

〔シンポジウム／子宮内膜症と骨盤内環境〕

Bacterial contamination hypothesis : 子宮内膜症の病態における細菌性エンドトキシンと Toll-like receptor 4 (TLR4) の役割

- 1) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科産科婦人科
- 2) 済生会長崎病院産婦人科
- 3) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科原研病理
- 4) 佐世保中央病院

カーン カレク¹⁾, 北島 道夫¹⁾, 平木 宏一¹⁾, 藤下 晃²⁾
中島 正洋³⁾, 石丸 忠之⁴⁾, 増崎 英明¹⁾

緒 言

子宮内膜症は、炎症反応の二次的なメディエーターが病態に関与している慢性炎症性疾患である〔1-4〕。炎症初期のメディエーターである細菌性エンドトキシン(リポポリサッカライド, LPS)は、骨盤内のマクロファージから二次的炎症メディエーターである各種のサイトカイン, ケモカインあるいは増殖因子の産生を亢進させる〔5〕。Baileyらは、内膜症を有するアカゲザルでは、腸管内細菌叢の性状が変化し、内膜症の発症とグラム陰性細菌の増殖亢進が関連している可能性があることを報告している〔6〕。これらの報告から、腔内細菌叢に存在する大腸菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) などのグラム陰性細菌の構成成分であるLPSがヒト子宮内膜症の病態に関与している可能性が示唆される。

ヒトの下部生殖器官は常に各種微生物に暴露されており、直接的な上行性感染が生じうる。私どもは、これまでに腔常在細菌叢のなかのグラム陰性細菌が子宮腔内へ上行性・潜在性感染を生じることにより月経血中に混入し、結果として月経血あるいは腹水中のエンドトキシン濃度が上昇し、骨盤内炎症を惹起することを検討してきた。

本研究では、大腸菌由来のLPSが、子宮内膜症の病態に関与していることが予想される各

種炎症促進分子〔3,4〕のマクロファージからの産生を亢進させるかどうか検討した。また、子宮内膜細胞に対するLPSの増殖促進作用を検討し、LPSの受容体であるToll-like receptor 4 (TLR4)が、マクロファージからの炎症促進分子の分泌あるいは子宮内膜の増殖にどのような関与をしているのかを検討した。さらに、子宮内膜における抗菌ペプチドの発現の月経周期による相違を検討し、細菌増殖におけるプロスタグランジン (PG) E2の作用を検討した。

対象および方法

本研究は施設倫理委員会の承諾を得て、各対象女性にインフォームドコンセントを得てから行った。良性婦人科疾患のため当科で腹腔鏡を施行した、規則的な月経周期を有する58例内膜症女性 (20~42歳) および28例の非内膜症コントロール女性 (18~32歳) から腹水を採取した。内膜症の有無は腹腔鏡により診断した。

これまでに報告した無菌的操作を用いて、20例の内膜症および15例の非内膜症コントロールから月経血を採取した〔11〕。月経血は大腸菌の増殖に適した eosin-methylene blue (EMB) アガー (Difco Laboratories, Detroit, MI) 上で培養した〔6〕。Limulus amoebocyte lysate (LAL) 法 (エンドトキシン—シングルテストワコー, 和光純薬, 東京) を用いて腹水および月経血中

のエンドトキシン濃度を測定した [11].

これまでに報告した方法を用いて、腹水中からマクロファージを抽出し、また内膜症あるいは非内膜症コントロールから正所性あるいは異所性内膜を採取した [12-17]. マクロファージは初代培養後、血清非添加培地 (RPMI) 中に 1 ウェルあたり 10^5 の濃度で 24 時間培養したのち、種々の濃度の *E. coli* 由来の LPS (serotype 0111 : B4 ; Sigma, St Louis, MO) を添加したうえでさらに 24 時間培養した. また、マクロファージを、LPS の拮抗物質であるポリミキシン B (Sigma) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) あるいは抗 TLR4 抗体 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (HTA-125, HyCult Biotechnology) で 20 分前処置を行ったのちに、10 ng/mL の LPS 存在下に 24 時間培養し、マクロファージから産生される炎症促進性分子の変化を検討した.

