

子宮内膜症の原因細菌エクソソームに着目した病態 解明と創薬開発

Endometriosis research focusing on endometriosis-associated bacteria and extracellular vesicles

名古屋大学医学部附属病院 総合周産期母子医療センター 講師 村岡 彩子

要 約

我々は子宮内膜症の発症メカニズムとして子宮内膜症を引き起こす一要因となる子宮内膜内の細菌 (*Fusobacterium*) を新規に発見し報告した。今回は子宮内膜症原因細菌の放出する bacterial extracellular vesicles (BEVs) に着目した病態機能解析を行い、臨床応用として新規治療法の創出に繋げることを目的として研究を展開した。まず、BEVsを超遠心法で抽出し、菌体およびBEVs搭載の small RNA についてシーケンスを行い網羅的遺伝子発現解析およびプロテオミクス解析を行った。さらに、子宮内膜上皮細胞および間質細胞に *Fusobacterium nucleatum* 由来 BEVs を添加して表現系変化を確認した。*Fusobacterium nucleatum* 由来 BEVs を子宮内膜間質細胞に添加したときに子宮内膜症の表現系の一つである遊走能の亢進が確認された。これらの表現系を引き起こす可能性のある BEVs 内搭載 RNA を絞り込み、今後の核酸薬の開発に向けて取り組む予定である。また、治療対象患者の選別と BEVs 特異的治療法臨床応用に向けた展開として、腔内スワブ検体での *Fusobacterium* の存在を特異的プライマー配列使用の上 PCR 法にて検出した。子宮内膜症のない患者では *Fusobacterium* 陰性が8名 (47.1%)、陽性が9名 (52.9%)、子宮内膜症ありの患者で *Fusobacterium* 陰性が4名 (19.0%)、陽性が17名 (81.0%) となった (Fisher's exact test, $P = 0.087$)。この結果から腔内スワブサンプルは子宮内膜症の診断として用いることができる可能性が考えられたが、子宮内膜症なし患者での陽性率が高く、偽陽性率が高いことが懸念された。

緒 言

子宮内膜症 (以下、内膜症) は逆流月経血内の子宮内膜細胞が子宮内腔外に接着、増殖して発症する疾患で、下腹部疼痛や不妊症の原因となる¹。妊娠後の周産期合併症や、閉経後の卵巣癌の発症にも関連し、生涯にわたり女性の QOL を大きく損なう病態である。月経血逆流により子宮内膜細胞が卵管経由で腹腔内に流入することが成因の一つと考えられているが、殆どの生殖年齢女性で月経血逆流が起こる一方で、内膜症の発症率は10%程度であることから、内膜症成立には未知なる発症メカニズムが存在すると考えられる。現行の治療法として内膜症病巣の摘出術及びホルモン療法による偽閉経療法が広く行われている。しかし、これらの古典的治療法の大きなデメリットは、妊娠を希望する女性に対しての病巣摘出術は正常卵巣組織合併切除による術後の卵巣予備能低下をきたすこと、及び排卵を医原的に止める

ホルモン療法では治療期間中の妊娠が望めないことである。さらに、古典的治療法では全ての患者が根治可能なわけでは無く、術後の高頻度再発やホルモン剤使用対象患者の限定及び薬剤副作用等の課題が存在するため、内膜症の病態メカニズムに即した抜本的な新規治療法が望まれている。申請者らは内膜症発症原因菌として *Fusobacterium* を発見したことから発展し^{2,3}、本研究では子宮内細菌が放出する細胞外小胞 (bacterial extracellular vesicles: BEVs、エクソソーム) に着目した病態機能解析を行い、新規治療法の創出につなげることを目的とする。

方 法 (倫理記載)

1) BEVs 内搭載 RNA 及びタンパクのプロファイル
解明と病態機能解析

Fusobacterium nucleatum、*E. Coli* (K12 株)、*Lactobacillus crispatus*、*Lactobacillus gasseri*、

Lactobacillus jensenii, *Lactobacillus iners* の6種類の菌体について適切な液体培地で培養し、超遠心法にてBEVsを抽出した。それぞれのBEVs粒子径について nano particle tracking assay で計測し、凍結電子顕微鏡で画像解析を行った。菌体およびBEVs搭載の small RNA についてシークエンスを行い網羅的遺伝子発現解析およびプロテオミクス解析を行った。

