

Mini Review

子宮内膜症における MAPK を介する炎症の解析と新たな治療戦略

吉野 修, 大須賀 穰, 矢野 哲, 堤 治, 武谷雄二

東京大学医学部産婦人科学

p38 MAPK might be at play as a pivotal intracellular signal transducer in endometriosis

Given the current theory of inflammatory changes being involved in the progression of endometriosis, MAPKs might be at play as pivotal intracellular signal transducers in endometriotic cells and thus have a pathophysiological role in the disease. *In vitro* study using endometriotic cell, all the MAPK inhibitors examined suppressed IL-1 α -induced secretion of IL-6 and IL-8, and IL-1 α -induced expression of COX-2 in endometriotic cells. Among MAPK inhibitors, p38MAPK inhibitor seemed to have the best potential to block inflammation. Then, the authors evaluated the effect of FR 167653, a p38MAPK inhibitor, on the development of endometriotic lesions and on the intraperitoneal inflammatory status using experimental model mice for endometriosis. FR 167653, a p38 MAPK inhibitor, caused a reduction in the growth of endometriotic lesions, coupled with the suppression of intraperitoneal inflammation. Thus, p38 MAPK inhibitors could have the therapeutic potential for endometriosis.

Rec.3/15/2004, Acc.6/1/2004, pp629-633

Osamu Yoshino, Yutaka Osuga, Tetsu Yano, Osamu Tsutsumi and Yuji Taketani
Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Tokyo

Key words endometriosis, inflammation, p38MAPK, BALB/c mice, FR167653

子宮内膜症について

子宮内膜症は月経痛・不妊症を引き起こし、女性のリプロダクティブ・ヘルスを損なう疾患として注目されている。子宮内膜症の発症機序の一つとして、月経時に腹腔内へ逆流した子宮由来の内膜(正所性子宮内膜)が骨盤腹膜に生着する、いわゆる逆流説が広く受け入れられている。逆流した子宮内膜が腹腔内マクロファージに捕捉される過程で、マクロファージより炎症性サイトカインである IL-1 (interleukin-1) が分泌される。この IL-1 が、腹腔内に存在する逆流子宮内膜・血球細胞等を刺激しサイトカイン・ケモカイン・プロスタグランディンを分泌させることで腹腔内が炎症状態となる。そして、この炎症状態が子宮内膜の腹膜への生着を促進し、また、子宮内膜症細胞の増殖を促進することが想定されている。事実、子宮内膜症患者の腹腔

内貯留液中において IL-1 α , IL-6, IL-8, MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1)などの炎症性サイトカインが増加していることや、*in vitro*の系において IL-1 α が子宮内膜症細胞からの IL-8, MCP-1 分泌を誘導することが報告されている¹⁻³⁾。

また、プロスタグランジンが子宮内膜症患者の腹腔内で上昇することも知られている⁴⁾。プロスタグランジンは、主に正所性子宮内膜および、子宮内膜症細胞で COX-2(cyclooxygenase-2)により産生される。プロスタグランジンの増加は月経痛の原因となることから、COX-2の発現を減少させることが、月経痛の治療になりうる⁵⁾。

MAPキナーゼ(Mitogen-activated protein kinase: MAPK)カスケードは、細胞外の情報を核に伝える細胞内シグナル伝達経路の主要なものの一つであり、中でも p38MAPK

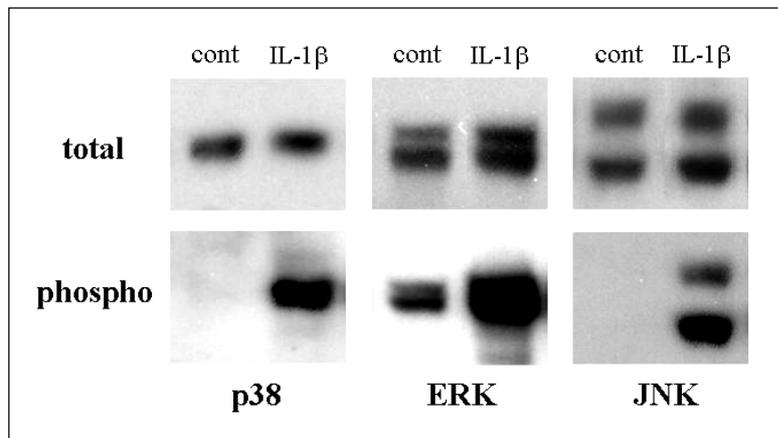


図1a 異所性子宮内膜症性間質細胞におけるIL-1 添加による各種MAPKのリン酸化
子宮内膜症性間質細胞をIL-1 にて15分間刺激しWestern blot法にてp38,ERK, JNKの発現を検討した．一次抗体として各種MAPKリン酸化抗体(P)と各種MAPKトータルの抗体(T)を用いた．