培養上清中の hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial cell growth factor (VEGF), interleukin (IL)-6, および tumor necrosis factor alpha (TNF α) の濃度を ELSA キット (Quantikine, R&D system, Minneapolis, MN) を用いて測定した. 内膜組織における TLR4 の発現局在を HTA-125 抗体 (1 : 50 希釈, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を用いた免疫染色で検討した [12, 18].

内膜組織から RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) を用いて RNA を抽出し、RNA (1 μg) を RT-PCR に供した. プライマーは既報の方法のものを用いた [12, 14, 19]. TLR-4, HGF, および HGF の受容体である c-Met の発現は β -actin の発現量で補正して評価した.

細胞の増殖性は 5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU) の取り込み能を ELISA 法 (Amersham Pharmacia, Tokyo, Japan) で測定することにより評価した. ヒト β -defensin [HBD, mouse, monoclonal (M11-14b-D10), (ab14425), abcam] および secretory leukocyte protease inhibitor [SLPI, goat polyclonal (LS-B2174), Lifespan Biosciences] の子宮内膜における発現局在を、異なる月経周期で採取した内膜組織 (増殖期, $n=10$; 分泌期, $n=10$; 月経期, $n=5$) での免疫染

色で検討した. また、これらの発現を 6 例の閉経期あるいは 3~6 ヶ月間 GnRHa を使用した女性から採取した子宮内膜で検討した. また、PGE2 の添加 (1 pg/mL ~100 ng/mL) による大腸菌の増殖性の変化を検討した.

結果は平均 \pm 標準誤差あるいは標準偏差で表し、*E. coli* の月経血 1 mL あたりのコロニー形成能 (colony forming unit, CFU) は対数換算し中央値と 4 分位間 (interquartile range, IQR) で表した. 推計学的検討は、分散分析 (analysis of variance, ANOVA), Mann-Whitney U-test および Student's t-test を用いて 2 群間の比較を行い、複数群間の比較には Kruskal-Wallis test を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと評価した.

結 果

月経血 1 mL あたりの *E. coli* のコロニー形成能 (CFU/mL) は、非内膜症 (中央値, Log_{10} , 1.2 CFU/mL ; IQR, 0.8~1.9) に比して内膜症 (中央値, Log_{10} , 4.5 CFU/mL ; IQR, 1.4~7.2) で有意に高値であった ($P < 0.01$, 図 1 A). さらに、*E. coli* のコロニー形成能は、血液の貯留した非透明赤色病変を有する内膜症の月経血では、卵巣内膜症のみで腹膜赤色病変を合併しない内膜症の月経血に比較して有意に高値であった ($P < 0.01$, 図 1 B) [20].

月経血あるいは腹水中のエンドトキシン濃度は、それぞれコントロールに比して内膜症で有意に高値であった (月経血, $285.5 \pm 64.5 \text{ pg}/\text{mL}$ vs. $114.9 \pm 17.0 \text{ pg}/\text{mL}$, $p < 0.01$; 腹水, $71.5 \pm 9.2 \text{ pg}/\text{mL}$ vs. $43.3 \pm 9.8 \text{ pg}/\text{mL}$, $p < 0.001$, 図 1 C). 腹水中のエンドトキシン濃度は、月経期に採取された腹水において、その他の周期に採取された検体に比較してもっとも高いことが認められた (図 1 D).

マクロファージ培養上清中の HGF, VEGF, IL-6 および TNF α の濃度は、LPS 添加群で、非添加群に比して有意に高値で、内膜症では非内膜症コントロールに比して有意に高値であった ($p < 0.05$). これらの LPS の作用は、抗 TLR4 抗体でマクロファージを前処理することにより有意に低下した (HGF, IL-6 および TNF α , p

