊症、月経困難症などを合併するため、女性のQOLを著しく低下させる。しかしながら現在の治療法では症状の軽減が困難な場合も多い。

子宮内膜症の病態生理は、いまだ不明な点が多いが、子宮内膜症病変内の間質にみられる血管新生やリンパ管新生が子宮内膜症進展の寄与する可能性が注目されている。私たちは、ドナーマウスの子宮内膜移植片を宿主マウスの腹膜壁に移植する異所性子宮内膜症モデルを用いた研究で、移植片内の血管新生やリンパ管新生が子宮内膜症の進展に関与することを報告した。さらに内膜症病変内の血管新生およびリンパ管新生促進に関わるメカニズムには、シクロオキシゲナーゼ (COX) 経路によって合成されるアラキドン酸代謝物であるプロスタグランジン E_2 が関与する可能性を見いだした。一方、同じCOX由来のアラキドン酸代謝物であるトロンボキサン $A_2(TXA_2)$ はトロンボキサンプロスタノイド (TP) 受容体を介して活性を発揮する。興味深いことに、下肢虚血や腹膜炎モデルでTP受容体シグナルが血管新生およびリンパ管新生に関与することを私たちは最近見いだした。

【目的】

そこで今回、TP受容体シグナルが血管新生およびリンパ管新生を介して、子宮内膜症進展に寄与するものと仮説を立て、子宮内膜症進展におけるTP受容体シグナルの役割とその制御機構を解明することを本研究の目的とした。

【方法】

雌性8週令C57BL/6マウス(野生型,WT)とTP受容体ノックアウトマウス($TP^{-/-}$)を用いた。ドナー(WTまたはKO)マウスの子宮内膜移植片を、宿主(WTまたは $TP^{-/-}$)の腹膜に移植するマウス異所性子宮内膜症モデルを作成した(WT→WT, $TP^{-/-}$ → $TP^{-/-}$)。移植日を0日目とし、移植後14日目に移植片を摘出し、子宮内膜移植片面積、血管新生ならびにリンパ管新生およびその関連因子について、また集積マクロファージなどを免疫染色やPCRで比較検討した。一部のWT→WTモデルに、トロンボキサン合成酵素(TXS)阻害薬であるオザグレール(30mg/kg)を連日経口投与した。また、WTおよび $TP^{-/-}$ マウスの培養骨髓由来マクロファージを TXA_2 受容体作動薬であるU46619で刺激した反応についてPCRで比較検討した。

【結果】

移植後 14 日目の、移植片面積・移植片内の血管密度・リンパ管密度および、血管内皮マーカー(*Cd31*)やリンパ管内皮マーカー(*Lyve1*, *Prox1*, *Vegfr3*)および血管新生関連遺伝子(*Vegfa*)やリンパ管新生関連遺伝子(*Vegfc*, *Vegfd*)の mRNA 発現は、WT→WT に比べ TP^{-/-}→TP^{-/-}で増加した。免疫二重染色にて TP は移植片のマクロファージ(F4/80 陽性細胞)に共発現したが、血管内皮 (CD31)やリンパ管内皮 (LYVE-1)には共発現しなかった。また、移植片のマクロファージは血管新生因子 (VEGF-A)・リンパ管新生因子 (VEGF-C・VEGF-D) を共発現した。移植片の CCL2、CCR2 の発現および移植片へのマクロファージの集積は TP^{-/-}→TP^{-/-}で増加した。また、TP^{-/-}→TP^{-/-}の移植片では抗炎症性マクロファージ関連遺伝子(*Mr*, *Fizz1*, *Il10*)の mRNA 発現が TP^{-/-}→TP^{-/-}でより増加した。

トロンボキサン合成酵素(TXS)阻害薬であるオザグレルを投与すると、WT→WT マウスにおいて移植片面積を増大させ、移植片における血管新生とリンパ管新生を促進した。また、血管新生関連遺伝子およびリンパ管新生関連遺伝子の mRNA 発現を増加させた。

in vitro において、LPS 処置下の培養骨髄由来マクロファージを U46619 で刺激すると、血管およびリンパ管新生関連遺伝子や抗炎症性マクロファージ関連遺伝子(*Mr*, *Fizz1*, *Il10*)の mRNA 発現が WT 由来マクロファージで減少したが、TP^{-/-}由来マクロファージでは減少しなかった。

【結語】

マウス異所性子宮内膜症モデルにおいて、TP 受容体シグナルを阻害すると、抗炎症性マクロファージから血管およびリンパ管新生因子産生が増加し、移植片の血管およびリンパ管新生が促進することで、子宮内膜症進展に関与することが示唆された。

子宮内膜症の治療には、鎮痛剤による対症療法、ホルモン療法、手術療法などがあるが、ホルモン療法や手術療法は挙児を希望する女性に対しては選択しにくい場合があり、より有効な治療法が望まれる。TP 受容体シグナルを標的とした子宮内膜症進展の制御は、新たな子宮内膜症治療への足がかりとなり、子宮内膜症に悩む女性の治療の選択肢が広がることが期待される。

目次

1. 序論	1
2. 方法	4
2-1. 動物	4
2-2. 異所性子宮内膜症モデル	4
2-3. 蛍光免疫染色	5
2-4. リアルタイム定量的 PCR (RT-qPCR) 解析	6
2-5. 細胞調製と細胞培養	6
2-6. 統計分析	7
3. 結果	8
3-1: TP 受容体シグナル阻害による子宮内膜症病変の発育への影響	8
3-1-1: TP 受容体シグナル阻害による子宮内膜移植片面積の変化	8
3-1-2: TP 受容体シグナル阻害による子宮内膜移植片における TXS と TP の発現	8
3-2: TP 受容体シグナル阻害による子宮内膜移植片の血管新生への影響	10
3-3: TP 受容体シグナル阻害による子宮内膜移植片のリンパ管新生 への影響	12
3-4: TXS 阻害による子宮内膜移植片の発育と血管およびリンパ管新生 への影響	14
3-5: 移植片に集積したマクロファージの役割	16
3-6: 移植片に集積するマクロファージの特徴	17
3-7: TP 受容体刺激は、培養マクロファージにおける血管新生および リンパ管新生因子発現や抗炎症性マクロファージ関連因子発現 を低下させた	19
4. 考察	21
5. 総括	25
6. 謝辞	26
7. 引用文献	27
8. 表	31

1. 序論

1-1. 子宮内膜症

子宮内膜症は、子宮内膜の間質および上皮が、異所性(子宮外の骨盤腔、臍部、横隔膜、胸腔など)に生着・発育することを特徴とする婦人科疾患である(1)。子宮内膜症は、生殖年齢の女性の約 10%程度が罹患し、月経困難症、慢性骨盤痛、不妊症などの症状が慢性的に持続するため、QOL が著しく低下する。しかしながら、現時点では十分な治療方法はない(2,3)。また、子宮内膜症の病態生理については、いまだに十分な理解が得られていない。

1-2. 血管内皮増殖因子(VEGF)群と受容体群

血管新生ならびにリンパ管新生を促進する代表的なメディエーターが血管内皮増殖因子(VEGF; vascular endothelial growth factor)である(図1)。VEGF は免疫グロブリン様ドメインを持つ細胞外ドメインと、チロシンキナーゼドメインをもつ細胞内ドメインから構成される受容体に結合し、その受容体には VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 の 3 種類がある。VEGFR1 は単球やマクロファージおよび一部の血管内皮細胞に、VEGFR2 は血管内皮細胞に、VEGFR3 はリンパ管内皮細胞に発現する。VEGFs のうち、VEGF-A は血管新生促進因子として知られ、VEGFR1 と VEGFR2 に作用し血管新生に関与する。また VEGFR1 はマクロファージの遊走にも関与する。一方 VEGF-C と VEGF-D はリンパ管新生促進因子として知られ、主に VEGFR3 に結合しリンパ管新生に関与する。また一部には VEGFR2 を利用して血管新生にも関与することが見いだされた。

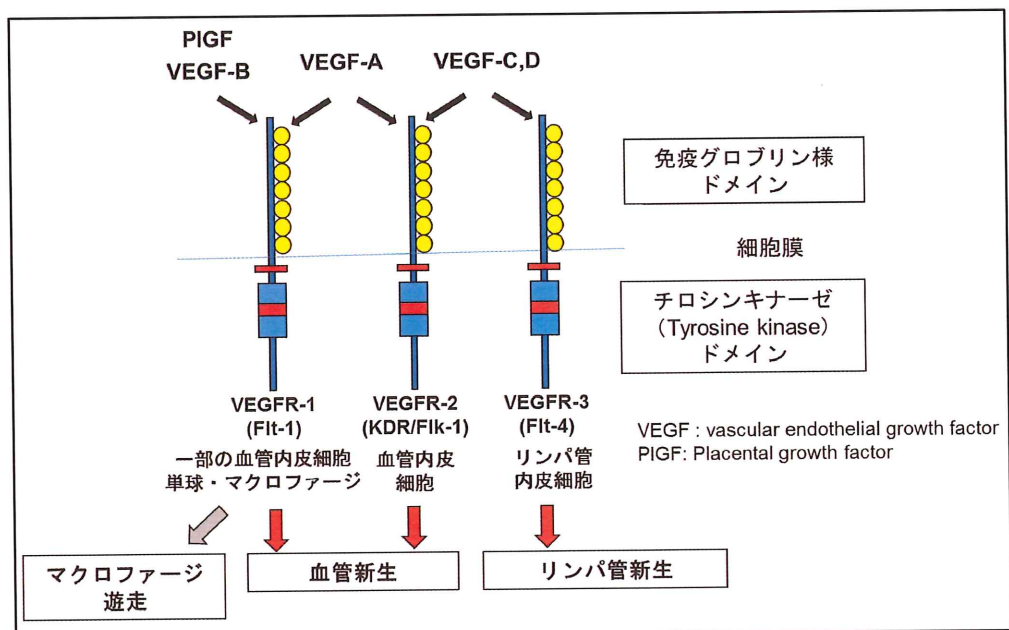


図1. VEGF ファミリーと VEGF 受容体群

血管新生促進因子である VEGF-A は VEGFR1 と VEGFR2 に、リンパ管新生促進因子である VEGF-C, VEGF-D は VEGFR3 に主に結合してその作用を発揮する。VEGFR1 は単球・マクロファージにも発現し、これらの遊走に関与する。

1-3. 子宮内膜症における血管新生の関与

血管新生とは、既存の血管から新しい血管が形成されることである。子宮内膜症はこの血管新生に大きく依存することが分かってきた(4,5)。子宮内膜症の女性の腹腔内や子宮内膜症病変では、強力な血管新生促進因子である血管内皮増殖因子(VEGF)-A が上昇していることが報告されている(4)。またドナーマウスの子宮内膜片を宿主マウスの腹膜壁に移植することによって作成した異所性子宮内膜症モデルにおいて、移植片組織中の血管新生が増強し、これには移植片組織中の VEGF-A を含む血管新生促進因子、および CD31 (cluster of differentiation 31) や VEGFR2 を含む血管内皮マーカーが上昇していることが分かった(6)。また、VEGF-A を中和抗体で阻害すると、異所性子宮内膜症モデルにおいて子宮内膜移植片は縮小し、子宮内膜移植片内の血管新生が抑制された(5,7)。

1-4. 子宮内膜症におけるリンパ管新生の関与

最近の研究で、リンパ管新生が子宮内膜症病変で増強していることが明らかになってきた(8,9)。ヒトにおいて、子宮内膜症はリンパ管新生促進因子およびリンパ管内皮マーカーの発現増加と関係している(4)。また、異所性子宮内膜症モデルにおいて、子宮内膜移植片の発育とリンパ管新生は、リンパ管新生促進因子 VEGF-C と VEGF-D の mRNA 発現増加と関連していた(8,9)。VEGF-C と VEGF-D の受容体である VEGFR3 受容体チロシンキナーゼの阻害薬によって、子宮内膜移植片の発育およびリンパ管新生が抑制されたことにより、リンパ管新生が子宮内膜症進展に関与することが示唆された(8)。しかしながら、子宮内膜症における血管新生とリンパ管新生のメカニズムは不明である。

