

# 主論文

## High Expression of High-Mobility Group Box 1 in Menstrual Blood: Implications for Endometriosis

(HMGB1 は月経血中に高濃度に存在する:子宮内膜症との関連)

### 【緒言】

子宮内膜症は異所性子宮内膜に起因し、卵巣ホルモン依存性に月経困難や慢性骨盤痛、不妊等の症状を引き起こす。子宮内膜細胞の生着、維持には interleukin (IL)-6, 8, tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  や vascular endothelial growth factor (VEGF) 等のサイトカインや増殖因子が作用し、慢性炎症や免疫異常の関与が指摘されている。月経時に卵管を通して腹腔内に逆流する月経血は子宮内膜症発症の重要な因子と考えられるが、その病態に関連した物質や子宮内膜組織生着の機序は明らかになっていない。high-mobility group box1 (HMGB1) はすべての有核細胞の核内に存在する非ヒストン蛋白で、通常は DNA 転写や複製、構造維持を担っているが、外傷、感染や細胞壊死等の重症病態においては炎症の late mediator として働き、壊死細胞から受動的に放出、活性化された単球やマクロファージから能動的に分泌され血中に出現する。また、HMGB1 は単独よりも lipopolysaccharide (LPS) や IL-1  $\beta$  等と複合体を形成することでより強力な炎症性メディエーターとして作用し、receptor for advanced glycation end products (RAGE), Toll-like receptor (TLR)-2, 4, 9 を介して炎症性サイトカインの産生を刺激し、自然免疫や炎症を活性化する。さらに血管新生因子としても作用し、RAGE や TLR4 を介して血管内皮細胞の増殖を刺激し、VEGF や TNF- $\alpha$ , IL-8 などの分泌を促進することが報告されている。我々は月経血中の HMGB1 またはその複合体が腹腔内に逆流して炎症や血管新生に促進的に働き、子宮内膜症の発生や進展に関与すると推測した。本研究では、血清、腹水および月経血中の HMGB1 濃度を測定、子宮内膜症の病態との関連について検討し、RAGE のヒト正常子宮内膜および子宮内膜症腹膜病変における発現を確認した。さらに HMGB1 の子宮内膜症間質細胞への直接作用を評価するために、HMGB1 と LPS を共培養し、RAGE と VEGF の mRNA の発現を測定した。

### 【材料と方法】

#### 検体の採取

子宮内膜症 84 例、コントロールとして子宮内膜症以外の良性婦人科疾患 55 例の計 139 例を対象とした。子宮内膜症は Re-ASRM I - II が 33 例、III - IV が 51 例、年齢、BMI に差はなく、妊娠、糖尿病、心血管疾患、悪性疾患、骨盤内炎症性疾患、急性・慢性炎症性疾患は除外した。月経周期は基礎体温と子宮内膜の病理組織診断に基づき、Re-ASRM の基準に準じて子宮内膜症腹膜病変のステージングと病巣の形態学的分類を行った。末梢血 21 例、月経血 27 例は月経 3-5 日目に採取、腹水 57 例は月経周期の増殖期中期に施行した腹腔鏡手術症例から採取した。月経血のみ PBS で 2 倍希釈し、それぞれ遠心分離後 -30°C で保存した。子宮内膜症腹膜病変 36 例と卵巣子宮内膜症性嚢胞 4 例も同様の腹腔鏡手術症例から採取し、正常子宮内膜 23 例は良性婦人科疾患で子宮全摘を施行した症例から採取した。

#### Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

血清、月経血、腹水中の HMGB1 濃度は、シノテスト社の ELISA キットを用いてプロトコールに準じて測定した。

#### 免疫組織化学染色

子宮内膜症腹膜病変 36 例と正常子宮内膜 23 例の組織は 48 時間のホルマリン固定後パラフィン包埋し、4  $\mu$ m に薄切した。RAGE の発現は LSAB 法で、一次抗体は抗 RAGE ウサギポリクローナル抗体、二次抗体はビオチン化抗ウサギ免疫グロブリン抗体を用い、免疫組織化学染色にて評価した。

### 子宮内膜症間質細胞培養

卵巣子宮内膜症性嚢胞から採取した間質細胞に、リコンビナント HMGB1 100, 1000ng/mL と LPS 1, 10, 100 ng/mL を添加し 24 時間共培養した。

### Real-Time Polymerase Chain Reaction

24 時間の HMGB1 と LPS の共培養の後に子宮内膜症間質細胞を回収し、iTaQ Universal SYBR Green One-Step kit と Mini Opticon reader を使用し、real-time PCR にて VEGF, RAGE の mRNA の発現を確認した。使用したプライマーは下記の通りである。VEGF: 5'-GCAGAAGGAGGAGGGCAG-AAT-3'(sense), 5'-GTCTCGATTGGATGGCAGTAGC-3'(antisense), RAGE: 5'-CAGGATGAGGG-GATTTTC-3'(sense), 5'-AGGAATCTGGTAGACACG-3'(antisense), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): 5'-GATGACATCAAGAAGGTGGTGAA-3'(sense), 5'-GTCTTACTCCT-TGGAGGCCATGT-3'(antisense)。