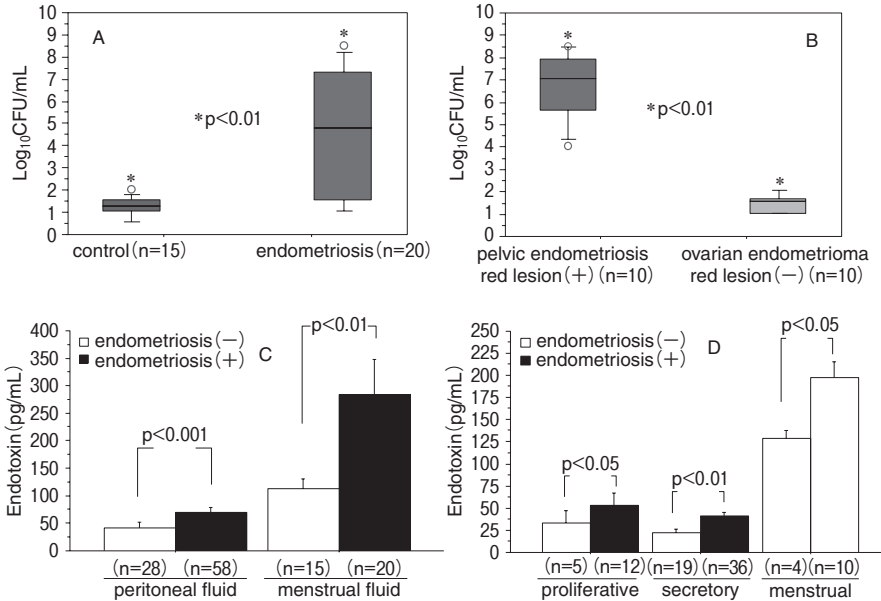


図1 (A)子宮内膜症(赤)および非内膜症(コントロール, 青)月経血1 mLあたりの *Escherichia coli* の Colony forming unit (CFU) を log 変換した値で表した。コントロールに比して内膜症では *E. coli* のコロニー形成が有意に高い ($P < 0.01$)。 (B) 赤色病変をもつ内膜症と赤色病変(赤)では、チョコレート嚢胞のみの内膜症(緑)に比較してコロニー形成が有意に高い ($P < 0.01$)。 (C) および (D) 内膜症および非内膜症(コントロール)における腹水中および月経血中のエンドトキシン濃度を示す。月経血 ($P < 0.01$) および腹水中 ($P < 0.001$) のエンドトキシン濃度はコントロール(白)に比較して内膜症(黒)で有意に高い (C)。腹水中のエンドトキシン濃度は増殖期あるいは分泌期に比較して月経期で最も高く、コントロールに比較して内膜症で有意に高い (D)。結果は平均 \pm 標準誤差で示す。

< 0.05 ; VEGF, $p < 0.01$)。これらは HGF あるいは c-Met 遺伝子の発現においても確認された [21]。LPS の特異的作用は、同様の低下作用が LPS の拮抗物質であるポリミキシン B 添加によって確認された (VEGF, IL-6, TNF α , $p < 0.05$; HGF, $p = 0.08$)。これらの結果の詳細は既報を参照されたい [21]。

TLR4 の蛋白および mRNA の発現は、内膜症あるいは非内膜症コントロールから採取された正所性あるいは異所性子宮内膜組織から抽出した上皮および間質細胞、ならびに intact な組織中の腺上皮および間質細胞いずれにおいても認められた。マクロファージにおいても TLR4 の発現が確認された [3, 22]。

LPS は、内膜症女性から得られた正所性あるいは異所性子宮内膜の上皮あるいは間質細胞の増殖を濃度依存的に亢進させた。これら LPS

の内膜細胞増殖促進作用は、内膜症女性で非内膜症コントロールに比較して有意に高いことが認められ、また抗 TLR4 抗体による前処置によりその亢進作用が有意に低下した ($p < 0.05$)。

子宮内膜における HBD あるいは SLPI の発現は、血中のエストロゲン濃度と関連することが示唆された (図 2A)。すなわち、Q-H スコアで評価した HBD および SLPI の正所性子宮内膜組織での発現強度は、増殖期で高く、月経期や閉経あるいは GnRHa で治療された女性で低く、分泌期ではそれらの中間であった (図 2B, C)。

月経血培養で検出された *E. coli* と同系株 (K-12, serotype 0111 : B4) を種々の濃度の PGE2 を添加して培養したところ、非添加群に比較して、PGE 添加群では有意にコロニー形成能が亢進することが認められた (図 3A, B)。

