

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09219

研究課題名(和文) 子宮筋腫周囲筋層の血管新生因子発現と血管新生阻害効果に関する研究

研究課題名(英文) Role of angiogenesis and its inhibition in the surrounding myometrium for the development of uterine leiomyoma

研究代表者

石川 博士 (Ishikawa, Hiroshi)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：70553973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：子宮筋腫周囲筋層では、血管新生に重要な役割を果たす血管内皮成長因子(VEGFとVEGF受容体の発現が正常子宮筋、子宮筋腫よりも高いこと、さらに子宮筋腫の動物実験モデルに低酸素誘導因子(HIF-1)の阻害剤を投与すると、子宮筋腫の増大が止まることが明らかとなった。子宮筋腫周囲筋層の血管新生を阻害すると筋腫への血流供給が遮断され、筋腫におけるHIF-1の働きが阻害される可能性があるため、子宮筋腫周囲筋層の血管新生阻害は子宮筋腫の新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮筋腫は産婦人科で最も多い腫瘍で、女性の3人に1人が罹患すると言われているが、その病態はいまだ解明されていない。現在の子宮筋腫に対する薬物療法は女性ホルモンの作用を遮断してしまうため、6か月以上の長期間の投与が認められておらず、新しい治療法の開発が求められている。本研究で明らかとなった子宮筋腫周囲筋層の血管新生阻害効果は、女性のホルモンバランスを崩さない新しい子宮筋腫の治療法の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We identified the highest expression of mRNA of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, VEGFR1 and VEGFR2, in myometrial tissues surrounding uterine leiomyoma, so called leiomyoma pseudocapsule, compared with that in normal myometrium and uterine leiomyoma, suggesting that angiogenesis in the leiomyoma pseudocapsule may play important roles for the blood supply to the leiomyoma. We also identified the growth of leiomyoma xenograft was significantly inhibited by the administration of the inhibitors of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), which expression is higher in uterine leiomyoma than that in myometrium, in non-obese diabetes/severe combined immunodeficient mice. Because inhibition of angiogenesis in the leiomyoma pseudocapsule may induce downregulation of HIF-1 in uterine leiomyoma, these results suggest that inhibition of HIF-1 is a potential therapeutic strategy for the treatment of uterine leiomyoma.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮筋腫 血管内皮成長因子 低酸素

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 子宮筋腫は大量の細胞外マトリックスを含み、筋腫核内部の血流は乏しく慢性的な低酸素状態にある。しかし筋腫核内部では癌にみられる血管新生はほとんど起こっていない。一方、漿膜下筋腫表面の筋腫被膜直下に、しばしば太い新生血管を見ることがある。筋腫核出時の出血量軽減目的に希釈バゾプレッシンを筋腫被膜直下に局注すると、筋腫核表面の血管が収縮するだけでなく、筋腫周囲筋層も白く変色する。したがって、筋腫周囲筋層の血流を遮断することで、筋腫被膜直下への血流が減少し、筋腫の増大抑制につながると考えられる。

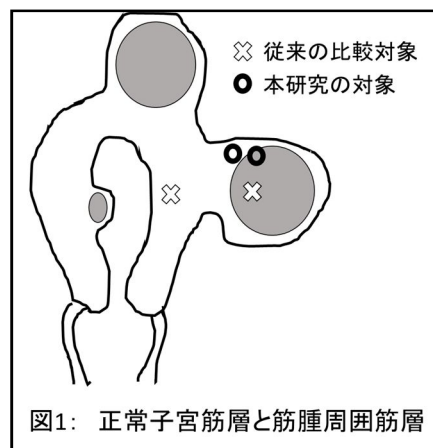


図1: 正常子宮筋層と筋腫周囲筋層

(2) 子宮筋腫核出時に筋層内筋腫を持ち上げてくると、筋腫周囲筋層は筋腫核と網目状に密に接着している。しかしながらこの層は、筋腫核出後直ちに収縮し筋腫核と離れた筋層との区別がつかなくなる。これまでの子宮筋腫研究において、臨床検体での正常子宮筋層採取は、筋腫核からできるだけ離れ、かつ、子宮内膜に近い位置で行われてきた(図1、2)。子宮筋腫と子宮筋の差異を明らかにすることで、子宮筋腫の病態に迫る研究では、筋腫周囲筋層は正常子宮筋層の一部として扱われ、筋腫周囲筋層を標的とした研究はほとんど行われてこなかった。

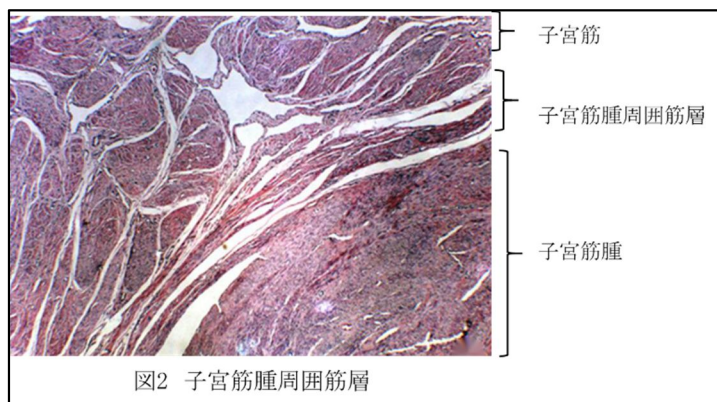


図2 子宮筋腫周囲筋層

(3) 子宮筋腫はもともと低酸素状態である。われわれは以前に低酸素で誘導される転写因子である、低酸素誘導因子 (Hypoxia-inducible factor, HIF-1) の発現が子宮筋腫で上昇していることを報告した。しかしながら、筋腫において HIF-1 阻害効果を検証した報告は見られていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、以下の3点を明らかにすることを目的とした。