2) 治療対象患者の選別と BEVs 特異的治療法臨床応用に向けた展開

内膜症保有患者の妊娠希望症例（偽閉経ホルモン療法適応外患者）に対して治療最適患者選別のため、腔内スワブ検体や内膜吸引組織診での内膜症原因細菌の存在を特異的プライマー配列使用PCR法で検討した。なお、本研究内容についてはヒトを対象とする

研究内容であり当院の倫理委員会で承認を受けている。

結果

1) BEVs内搭載RNA及びタンパクのプロファイル解明と病態機能解析

6種類の菌体についてそれぞれの適切な液体培地で培養し菌体濃度が最高になる時点から8時間以内にBEVsを回収した。それぞれの菌体が放出するBEVsは nano particle tracking assay で粒子径が確認でき、凍結電子顕微鏡で脂質二重膜に囲まれる形態を確認できた（図1）。シークエンス結果から菌体とBEVs搭載のRNAは大きく異なる母集団を持ち、菌体から能動的にBEVs内にRNAを搭載して細胞間伝達として用いている可能性が示唆された（図2）。さ

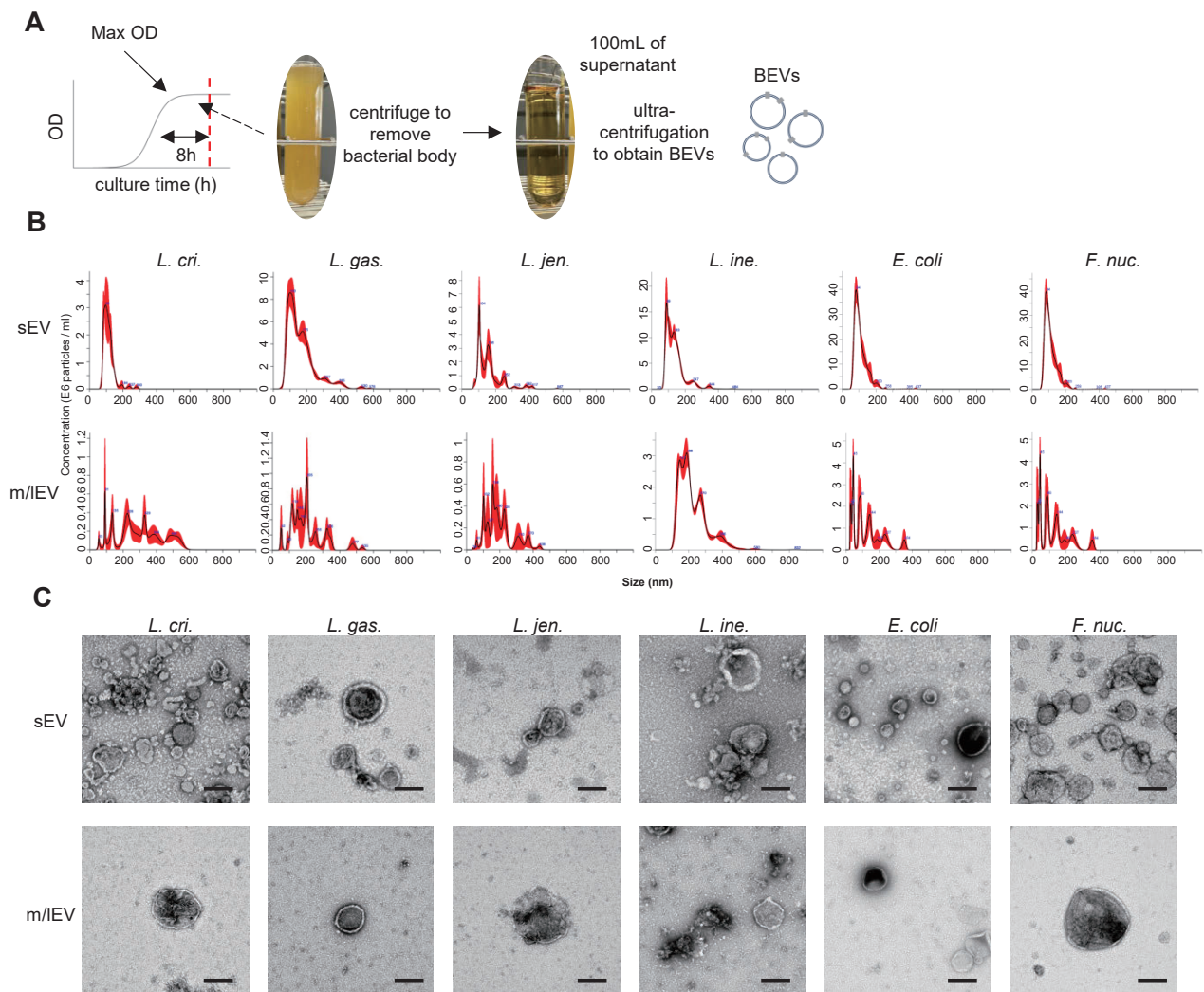


図1. 細菌培養と BEVs の検証

(A)細菌培養と BEVs 回収プロトコール (B)nano particle tracking assay による粒子径の測定 (C)凍結電子顕微鏡による脂質二重膜構造の可視化 sEV: small EV, m/IEV: midiam and large EV, Scale bars, 200 nm.

