

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名 本田 雅子



論 文 題 目

Inhibition of receptor activity-modifying protein 1 suppresses the development of endometriosis and the formation of blood and lymphatic vessels

(RAMP1 阻害は子宮内膜症進展と血管およびリンパ管形成を抑制する)

指 導 教 授 承 認 印

海野 信也



# Inhibition of receptor activity-modifying protein 1 suppresses the development of endometriosis and the formation of blood and lymphatic vessels

(RAMP1 阻害は子宮内膜症進展と血管およびリンパ管形成を抑制する)

氏名 本田 雅子

(以下要旨本文)

## 【背景】

子宮内膜症は、子宮内膜およびその類似組織が子宮内膜層以外の場所で増殖する疾患である。生殖年齢の 5~10%が罹患し、月経困難症や不妊症の原因となり、女性の QOL を著しく低下させる。一方、痛みや炎症などの侵害刺激は知覚神経終末からカルシトニン遺伝子関連ペプチド (Calcitonin gene-related peptide, CGRP) などの神経ペプチドを遊離する。子宮内膜症患者の子宮内膜病巣内には、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(以下 CGRP)陽性神経線維が存在するという報告があり、CGRP が子宮内膜症関連疼痛に関与していることが考えられる。知覚神経から遊離される CGRP は、受容体活性調節蛋白 1 (Receptor activity modifying protein 1, RAMP1) を介して作用を発揮する。我々はこれまでに RAMP1 が免疫細胞に発現し、血管およびリンパ管新生を増強して創傷治癒を促進することを見出した。しかし、血管新生/リンパ管新生の調節と子宮内膜症の発症における RAMP1 シグナル伝達の役割は解明されていない。本研究では、内因性 CGRP が子宮内膜症と血管新生/リンパ管新生に関与しているかどうかを調べた。

## 【目的】

子宮内膜症における RAMP1 受容体シグナルの役割と血管およびリンパ管新生の制御機構を解明することを目的とした。

## 【方法】

8 週令の雌性 RAMP1 ノックアウトマウス(RAMP1<sup>-/-</sup>)と雌性野生型マウス(WT)を用い、子宮内膜症モデルマウスを作成した。卵巣を摘出した宿主マウスにドナーマウスから採取した子宮内膜移植片を宿主の腹膜に縫合固定する。これまでの検討で移植 14 日後(Day14)の移植片面積が最大になっていたため、検体は Day14 に採取し、免疫染色や real time PCR 法等を用いて検討した。

## 【結果】

### 1) 子宮内膜移植片における RAMP1 の役割

Implant/Host で 4 通りの組み合わせで子宮内膜症モデルを作成したところ、RAMP1<sup>-/-</sup>→RAMP1<sup>-/-</sup>の移植片が最も小さくなった。また、移植片における RAMP1 発現を測定したところ RAMP1 の mRNA レベルは Day14 にピークに達した。この結果から移植片および宿主側の RAMP1 シグナルが子宮内膜症進展に関与している可能性が示唆された。RAMP1 は、主に移植片の間質組織および移植された組織との境界で発現しており、蛍光二重染色では RAMP1 は CD11b および S100A4 と共発現していた。これはマクロファージまたは線維芽細胞がそれぞれ移植片の RAMP1 発現細胞であることを示唆している。一方、CGRP は神経系の後根神経節で産生される。そこで、L1-L5 椎骨後根神経節での CGRP の発現を、抗 CGRP 抗体による免疫染色で評価した。CGRP の発現は WT→WT および RAMP1<sup>-/-</sup>→RAMP1<sup>-/-</sup>共に Day0 と比較して Day14 で増強した。また、移植片を抗 CGRP 抗体で免疫染色すると CGRP 陽性神経線維が、腹壁から移植片内に伸長するように観察された。これは WT→WT、RAMP1<sup>-/-</sup>→RAMP1<sup>-/-</sup>共に同様の結果であった。これらの結果から、CGRP は RAMP1 シグナル伝達経路を介して子宮内膜症の進行に関与することが示唆された。