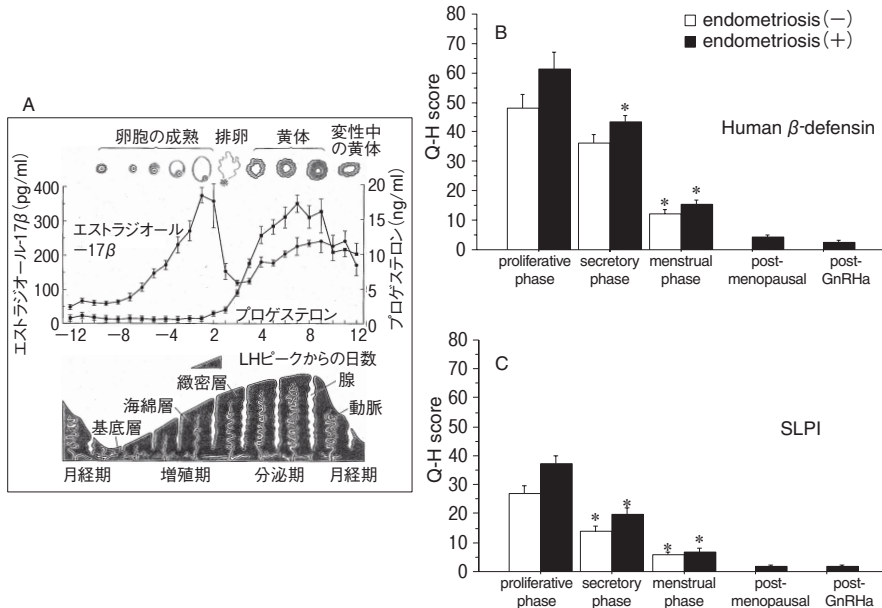


図2 月経周期による血液中のエストロゲン (17β-estradiol) とプロゲステロンの濃度を示し (A), ヒト正所性子宮内膜におけるヒト β-defensin (HBD, B) と secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI, C) の免疫染色による発現強度の子宮内膜症の有無および月経周期による相違を示す。HBD あるいは SLPI の Q-H スコアは増殖期で最も高く、月経期で最も低く、分泌期でその中間を示した (B, C)。閉経女性あるいは 3~6 ヶ月 GnRHα 治療を行った女性から得られた正所性内膜での HBD あるいは SLPI の発現は月経期に比してさらに低いことが認められた。

考 察

私どもは、内膜症女性の月経血では、非内膜症コントロール女性に比して大腸菌の混入が多く、月経血中のエンドトキシン濃度が高く、またそれらの経卵管的逆流により骨盤内腹水でのエンドトキシン濃度が高くなっていることを初めて報告した。すなわち、LPS が子宮内膜細胞の増殖を促し、その作用が抗 TLR4 抗体により抑制されることから、TLR4 を介した内膜症の増殖に関与していることが示唆される。これまでに子宮内膜症の病態における感染の役割ははっきりしていなかったが、私どもは、子宮内膜症の病態における新たな仮説として、骨盤局所の生得免疫機構における LPS と TLR4 を介した子宮内膜症の増殖・進展に関する「bacterial contamination hypothesis」を提唱したい。

私どもはこれまでに、内膜症では非内膜症(コントロール)に比較して、正所性および異所性内膜組織あるいは腹水でマクロファージの浸潤

が有意に亢進していることを報告してきた [18, 23]。本研究では、それら直接的な炎症反応に加えて、内膜症の骨盤局所では、E. coli. に由来するエンドトキシンによるマクロファージあるいは TLR4 を介した炎症促進反応が亢進していることを示した。

卵巣ステロイドホルモンであるエストロゲン (E2) は、呼吸器、尿路、内性器および腔上皮あるいは好中球における抗菌性ペプチドの発現を調節し、臓器局所における病原性微生物の侵入防御に役割をもつと考えられる [24, 25]。今回の検討では、正所性内膜におけるヒト HBD あるいは SLPI の発現は、エストロゲンレベルが高い増殖期あるいは分泌期において、エストロゲンレベルが低い月経期に比して高かった。また、閉経女性あるいは GnRHα 治療後の正所性子宮内膜では月経期と同様にヒト HBD あるいは SLPI の発現が低かった。月経周期による宿主局所の防御機構の変化により、月経血では