1-5. 子宮内膜症におけるプロスタノイドの関与

プロスタノイドは、プロスタグランジン (PG) やトロンボキサン (TX) を含むアラキドン酸代謝経路の代謝産物であり、PG は特にシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)/PGE₂ 経路を介して、子宮内膜症の病因に関係している(7,10)。COX-2 は子宮内膜症の発症と進展に関与し(11)、子宮内膜症病変では COX-2 発現の亢進がみられる(12)。また、PGE₂ の合成に欠かせないミクロソーム PGE 合成酵素-1(mPGES-1)により誘導される VEGF-A は、マウスにおける子宮内膜症および子宮内膜症病変の血管新生を促進した(7)。PGE₂ を介したリンパ管新生に関しては、COX-2 由来の PGE₂ が、慢性炎症(13,14)や胃潰瘍(15)、創傷(16)の治癒過程において、VEGF-C や VEGF-D を含むリンパ管新生促進因子の増強を介してリンパ管新生を促進することが見いだされた。

PGE₂に加え、TXA₂はCOXとTX合成酵素(TXS)によって産生されるもう一つの代表的なプロスタノイドであり、TXA₂受容体であるトロンボキサンプロスタノイド(TP, thromboxane prostanoid)受容体に結合してその作用を発揮することが知られている。TP受容体は血小板の凝集や血管平滑筋細胞の収縮に重要な役割を果たすため、心血管疾患や脳血管疾患、特にTXA₂の高発現と関連する脳虚血と関連している(18)。マウス後肢虚血モデルでは、TP受容体シグナルは虚血組織の血管新生を介して後肢虚血からの血流回復を促進した(19)。さらに、マクロファージにおけるTP受容体シグナルは、エンドトキシン誘発性腹膜炎の際に横隔膜のリンパ管新生を促進した(20)。これらの報告は、TP受容体シグナルが子宮内膜症病変における血管新生とリンパ管新生に関与し、子宮内膜症の発育を促進することに関与することを示唆している。そこで本研究では、子宮内膜症進展と血管新生およびリンパ管新生におけるTP受容体シグナルの効果を調べることを目的とした。

2. 方法

2-1. 動物

8週齢の雌性 TP 欠損 (TP^{-/-}) マウスは、C57BL/6 系統マウスと交配したマウスを京都大学成宮周博士から譲渡されたものを使用した(21)。野生型(WT)マウスとして8週齢の雌性 C57BL/6 マウスを、日本クレア株式会社(東京,日本)より入手した。すべての実験および研究は、北里大学医学部動物実験委員会 Institutional Animal Care and Use Committee (承認番号 2022-060) の審査を経て、北里大学医学部長の承認を得た。実験は、日本学術会議動物実験ガイドラインに準拠して行った。本研究では、合計 75 匹のマウスを子宮内膜移植 (n=39)、薬物介入 (n=12)、細胞培養 (n=24) の各実験に対して使用した。

2-2. 異所性子宮内膜症モデル

異所性子宮内膜症モデルは、既報に従い作成した(9)。モデル作成に当たり、4.0mg/kg のミダゾラム (cat.No.614243022; Sandoz; Novartis)、0.75mg/kg の塩酸メデトミジン (cat.No.14111; 日本全薬工業)、および 5.0mg/kg のブトルファノール (cat.No.219711; 明治製菓) を含んだ混合麻酔薬を腹腔内投与する麻酔下に各外科的処置を行った。メデトミジン、ミダゾラム、ブトルファノールの混合麻酔薬は、ケタミンやペントバルビタールナトリウムの代用として近年使用されている(22)。混合麻酔薬とその使用については、北里大学医学部動物実験委員会の審査を経て、北里大学医学部長の承認を得た。各処置の後、メデトミジンの作用を 0.75mg/kg のアチパメゾール (日本全薬工業) の腹腔内投与により消失させマウスを覚醒させた。

マウスにおける内因性エストロゲンの影響および月経周期の影響を排除するため、両側の卵巣を傍脊椎切開により摘出した。卵巣摘出当日から、ドナーマウスおよび宿主マウス共に、エストラジオール吉草酸エステル (100mg/kg/週) (ペラニン・デポ; 商品番号 4987224136400; 持田製薬) を皮下投与した(6)。

卵巣摘出 7 日後に子宮内膜片の移植を行った。ドナーマウスの摘出子宮から直径 3mm 大の円形の子宮内膜片を作成し、宿主マウスの腹壁の両側に一つずつ、#7-0 ポリプロピレン縫合糸 (cat. no. C0024501; B-Brown Ace Scrap, Inc.) を用いて移植した。宿主の WT マウスまたは TP^{-/-}マウスへ、ドナーの WT マウスまたは TP^{-/-}マウスの子宮内膜移片を移植した (以後、WT→WT および TP^{-/-}→TP^{-/-}と記載する)。移植日を 0 日目とした。WT→WT のうち 6 匹に、選択的 TXS 阻害剤であるオザグレル (30mg/kg; カタログ番号 87449; キッセイ薬品工業株式会社) を毎日経口投与した(20)。

子宮内膜移植後 14 日目に、子宮内膜移植片を摘出した。5% イソフルラン

(cat.No.4987114133403; ファイザー社製) の 5 分間の吸入によってマウスを安楽死

させた後、子宮頸部を脱臼し、心停止と呼吸停止によって死亡を確認した。その後、腹壁両側の移植片を摘出した。移植直後に採取した移植片検体を、0 日目の検体とした。

摘出した全ての移植片を撮影し、ImageJ version 1.53e (National Institutes of Health) を用いて移植片面積 (mm²) を求めた。左右両側の腹壁から摘出した移植片検体のうち、片側からは逆転写-定量的 PCR (RT-qPCR) 用に cDNA を作成し、もう片側は免疫組織学的分析のために凍結処理をした。実験中の人道的エンドポイントは、摂餌・摂水困難、体重減少 $\geq 20\%$ 、活動・運動の低下と定義した。

2-3. 蛍光免疫染色

固定した子宮内膜サンプルを Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek USA, Inc.) に包埋し、-80°C で凍結した後、厚さ 8 μ m の凍結切片に切り出した。

切片を以下の一次抗体のいずれかと 4°C で一晩インキュベートした：ウサギ抗マウス TP 抗体 (1:100; cat. no. APR-069; Almone Labs, Jerusalem, Israel)、ウサギ抗マウス TXS 抗体 (1:100; cat. no. bs-4019R; Bioss Antibodies Inc, Woburn, MA, USA)、ラット抗マウス CD31 モノクローナル抗体 (1:200; cat. no. 553370; BD Biosciences)、ウサギ抗マウス リンパ管内皮ヒアルロン酸受容体 1 (LYVE-1) 抗体 (1:100; cat. no. ab14917; Abcam)、ヤギ抗マウス LYVE-1 抗体 (1:100; cat. no. AF2125; R&D Systems Inc.)、ヤギ抗マウス VEGF-A 抗体 (1:100; cat. no. AF-493-NA; R&D Systems Inc.)、ウサギ抗 VEGF-C 抗体 (1:100; cat. no. ab9546; Abcam)、ヤギ抗 VEGF-D 抗体 (1:50; cat. no. sc6313; Santa Cruz Biotechnology Inc. ab9546; Abcam 社)、血小板のマーカーであるウサギ抗マウス CD41 (1:100; cat. no. MCA2245GA; Bio-Rad Laboratories 社)、マクロファージのマーカーであるラット抗マウス F4/80 抗体 (1:100; cat. no. MCA497G; Bio-Rad Laboratories 社)。

翌日、切片を以下の、それぞれの動物に対応したいずれかの二次抗体と、室温で 1 時間インキュベートした：Alexa Fluor 488 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (cat. no. A21206)、Alexa Fluor 488 標識ロバ抗ヤギ IgG 抗体 (cat. no. A11055)、Alexa Fluor 594 標識ロバ抗ラット IgG 抗体 (cat. no. A21209) または Alexa Fluor 594 標識ロバ抗ヤギ IgG 抗体 (cat. no. A11058) (1:200; Molecular Probes; Thermo Fisher Scientific, Inc.)。

蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-700; 株式会社キーエンス) を用いて蛍光切片の画像を撮影した。

移植片へ集積したマクロファージの測定：染色切片の画像は、蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-700; 株式会社キーエンス) を用いて撮影した。子宮内膜組織の 5 視野 (倍率 400 倍) において、F4/80+細胞の数を数えた。結果は 1 平方ミリメートルあたりの F4/80 陽性細胞数で示した。

血管密度およびリンパ管密度の測定：子宮内膜移植片内の微小血管密度（MVD）とリンパ管密度（LVD）は、それぞれ血管新生とリンパ管新生の評価に用いられてきた（9）。蛍光顕微鏡（Biozero BZ-700; Keyence Corporation）を用いて、ランダムに選択した子宮内膜移植片 4 視野における CD31 陽性の血管と LYVE1 陽性のリンパ管の数を測定した（倍率 200 倍）。結果は、1 平方ミリメートルあたりの血管およびリンパ管の数（MVD/mm² または LVD/mm²）として示した。さらに、ImageJ を用いて血管およびリンパ管が占める面積を求め、移植片の総面積に対する割合（血管面積（MVA）% およびリンパ管面積（LVA）%）で示した。

2-4.リアルタイム定量的 PCR（RT-qPCR）解析

TRIzol 試薬（cat. no. 15596018; Thermo Fisher Scientific, Inc.）でホモジナイズし、子宮内膜移植片組織から全 RNA を抽出した。Total RNA（1 μ g）は、ReverTra Ace qPCR RT Kit（cat.No.FSQ-201；東洋紡株式会社）を用いて、メーカーのプロトコールに従って一本鎖 cDNA に転写した。qPCR は、TB Green Premix Ex Taq II（Tli RNase H Plus；cat.No.RR820A；タカラバイオ株式会社）を用いて行った。PCR 増幅は以下のサーモサイクル条件で行った：95°C10 秒間の前変性に続く 95°C3 秒、60°C20 秒のサイクルを 40 回繰り返す 2 段階の PCR プログラム。mRNA 発現量は比較閾値サイクル法（ $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ）（23）を用いて算出し、各サンプルの GAPDH 発現量に対する比を求めた。使用したプライマーの配列を表 I に示す。

2-5.細胞調製と細胞培養

骨髓細胞は、8 週齢の雌性 WT マウスと TP^{-/-}マウスの大腿骨と脛骨から単離した。骨髓細胞は 6 ウェルプレート（1.0x10⁶細胞/ウェル）で培養し、10%子牛胎児血清(FBS)および 20ng/ml マクロファージコロニー刺激因子(M-GSF)（カタログ番号 576406；BioLegend, Inc.）を添加した RPMI-1640 培地で維持した。

7 日目に、リポ多糖(LPS, lipopolysaccharide)（10 ng/ml; カタログ番号 L3012; Millipore）のみ、もしくは LPS および TP 受容体アゴニスト U46619（100 nM; カタログ番号 16450; Cayman Chemical）で刺激した骨髓由来マクロファージを、RPMI-1640 で 3 時間培養した後、回収した。検体は、TRIzol 試薬（カタログ番号 15596018; Thermo Fisher Scientific, Inc.）でホモジナイズし、RT-qPCR を用いて mRNA レベルを測定した。

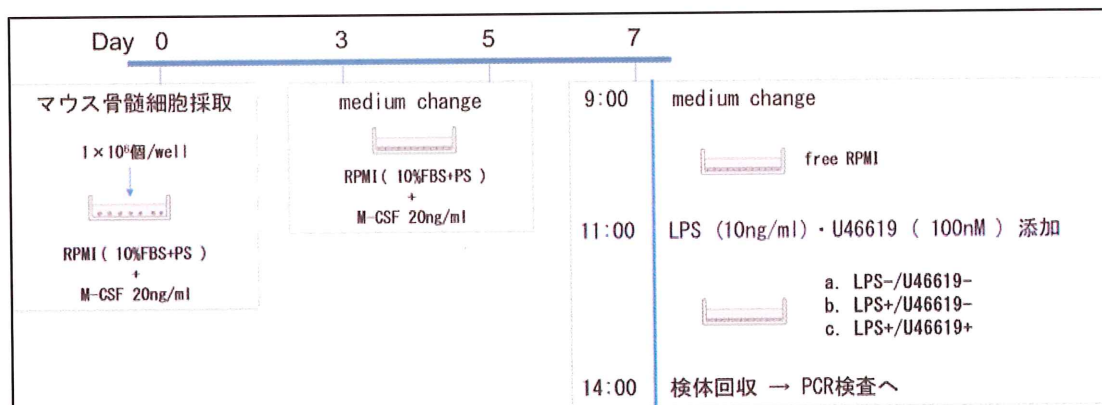


図 2. 細胞培養実験方法

8 週齢の雌性 WT もしくは $TP^{-/-}$ の大腿骨および脛骨から骨髓細胞を単離し、6 ウェルプレート (1.0×10^6 細胞/ウェル) で培養した。10% 子牛胎児血清 (FBS) および 20ng/ml マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) を添加した RPMI-1640 培地で維持した。培地は 3 日目および 5 日目に交換した。7 日目に RPMI-1640 のみの培地で 2 時間静置した後、刺激なし (a)、LPS (10ng/ml) のみ (b)、LPS (10ng/ml) + U46619 (100nM) (c) を添加し、3 時間培養した後、検体を回収した。