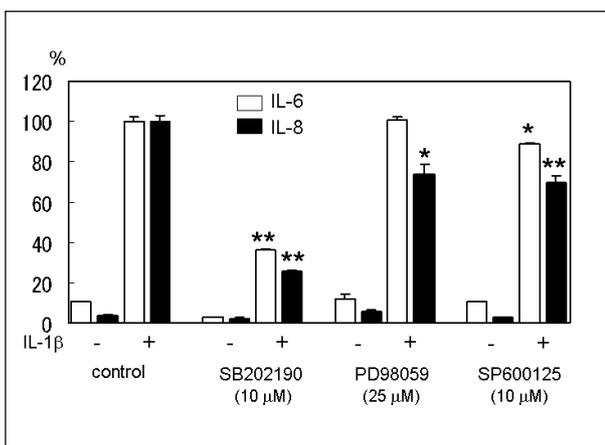


図1b IL-1 添加による子宮内膜症性間質細胞でのIL-6・IL-8産生促進に対する各種MAPK阻害剤の効果

阻害剤非添加時のIL-1 添加による反応を100%として示した．各種MAPK阻害剤存在下におけるIL-6・IL-8濃度をELISA法により測定した．SB202190 (p38MAPK阻害剤), PD98059 (ERK阻害剤), SP600125 (JNK阻害剤)．

* $p < 0.001$, ** $p < 0.0001$ vs. control

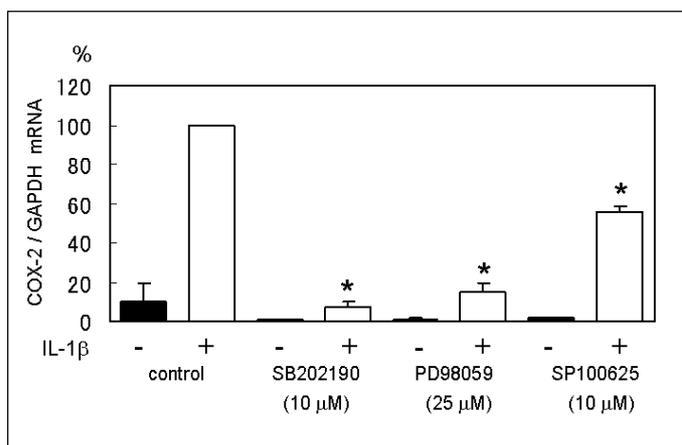


図1c IL-1 添加による子宮内膜症性間質細胞でのCOX-2 mRNA発現に対する各種MAPK阻害剤の効果

COX-2 mRNA発現量を定量的PCRにて検討を行った．阻害剤非添加時のIL-1 添加による反応を100%として示した．SB202190 (p38MAPK阻害剤), PD98059 (ERK阻害剤), SP600125 (JNK阻害剤)．* $p < 0.001$ vs. control

はLPS(lipopolysaccharide)刺激でチロシンリン酸化される分子量38kDaのタンパク質として,さらにはTNF- (tumor necrosis factor-)やIL-1などの炎症性サイトカインの産生を抑制する薬剤であるCSAID (cytokine suppressive anti-inflammatory drug)に強く結合する標的分子として同定された．p38MAPK阻害剤はエンドトキシンショック・胃炎・気道炎の動物モデルにて効果を認めており,炎症性疾患に対する治療薬としての発展が期待されている⁶⁻⁹⁾．

我々は子宮内膜症細胞におけるシグナル伝達を検討し,特に炎症に関与するp38MAPKを抑制することが子宮内膜症の新たな治療法になりうるか検討してきた．そこで本稿では我々のデータを紹介し,子宮内膜症治療薬としてのp38MAPK阻害剤の可能性について述べたい．

