

平成 30 年 9 月 7 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10724

研究課題名(和文)子宮筋腫が増大する機序に関する分子生物学的研究

研究課題名(英文)Molecular biological mechanisms of uterine leiomyoma growth.

研究代表者

佐藤 美紀子(SATO, Mikiko)

横浜市立大学・附属病院・准教授

研究者番号：70326049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：子宮筋腫がエリスロポエチン(EPO)を産生し、多血症を呈す病態をヒントに子宮筋腫とEPOについて検討した。先行研究で我々は、一部の筋腫はEPOを高発現しており、EPO発現と腫瘍径には相関が認められることから、EPOが一部の筋腫に見られる巨大な増大に関与している可能性を報告した。

本研究では、EPO発現と筋腫に多いMED12遺伝子変異との関連およびEPO発現を調節する因子について検証を行った。その結果、EPOはMED12野生型の筋腫で特異的に分泌されており、低酸素よりもエストロゲンがその調節に関与していることを示した。本研究は、子宮筋腫の遺伝生物学的な多様性を解明する一助になったと考える。

研究成果の概要(英文)：We have previously implicated erythropoietin (EPO) production in promoting the growth of some leiomyomas. In this study, we proceeded to explore the mechanisms of EPO production in leiomyomas and the role of EPO in leiomyoma growth. Thus, the relationship between EPO mRNA expression and the mutation of MED 12 gene, the major gene reported to be deeply involved in tumorigenesis of leiomyomas, was assessed.

Consequently, we found robust increase of EPO only in MED12 wild type leiomyomas. In addition, estrogen induced EPO mRNA expression in MED12 wild type leiomyomas whereas hypoxia did not affect EPO expression with or without the estrogen treatment.

Since EPO expression level was significantly correlated with the tumor size, our study proposed a noble phenotype and mechanisms of leiomyomas to grow large in response to estrogen.

研究分野：産婦人科

キーワード：子宮筋腫 エリスロポエチン

## 1. 研究開始当初の背景

1972年、Spurlin GWらが巨大子宮筋腫に合併した赤血球増多症の一例 (Myomatous erythrocytosis syndrome: MES) を報告し (Spurlin GW et al, Obstet Gynecol. 1972 Nov;40(5):646-51)、その後 MES は子宮筋腫細胞自身が赤芽球の増殖・分化因子である erythropoietin (EPO) を分泌することによって発症するとの報告がなされた。我々はこれまでに赤血球増多症を呈していない子宮筋腫症例 114 例を解析し、臨床上 MES を呈していない筋腫でも正常子宮筋層に比して EPO mRNA と蛋白を高発現している症例が高率に存在することを見出した。さらに EPO mRNA 発現と子宮筋腫径との間には正の相関関係があり、腫瘍細胞から分泌される EPO が子宮筋腫の発育に関与していること、また、EPO 高発現の子宮筋腫には腫瘍内血管の拡張・壁肥厚が認められ、EPO は腫瘍内血管成熟を介して腫瘍の増大に寄与していることをしめした (Asano R, Asai-Sato M et al. Am J Obstet Gynecol. 2015)。

## 2. 研究の目的

子宮筋腫は腫瘍変性もなく cell viability を保ちながら腹腔内を占拠するほど巨大化することがあり、その機序解明が各症例に対する適切な治療方針立案や新規の治療法確立のために重要である。我々は現在までに EPO が正常筋層に比較して筋腫で高発現しており、腫瘍の発育に関与している可能性があることを明らかにした。本研究は子宮筋腫における EPO の発現機序とその作用を検討し、各症例に適した治療計画の選択については治療標的へ応用することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究は学内倫理委員会の認可を得て施行されており、全ての症例より文書による同意を得て行われた。

子宮筋腫細胞において EPO が発現する機序を解明する目的に研究を行った。子宮筋腫組織 108 個の EPO mRNA 発現量を Real-Time PCR 法で解析した。

子宮筋腫の原因として最も頻度が高い遺伝子異常である MED12 (約 70% の子宮筋腫の原因とされる) の変異をサンガーシークエンス法で解析し、子宮筋腫による EPO mRNA 発現との関連を解析した。

また、子宮筋腫はエストロゲン依存性に増大する腫瘍であることから、エストロゲンの子宮筋腫による EPO mRNA 発現に対する影響を検討した。初代培養した子宮筋腫細胞、正常子宮筋層細胞に対して 17 $\beta$ -estradiol を添加し、EPO mRNA 発現の変化を Real-time PCR