2-6. 統計分析

すべての結果は平均値と SD で示した。すべての統計解析は、GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software, Inc.) を用いて行った。2 群間のデータ比較は、対応のない両側 Student's t-test を用い、複数群間の比較は、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) と Tukey's post hoc test を用いて行った。P<0.05 は統計的に有意な差を示すとみなした。

3. 結果

3-1: TP 受容体シグナル阻害による子宮内膜症病変の発育への影響

3-1-1: TP 受容体シグナル阻害による子宮内膜移植片面積の変化

移植片の発育に、TP 受容体シグナルが関与するかを調べるため、WT または TP^{-/-}マウスの子宮内膜片を WT または TP^{-/-}の宿主マウスに移植した (図 3)。子宮内膜移植片面積は移植後 14 日目に最大になることが以前の報告で明らかになっており (6,9)、14 日目の子宮内膜移植片面積を評価した。TP^{-/-}ドナーマウスの子宮内膜片を TP^{-/-}宿主マウスに移植すると (TP^{-/-}→TP^{-/-}マウス)、移植片は WT→WT マウスよりも発育した (図 3A)。同様に、WT→TP^{-/-}マウスでも移植片の発育は促進された。しかし、TP^{-/-}→WT マウスと WT→WT マウスの間では、移植片の発育に統計学的に有意な差は認められなかった。これらの所見から、宿主に由来する TP 受容体シグナルが移植子宮内膜片の発育を抑制していることが示唆された。従って、WT→WT マウスと TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスにおける移植片の発育、ならびに血管新生およびリンパ管新生を、続く実験で評価した。

3-1-2: TP 受容体シグナル阻害による子宮内膜移植片における TXS と TP の発現

RT-qPCR 解析によると、移植後 14 日目の WT→WT マウスの移植片における TXS と TP の mRNA 発現レベルは増加した。TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの移植片におけるトロンボキサン合成酵素 (Thromboxane synthase, TXS) mRNA 発現レベルは、WT→WT マウスの移植片と同程度であり、TP mRNA 発現レベルは TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの移植片で減少した (図 3B)。

また、移植後 14 日目の WT→WT マウスの子宮内膜移植片について蛍光免疫二重染色で評価すると、TXS と TP は子宮内膜移植片内の間質組織に存在する F4/80 陽性細胞に発現しており、マクロファージが移植片における TXS と TP の供給源であることが示された (図 3C)。一般的に TP 受容体は血小板に発現するため、蛍光免疫染色で解析すると、子宮内膜移植片における血小板マーカーである CD41 の分布は、WT→WT マウスと TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスとで差がないことが明らかになった (図 3D)。

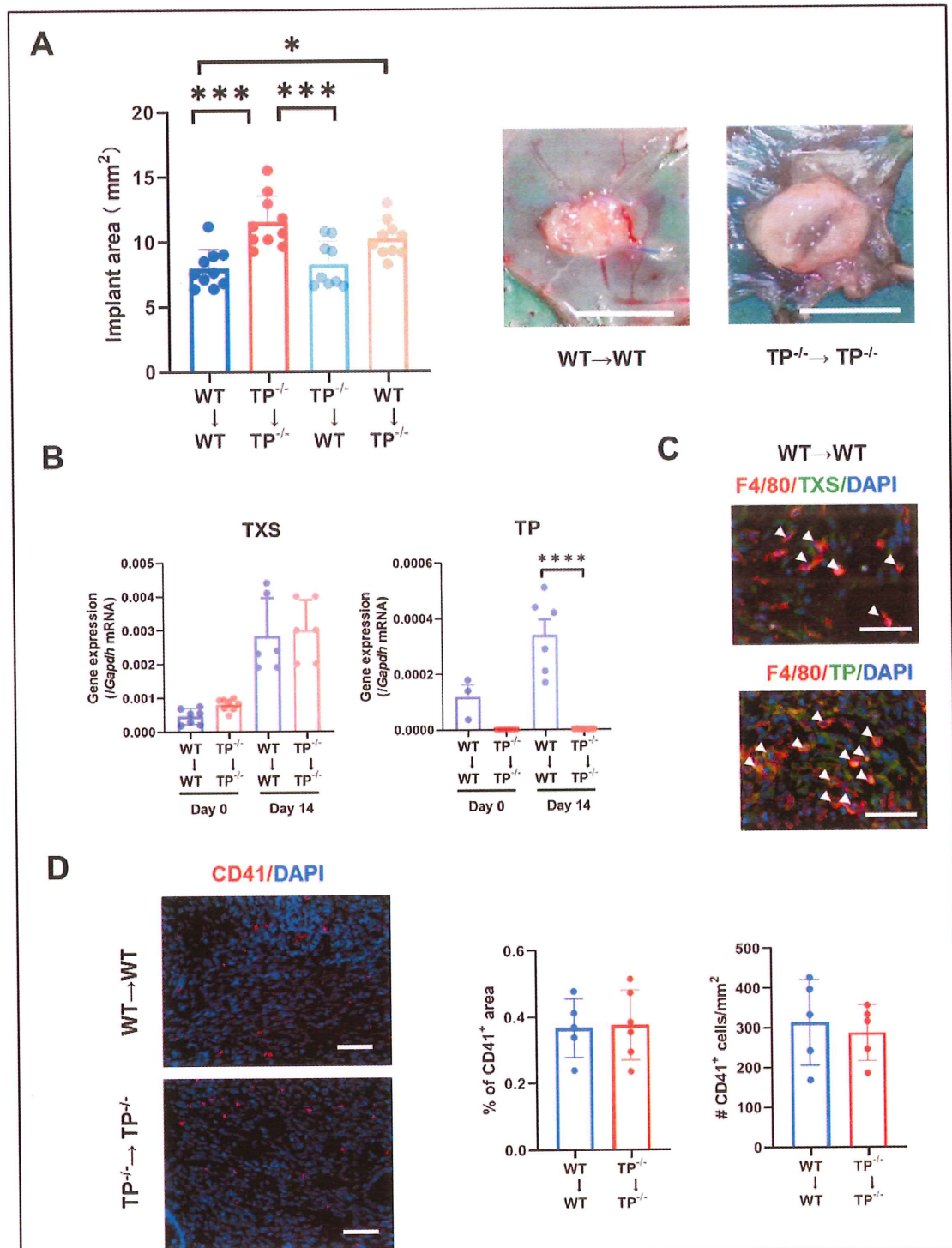


図 3. 子宮内膜移植片の発育とトロンボキサン合成酵素 (TXS) /トロンボキサンプロスタノイド (TP) の発現

(続き)

(A) 子宮内膜組織移植後の移植片面積 (左パネル) および 14 日目の WT→WT および TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスにおける典型的な移植片の外観 (右パネル)。データは平均値±標準偏差 (SD) で表し、一元配置分散分析 (ANOVA) に Tukey 検定を加えて解析した (スケールバー: 5mm)。
* p < 0.05、*** p < 0.001。

(B) WT→WT および TP^{-/-}→TP^{-/-}マウス移植における TXS および TP の mRNA 発現レベル。データは平均値±SD で表し、Student's t-test を用いて解析した。*** p < 0.001。

(C) 移植 14 日目の WT→WT マウス移植片における F4/80 (赤) /TXS (緑) または TP (緑) の二重免疫染色の代表的染色画像 (スケールバー: 50 μm)。矢印は二重陽性細胞を示す。

(D) 移植 14 日目の WT→WT マウスおよび TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの子宮内膜移植片の組織切片における CD41 (赤) の免疫蛍光染色 (スケールバー: 50 μm)。移植 14 日目の WT→WT および TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの移植片における CD41+細胞の面積と数。データは平均±SD で表した。

WT, wild-type; TP, thromboxane prostanoid; TXS, thromboxane synthase.

3-2 : TP 受容体シグナル阻害による子宮内膜移植片の血管新生への影響

子宮内膜移植片の発育は血管新生に因ることから(6,9)、WT→WT マウスおよび TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの移植片中の CD31 陽性血管数を測定することにより、血管新生における TP 受容体シグナルの関与を調べた。図 4A は、TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの移植片が、WT→WT マウスの移植片と比較して、新しく形成された CD31 陽性血管数が多いことを示している。TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの移植片の MVD (血管密度) と MVA% (血管占有面積割合) は、WT→WT マウスの移植片の MVD と MVA% よりも大きかった (図 4B)。さらに、CD31、VEGFR2、血管新生促進因子 VEGF-A の mRNA 発現レベルは、TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの移植片では、WT→WT マウスの移植片よりも高かった (図 4C)。蛍光免疫二重染色では、移植片組織では TP 受容体と CD31 の共局在が見られなかったことから (図 4D)、TP 受容体は新しく形成された血管には発現していないことが示唆された。これらの所見から、TP 受容体シグナル阻害は、子宮内膜移植片における血管新生を直接促進しないことが示唆される。

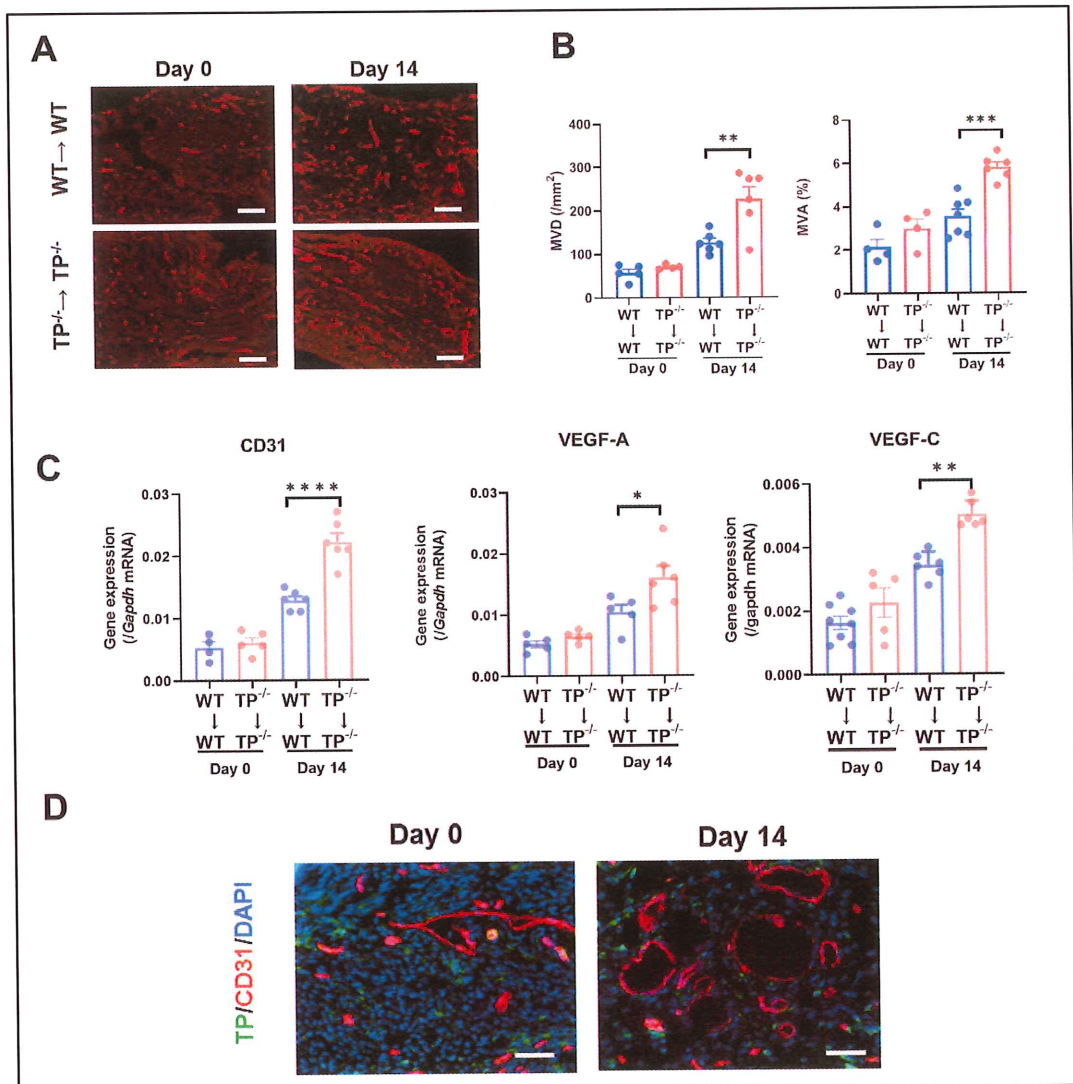


図 4. TP 受容体シグナル阻害は子宮内膜移植片の血管新生を促進する。

(A) 移植 0 日目および 14 日目の WT → WT および TP^{-/-} → TP^{-/-} マウスの子宮内膜移植切片における CD31 免疫蛍光染色 (スケールバー: 100 μm)。

