

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15603

研究課題名(和文) 微小環境からみた婦人科腫瘍進展機序の包括的研究

研究課題名(英文) Integrated approach in investigation of gynecologic tumors based on their microenvironments

研究代表者

岩瀬 明 (Iwase, Akira)

名古屋大学・医学部附属病院・病院教授

研究者番号：20362246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症と卵巣癌には、卵巣には時に大きな腫瘤形成が、腹膜には散在性の小さな病変が多発するという共通点がある。我々は生着場所依存性の発育様式に着目し、微小環境と腫瘍進展についての研究をおこなった。

子宮内膜症間質細胞を用いた実験で、細胞外マトリクスへの接着依存性のmonocyte chemotactic protein-1とtransforming growth factor- $\alpha$ の産生増加をみとめた。これらはfocal adhesion kinase (FAK) インヒビターで抑制された。本研究により子宮内膜症の特徴である線維化と炎症の経路として、FAK依存性の微小環境での接着の重要性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Endometriosis and ovarian cancer often cause relatively big ovarian cystic lesions and small disseminated lesions on peritoneum. We focused on the common features of endometriosis and ovarian cancer and explored interrelation between tumorigenesis and tumor microenvironments.

We found the production of monocyte chemotactic protein-1 and transforming growth factor- $\alpha$  from endometriotic stromal cells induce by the adhesion onto extracellular matrix that was inhibited by focal adhesion kinase (FAK) inhibitor. Our results indicated the significance of FAK-mediated signaling in two distinguished features of endometriosis, local inflammation and fibrosis. FAK can be a therapeutic target of endometriosis.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮内膜症 卵巣癌 チョコレート嚢胞 腹膜播種 Focal adhesion kinase

## 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症の病因・病態は完全には解明されていないが、逆流月経血中子宮内膜細胞移植説が有力な仮説として認識されている。子宮内膜症病変には主に腹膜表在性病変、子宮内膜症性卵巣嚢胞(チョコレート嚢胞)があるが異なる特徴を有する。腹膜病変は、主に骨盤腹膜表面に0~1cm程度のスポットとしてみとめられるに過ぎないが、チョコレート嚢胞は古い血性内容を含み数cm~十数cmに達し、その嚢胞被膜に内膜症組織が存在する。それぞれの内膜症病変は組織学的に同様の構造を示し、多くの場合、腹膜病変およびチョコレート嚢胞が同時にみとめられることから、内膜症組織固有の性質によりその違いがもたらされているとは考えにくい

卵巣癌も卵巣から腹膜に播種することが多いが、近年、上皮性卵巣癌に分類されている serous adenocarcinoma が卵管原発悪性腫瘍であることを示唆する報告がある。卵管由来の癌細胞が腹腔内に逆流し卵巣・腹膜に生着することは想定されるが、卵管原発と推定される serous adenocarcinoma も卵巣病変も時に10cmを超える腫瘍を形成するのに対し腹膜播種性病変のひとつひとつは小さな散布性である。以上より、逆流子宮内膜細胞、卵管癌細胞が異所性に生着・増殖し病変を形成する際に、腹膜、卵巣といった微小環境により腫瘍増殖および進展が影響を受けている可能性がある。

## 2. 研究の目的

婦人科腫瘍の多くは子宮または卵巣から発生し、骨盤内を進展の主要部位とし腹膜・大網に播種をしていく。子宮内膜症は腫瘍ではないが、類腫瘍の性質を有し卵巣・腹膜に病変を形成する。また卵巣癌は卵巣の腫瘍形成と腹膜播種が特徴である。これらには類腫瘍と悪性腫瘍との違いがあるが、卵巣と腹膜(大網含む)に病変を形成し、卵巣には時に大きな腫瘍形成が、腹膜には散布性の小さな

病変が多発するという共通点がある。すなわち腹膜と卵巣は婦人科(類)腫瘍の生存に適した部位であるが、その病変形成、とくに病変の大きさには幾分の相違点が存在している。