子宮内膜症細胞におけるMAPK

ヒト子宮内膜症細胞に対するIL-1 刺激によるCOX-2誘導およびIL-8・IL-6産生におけるMAPK阻害物質の効果

IL-1は子宮内膜症患者の腹腔内で上昇するサイトカインとして知られている．培養ヒト子宮内膜症細胞においてIL-1刺激により,MAPKであるERK(extracellular signal-regulated kinase)・p38MAPK・JNK(c-jun N terminal kinase)すべてのリン酸化亢進が認められた(図1a)．IL-1刺激によりIL-8,IL-6産生とCOX-2 mRNA発現が亢進した．このIL-1による刺激作用は各種MAPK阻害剤により抑制され,IL-8,IL-6産生に対する抑制作用は,特にp38MAPK阻害剤の効果が強かった(図1b)．COX-2 mRNA発現においてはp38MAPK > ERK > JNK各阻害剤の順で

図2a マウス子宮内膜症モデルの作成
6~8週齢 BALB/cマウス .屠殺時に子宮
内膜症様病巣 ,血液 ,腹腔内洗浄液 (800
 μ L PBS) を採取した .

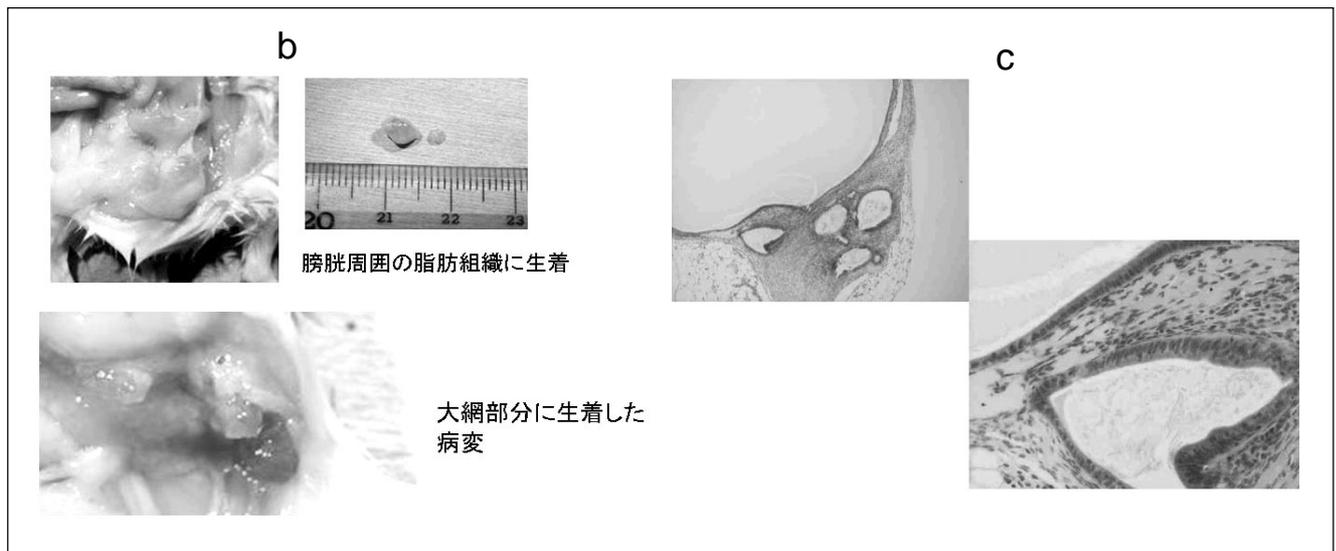
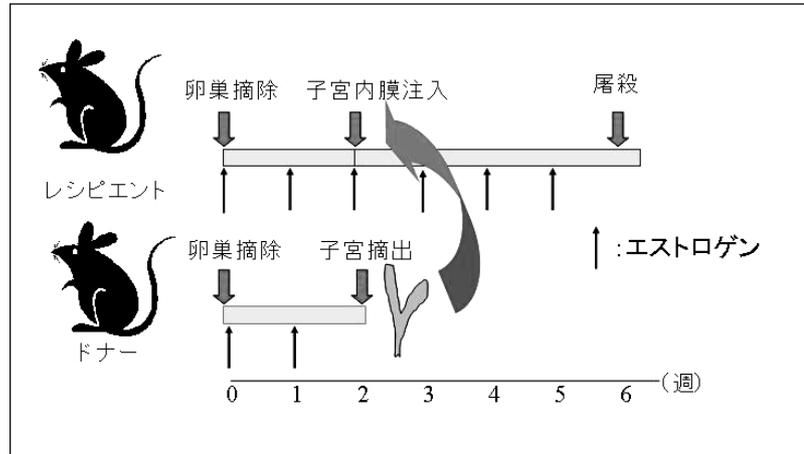