(B) 移植 0 日目と 14 日目の WT → WT マウスと TP^{-/-} → TP^{-/-} マウスの移植片における微小血管密度 (MVD) と微小血管面積 (MVA)。データは平均値 ± 標準偏差 (SD) で表し、一元配置分散分析 (ANOVA) に Tukey 検定を加えて解析した。** p < 0.01 および *** p < 0.001。

(C) 移植 14 日目の WT → WT および TP^{-/-} → TP^{-/-} マウスの移植片における CD31、血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2) および VEGF-A の mRNA 発現レベル。データは平均値 ± SD で表し、Student's t-test を用いて解析した。* p < 0.05 および ** p < 0.01。

(続き)

(D) 移植 0 日目と 14 日目の WT→WT マウス移植における TP (緑) と CD31 (赤) の二重免疫染色 (スケールバー: 50 μ m)。

WT, wild-type; TP, thromboxane prostanoid; MVD, microvessel density; MVA, microvessel area; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor.

3-3: TP 受容体シグナル阻害による子宮内膜移植片のリンパ管新生への影響

リンパ管新生における TP 受容体シグナルの役割を、LVD (リンパ管密度) と LVA% (リンパ管占有面積割合) を測定することによって調べた (図 5A, B)。TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの移植片における LVD と LVA% は、WT→WT マウスの移植片より増加した。TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの移植片における LYVE-1、VEGFR3、および Prospero-related homeobox 1 (Prox1) を含むリンパ管内皮マーカーの mRNA 発現レベルは、WT→WT マウスの移植片よりも高値であった (図 5C)。VEGF-C と VEGF-D の mRNA 発現レベルも TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの移植片で高値だった。これらの結果は、TP 受容体シグナル阻害が VEGF-C と VEGF-D を増強することでリンパ管新生を促進させることを示している。そこで、リンパ管内皮細胞における TP 受容体の局在を調べた (図 5D)。TP 受容体と LYVE-1 との蛍光免疫二重染色では共局在が見られなかったことから、TP 受容体は新しく形成されたリンパ管には発現していないことが示唆された。したがって、これらの結果から、TP 受容体シグナル阻害は、子宮内膜移植片におけるリンパ管新生を直接促進しないことが示唆された。

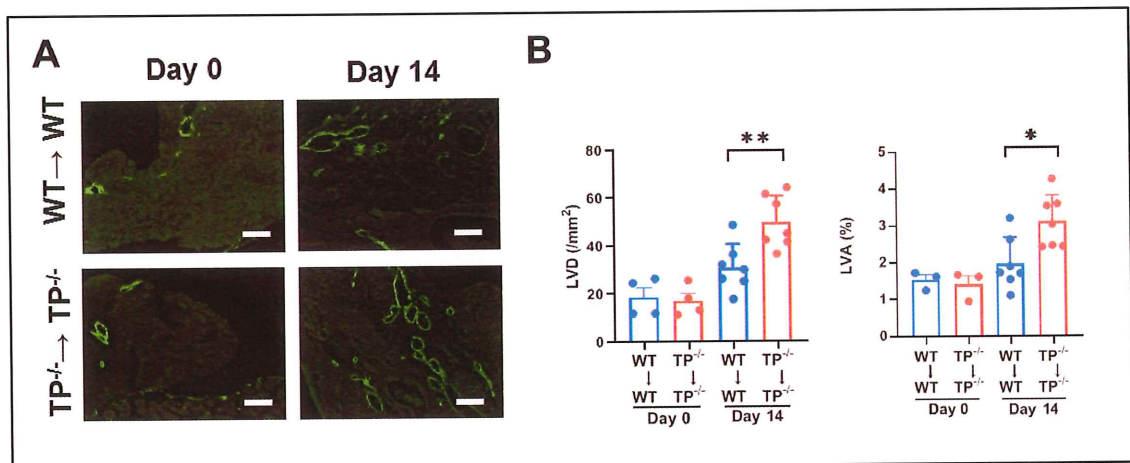


図 5. TP 受容体シグナル阻害は子宮内膜移植片のリンパ管新生を促進する。

(A) 移植 14 日目の WT→WT および TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスにおける移植片内のリンパ管内皮ヒアルロン酸レセプター 1 (LYVE-1) の免疫蛍光染色像 (スケールバー: 100 μ m)。

(続き)

(B) 移植 0 日目と 14 日目の WT→WT マウスと TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスにおける移植片内のリンパ管密度 (LVD) とリンパ管面積 (LVA)。データは平均値±標準偏差 (SD) で表し、一元配置分散分析 (ANOVA) に Tukey 検定を加えて解析した。* p < 0.05 および**p < 0.01。

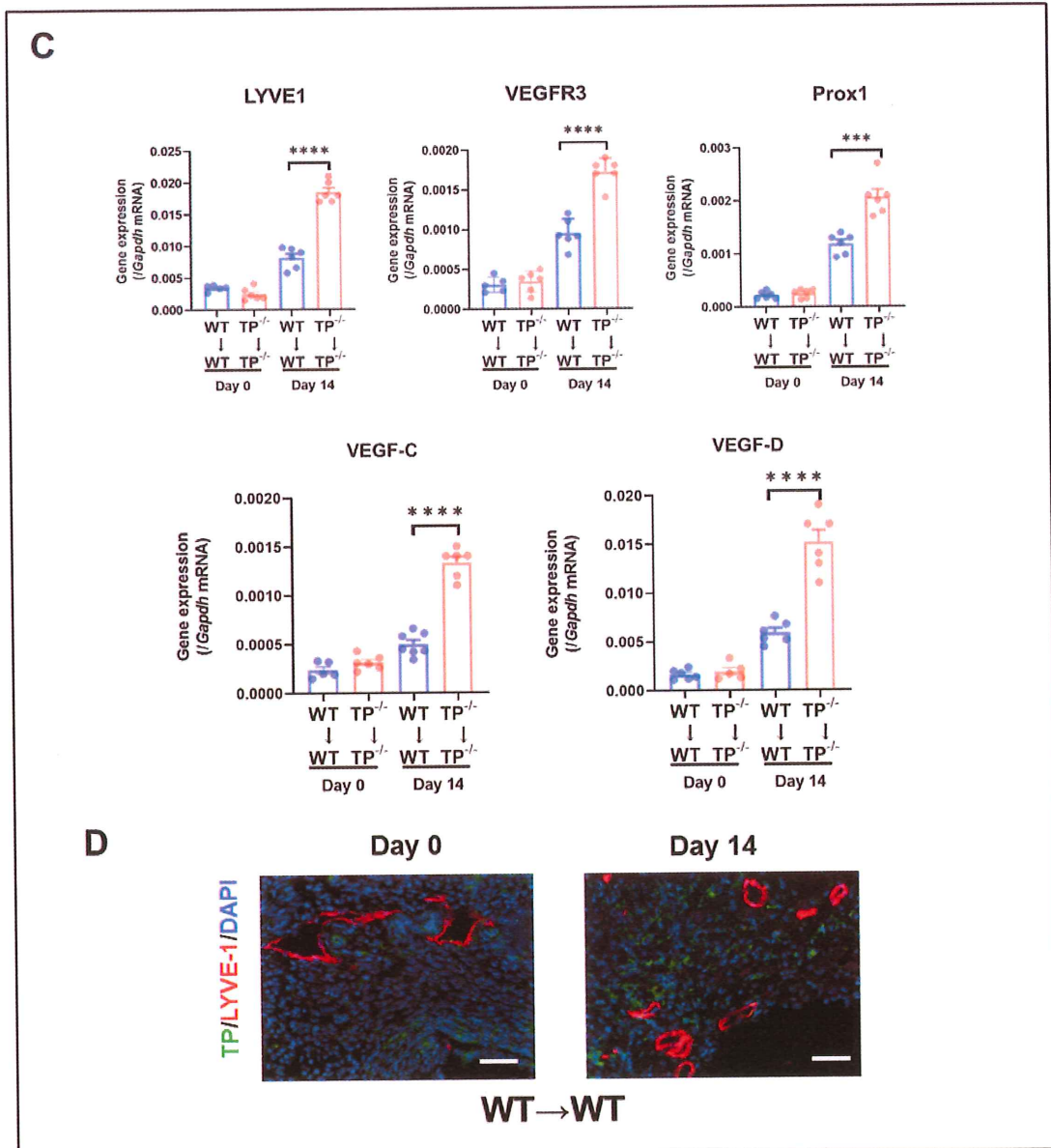


図 5. TP 受容体シグナル阻害は子宮内膜移植片のリンパ管新生を促進する。

(C) 移植 14 日目の WT→WT および TP^{-/-}→TP^{-/-}マウス移植における LYVE-1、血管内皮増殖因子受容体 3 (VEGFR3)、Prox1、VEGF-C、および VEGF-D の mRNA 発現レベル。

(続き)

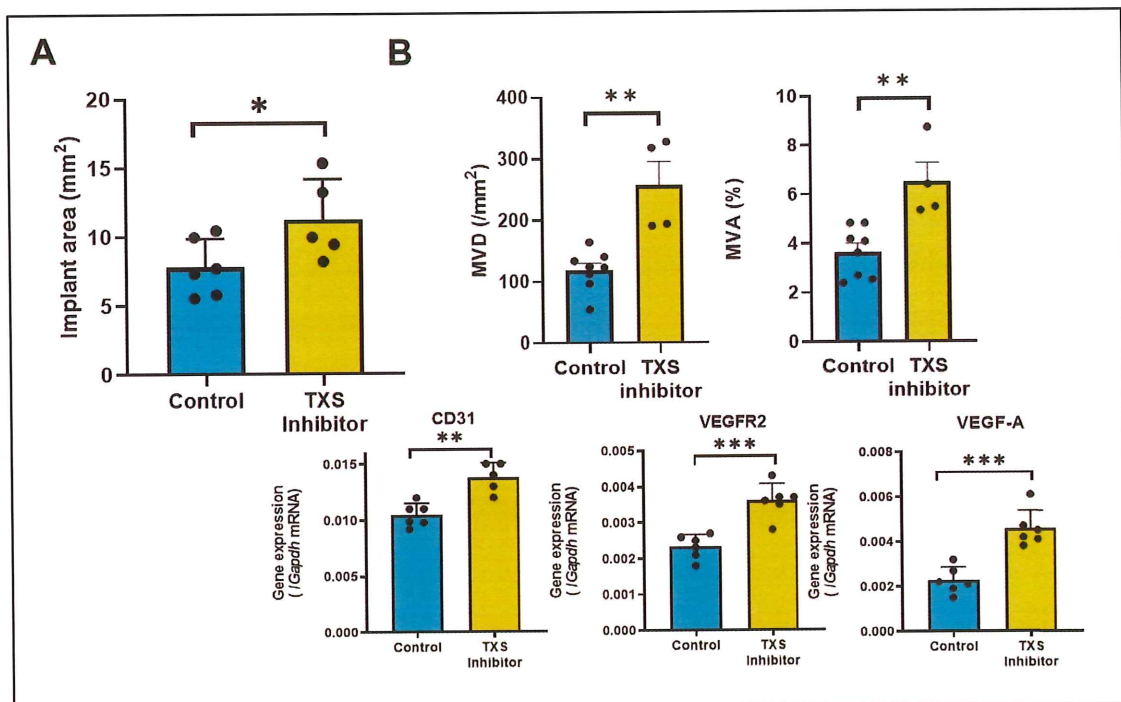
データは平均値±SD で表し、Student's t-test を用いて解析した。 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 、 $***p < 0.0001$ 。