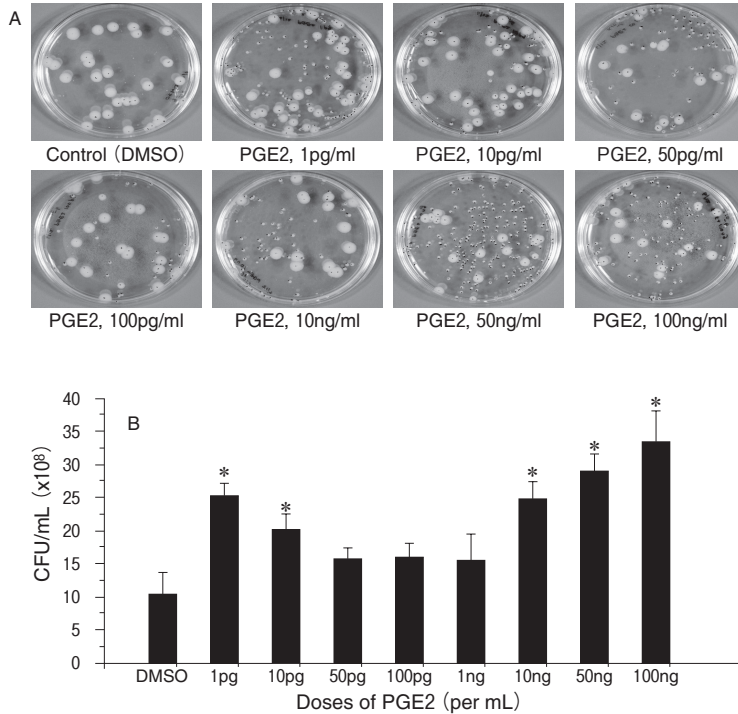


図3 異なる濃度のPGE2存在下のEMBアガープレートにおけるE. Coli. (K-12, serotype 0111 : B4) のコロニー形成パターンを示す (A). PGE2 存在下に24時間培養させたE. Coli. のmLあたりのコロニー形成能 (CFU/mL) を示す (B). PGE2 は低濃度および高濃度いずれでもPGE2 を添加しないコントロール (DMSO) に比して有意にE. Coli のコロニー形成を亢進させた ($P < 0.05$). 結果はそれぞれの濃度を3回検討した平均±標準偏差で表す.

細菌混入が誘起される可能性が考えられる。

PGE2 は、HTLV-I あるいは HIV の増殖を直接的あるいは免疫抑制作用により間接的に促進することが報告されている [26, 27]. 本研究では、PGE2 が E. Coli. の増殖 (コロニー形成) を直接的に亢進させることが示唆された. 内膜症女性では、月経期に骨盤内あるいは月経血中の PGE2 あるいは PGF2 α の亢進により疼痛症状が発現することから、PGE2 が子宮腔内に侵入した E. Coli. の増殖に直接に関与している可能性がある. 一方で、E. Coli あるいはエンドトキシンの産生源が腸管由来である可能性は否定できない [28, 29].

月経血中に存在する E. Coli. が骨盤への細菌性エンドトキシンの恒常的な産生源であり、TLR4 を介した内膜症の増殖・進展に関与していると考えられる. つまり、E. Coli の月経血へ

の上行性混入が骨盤内炎症と TLR-4 を介した内膜症の増殖を惹起する初期因子であると捉えることができる.

これらの結果は、子宮内膜症の病態と臨床に以下の2つの新たな知見を加える.

①LPS/TLR4 経路を介した「bacterial contamination hypothesis」を子宮内膜症の発生説として提唱したい.

②TLR-4 を標的とした分子治療が子宮内膜症の治療の新たなストラテジーになり得る.

今後は「bacterial contamination」仮説の確証と内膜症の病態における役割についてさらに検討する必要がある.

文 献

- [1] Halme J et al. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis.