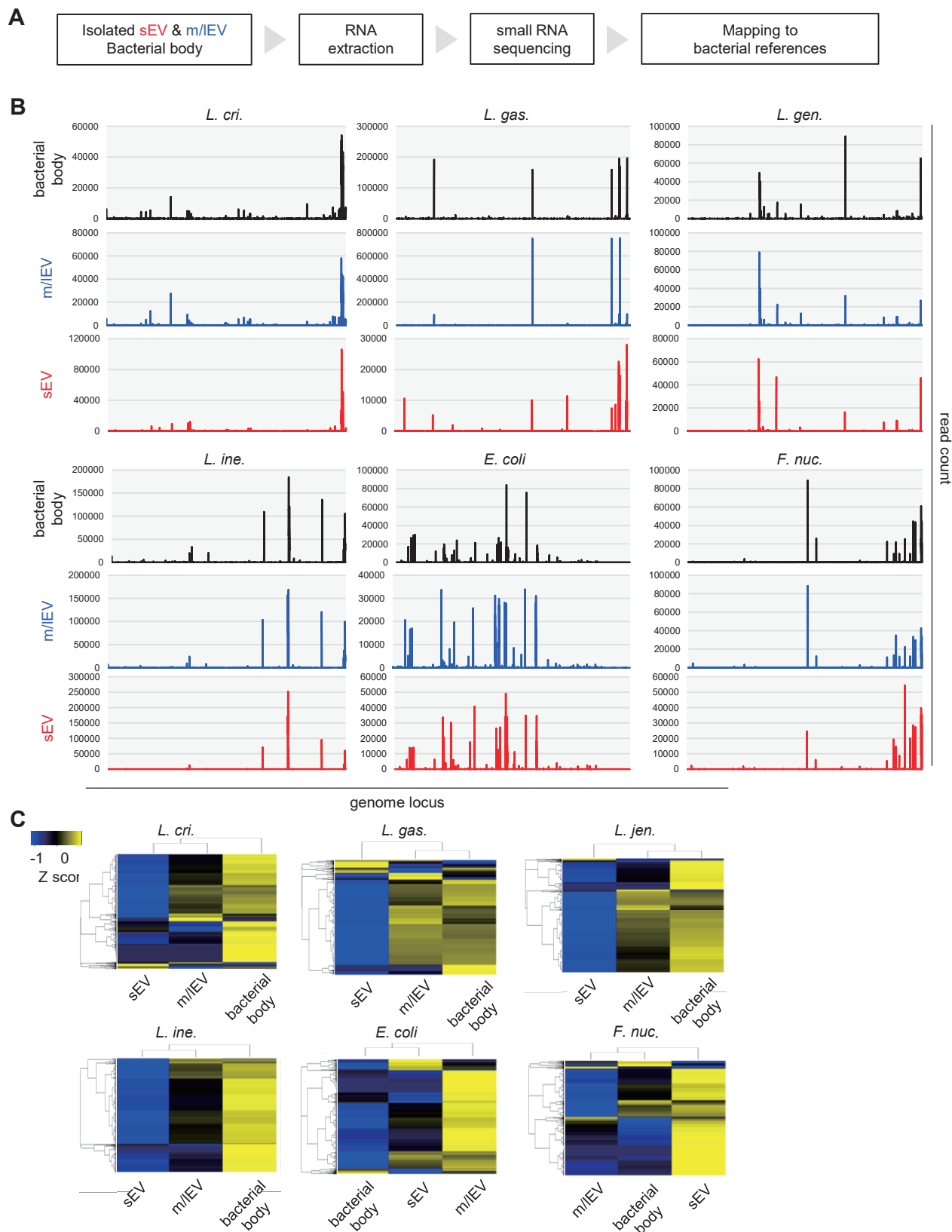


図2. 細菌菌体と BEVs のシーケンス解析

(A)シーケンスフローチャート (B)細菌の genome へマッピングして解析

(C)菌体と BEVs のシーケンス結果ヒートマップ