(D) 移植 14 日目の WT→WT マウス移植における TP (緑) と LYVE-1 (赤) の免疫二重染色 (スケールバー: $50\mu\text{m}$)。

WT, wild-type; TP, thromboxane prostanoid; LYVE-1, lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1; LVD, lymphatic vessel density; LVA, lymphatic vessel area; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor; Prox1, prospero-related homeobox 1

3-4: TXS 阻害による子宮内膜移植片の発育と血管およびリンパ管新生への影響

子宮内膜症における TP 受容体シグナルの役割を確認するために、TXS 阻害薬であるオザグレルを投与して、移植片の発育、血管新生、リンパ管新生に対する効果を調べた (図 6)。オザグレルは、コントロールと比較して WT→WT マウスにおいて移植片面積を増大させ (図 6A)、移植片における血管新生とリンパ管新生を促進した。このことは、MVD と MVA% の増大 (図 6B)、LVD と LVA% の増大 (図 6C) から明らかである。さらに、オザグレルは、WT→WT マウスにおいて CD31、VEGFR2、VEGF-A を含む血管新生関連遺伝子 (図 6B)、および LYVE-1、VEGFR3、Prox1、VEGF-C、VEGF-D を含むリンパ管新生関連遺伝子 (図 6C) の mRNA 発現レベルを増加させた。



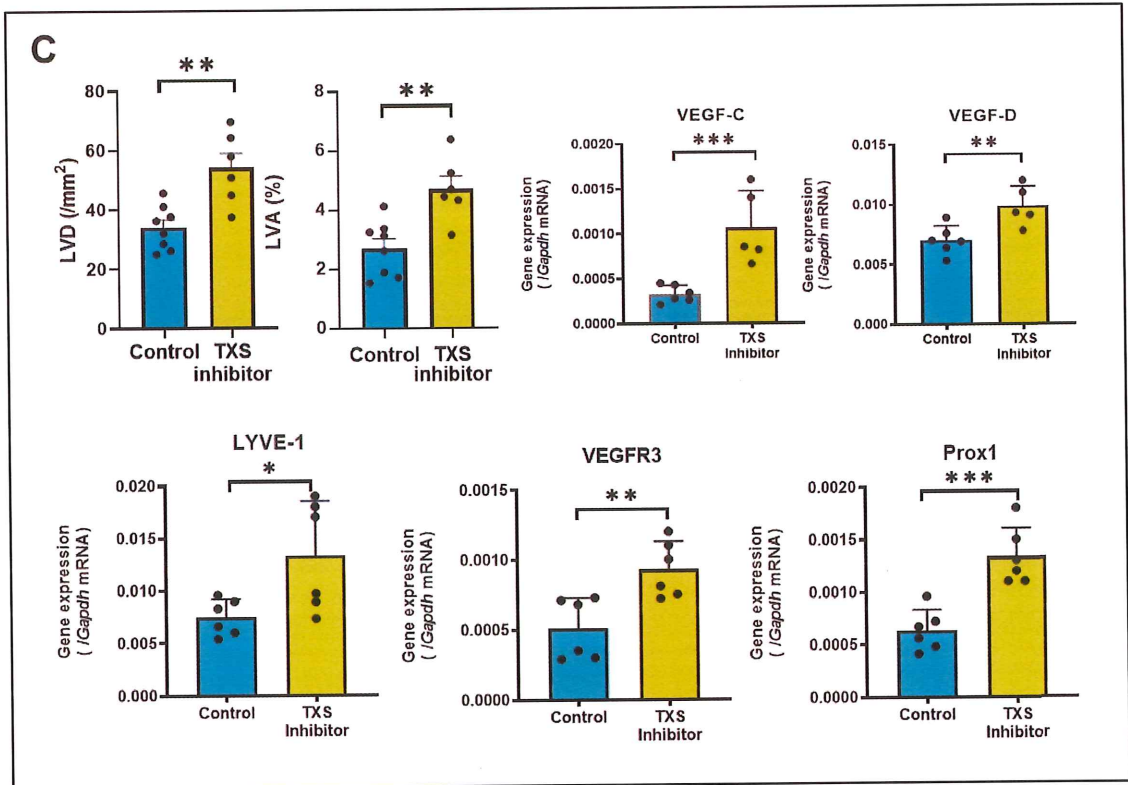


図 6. TXA₂ 合成酵素阻害薬は移植片を発育させ血管新生およびリンパ管新生を促進した

(A)TXA₂ 阻害薬またはコントロールで治療した WT→WT マウスの移植片面積。データは平均値±標準偏差 (SD) で表し、Student の t 検定を用いて解析した。* p < 0.05。

(B)TXA₂ 阻害薬またはコントロールで治療した WT→WT マウス移植片における微小血管密度(MVD)、微小血管面積(MVA)、血管新生因子 血管新生促進遺伝子 CD31、血管内皮増殖因子受容体 2(VEGFR2)、VEGF-A の mRNA 発現レベル。データは平均値±SD で表し、Student's t-test を用いて解析した。** p < 0.01 および***p < 0.001。

(C) TXA₂ 阻害薬またはコントロールで治療した WT→WT マウス移植片におけるリンパ管密度 (LVD)、リンパ管面積 (LVA) およびリンパ管新生因子。リンパ管新生促進遺伝子リンパ管内皮ヒアルロン酸レセプター1 (LYVE-1)、VEGFR3、Prox1、VEGF-C および VEGF-D の mRNA 発現レベル。データは平均値±SD で表し、Student's t-test を用いて解析した。* p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001。

TXS, thromboxane synthase; WT, wild type; MVD, microvessel density; MVA, microvessel area; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor; LVD, lymphatic vessel density; LVA, lymphatic vessel area; LYVE-1, lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1; Prox1, prospero-related homeobox 1

3-5：移植片に集積したマクロファージの役割

マクロファージはマウス子宮内膜症進展における血管新生とリンパ管新生に関与しているとの報告があり(9)、その役割を調べるため、子宮内膜移植片内の F4/80 陽性細胞数をカウントした (図 7A)。F4/80 陽性細胞数は、TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの移植片の方が WT→WT マウスの移植片よりも多く、F4/80 陽性細胞の集積が子宮内膜症における血管新生とリンパ管新生に関係していることを示している。さらに、移植片における F4/80 陽性細胞の集積は、マクロファージのケモカインである C-C motif chemokine 2 (CCL2) とその受容体である C-C motif chemokine receptor 2 (CCR2) の発現上昇と関連していた (図 7B)。

マクロファージは、血管新生やリンパ管新生に極めて重要な役割を果たす血管新生促進因子 (VEGF-A) やリンパ管新生促進因子 (VEGF-C と VEGF-D) などの VEGF タンパク質ファミリー合成に関与する。そこで、移植片に集積したマクロファージが VEGF-A、VEGF-C、または VEGF-D を発現しているかどうかを調べた (図 7C)。移植 14 日目の WT→WT マウスの移植片では、蛍光免疫二重染色で F4/80 陽性細胞が VEGF-A だけでなく VEGF-C および VEGF-D を共発現していることが示された (図 7C)。これらの所見は、マクロファージが VEGF-A および VEGF-C、VEGF-D 発現を増強させて、子宮内膜移植片の血管新生およびリンパ管新生に関与していることを示唆している。

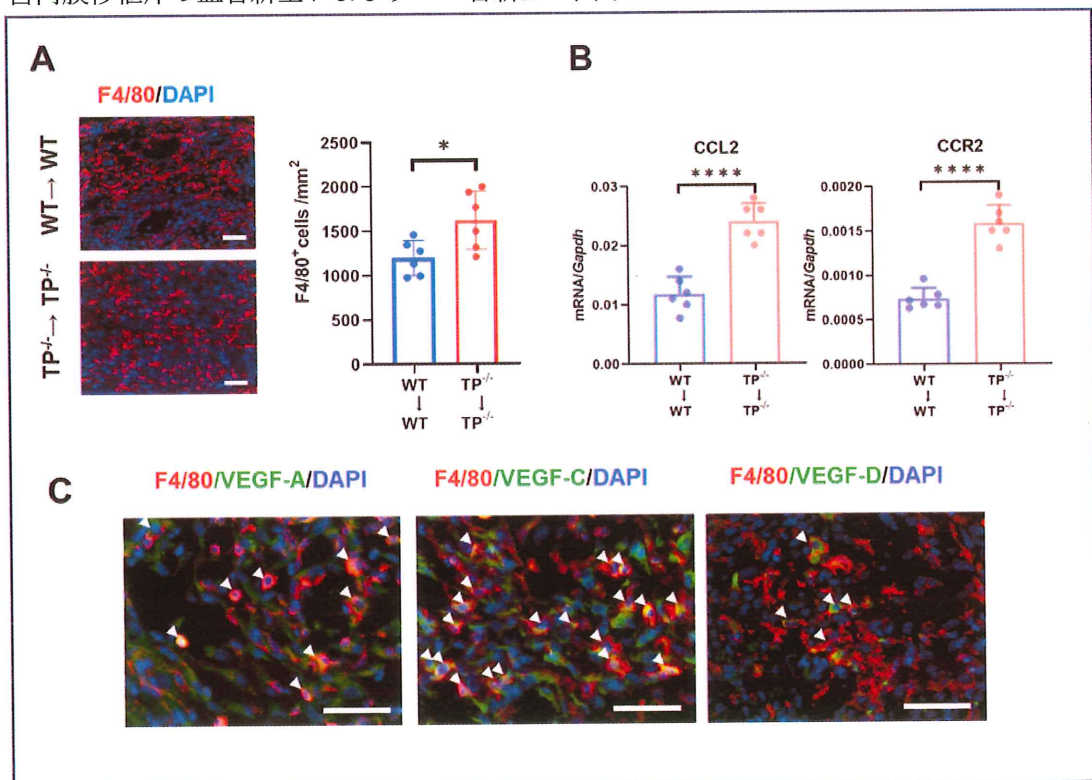


図 7. 子宮内膜移植組織における集積マクロファージ

(A) 移植 14 日目の WT→WT および TP^{-/-}→TP^{-/-}マウス移植片組織における F4/80 免疫染色像 (赤) (スケールバー: 50 μ m)。移植 14 日目の WT→WT および TP^{-/-}→TP^{-/-}マウス移植片における F4/80 陽性細胞数。データは平均値 \pm 標準偏差 (SD) で表し、Student の t 検定を用いて解析した。* $p < 0.05$ 。

(B) 移植 14 日目の WT→WT および TP^{-/-}→TP^{-/-}マウス移植片における C-C motif chemokine 2 (CCL2) および C-C motif chemokine receptor 2 (CCR2) の mRNA 発現レベル。データは平均値 \pm SD で表し、Student's t-test を用いて分析した。*** $p < 0.001$ および**** $p < 0.0001$ 。

(C) 移植 14 日目の WT→WT マウス移植における F4/80 (赤) と血管内皮増殖因子 A (VEGF-A; 緑)、VEGF-C (緑)、または VEGF-D (緑) の蛍光免疫二重染色 (スケールバー: 50 μ m)。矢印は二重陽性細胞を示す。

WT, wild-type; TP, thromboxane prostanoid; CCL2, C-C motif chemokine 2; CCR2, C-C motif chemokine receptor 2; VEGF, vascular endothelial growth factor.