- sis. *Obstetrics and Gynecology* 1984 ; 64 : 151 - 154
- [2] Nisolle M et al. Immunohistochemical analysis of proliferative activity and steroid receptor expression in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 1997 ; 68 : 912-919
- [3] Khan KN et al. Immunopathogenesis of pelvic endometriosis: role of hepatocyte growth factor, macrophages and ovarian steroids. *Am J Reprod Immunol* (review) 2008 ; 60 : 383-404
- [4] Harada T et al. Role of cytokines in endometriosis. *Fertil Steril* 2001 ; 76 : 1 - 10
- [5] Halme J et al. Altered maturation and function of peritoneal macrophages: possible role in pathogenesis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1987 ; 156 : 783-789
- [6] Bailey MT et al. Endometriosis is associated with an altered profile of intestinal microflora in female rhesus monkeys. *Hum Reprod* 2002 ; 17 : 1704-1708
- [7] Wira CR et al. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Reviews* 2005 ; 206 : 306-335
- [8] Deb K et al. Gram-negative bacterial endotoxin-induced infertility: a bird eye view. *Gynecol Obstet Invest* 2004 ; 57 : 224-232
- [9] Larsen S et al. Vaginal microbial flora: practical and theoretic relevance. *Obstet Gynecol* 1980 ; 55 : 100S-113S
- [10] Takeda K et al. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005 ; 7 : 1 - 14
- [11] Kamiyama S et al. Impact of detection of bacterial endotoxin in menstrual effluent on the pregnancy rate in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 2004 ; 82 : 788-792
- [12] Khan KN et al. Regulation of hepatocyte growth factor by basal and stimulated-macrophages in women with endometriosis. *Hum Reprod* 2005 ; 20 : 49-60
- [13] Rana N et al. Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1996 ; 65 : 925 - 930
- [14] Hirata T et al. Evidence for the presence of Toll-like receptor 4 system in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 ; 90 : 548-556
- [15] Sugawara J et al. Hepatocyte growth factor stimulates proliferation, migration, and lumen formation of human endometrial epithelial cells in vitro. *Biol Reprod* 1997 ; 57 : 936-942
- [16] Khan KN et al. Interleukin - 6 - and tumor necrosis factor α -mediated expression of hepatocyte growth factor by stromal cells and its involvement in the growth of endometriosis. *Hum Reprod* 2005 ; 20 : 2715-2723
- [17] Osteen KG et al. Development of a method to isolate and culture highly purified populations of stromal and epithelial cells from human endometrial biopsy specimens. *Fertil Steril* 1989 ; 52 : 965-972
- [18] Khan KN et al. Estrogen and progesterone receptor expression in macrophages and regulation of hepatocyte growth factor by ovarian steroids in women with endometriosis. *Hum Reprod* 2005 ; 20 : 2004-2013
- [19] Koga K et al. Evidence for the presence of angiogenin in human follicular fluid and the up-regulation of its production by human chorionic gonadotropin and hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 ; 85 : 3352-3355
- [20] Khan KN et al. Higher activity by opaque endometriotic lesions than non-opaque lesions in women with endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004 ; 83 : 375-382
- [21] Khan KN et al. Escherichia coli contamination of menstrual blood and effect of bacterial endotoxin on endometriosis. *Fertil Steril* 2010 ; 94 (7) : 2860-2863
- [22] Khan KN et al. Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated growth of endometriosis by human heat shock protein 70 (Hsp70). *Hum Reprod* 2008 ; 23 : 2210-2219
- [23] Khan KN et al. Differential macrophage infiltration in early and advanced endometriosis and adjacent peritoneum. *Fertil Steril* 2004 ; 81 : 652 - 661
- [24] Valora EV et al. Wiles Human β -Defensins-1: An antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 1998 ; 101 : 1633-1642
- [25] Defensins: Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 1985 ; 76 : 1427-1435
- [26] Kuno S et al. Prostaglandin E2, a seminal constituent, facilitates the replication of acquired immune deficiency syndrome virus *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 3487-3490
- [27] Kuno S et al. Prostaglandin E2 administered via anus causes immunosuppression in male but not female rats: A possible pathogenesis of acquired immune deficiency syndrome in homosexual males. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 2682-2683
- [28] Deitch EA et al. Endotoxin-induced bacterial translocation: a study of mechanisms. *Surgery* 1989 ; 106 : 292-300
- [29] Alexander JW et al. The process of microbial translocation. *Ann Surg* 1990 ; 212 : 496-511