図2b,c 子宮内膜症モデルマウスにおいて3週間目に存在した病変
子宮内膜症様病巣 : マクロ所見 (図 2b) およびそのミクロ所見 (図 2c)

効果が認められた (図 1c) . 以上のように MAPK のうち , 子宮内膜症に関連する炎症性メディエーターの産生に最も p38MAPK が関与していることが考えられた .

また , 炎症性サイトカインが子宮内膜症細胞の増殖を促す報告もある⁴⁾ . これは , 炎症の制御が子宮内膜症の治療になることを示唆する . この時 , p38MAPK が治療のターゲットになる可能性が考えられた . そこでマウス子宮内膜症モデルを作成し , p38MAPK 阻害剤の効果について検討した .

マウスの子宮内膜症モデル

1) 子宮内膜症様病変の誘導

マウスへの子宮内膜症の誘導方法として , 図 2a に方法を示す . ホルモン動態を同調させた BALB/c マウス (東京実験動物) をドナー群とレシピエント群にわけ , ドナー群

の子宮内膜をミンチ後レシピエントマウスの腹腔内に投与した . この方法にて , ほぼ 100% の確率で子宮内膜症様病変を誘導することができた (図 2b) . 病変は漿液性の嚢胞であり , 組織学的には , 間質を伴う単層の子宮内膜上皮様細胞を認め , ヒト子宮内膜症の病理所見に類似していた (図 2c) . ヒト子宮内膜症は炎症性およびエストロゲン依存性の疾患であることが知られている . 本マウスモデルはヒトと同様に , 腹腔内洗浄液中の IL-6 , MCP-1 濃度が上昇していることから炎症性疾患モデルであると考えられた (図 3a) . また , 同様にエストロゲン依存性であることを認めている .

2) 本モデルに対する p38MAPK 阻害剤 FR167653 の効果

FR167653 (藤沢薬品 ; 以下 FR) は特異的 p38MAPK 阻害剤であることが知られている⁶⁾ . FR を子宮内膜接種の 2 日前よりレシピエントマウスに投与を行い , エストロゲン

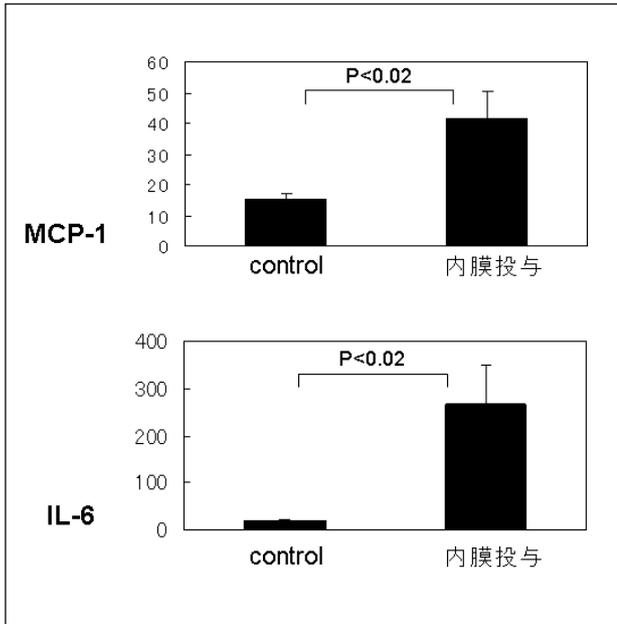


図3a 本モデルは炎症性疾患モデルである。内膜注入時にコントロール群・内膜投与群に分けた。コントロール群にはPBSを腹腔内に注入した(sham operation)。3週間後の病変評価時、マウス腹腔内洗浄液を採取しMCP-1, IL-6濃度をELISA法にて測定した。