3-6: 移植片に集積するマクロファージの特徴

子宮内膜症進展に関与するマクロファージの表現型の特徴は、炎症性マクロファージ (M1 様マクロファージ) よりかは抗炎症性マクロファージ (M2 様マクロファージ) であることが報告されている。そこで、本モデルにおける移植片に集積するマクロファージの表現型を調べるため、炎症性マクロファージの関連因子である、tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)、interleukin (IL) -1 β 、IL-6 の mRNA 発現レベル、および抗炎症性マクロファージ関連因子である mannose receptor (MR)、Fizz1、IL-10 の mRNA 発現レベルを調べた (図 8)。炎症性マクロファージに関連する mRNA 発現量は、WT→WT マウスと TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスで大きな差はなかったが、抗炎症性マクロファージに関連する mRNA 発現量は WT→WT マウスよりも TP^{-/-}→TP^{-/-}マウスの方が高かったことから、抗炎症性マクロファージが子宮内膜症の進展に関与していることが示唆された。

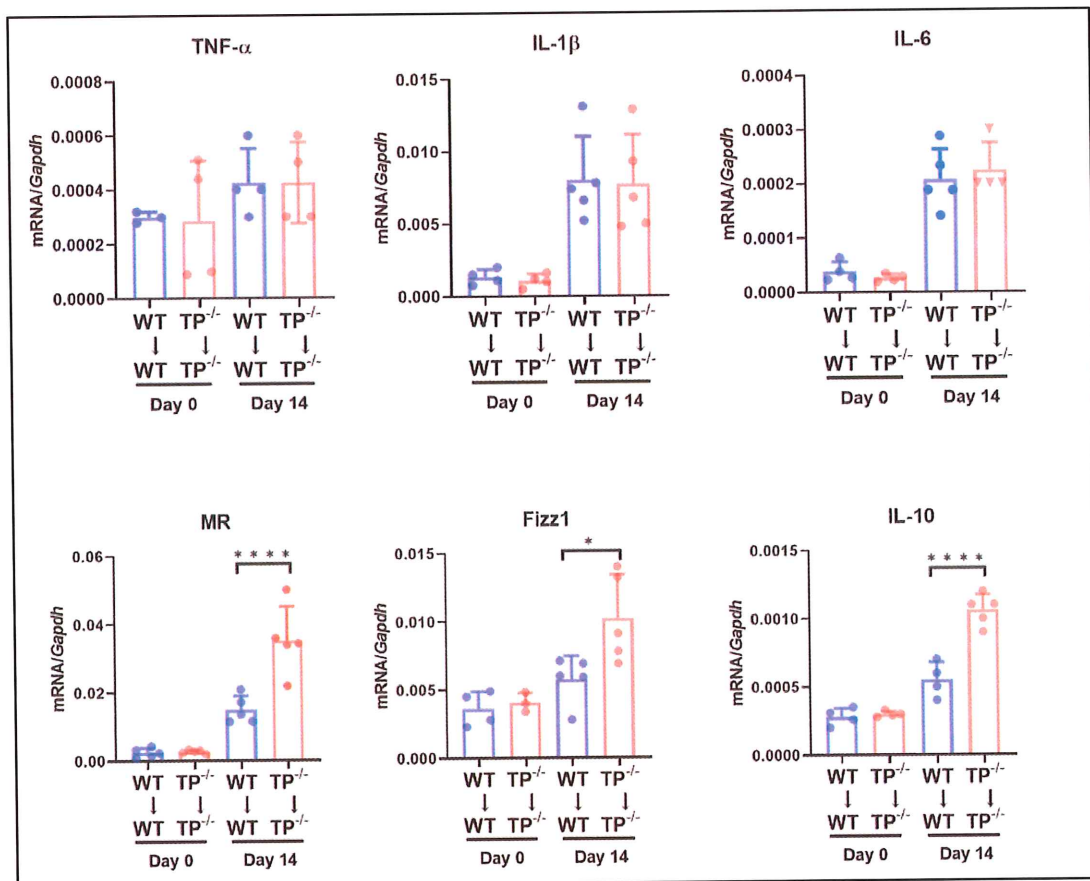


図 8. 内膜移植片における炎症性および抗炎症性マクロファージ関連遺伝子 mRNA 発現

移植 14 日目の WT→WT および TP^{-/-}→TP^{-/-}マウス移植片組織における、tumor necrosis factor-alpha (TNF-α)、interleukin (IL) -1β、IL-6 を含む炎症性マクロファージ表現型関連遺伝子、および mannose receptor (MR)、Fizz1、IL-10 を含む抗炎症性マクロファージ表現型関連遺伝子の mRNA 発現レベル。データは平均値±標準偏差 (SD) で表し、Student's t-test を用いて解析した。* p < 0.05 および***p < 0.001。

WT, wild-type; TP, thromboxane prostanoid; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; MR, mannose receptor.

3-7: TP 受容体刺激は、培養マクロファージにおける血管新生およびリンパ管新生因子発現や抗炎症性マクロファージ関連因子発現を低下させた

最後に、in vitro で培養骨髄マクロファージにおける TP 受容体シグナル阻害が、血管新生促進因子やリンパ管新生促進因子を制御するかどうかを調べた。培養骨髄マクロファージを TXA₂ アナログである U46619 で刺激すると、VEGF-A、VEGF-C、および VEGF-D の mRNA 発現レベルは、WT マウス由来の骨髄マクロファージでは低下したが、TP^{-/-} マウス由来の骨髄マクロファージでは変化しなかった (図 9A)。これらの所見から、培養骨髄マクロファージの VEGF-A、VEGF-C、および VEGF-D の発現が、TP 受容体シグナルを介して低下していることが示された。

さらに、培養骨髄マクロファージにおける炎症性因子および抗炎症因子の mRNA 発現レベルを in vitro で測定した。U46619 刺激は、WT および TP^{-/-} マウス由来のマクロファージにおいて、TNF α 、IL-1 β 、IL-6 を含む炎症性因子の発現レベルに影響を及ぼさなかった。一方で、U46619 刺激は、WT マウス由来のマクロファージにおいて、MR、Fizz1、IL-10 などの抗炎症性因子の発現レベルを低下させたが、TP^{-/-} マウス由来のマクロファージには影響を及ぼさなかった (図 9B)。

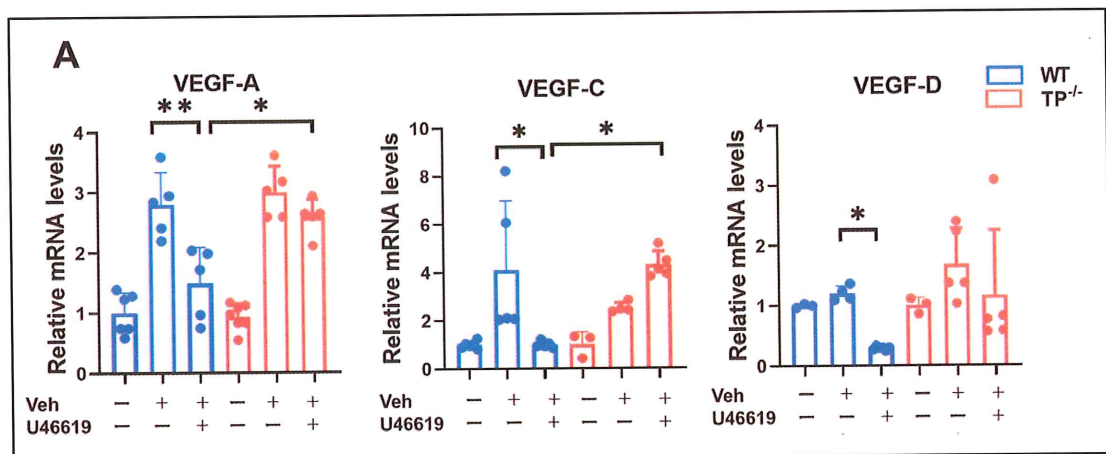


図 9. 培養マクロファージにおける血管増殖因子群(VEGFs)と炎症性・抗炎症性マクロファージ表現型関連遺伝子。

(A) U46619 (100nM) で刺激した培養骨髄由来マクロファージにおける血管内皮増殖因子 A (VEGF-A)、VEGF-C、VEGF-D の発現レベル。データは 2 回の独立実験の平均値±標準偏差 (SD) で表し、一元配置分散分析 (ANOVA) に Tukey 検定を加えて解析した。* p < 0.05 および ** p < 0.01。

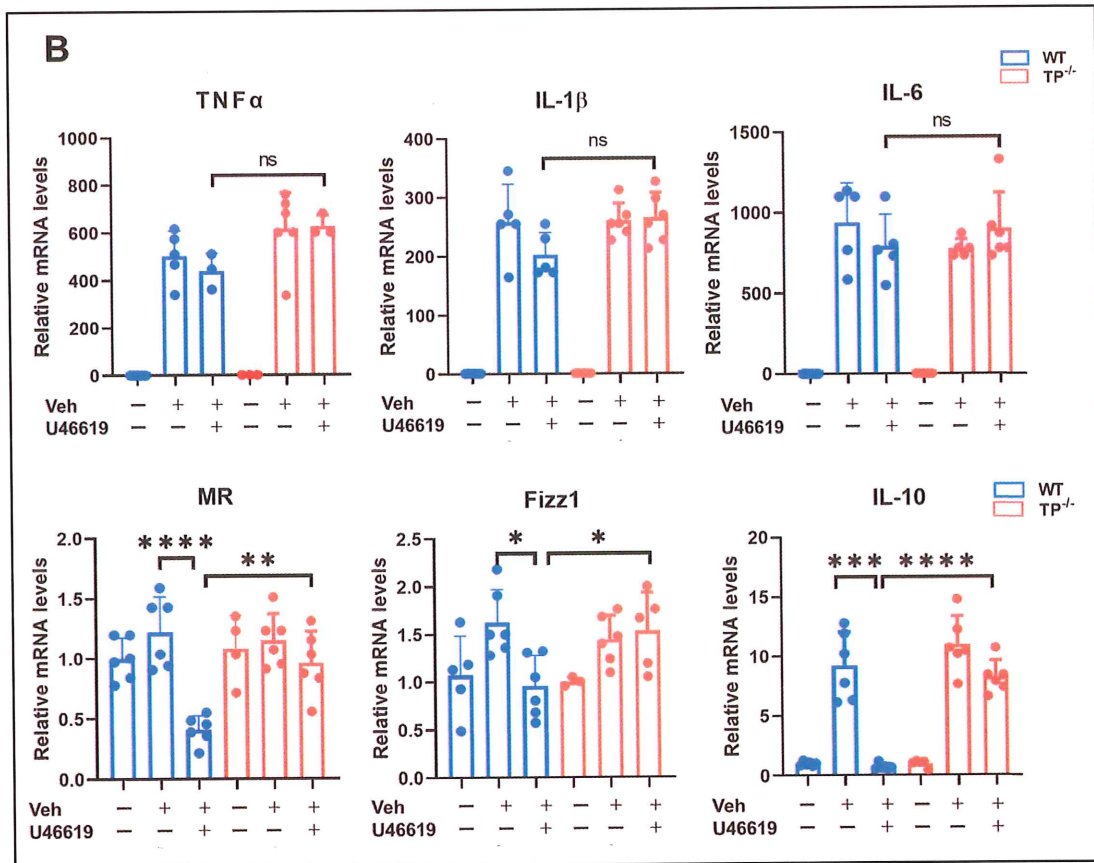


図 9. 培養マクロファージにおける血管増殖因子群(VEGFs)と炎症性・抗炎症性マクロファージ表現型関連遺伝子。

(B) WT および TP^{-/-}マウスの培養骨髄由来マクロファージにおける、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin (IL) -1 β 、IL-6 などの炎症性マクロファージ関連遺伝子、および mannose receptor (MR)、Fizz1、IL-10 などの抗炎症性マクロファージ関連遺伝子の発現レベルに対する U46619 (100 nM) の効果。データは 2 回の独立した実験の平均値 \pm SD で表され、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) に Tukey 検定を加えて解析した。* $p < 0.05$, *** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$, ***** $p < 0.0001$ 。

WT, wild-type; TP, thromboxane prostanoid; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; MR, mannose receptor.