これまで子宮内膜症や卵巣癌については、子宮内膜症細胞、卵巣癌細胞そのものを研究のマテリアルとして扱ってきた。しかしながら上記のように局所的な増殖・進展形式に組織特異的な面があると考えれば、同じオリジンである細胞が進展部位により、大きさや性質の異なる病変を形成する点を説明しやすい。本研究では、卵巣腫瘍や類腫瘍の性質を有する子宮内膜症細胞の増殖・進展に、周囲微小環境との相互作用が存在するのではないかという仮説のもと婦人科腫瘍に対する包括的研究を行う点を主たる目的とする。そのため、まず子宮内膜(症)細胞、卵巣癌細胞が周囲微小環境からどのような影響を受けるかを解析する。腹膜と卵巣に着目し、腹膜中皮細胞、卵巣上皮細胞由来コンディショニングメディウム添加またはco-culture等の系により子宮内膜(症)細胞、卵巣癌細胞の増殖能、浸潤能等の変化を解析するとともに遺伝子発現の変化を網羅的に解析する。また子宮内膜(症)細胞、卵巣癌細胞が腹膜中皮、卵巣上皮に及ぼす影響についても解析し、腫瘍周囲微小環境の双方向作用による腫瘍進展機序を考察する。

本研究は腫瘍進展部位と腫瘍との相互作用に着目し、子宮内膜症と卵巣癌といった個別に研究されることの多いテーマについて横断的・包括的に研究を行うことに特色がある。本研究により共通の進展先を有する異なる婦人科腫瘍について共通の性質および異なる性質を抽出することが可能となり、それぞれの疾患の理解に役立つ。また進展先(腹膜・卵巣)とのインターアクションが腫瘍進展を防止する新規の治療ターゲットになる可能性がある。

### 3. 研究の方法

#### (1) 内膜症病変周囲微少環境が内膜症細胞に及ぼす影響の解析

卵巢上皮細胞、腹膜中皮細胞由来コンディションドメディウムによる内膜(症)細胞の増殖・接着能変化と遺伝子発現解析

手術時摘出検体から、腹膜中皮細胞および卵巢上皮細胞をコラゲナーゼ/トリプシン処理にて分離、培養した。初代培養細胞を用いてそれぞれのコンディションドメディウムを採取した。また同様に手術検体から正所性内膜細胞(上皮、間質)、チョコレート嚢胞由来子宮内膜症間質細胞を分離・培養した。

#### 増殖能評価・アポトーシス評価

腹膜中皮細胞および卵巢上皮細胞由来コンディションドメディウムを各種濃度(0%: コントロール, 10, 20, 50, 100%)で添加し、正所性内膜上皮細胞、正所性内膜間質細胞、子宮内膜症間質細胞に添加し増殖能を MTS アッセイおよび BrdU アッセイにて解析した。コンディションドメディウム添加により、内膜(症)細胞の抗アポトーシス能が修飾を受ける可能性があるため、TUNEL 法にてアポトーシスの評価を行った。

#### 接着能評価

正所性内膜間質細胞、子宮内膜症間質細胞の細胞外マトリックス(コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ヒアルロン酸)への接着能が、腹膜中皮細胞および卵巢上皮細胞由来コンディションドメディウム添加にてどのように変化するか検証した。コンディションドメディウム添加は増殖能評価と同様に行う。接着能の定量的評価は、蛍光ラベルした細胞が、上記マトリックスをコートした 96well plate にどれだけ接着したかを蛍光マイクロプレートリーダーを用いて定量的に評価した。

#### (2) 子宮内膜症細胞が内膜症発生母地に及ぼす影響の解析

Sampson の逆流月経血移植説による子宮内

膜症の発生過程においては、逆流月経血やその中に含まれる子宮内膜細胞が、生着先である卵巢表層上皮や腹膜中皮に影響を与え、子宮内膜症細胞の生着・増殖を促進している可能性が指摘されている。近年、子宮内膜症の発症には、内膜症の origin である正所性子宮内膜細胞の段階での遺伝子発現の変化が、細胞生物学的に内膜症易発症群とも呼ぶべき形質をもたらしているとする説を支持するエビデンスが蓄積されている。この説を内膜症進展の微少環境という観点から捉えなおすと、内膜(症)細胞からの内膜症形成に関わるシグナルが微少環境に影響を与えるが、微少環境の応答性の違いが、表在性病変や卵巢チョコレート嚢胞、深部内膜症といった異なる病態の形成に寄与している可能性があると考えられることができる。そのため正所性内膜細胞由来コンディションドメディウムによる卵巢上皮細胞、腹膜中皮細胞の形態変化(EMT 評価)と遺伝子発現解析が実験として有用であると考えた。