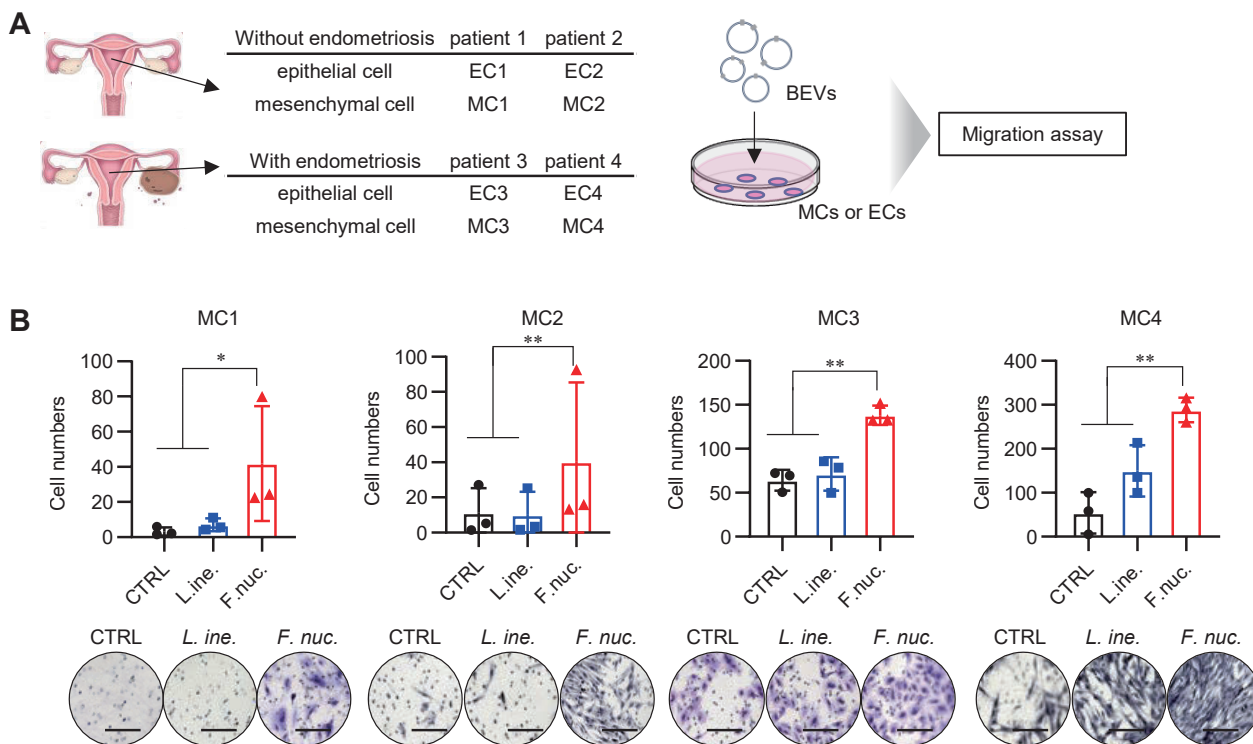


図3. BEVsの機能解析

(A) BEVsを添加して遊走能実験を検討した細胞の表

(B) 遊走能結果と遊走した細胞の実体顕微鏡像 Scale bar, 100 μ m.