4. 考察

子宮内膜症進展には子宮内膜病変内の血管新生とリンパ管新生の両者が関与している。最近の研究で、TP 受容体シグナルが炎症や腫瘍増殖などの病態時に血管新生を促進することが報告された(19,25,26)。またリンパ管新生についても、マウス腹膜炎時の横隔膜において、TP 受容体シグナルがリンパ管新生を促進することが明らかにされた(20)。さらに、本研究により、内因性の TP 受容体シグナルを阻害すると、子宮内膜移植片の発育に加えて、移植片における血管新生とリンパ管新生が促進されることが子宮内膜症マウスモデルを用いることにより、明らかになった。さらに TXS 阻害薬と投与すると、子宮内膜移植片の発育と移植片内の血管新生およびリンパ管新生が促進した。血管およびリンパ管新生に関与するマクロファージに注目すると、子宮内膜移植片に集積した TP 受容体欠損マクロファージは抗炎症性マクロファージの表現型を示し、血管新生とリンパ管新生に関与するサイトカイン発現を亢進していた。これらの所見は、TP 受容体シグナルの活性化は子宮内膜移植片の発育を抑制し、移植片内の血管新生およびリンパ管新生を減少させることを示唆している。

子宮内膜症の根本的なメカニズムは不明であるが、子宮内膜症病変における血管新生とリンパ管新生が、その進展に寄与している。血管新生促進因子 VEGF-A は子宮内膜症の患者やマウスで発現が上昇している。VEGF-A と VEGFR1 受容体シグナルを阻害すると、子宮内膜移植片の発育と移植片における血管新生が抑制される(6)。さらに、リンパ管新生促進因子である VEGF-C と VEGF-D は、子宮内膜症のヒトとマウスにおいて増加している(9)。またマウス異所性子宮内膜症モデルにおいて VEGFR3 受容体シグナルを阻害すると、子宮内膜症の進展と子宮内膜病変における新生リンパ管形成が抑制された(8)。さらに子宮内膜症は、血管新生およびリンパ管新生促進遺伝子の過剰発現と関連していた(27)。これら所見に一致して、我々の本研究結果でも、子宮内膜移植片組織における血管新生とリンパ管新生の促進が子宮内膜症進展と関連していることが明らかになった。

子宮内膜症病変内の血管新生とリンパ管新生には子宮内膜間質細胞が関与している。これまでの報告により、子宮内膜症病変におけるマクロファージの集積は新生血管と関連していることが示されており(6,8,9)、また骨髓由来マクロファージが子宮内膜症と血管新生に関与していると報告されている(6)。一方で、腹腔内マクロファージの LPM(Large peritoneal macrophages)が子宮内膜症に関与するとの報告もある(28)。従って、子宮内膜症組織における集積マクロファージの由来については、今後さらなる検討が必要である。さらに、集積するマクロファージにも、特定の表現型を示すマクロファ

ージが子宮内膜症進展に重要である(28)。本研究の結果から、抗炎症性マクロファージ（これまで古典的に知られている因子とは異なる因子によって活性化されるマクロファージと考えられるので代替活性化マクロファージとも呼称される）が子宮内膜症進展に寄与していることが示唆された。マウス子宮内膜症モデルでは、抗炎症性マクロファージは子宮内膜症病変の発育を促進し、一方、炎症性マクロファージは子宮内膜症の進展を抑制した(29)。また、CD206 を発現する抗炎症性マクロファージを欠損させると、子宮内膜症病変は縮小した(30)。さらに、マクロファージの表現型は子宮内膜症の進行とともに変化する。炎症性マクロファージは子宮内膜組織移植後 14 日以内に腹腔内に出現し、移植後 14 日目に抗炎症性マクロファージに切り替わったという報告がある(31)。しかし、マクロファージの表現型を炎症性か抗炎症性かに区分する仕方で単純化しすぎると、組織におけるマクロファージの多様性を理解することが難しくなる。最近のシングルセル解析の進歩により、ヒト子宮内膜症病変におけるマクロファージには 5 つの異なる亜集団が存在する可能性が示され、子宮内膜症進展におけるマクロファージの不均一性が示唆されている(32)。子宮内膜症進展に関与するマクロファージの表現型を決定するためには、さらなる研究が必要である。

COX-2 は子宮内膜症の発症に関与する(11)。子宮内膜症患者では、その発現が子宮内膜症組織で上昇している(12)。COX-2 阻害薬は、げっ歯類の子宮内膜移植モデルにおいて、子宮内膜移植片の発育、血管密度ならびに VEGF-A の発現を減少させた(7,33,34)。さらに、mPGES-1 欠損マウスでは、子宮内膜移植片における VEGF-A 発現が抑制されることで、子宮内膜症の発育と血管新生が抑制された(7)。これらの所見は、COX-2/mPGES-1 由来の PGE₂ が血管新生を促進することによって子宮内膜症の発症に寄与していることを示している。しかし、子宮内膜症の病態における TXA₂ の役割については、まだ解明されていない。本研究の結果により、TP 受容体シグナルまたは TXS 阻害が、子宮内膜症病変における子宮内膜移植片の発育、血管新生およびリンパ管新生を促進することが明らかになった。

病態時では、TP 受容体シグナルは血管新生促進作用と抗血管新生作用の両方の作用がある(35)。一方では TP 受容体シグナルは腫瘍増殖と血管新生を促進する。TXA₂ は腫瘍細胞からの VEGF-A の分泌を促進する(26)。血小板由来の TXA₂ は、後肢虚血(19)や胃潰瘍(15)後の血管新生と血流回復を促進する。また他方で、内皮細胞の TP 受容体の活性化は細胞の遊走と増殖を減少させる(36)。TP 受容体シグナルの活性化は、ヒト臍帯静脈内皮細胞の血管新生促進能を阻害する。内皮細胞における TP 受容体シグナルを欠損させると、in vivo での VEGF 誘導血管新生が促進される。さらに、TP 受容体の活性化はヒト臍帯静脈内皮細胞における VEGFR2 の発現を減少させるが、TP 受容体のノ

ックダウンはその発現を増加させる(37,38)。本研究では、TP 受容体シグナル阻害が、子宮内膜移植片の間に蓄積したマクロファージからの VEGF-A の産生を介して血管新生を促進することを示した。培養骨髄マクロファージでは、VEGF-A 発現は TP 受容体シグナルを介して減少した。TP 受容体は子宮内膜移植片の微小血管には発現していなかったため、TP シグナルを活性化しても、内皮における血管新生促進機能を直接誘導することはできなかったが、子宮内膜移植片に集積したマクロファージから血管新生促進因子が放出されることによって、間接的に血管新生が誘導された。

COX-2 阻害は、マウス尾と耳における炎症誘発性リンパ浮腫を遷延させ(13,14)、COX-2 由来の PGE_2 はリンパ管新生に関与していた(39)。内因性 TXA_2 に関しては、最近の研究で、マクロファージにおける TP 受容体シグナルが、エンドトキシン誘発性腹膜炎における横隔膜組織内のリンパ管新生を促進することが示されている(20)。一方で、本研究の異所性子宮内膜症モデルマウスでは、TP 受容体シグナル阻害によりリンパ管新生が促進され、培養骨髄由来マクロファージでは TP 受容体シグナルを介して VEGF-C と VEGF-D 発現レベルが低下した。また TP 受容体発現はリンパ管ではなく、子宮内膜間質のマクロファージに観察された。これらの所見は、内膜症病変に集積するマクロファージにおける TP 受容体シグナルが、子宮内膜症におけるリンパ管新生を抑制することを示唆している。このように本研究の結果はこれまでとは矛盾した結果が得られているが、使用した実験系やマウスの性別の違いなどの要因によるかもしれない。また炎症性マクロファージが傷害部位の新生リンパ管形成を阻害する可能性があるため、炎症性マクロファージの子宮内膜移植片への動員が、リンパ管新生を阻害する可能性がある(40)。

マクロファージを PGE_2 で刺激すると、その表現型が炎症性から抗炎症性へと変化的ことが報告されている(16,41)が、マクロファージの表現型変換に対する TP 受容体シグナルの影響についてはほとんど知られていない。本研究の結果は、TP 受容体シグナル遮断が、子宮内膜症における抗炎症性マクロファージ関連遺伝子発現や CCL2 発現を増強させることを示唆した。CCL2 発現増強は、子宮内膜症女性の子宮内膜(42)および女性由来の子宮内膜間質組織、ならびに子宮内膜症モデルマウス(43)で観察されており、子宮内膜移植片組織の子宮内膜腺および間質細胞が CCL2 の供給源であることが示唆された。さらに、抗炎症性マクロファージの動員は、子宮内膜病変における CCL2 発現増強と関連しており、CCR2 阻害薬 RS102895 は、子宮内膜症マウスの子宮内膜増殖を抑制した(43)。これらのデータは、CCL2/CCR2 経路を介した子宮内膜症病変における抗炎症性マクロファージの集積が、子宮内膜症進展を促進することを示唆している。TP^{-/-}マウスの子宮内膜移植片組織への抗炎症性マクロファージ動員における CCL2/CCR2 経

路の役割解明には、さらなる研究が必要である。TP 受容体アゴニストである U46619 の投与は、TK^{-/-}マウスに比べ、WT マウスの培養骨髓由来マクロファージで抗炎症性マクロファージ関連遺伝子発現を減少させたことから、TP 受容体シグナルの阻害によって、抗炎症性マクロファージが優位な状態になることが示唆された。炎症性マクロファージ関連遺伝子の発現は変化しなかった。これとは対照的に、以前の研究において、雄マウスから単離したチオグリコールによって誘導された腹腔マクロファージでは、U46619 による TP 受容体刺激は炎症性マクロファージ関連遺伝子発現を増加させた(44)。これら相異なった結果が得られたことについては、マクロファージの性差や由来、病態や TP 受容体アゴニスト投与前の刺激の有無などに起因している可能性があるもの考えられる。

5. 総括

結論として、本研究の結果から、TP 受容体シグナル阻害が、子宮内膜症病変における血管新生およびリンパ管新生を促進することにより、子宮内膜症進展を促進することが分かった。TP 受容体シグナル阻害は、血管内皮およびリンパ管内皮には直接的には影響せず、抗炎症性マクロファージを子宮内膜病変へ集積させた。TP 受容体作動薬は、培養骨髄マクロファージにおける抗炎症性マクロファージ関連遺伝子および血管・リンパ管新生関連遺伝子の発現を減少させた。したがって、子宮内膜症進展と血管新生およびリンパ管新生は、抗炎症性マクロファージにおける TP 受容体シグナル阻害によって引き起こされている可能性が高い。しかし、この可能性を確認するためには、さらなる研究が必要である。

子宮内膜症の治療には、鎮痛剤による対症療法、ホルモン療法、手術療法などがあるが、ホルモン療法や手術療法は挙児を希望する女性に対しては選択しにくい場合があり、より有効な治療法が望まれる。アゴニストによる選択的な TP 受容体活性化が子宮内膜症の発育を抑制することを考えると、TP 受容体シグナルを標的とすることは、子宮内膜症の治療にとって実行可能な選択肢であるかもしれない。TP 受容体シグナルを標的とした子宮内膜症進展の制御は、新たな子宮内膜症治療への足がかりとなり、子宮内膜症に悩む女性の治療の選択肢が広がることが期待される。

6. 謝辞

本論文の作成にあたり、貴重なご指導・御鞭撻を賜りました、産婦人科学教室「婦人科学」加藤一喜教授、「産科学」海野信也前教授に深謝いたします。また、常に適切な御助言と丁寧な御指導をくださいました薬理学教室 天野英樹教授に深く感謝いたします。本研究の遂行にあたり、実験手技、検体処理、試料作成などにつきましては、薬理学教室の馬嶋正隆前教授、伊藤義也先生、細野加奈子先生、同教室技術員の荻野三智子さん、吉川恭子さんに、常に丁寧でかつ細部にわたったご指導とサポートをいただきました。産婦人科教室の服部響子先生、本田雅子先生、関口和企先生、同教室技術員の佐藤絵理奈さんには、これまで蓄積されてきた研究内容の仔細を教示いただくとともに、実験への沢山のご協力と温かい励ましをいただきました。心より感謝申し上げます。また、本研究に必要不可欠であった TP 受容体ノックアウトマウスを提供していただきました、京都大学大学院医学研究科創薬医学講座 成宮周特任教授に、深く感謝いたします。