### 2) 子宮内膜移植片の血管新生は、RAMP1<sup>-/-</sup>→RAMP1<sup>-/-</sup>で抑制された

移植片を血管内皮マーカー CD31 で染色したところ、CD31 陽性細胞数は WT→WT に比較して RAMP1<sup>-/-</sup>→RAMP1<sup>-/-</sup>で減少した。また、血管密度の定量評価でも同様の結果であった。血管新生関連マーカーについて PCR で検討したところ、CD31、VEGFR2 発現は RAMP1<sup>-/-</sup>→RAMP1<sup>-/-</sup>で抑制され、血管新生因子 VEGF-A とその受容体 VEGFR1 の発現も抑制された。一方、RAMP1 と CD31 の蛍光二重染色では共発現せず、RAMP1 は VEGF-A と共発現した。このことから、RAMP1 シグナルは直接血管内皮を増殖させるのではなく、VEGF-A を産生することにより血管新生が促進されることが示唆された。

### 3) 子宮内膜移植片のリンパ管新生は RAMP1<sup>-/-</sup>→RAMP1<sup>-/-</sup>で抑制された

移植片をリンパ管内皮マーカーである抗 LYVE-1 抗体で染色したところ、LYVE-1 陽性細胞数は WT→WT に比較して RAMP1<sup>-/-</sup>→RAMP1<sup>-/-</sup>で減少した。またリンパ管新生関連因子 LYVE-1、VEGFR3 および Prox1 の mRNA レベルも、RAMP1<sup>-/-</sup>→RAMP1<sup>-/-</sup>で抑制された。リンパ管新生促進因子である VEGF-C および D の発現も同様の結果であった。一方、RAMP1 と LYVE-1 の蛍光二重染色では共発現せず、RAMP1 発現は VEGF-C および D と共発現することがわかった。これらの結果は、RAMP1 シグナルはリンパ管内皮を直接刺激して増殖・新生するのではなく、VEGF-C および D の発現を誘導することによりリンパ管新生を促進させることを示唆している。



#### 4) 移植片内のマクロファージと線維芽細胞の動員

移植片における、CD11b 陽性細胞（マクロファージ）数と S100A4 陽性細胞（線維芽細胞）数を調べるところ、CD11b 陽性細胞数、S100A4 陽性細胞数共に WT→WT に比較し RAMP1-/-→RAMP1-/- で抑制された。

#### 5) マクロファージおよび線維芽細胞は、血管およびリンパ管新生のサイトカインを発現する

Day14 の WT→WT 移植片における蛍光二重染色の結果、マクロファージと線維芽細胞は、それぞれ VEGF-A、C および D と共発現した。これによりマクロファージと線維芽細胞は、VEGF-A、C および D の産生に関与することが示唆された。

#### 6) 培養マクロファージおよび培養線維芽細胞における VEGF の発現

WT の骨髄由来培養マクロファージを CGRP で刺激すると VEGF-A、C および D の mRNA レベルは増加した。しかし RAMP1-/- の骨髄由来マクロファージは増加しなかった。これは、培養マクロファージが RAMP1 に依存して VEGF-A、C および D を増強することを示している。

一方、培養 L929 線維芽細胞における VEGF-A の mRNA レベルは、CGRP によりわずかに抑制され、CGRP 受容体アンタゴニスト CGRP8-37 の添加により回復した。また VEGF-C および D の mRNA レベルは、CGRP により増加し、CGRP8-37 の添加により VEGF-C は減少し、VEGF-D には影響しなかった。これらの結果は、培養線維芽細胞は CGRP 受容体シグナル伝達を介して VEGF-C を増加させるが、VEGF-A や D の発現は増加させないことを示唆している。

#### 7) CGRP 受容体の阻害は、移植片の成長と血管新生/リンパ管新生を抑制する

最後に、子宮内膜症における CGRP/RAMP1 シグナルの役割を、CGRP 受容体拮抗薬である CGRP8-37 を用いて確認した。CGRP8-37 を移植後 2 週間、持続投与した WT→WT における子宮内膜移植片のサイズは vehicle 投与に比較して減少し、また移植片の血管新生/リンパ管新生も抑制した。CGRP8-37 投与下では、CD31、VEGF-A および VEGFR2 の mRNA レベルを低下させ、さらに VEGF-C、VEGF-D、VEGFR3、LYVE-1 および Prox1 の発現も低下させた。