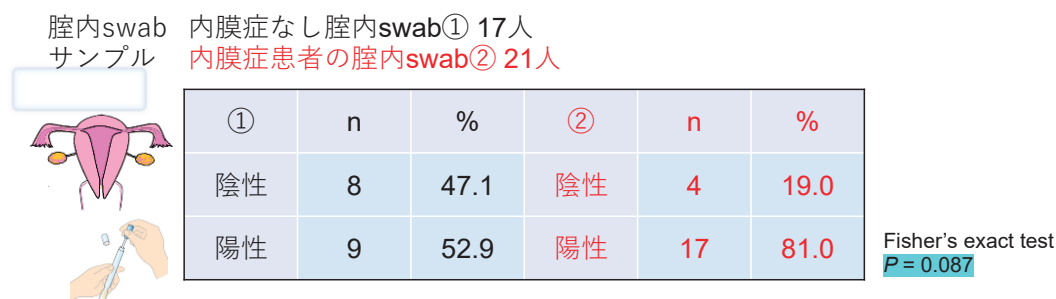


図4. 腔内スワブ検体での *Fusobacterium* 検出結果

らに、樹立済みの子宮内膜上皮細胞および間質細胞に *Fusobacterium nucleatum* 由来BEVs、およびコントロール菌としてアジア人女性で腔内存在率の高い *Lactobacillus iners* を選択して *Lactobacillus iners* 由来BEVsを添加して表現系変化を確認した^{4,5}。 *Fusobacterium nucleatum* 由来BEVsを子宮内膜間質細胞に添加したときに子宮内膜症の表現系の一つである遊走能の亢進が確認された (図3)。

2) 治療対象患者の選別とBEVs特異的治療法臨床応用に向けた展開

内膜症患者かつ妊娠希望症例に対して治療最適患者選別のため、腔内スワブ検体での *Fusobacterium*

の存在を特異的プライマー配列使用の上PCR法にて検出した。対象は子宮内膜症のない患者からの腔内スワブサンプル17人分と、子宮内膜症患者の腔内スワブサンプル21人分とした。腔内スワブサンプルからDNAを抽出し、PCR法にて菌体の存在を確認した。子宮内膜症のない患者では *Fusobacterium* 陰性が8名 (47.1%)、陽性が9名 (52.9%)、子宮内膜症ありの患者で *Fusobacterium* 陰性が4名 (19.0%)、陽性が17名 (81.0%) となった (Fisher's exact test, $P = 0.087$ 、図4)。

考察

子宮内膜症原因細菌の放出するBEVsは子宮内膜

間質細胞に遊走能の亢進を引き起こすことが確認された。今後はBEVs内搭載RNAを絞り込み、今後の核酸薬の開発に向けて取り組む予定である。治療対象患者の選別結果から腔内スワブサンプルは子宮内膜症の診断として用いることができる可能性が考えられたが、内膜症なし患者での陽性率が高く、偽陽性率が高いことが懸念された。今後症例数を増やして検証していきたい。

引用文献

1. Saunders P.T.K. and A.W. Horne, Endometriosis: Etiology, pathobiology, and therapeutic prospects. *Cell*, 2021. 184(11): p.2807-2824.
2. Muraoka A, Suzuki M, and Hamaguchi T, et al., Fusobacterium infection facilitates the development of endometriosis through the phenotypic transition of endometrial fibroblasts. *Sci Transl Med*, 2023. 15(700):eadd1531.
3. Muraoka A, Yokoi A, and Kajiyama H, Emerging bacterial factors for understanding pathogenesis of endometriosis. *iScience*, 2024. 27(1):108739.
4. Muraoka A, Osuka S, and Kiyono T, et al., Establishment and characterization of cell lines from human endometrial epithelial and mesenchymal cells from patients with endometriosis. *F S Sci*, 2020. 1(2): p.195-205.
5. Ravel J, Gajer P, and Abdo Z, et al., Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci*, 2011. 108 Suppl 1: p.4680-7.

Abstract

We recently reported that *Fusobacterium* is involved in the pathogenesis of endometriosis. Here, we isolated bacterial EVs (BEVs) from six species of common vaginal bacteria and analyzed their components by comprehensive small RNA sequencing. We then examined the influence of these BEVs on host cells. We showed that BEVs from *Fusobacterium nucleatum* (F. nuc.), an endometriosis-associated bacterium, significantly stimulated the migration ability of endometrial mesenchymal cells ($P < 0.01$). As part of efforts to identify patients suitable for treatment and promote the clinical application of BEVs-specific therapy, the presence of *Fusobacterium* species in vaginal swab specimens was detected using PCR with specific primer sequences. In the group without endometriosis, 8 cases (47.1%) were *Fusobacterium*-negative, and 9 cases (52.9%) were positive. In the endometriosis patient group, 4 cases (19.0%) were negative, and 17 cases (81.0%) were positive (Fisher's exact test, $P = 0.087$). Going forward, we will focus on BEVs and develop our technology based on our research findings.