法で解析した。

## 4. 研究成果

### (1) MED12 野生型の子宮筋腫では MED12 変異型の子宮筋腫と比較して EPO mRNA 発現が高い。

108 検体の子宮筋腫の MED12 変異を解析した。MED12 変異は 52 症例、48% で検出された。MED12 野生型では有意に EPO mRNA 発現が高かった。(EPO level: MED12 野生型, 5453  $\pm$  5721; 変異型, 1833  $\pm$  2390;  $P=0.001$ , Mann-Whitney  $U$  test)(図 1)。このことから、MED12 野生型の子宮筋腫は変異型と比較して腫瘍内 EPO 発現が高く、腫瘍内血管成熟が促されることにより増大しやすいことが考えられる。また、EPO mRNA 発現が高値な子宮筋腫は MED12 野生型である傾向を示した(図 2)。

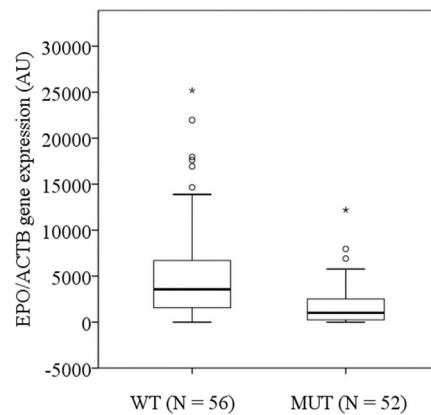


図 1 MED12 野生型 (WT) は変異型 (MUT) と比較し EPO mRNA 発現が高い。

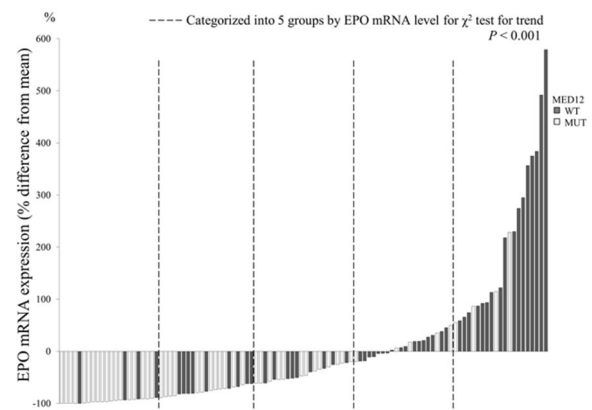


図 2 MED12 野生型 (WT) は変異型 (MUT) の EPO 発現量の分布。EPO mRNA 高発現の子宮筋腫は MED12 野生型である傾向を示している。

### (2) 子宮筋腫初代培養細胞ではエストロゲンにより EPO mRNA 発現が上昇する。

子宮筋腫 10 個および対応する子宮筋層 8 個を初代培養し、エストロゲン ( $10^{-8}$  M 17 $\beta$ -estradiol) が EPO mRNA 発現に及ぼす影響を検討した。子宮筋腫による EPO mRNA 発現はエストロゲンにより 1.6 倍に上昇する (range

0.8-3.0,  $P=0.017$ ; Wilcoxon signed rank test)(図3)。一方、正常子宮筋層では1.2倍と有意な上昇は見られなかった。

子宮筋腫は正常子宮筋層と比較してエストロゲンに対する感受性が高く、EPO mRNA 発現亢進を来すことにより成長している可能性がある。

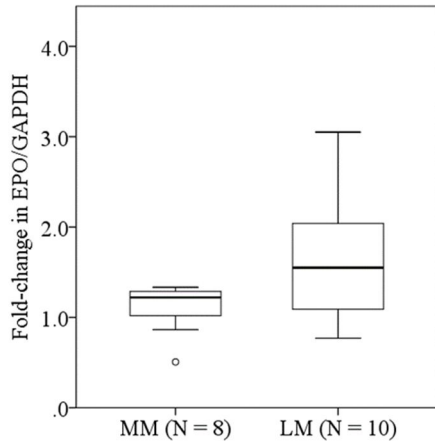


図3 エストロゲン( $10^{-8}$  M 17 $\beta$ -estradiol)は子宮筋腫(LM)に対してはEPO mRNA 発現を亢進させる作用を持つが、正常子宮筋層(MM)に対しては有意な効果はなかった。