7. 引用文献

1. Saunders PTK, Horne AW: Endometriosis: Etiology, pathobiology, and therapeutic prospects. *Cell* 184 2021; 2807-2824.
2. Zondervan KT, Becker CM, Missmer SA: Endometriosis. *N Engl J Med* 2020; 382: 1244-1256.
3. Taylor HS, Kotlyar AM, Flores VA: Endometriosis is a chronic systemic disease: Clinical challenges and novel innovations. *Lancet* 2021; 397: 839-852.
4. Hey-Cunningham AJ, Peters KM, Zevallos HB, Berbic M, Markham R, Fraser IS: Angiogenesis, lymphangiogenesis and neurogenesis in endometriosis. *Front Biosci (Elite Ed)* 2013; 5: 1033-1056.
5. Chung MS, Han SJ: Endometriosis-associated angiogenesis and anti-angiogenic therapy for endometriosis. *Front Glob Womens Health* 2022; 3: 856316.
6. Sekiguchi K, Ito Y, Hattori K, Inoue T, Hosono K, Majima M, et al: VEGF receptor 1-expressing macrophages recruited from bone marrow enhances angiogenesis in endometrial tissues. *Sci Rep* 2019; 9: 7037.
7. Numao A, Hosono K, Suzuki T, Hayashi I, Uematsu S, Majima M, et al: The inducible prostaglandin E synthase mPGES-1 regulates growth of endometrial tissues and angiogenesis in a mouse implantation model. *Biomed Pharmacother* 2011; 65: 77-84.
8. Hattori K, Ito Y, Honda M, Sekiguchi K, Hosono K, Majima M, et al: Lymphangiogenesis induced by vascular endothelial growth factor receptor 1 signaling contributes to the progression of endometriosis in mice. *J Pharmacol Sci* 2020; 143: 255-263.
9. Honda M, Ito Y, Hattori K, Hosono K, Sekiguchi K, Majima M, et al: Inhibition of receptor activity-modifying protein 1 suppresses the development of endometriosis and the formation of blood and lymphatic vessels. *J Cell Mol Med* 2020; 24: 11984-11997.
10. Motohashi E, Kawauchi H, Endo H, Kondo H, Kitasato H, Hayashi I, et al: Regulatory expression of lipoxin A4 receptor in physiologically estrus cycle and pathologically endometriosis. *Biomed Pharmacother* 2005; 59: 330-338.
11. Lai ZZ, Yang HL, Ha SY, Chang KK, Mei J, Li MQ, et al: Cyclooxygenase-2 in endometriosis. *Int J Biol Sci* 2019; 15: 2783-2797.
12. Lousse JC, Defrere S, Colette S, Van Langendonck A, Donnez J, et al: Expression of eicosanoid biosynthetic and catabolic enzymes in peritoneal endometriosis. *Hum Reprod* 2010; 25: 734-741.

13. Hosono K, Suzuki T, Tamaki H, Sakagami H, Hayashi I, Majima M, et al: Roles of prostaglandin E2-EP3/EP4 receptor signaling in the enhancement of lymphangiogenesis during fibroblast growth factor-2-induced granulation formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 1049-1058.
14. Kashiwagi S, Hosono K, Suzuki T, Takeda A, Uchinuma E, Majima M: Role of COX-2 in lymphangiogenesis and restoration of lymphatic flow in secondary lymphedema. *Lab Invest* 2011; 91: 1314-1325.
15. Ae T, Ohno T, Hattori Y, Suzuki T, Hosono K, Majima M, et al: Role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in the facilitation of angiogenesis and the healing of gastric ulcers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 299: G1139-G1146.
16. Hosono K, Isonaka R, Kawakami T, Narumiya S, Majima M: Signaling of prostaglandin E receptors, EP3 and EP4 facilitates wound healing and lymphangiogenesis with enhanced recruitment of M2 macrophages in mice. *PLoS One* 2016; 11: e0162532.
17. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F: Prostanoid receptors: Structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999; 79: 1193-1226.
18. Szczuko M, Koziol I, Kotlega D, Brodowski J, Drozd A: The role of thromboxane in the course and treatment of ischemic stroke: Review. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 11644.
19. Amano H, Ito Y, Eshima K, Kato S, Ogawa F, Shibuya M, et al: Thromboxane A2 induces blood flow recovery via platelet adhesion to ischaemic regions. *Cardiovasc Res* 2015; 107: 509-521.
20. Matsuda H, Ito Y, Hosono K, Tsuru S, Inoue T, Majima M, et al: Roles of thromboxane receptor signaling in enhancement of lipopolysaccharide-induced lymphangiogenesis and lymphatic drainage function in diaphragm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2021; 41: 1390-1407.
21. Takayama K, Yuhki K, Ono K, Fujino T, Hara A, Takahata O, et al: Thromboxane A2 and prostaglandin F2alpha mediate inflammatory tachycardia. *Nat Med* 2005; 11: 562-566.
22. Navarro KL, Huss M, Smith JC, Sharp P, Marx JO, Pacharinsak C, et al: Mouse anesthesia: The art and science. *ILAR J* 2021; 62: 238-273.
23. Schmittgen TD, Livak KJ: Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3: 1101-1108.
24. Wigle JT, Oliver G: Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 1999; 98: 769-778.
25. Majima M, Hosono K, Ito Y, Amano H: Biologically active lipids in the regulation of lymphangiogenesis in disease states. *Pharmacol Ther* 2022; 232: 108011.

26. Wei J, Yan W, Li X, Ding Y, Tai HH: Thromboxane receptor alpha mediates tumor growth and angiogenesis via induction of vascular endothelial growth factor expression in human lung cancer cells. *Lung Cancer* 2010; 69: 26-32.
27. Fonseca MAS, Haro M, Wright KN, Lin X, Abbasi F, Sun J, Choi-Kuaea Y, et al: Single-cell transcriptomic analysis of endometriosis. *Nat Genet* 2023; 55: 255-267.
28. Hogg C, Horne AW, Greaves E: Endometriosis-associated macrophages: Origin, phenotype, and function. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020; 11: 7.
29. Bacci M, Capobianco A, Monno A, Cottone L, Di Puppo F, Ferrari S, et al: Macrophages are alternatively activated in patients with endometriosis and required for growth and vascularization of lesions in a mouse model of disease. *Am J Pathol* 2009; 175: 547-556.
29. Bacci M, Capobianco A, Monno A, Cottone L, Di Puppo F, Ferrari S, et al: Macrophages are alternatively activated in patients with endometriosis and required for growth and vascularization of lesions in a mouse model of disease. *Am J Pathol* 2009; 175: 547-556.
30. Ono Y, Yoshino O, Hiraoka T, Akiyama I, Sato E, Onda T, et al: IL-33 exacerbates endometriotic lesions via polarizing peritoneal macrophages to M2 subtype. *Reprod Sci* 2020; 27: 869-876.
31. Johan MZ, Ingman WV, Robertson SA and Hull ML: Macrophages infiltrating endometriosis-like lesions exhibit progressive phenotype changes in a heterologous mouse model. *J Reprod Immunol* 2019; 132: 1-8.
32. Tan Y, Flynn WF, Sivajothi S, Luo D, Bozal SB, Courtois ET, et al: Single-cell analysis of endometriosis reveals a coordinated transcriptional programme driving immunotolerance and angiogenesis across eutopic and ectopic tissues. *Nat Cell Biol* 2022; 24: 1306-1318.
33. Machado DE, Berardo PT, Landgraf RG, Fernandes PD, Palmero C, Nasciutti LE, et al: A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an antiangiogenic effect in a rat model. *Fertil Steril* 2010; 93: 2674-2679.
34. Olivares C, Ricci A, Bilotas M, Baranao RI, Meresman G, et al: The inhibitory effect of celecoxib and rosiglitazone on experimental endometriosis. *Fertil Steril* 2011; 96: 428-433.
35. Ashton AW, Zhang Y, Cazzolli R, Honn KV: The role and regulation of thromboxane A2 signaling in cancer-trojan horses and misdirection. *Molecules* 2022; 27: 6234.

36. Ashton AW, Yokota R, John G, Zhao S, Suadican SO, Ware JA, et al: Inhibition of endothelial cell migration, intercellular communication, and vascular tube formation by thromboxane A(2). *J Biol Chem* 1999; 274: 35562-35570.
37. Tsou PS, Amin MA, Campbell PL, Zakhem G, Balogh B, Fox DA, et al: Activation of the thromboxane A2 receptor by 8-isoprostane inhibits the pro-angiogenic effect of vascular endothelial growth factor in scleroderma. *J Invest Dermatol* 2015; 135: 3153-3162.
38. Eckenstaler R, Ripperger A, Hauke M, Petermann M, Hemkemeyer SA, Koeberle A, et al: A thromboxane A2 receptor-driven COX-2-dependent feedback loop that affects endothelial homeostasis and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2022; 42: 444-461.
39. Matsuda H, Hosono K, Tsuru S, Kurashige C, Sekiguchi K, Majima M, et al: Roles of mPGES-1, an inducible prostaglandin E synthase, in enhancement of LPS-induced lymphangiogenesis in a mouse peritonitis model. *Life Sci* 2015; 142: 1-7.
40. Mishima T, Ito Y, Nishizawa N, Amano H, Tsujikawa K, Majima M, et al: RAMP1 signaling improves lymphedema and promotes lymphangiogenesis in mice. *J Surg Res* 2017; 219: 50-60.
41. Nishizawa N, Ito Y, Eshima K, Ohkubo H, Kojo K, Akira S, et al: Inhibition of microsomal prostaglandin E synthase-1 facilitates liver repair after hepatic injury in mice. *J Hepatol* 2018; 69: 110-120.
42. Jolicoeur C, Boutouil M, Drouin R, Paradis I, Lemay A, Akoum A: Increased expression of monocyte chemotactic protein-1 in the endometrium of women with endometriosis. *Am J Pathol* 1998; 152: 125-133.
43. Gou Y, Li X, Li P, Zhang H, Xu T, Zhang Z, et al: Estrogen receptor β upregulates CCL2 via NF- κ B signaling in endometriotic stromal cells and recruits macrophages to promote the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod* 2019; 34: 646-658.
44. Minamino T, Ito Y, Ohkubo H, Hosono K, Suzuki T, Narumiya S, et al: Thromboxane A (2) receptor signaling promotes liver tissue repair after toxic injury through the enhancement of macrophage recruitment. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 259: 104-114.

8. 表 I

Gene	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
TP	CCTCCTGCTCAACACCGTTAG	CTGAACCATCATCTCCACCTC
TXS	GGATTCTGCCCAATAAGAACC	GAAGTCTCTCCGCCTCTCTTC
VEGF-A	ACGACAGAAGGAGAGCAGAAG	ATGTCCACCAGGGTCTCAATC
VEGF-C	TCTGTGTCCAGCGTAGATGAG	GTCCCCTGTCCTGGTATTGAG
VEGF-D	CCTATTGACATGCTGTGGGAT	GTGGGTTTCCTGGAGGTAAGAG
CD31	CAGAGCCAGCAGTATGAGGAC	GCAACTATTAAGGTGGCGATG
VEGFR2	CTGCCTACCTCACCTGTTTCC	CGGCTCTTTCGCTTACTGTTC
VEGFR3	GGAAGGCTCTGAAGATAAAGG	ACAGAAGATGAGCAGGAGGAG
LYVE-1	GCTCTCCTCTTCTTTGGTGCT	TGACGTCATCAGCCTTCTCTT
Prox1	GTTCTTTTACACCCGCTACCC	ACTCACGGAAATTGCTGAACC
CCL2	CGGAACCAAATGAGATCAGAA	TTGTGGAAAAGGTAGTGGATG
CCR2	TTACCTCAGTTCATCCACGGC	CAAGGCTCACCATCATCGTAG
TNF α	TCTTCTCATTCCTGCTTGTGG	GATCTGAGTGTGAGGGTCTGG
IL-1 β	TACATCAGCACCTCACAAGCA	CCAGCCCATACTTTAGGAAGA
IL-6	CAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG	TAGGAGAGCATTGGAAATTGG
MR	TTTGTCCATTGCACTTTGAGG	TGCCAGGTTAAAGCAGACTTG
Fizz1	CAAGGAACTTCTTGCCAATCCA G	CCAAGATCCACAGGCAAAGCCA
IL-10	CGGAAATGATCCAGTTTTACC	TGAGGGTCTTCAGCTTCTCAC
GAPDH	ACATCAAGAAGGTGGTGAAGC	AAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG

表 I : PCR に使用したプライマーの塩基配列

TP, thromboxane prostanoid; TXS, thromboxane synthase; VEGF, vascular endothelial growth factor; CD, cluster of differentiation; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor; LYVE-1, lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1; Prox1, prospero-related homeobox 1; CCL2, C-C motif chemokine 2; CCR2, C-C motif chemokine receptor 2; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; IL-1 β , interleukin 1 β ; MR, mannose receptor; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.