### **【結果】**

月経血中の HMGB1 濃度は子宮内膜症、コントロールともに血清、腹水と比較して著明な高値を示していた。血清、月経血、腹水中それぞれの HMGB1 濃度に子宮内膜症の有無による差はなく、腹水では子宮内膜症の病期による差異も認められなかった。RAGE の免疫組織化学染色では正常子宮内膜の増殖期と分泌期どちらも腺上皮および間質細胞ともに RAGE の発現を認めた。子宮内膜症腹膜病変でも、red lesion, black lesion いずれにおいても腺上皮、間質細胞ともに強く発現していた。子宮内膜症間質細胞の培養では、HMGB1 1000ng/mL 添加にて VEGF mRNA の発現が亢進し、また、HMGB1 100ng/ml においても、LPS 100ng/mL との共培養により VEGF mRNA の発現が亢進した。RAGE mRNA の発現は HMGB1, LPS の添加にて変化は認められなかった。

### **【考察】**

HMGB1 は臨床的には敗血症、全身性炎症反応症候群、播種性血管内凝固症候群、悪性腫瘍の浸潤、動脈硬化、虚血再灌流障害等の病態に関与することが知られている。血清 HMGB1 は健常者では低値であるが、胃癌、大腸癌、子宮頸癌、敗血症で上昇する。関節リウマチでは変形性膝関節症に比し、滑膜液中の HMGB1 も高値となり、また、低酸素刺激が滑膜細胞における HMGB1 分泌を増加させるという報告がある。

最近ではヒト子宮内膜間質細胞において、酸化ストレスにより誘導された細胞壊死により HMGB1 の分泌が促進されるという報告もある。月経はステロイドホルモンの消退により毎月引き起こされる子宮内膜の低酸素イベントであり、壊死した子宮内膜細胞から HMGB1 が多量に放出される可能性は十分に考えられ、実際に我々の研究においても同様の結果が得られた。

HMGB1 は RAGE や TLR4 を介して、VEGF のような血管新生に関与するサイトカインの分泌を刺激する。子宮内膜症は局所的、慢性的な炎症性疾患であるが、特に VEGF はその血管新生に関与することが報告されている。腹腔内に逆流する月経血中の高濃度の HMGB1 が VEGF の分泌を促進し、子宮内膜症における血管新生に関与する可能性が考えられる。

我々は RAGE のヒト正常子宮内膜と子宮内膜症腹膜病変における発現を確認した。RAGE は multi-ligand receptor として、その下流で NF $\kappa$ B や AP-1 等の炎症に関連する転写因子を活性化する。HMGB1/RAGE 経路は膝腫瘍やループス血管炎等の病態において促進的に作用するという報告がある。

月経時に腹腔内に逆流する月経血は子宮内膜症発症の重要な因子と考えられている。本結果で確認された月経血中の高濃度の HMGB1 が腹腔内に逆流し、正所性、異所性子宮内膜に存在する RAGE を介して炎症や血管新生を促進することにより、子宮内膜細胞の腹腔内への生着、子宮内膜症の進展に関与する可能性が示唆される。

HMGB1 は単独よりも複合体を形成することでより強力な炎症性メディエーターとして作用する。子宮内膜上皮細胞や変形性膝関節症の滑膜線維芽細胞において、LPS と HMGB1 の共培養より、それぞれ TLR4, RAGE と TLR2,4 の発現が増加する。我々も子宮内膜症間質細胞において、VEGF mRNA の発現が HMGB1 100ng/mL 単独では促進されないが、LPS 100ng/mL との共培養において促進されるこ

とを示した。

生殖年齢女性の月経血の腹腔内逆流は頻繁に起こるが、すべてが子宮内膜症を発症するわけではない。本結果でも、子宮内膜症とコントロール群で月経血中の **HMGB1** 濃度に差は認められなかった。一方で、月経血中の大腸菌が子宮内膜症で多く、高濃度のエンドトキシンが **TLR4** を介して子宮内膜症に促進的に働くという報告がある。子宮内膜症の発症において何らかの差異があると考え、子宮内膜症では月経血中の **LPS** の増加により **HMGB1** との複合体の形成が亢進している可能性が示唆される。

#### **【結論】**

我々は月経血中の **HMGB1** 濃度が血清、腹水と比較して著明な高値を示すことを初めて報告した。また、**RAGE** の正所性、異所性子宮内膜における発現と、子宮内膜症間質細胞において、**HMGB1** または **HMGB1** と **LPS** の共培養による **VEGF mRNA** の発現亢進を確認した。月経血中に高濃度で存在する **HMGB1** または他の **LPS** のような物質と形成された複合体が月経血とともに腹腔内へ逆流することにより、炎症、血管新生促進的に作用し、子宮内膜症の進展に関与する可能性が示唆された。