#### 【考察】

本研究では、RAMP1 シグナルが子宮内膜移植片の血管新生/リンパ管新生を促進することで、子宮内膜症が進展することをマウス子宮内膜症モデルで示した。この中で、RAMP1 陽性マクロファージと線維芽細胞が内膜移植片の間質に集積することが、子宮内膜症の進展と血管新生/リンパ管新生の重要なドライバーであることが示された。

さらに、CGRP の阻害は、移植片の成長と血管新生およびリンパ管新生を抑制した。これらは、RAMP1 シグナルの遮断が子宮内膜症の治療のための有望な戦略になることを示唆している。

子宮内膜症が骨盤痛を伴うということは、知覚神経系がその病因に深く関与していることを意味する。ヒトおよびげっ歯類における子宮内膜症病変には、知覚神経を含む数種類の神経線維によって神経支配されていることが報告された。本研究では WT → WT および RAMP1<sup>-/-</sup> → RAMP1<sup>-/-</sup>における後根神経節で CGRP が産生されること、さらに子宮内膜移植片が増大するにつれて移植片内に向けて CGRP 陽性神経が宿主の腹壁から伸長することを見いだすことができた。このことは、神経ペプチド CGRP による神経支配と、RAMP1 シグナルが子宮内膜症の発症および維持に重要であることを示している。

血管新生は、子宮内膜症においても重要な役割を果たす。本研究においては RAMP1 シグナルが、移植片内にマクロファージを動員させ、この集積マクロファージから血管内皮増殖因子 VEGF-A 発現を RAMP1 依存性に誘導することにより、移植片の血管新生を促進させた。また本研究での子宮内膜症の進展において、血管新生がリンパ管新生に先行したことは注目に値する。宿主組織に生着する移植片内の血管の新たな形成が、移植片の最初の生着に不可欠なステップであることを示唆している。さらに集積する線維芽細胞も RAMP1 シグナルを介して血管新生を増強させ子宮内膜症進展に寄与する可能性を見いだした。したがって、免疫細胞は、RAMP1 シグナルを介して血管新生と子宮内膜症の進行に寄与し、神経免疫相互作用が子宮内膜症の病因において重要な役割を果たすことを示している。

子宮内膜症の発症と進行における新生リンパ管の役割については、血管新生と比較すると、ほとんど知られていなかった。最近、我々は VEGFR3 遮断薬によりリンパ管新生を阻害すると子宮内膜症進展も抑制することを見いだした。本研究では移植片に集積したマクロファージおよび線維芽細胞が VEGF-C および VEGF-D を含むリンパ管新生促進因子の産生を誘導することによってリンパ管新生を促進している。これらの結果は、神経免疫のクロストークが子宮内膜症の進行中に血管新生だけでなくリンパ管新生も調節することを示唆している。

CGRP 受容体拮抗薬 CGRP8-37 を投与したマウスでは子宮内膜移植片の成長と血管新生/リンパ管新生を有意に抑制した。最近、RAMP1 シグナルは、片頭痛の治療に対して臨床的にも注目にされている。RAMP1 シグナルの遮断が子宮内膜症患者を慢性骨盤痛から解放し、CGRP/RAMP1 経路が新しい治療法を提供できるかどうかを評価するためにはさらなる研究が必要と考える。さらに、子宮内膜症病変の発生におけ

る CGRP/RAMP の役割は、ヒト子宮内膜症組織で再現および検証する必要があると考える。

#### 【結論】

子宮内膜移植片内のマクロファージや線維芽細胞は、RAMP1 シグナルを介して血管新生因子 VEGF-A やリンパ管新生因子 VEGF-C/D を産生し脈管新生を促進させ、子宮内膜症の進展に関与するものと考えた。本研究結果から、RAMP1 シグナル阻害が子宮内膜症治療のための有望な選択肢となる可能性があると考ええる。