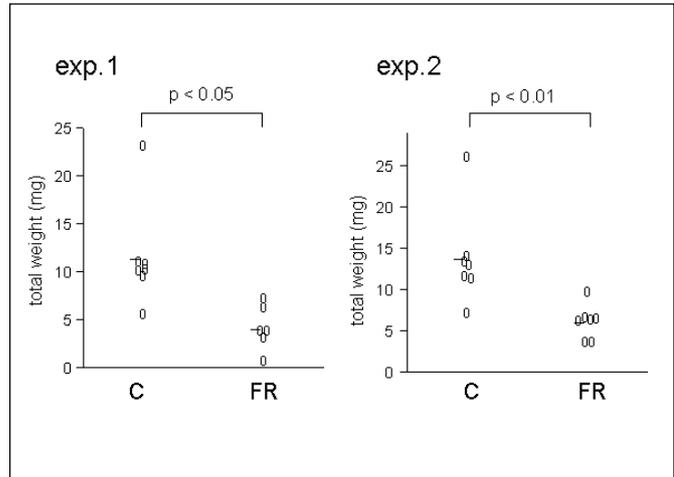


図3b 子宮内膜症モデルマウスにおけるFR167653 (p38MAPK阻害剤)の効果
レシピエントマウスへの子宮内膜注入の2日前からFR167653 (30mg/kg)またはcontrol(生食)を1日2回ずつ連日皮下投与し、3週間後の子宮内膜症様病巣を乾燥重量にて検討した。C: コントロール, FR: FR167653

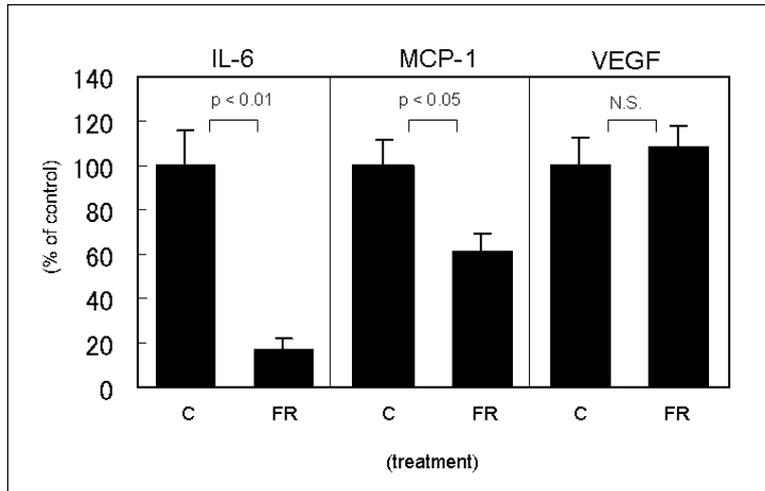


図3c 子宮内膜症モデルマウスにおけるFR167653(p38MAPK阻害剤)の効果
レシピエントマウスへの子宮内膜注入の2日前からFR167653(30mg/kg)またはcontrol(生理食塩水)を1日2回ずつ連日皮下投与し、3週間後の腹腔洗浄液を採取しIL-6, MCP-1, VEGF濃度を検討した。

存在下での病巣形成に与える影響を検討した。図3bに示す通り、2回の実験ともp38MAPK阻害剤投与群においてコントロール群に比して有意に病変が小さいことが確認された。

なお、病変の数、子宮重量・子宮内膜の形態、体重には差を認めなかった。腹腔内洗浄液中での検討では、FR投与群においてコントロール群に比し、IL-6およびMCP-1濃度は有意に抑制された。VEGF(vascular endothelial growth factor)濃度には差を認めなかった(図3c)。

以上より、p38MAPK阻害剤はエストロゲン依存性および炎症性のマウス子宮内膜症モデルにおいて子宮内膜症病巣の進展を抑制することが示され、この効果は子宮内膜症に伴う腹腔内の炎症を抑制することにより発揮されている可能性が示唆された。現在、子宮内膜症に対する治療として、本疾患がエストロゲン依存性疾患であることから、エストロゲンを低下させるホルモン療法がよく行われる。

しかし、エストロゲン抑制に伴う副作用として骨密度の低下・更年期症状の出現などが指摘されている。また、排

卵を抑制することから、挙児希望のある症例にはホルモン療法を行いづらい。p38MAPK阻害剤のようなエストロゲン存在下においても、子宮内膜症の進展を阻止する可能性のある治療法は発展が期待される。さらにマウスモデルにおいて子宮重量や子宮内膜の形態に影響を与えなかったことから、妊孕能を保った状態での治療が可能になるかもしれない。