子宮内膜症の発生の initial step として、内膜(症)細胞の生着のため、発生母地となる腹膜中皮や卵巢上皮の形態変化が伴う可能性がある。また内膜症組織では組織の線維化による癒痕形成が伴うことが多いが、このような変化は腹膜表在性病変や深部内膜症にはみとめられるものの、卵巢チョコレート嚢胞では顕著ではない。すなわち内膜症の微少環境が異なる応答を示している可能性を示唆している。我々は、予備実験として月経血および正所性内膜上皮細胞由来コンディションドメディウム、内膜間質細胞由来コンディションドメディウムが、異なる程度で腹膜中皮細胞セルラインの EMT 様変化を誘導することを確認している。この系を発展させて以下の実験を行った。

月経血を採取し遠沈にて細胞成分を除去する。手術検体から得られた正所性内膜から内膜上皮細胞と内膜間質細胞を初代培養しコ

ンディションドメディウム得る。月経血および各コンディションドメディウムを各種濃度(0%: コントロール, 10, 20, 50, 100%)で添加し、卵巣上皮細胞および腹膜中皮細胞の EMT 様変化を顕微鏡下で観察するとともに EMT マーカーであるカドヘリン等の発現を解析した。また内膜症周囲組織の線維化という観点から、 $\alpha$ SMA 等の線維化マーカーの発現を評価した。

(3) 子宮内膜細胞および子宮内膜症細胞における接着依存性局所炎症・線維化惹起効果の検討

上記の方法で分離した子宮内膜間質細胞、子宮内膜症間質細胞を細胞外マトリクス(コラーゲン I, II, ラミニン、フィブロネクチン)をコートしたディッシュで培養し、炎症性サイトカイン(IL-6, IL-8, MCP-1), TGF- $\beta$  などの培養上清中濃度を ELISA キットで測定し検討した。FAK インヒビター添加にて上記物質の分泌に変化があるかどうか検討した。さらに、手術摘出検体を用い正常子宮内膜、子宮内膜症病変において FAK, リン酸化 FAK, MCP-1、マクロファージに対する免疫組織染色を行い発現量を比較検討した。

#### 4. 研究成果

手術時摘出検体から分離した腹膜中皮細胞および卵巣上皮細胞の初代培養コンディションドメディウム添加で、子宮内膜間質細胞、子宮内膜症間質細胞、卵巣癌細胞の増殖促進と、細胞外マトリクスへの接着増加をみとめた。TUNEL 法によるアポトーシスの解析では、腹膜中皮細胞および卵巣上皮細胞の初代培養コンディションドメディウム添加いずれもアポトーシスに変化はみられなかった。

当初予定では、腹膜中皮細胞および卵巣上皮細胞の初代培養コンディションドメディウムに、子宮内膜間質細胞、子宮内膜症間質細胞、卵巣癌細胞の増殖促進効果、接着促進効果等に差がみとめられた場合に、その差をも

たらず性質の違いを検討する予定であったが、腹膜中皮細胞由来コンディションドメディウムおよび卵巣上皮細胞由来コンディションドメディウムに明らかな差がみとめられなかった。

正所性内膜細胞由来コンディションドメディウムによる卵巣上皮細胞、腹膜中皮細胞の形態変化の検討では、EMT 様変化、 $\alpha$ SMA 発現に変化はみられなかった。

上記の結果からは、内膜症、卵巣癌細胞とも周囲微小環境の違いにより、生着・発育先に応じた増殖能や接着能、アポトーシスに変化が生じうるという仮説を支持するデータを得ることができなかった。

そのため、後半の研究として、コンディションドメディウム添加にて促進された細胞外マトリクスへの子宮内膜症間質細胞接着時にみられる変化の解析を中心におこなった。子宮内膜症間質細胞は細胞外マトリクス接着時に、FAK 依存性に MCP-1 (図 1,2) と TGF $\beta$  の発現が増加していることを見出した。