### (3) エストロゲンに反応してEPO mRNAを亢進させる子宮筋腫はMED12野生型である。

各々の子宮筋腫初代培養細胞を検討すると、エストロゲンに反応して顕著なEPO mRNA 発現亢進した子宮筋腫は10例中5例であった(図4)。

初代培養を施行した子宮筋腫のMED12変異を解析したところ、MED12変異を4例認め、6例は野生型であった。

エストロゲンに反応してEPO mRNA 発現を亢進させた5例はいずれもMED12野生型であった。MED12変異の有無とエストロゲンに反応してEPO mRNAを亢進させる減少に有意な関連を認めた( $P=0.048$ , Fisher's exact test)。

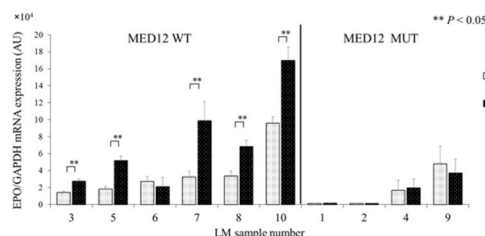


図4 エストロゲン(E)に反応してEPO mRNAを亢進させる子宮筋腫は全てMED12野生型であった。MED12野生型の子宮筋腫はエストロゲンに反応してEPOを産生し、自己分泌により腫瘍増大を促している可能性がある。

## 結果のまとめ：

我々はこれまでにEPOを高発現している子宮筋腫は腫瘍径が大きく、腫瘍内の血管成熟が亢進していることを報告した。本研究では、さらに子宮筋腫でのEPO発現の機序について検討し、EPO発現が高い子宮筋腫はMED12野生型であることを示した。また、MED12野生型の子宮筋腫はエストロゲンに反応し、EPO発現を亢進させていた。MED12変異型の筋腫は一般に腫瘍径が小さくエストロゲンに反応しにくいことが報告されている。このことから少なくともMED12野生型子宮筋腫の一部においては、エストロゲンに反応しEPOを発現することによって腫瘍内血管が成熟、腫瘍への酸素供給が保たれることにより腫瘍が増大する症例が含まれている可能性が推測される。

本研究をさらに発展させることにより子宮筋腫が巨大化する機序を解明し、腫瘍増大予測マーカーや新たな薬物治療ターゲットの開発へつながることが期待される。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 3 件)

1. 浅野涼子, 佐藤美紀子, 水島大一, 佐藤麻希子, 宮城悦子, 平原史樹. 子宮筋腫によるエリスロポエチン産生とその腫瘍増大因子としての機能解析. 第68回日本産科婦人科学会学術講演会(ミニワークショップ), 東京, (2016)
2. Ryoko Asano, Mikiko Asai-Sato, Yohei Miyagi, Etsuko Miyagi. Estrogen increases erythropoietin mRNA expression in uterine leiomyoma; a novel role of estrogen in uterine smooth muscle tumor, The 16th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, Lisbon, Portugal, (2016)
3. 浅野涼子, 佐藤美紀子, 宮城洋平, 宮城悦子. 子宮筋腫のエリスロポエチン発現はエストロゲンにより亢進する. 第16回日本婦人科分子標的研究会学術集会, 沖縄, (2017)

### 6. 研究組織

(1)研究代表者 佐藤美紀子 (SATO Mikiko)  
(横浜市立大学・附属病院・准教授)  
研究者番号：70326049

(2)研究分担者 宮城洋平 (MIYAGI Yohei)  
(地方独立行政法人神奈川県立がんセンター  
(臨床研究所・部長)  
研究者番号：00254194

(3)連携研究者 平原史樹 (HIRAHARA Fumiki)  
(国立病院機構横浜医療センター・院長)  
研究者番号：30201734

(4)連携研究者 宮城悦子 (MIYAGI Etsuko)  
(横浜市立大学・医学研究科・教授)  
研究者番号：40275053

(5) 連携研究者 榊原秀也 (SAKAKIBARA Hideya)  
(横浜市立大学・附属市民総合医療センター・准教授)  
研究者番号：60235140

(6)連携研究者 長嶋洋治 (NAGASHIMA Yoji)  
(東京女子医科大学・医学部・教授)  
研究者番号：10217995

(7)連携研究者 山中正二 (YAMANAKA Shoji)  
(横浜市立大学・附属病院・准教授)  
研究者番号：80264604

(3)連携研究者 幡多政治 (HATA Masaharu)  
(横浜市立大学・医学研究科・教授)  
研究者番号：60285145