子宮内膜症における他の細胞内シグナル伝達経路

NF- κ BもMAPKと並んで重要な細胞内シグナル伝達因子である。IL-1やTNF- α などの刺激によりNF- κ Bは活性化され、p38MAPKと同様に各種炎症性サイトカイン・ケモカインの遺伝子発現を制御しているため子宮内膜症との関連が考えられる。事実、子宮内膜症細胞においてNF- κ BがTNF- α によるIL-8発現およびIL-1によるRANTES(regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted)発現のシグナル伝達因子として重要であるとの報告が見られる^{10,11)}。今後、子宮内膜症におけるNF- κ Bの役割がより一層明らかになれば、NF- κ Bをターゲットとした治療戦略の研究も進むと思われる。

まとめ

p38MAPKによるシグナル伝達は子宮内膜症の病態に深く関与していると考えられる。

シグナル伝達をターゲットとした創薬は急速な発展が見られている分野であり、臨床応用に適したp38MAPK阻害剤の開発は、子宮内膜症の治療薬として期待されるものの一つであると考えられる。

文 献

- 1) Taketani Y, Kuo TM, Mizuno M: Comparison of cytokine levels and embryo toxicity in peritoneal fluid in infertile women with untreated or treated endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, 167: 265-270, 1992.
- 2) Akoum A, Jolicoeur C, Boucher A: Estradiol amplifies interleukin-1-induced monocyte chemotactic protein-1 expression by ectopic endometrial cells of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 896-904, 2000.
- 3) Akoum A, Lawson C, McColl S, Villeneuve M: Ectopic endometrial cells express high concentrations of interleukin (IL)-8 in vivo regardless of the menstrual cycle phase and respond to oestradiol by up-regulating IL-1-induced IL-8 expression in vitro. *Mol Hum Reprod*, 7: 859-866, 2001.
- 4) Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Nagano Y, Yoshida S, Tanikawa M, Terakawa N: Tumor necrosis factor-alpha promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(2): 824-829, 2000.
- 5) Cham WY, Hill JC: Determination of menstrual prostaglandin levels in non-dysmenorrheic and dysmenorrheic subjects. *Prostaglandins*, 15: 365-375, 1978.
- 6) Takahashi S, Keto Y, Fujita T, Uchiyama T, Yamamoto A: FR167653, a p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor, prevents Helicobacter pylori-induced Gastritis in Mongolian Gerbils. *J Pharmacol Exp Ther*, 296: 48-56, 2001.
- 7) Ju H, Nerurkar S, Sauermelech CF, Olzinski AR, Mirabile R, Zimmerman D, Lee JC, Adams J, Sisko J, Berova M, Willette RN: Sustained activation of p38 mitogen-activated protein kinase contributes to the vascular response to injury. *J Pharmacol Exp Ther*, 301(1): 15-20, 2002.
- 8) Yamamoto N, Sakai F, Yamazaki H, Sato N, Nakahara K, Okuhara M: FR16763, a dual inhibitor of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α , ameliorates endotoxin-induced shock. *Eur J Pharmacol*, 327(2-3): 169-174, 1997.
- 9) Underwood DC, Osborn RR, Kotzer CJ, Adams JL, Lee JC, Webb EF, Carpenter DC, Bochnowicz S, Thomas HC, Hay DW, Griswold DE: SB239063, a potent p38 MAP kinase inhibitor, reduces inflammatory cytokine production, airway eosinophil infiltration, and persistence. *J Pharmacol Exp Ther*, 293: 281-288, 2000.
- 10) Sakamoto Y, Harada T, Horie S, Iba Y, Taniguchi F, Yoshida S, Iwabe T, Terakawa N: Tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8(IL-8) expression in endometriotic stromal cells, probably through nuclear factor-kappa B activation: gonadotropin-releasing hormone agonist treatment reduced IL-8 expression. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(2): 730-735, 2003.
- 11) Lebovic DI, Chao VA, Martini JF, Taylor RN: IL-1beta induction of RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) chemokine gene expression in endometriotic stromal cells depends on a nuclear factor-kappa B site in the proximal promoter. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(10): 4759-4764, 2001.