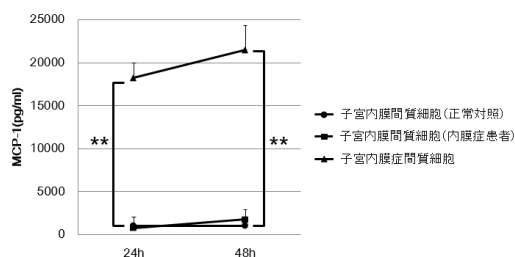


図 1 子宮内膜症間質細胞からの MCP-1 分泌

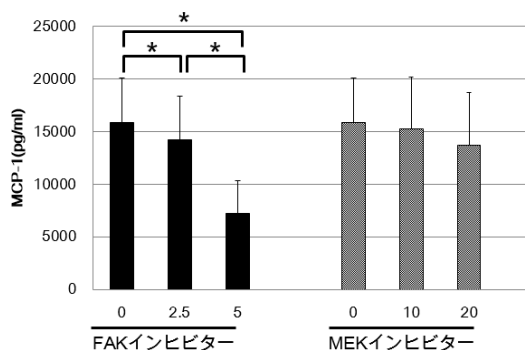


図 2 内膜症間質細胞の MCP-1 分泌は FAK 依存性である

手術検体を用いた免疫組織染色では、チョコレート嚢胞間質細胞の MCP-1 の染色とマクロファージの浸潤に正の相関をみとめた。さらに TGFβ 添加により子宮内膜症間質細胞中の αSMA 発現が増加することを見出した。以上の結果は、子宮内膜症間質細胞 - 細胞外マトリクス接着時に FAK 依存性の炎症惹起と線維化形成機転が働くことを示しており、FAK が子宮内膜症治療のターゲットとなりうることを示唆している。

総括すると、周囲微小環境の違いが腫瘍の発育形式に異なる影響を及ぼす点については実証できなかったが、内膜症細胞の生着・進展について周囲微小環境とのインターアクションが、内膜症の重要な性質である炎症惹起、線維化形成に重要であることが示された。接着、炎症惹起、線維化形成はいずれも FAK を介しており、今後は FAK の抑制が子宮内膜症の新規治療法になりうるかどうかを検証する方向への研究の発展をみた点は有意義な成果であった。

#### 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 5 件)

1. Increased secretion of monocyte chemoattractant protein-1 in endometriotic stromal cell is mediated by cell-extracellular matrix adhesion and focal adhesion kinase. Akira Iwase 4<sup>th</sup> Asian Conference on Endometriosis (国際学会) 2015.11.19-21 Dead Sea (Jordan)
2. 子宮内膜症における Focal adhesion kinase (FAK)と Monocyte chemotactic protein-1(MCP-1)の関連 永井 孝、石田千晴、中村智子、滝川幸子、後藤真紀、岩瀬 明、吉川史隆 第 37 回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会 2016.1.23-24 ホテル日航熊本(熊本県熊本市)
3. Increased secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and myofibroblastic change is mediated by focal adhesion kinase in endometriotic stromal cells. Akira Iwase, Chiharu

Ishida, Takashi Nagai, Tomohiko Murase, Tomoko Nakamura, Sachiko Takikawa, Maki Goto, Fumitaka Kikkawa 63<sup>rd</sup> Annual Meeting, Society of Reproductive Investigation 2016.3.16-19 Montreal (Canada)

4. Relationship between secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and cell extracellular matrix adhesion in endometriotic stromal cells. Takashi Nagai, Akira Iwase, Chiharu Ishida, Satoko Osuka, Tomoko Nakamura, Sachiko Takikawa, Maki Goto, Fumitaka Kikkawa 5<sup>th</sup> Asian Conference on Endometriosis (国際学会) 2016.9.22-24 大阪国際会議場(大阪府大阪市)
5. 子宮内膜症進展機序における Focal adhesion kinase の役割 永井 孝、岩瀬 明、石田千晴、加藤奈緒、大須賀智子、滝川幸子、後藤真紀、吉川史隆 第 38 回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会 2017.1.21-22 東京コンベンションホール(東京都中央区)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/obgy/>

(名古屋大学医学部産婦人科)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

岩瀬 明 (IWASE, Akira)

名古屋大学・医学部附属病院・病院教授  
研究者番号：20362246

##### (2)研究分担者

中村 智子 (NAKAMURA, Tomoko)

名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：40732681

##### (3)研究協力者

石田 千晴 (ISHIDA, Chiharu)

名古屋大学・大学院医学系研究科・大学院生

永井 孝 (NAGAI, Takashi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・大学院生