- (1) 筋腫周囲筋層と正常子宮筋層の血管新生関連因子の発現
- (2) 低酸素培養下における子宮筋腫細胞と正常子宮筋細胞の遺伝子発現
- (3) HIF-1 阻害剤による、筋腫増大阻止効果

### 3. 研究の方法

(1) 文書にて同意の得られた患者から子宮筋腫、子宮筋層、子宮筋腫周囲筋層を採取し、RNA を抽出後定量的 RT-PCR を施行した。血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、VEGF 受容体 1、2 (VEGFR1、VEGFR2) の mRNA 発現を検討した。内部標準として GAPDH mRNA の発現量を用い、Ct 法で算出した。

(2) 手術検体から得られた子宮筋腫、子宮筋をコラゲナーゼ、DNase1 処理して作成した初代培養細胞を1回継代後、21%酸素 (Normoxia) と1%酸素 (Hypoxia) 条件下で12時間培養した後、RNA を抽出し cDNA マイクロアレイを行った。マイクロアレイは Agilent 社の Human 60K を使用した。発現量は正規化後、発現変動遺伝子を抽出し、GO 解析と GenMAPP による Pathway 解析を行った。

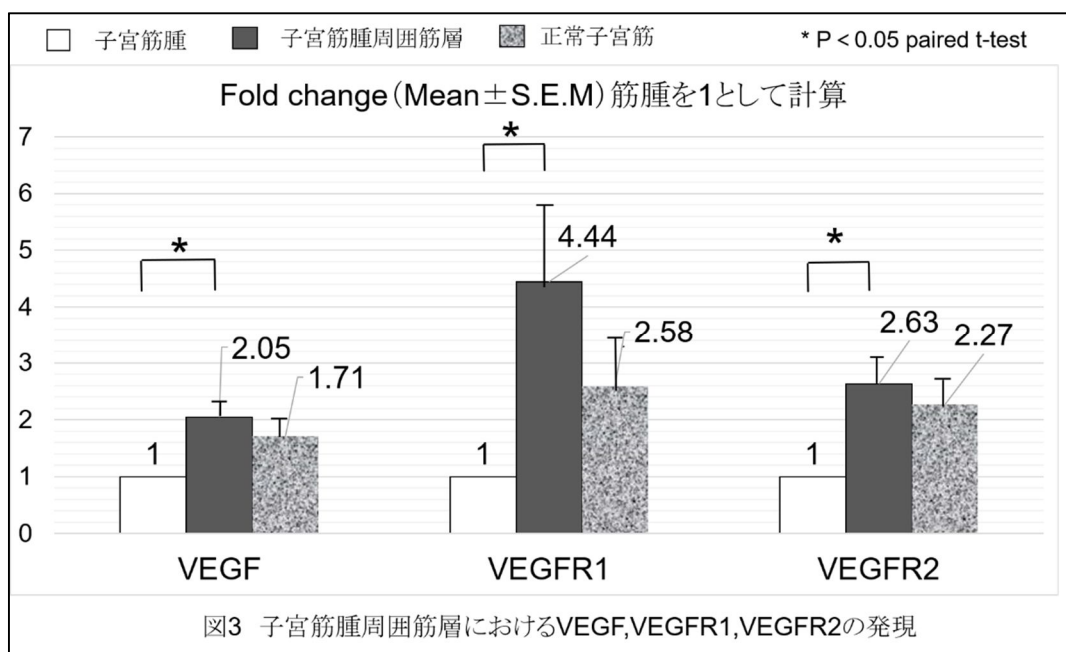
(3) 申請者らが確立した重症免疫不全マウス腎被膜下移植法を用いた子宮筋腫 xenograft モデルを用いて、子宮筋腫 xenograft に対する HIF-1 阻害剤の腫瘍増大抑制効果を検討した。筋腫 xenograft には、子宮筋腫初代培養細胞 ( $5 \times 10^6$  細胞) と1型コラーゲンを混合した筋腫細胞ゲルを使用した。また、重症免疫不全マウスとして、6-8週例の雌の Non obese diabetes/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) マウスを用いた。麻酔下にマウスの背中皮膚を切開し、腹腔内に入り、卵巣を摘除した。次いで腎を体外に誘導し、顕微鏡下に腎被膜下スペースを拡大した。このスペースに筋腫細胞ゲルを挿入し、創を閉鎖後、エストロゲンとプロゲステロンデポ剤を皮下注射した。エストロゲンとプロゲステロンは毎週皮下注射を行った。Xenograft 移植

手術2週間後から HIF-1 阻害剤である、PX-478, Echinomycin を 10 日間連日腹腔内に投与した。移植手術から 4 週間経過した時点で、マウスを解剖し、腎被膜下に移植されている筋腫 xenograft を回収した。Xenograft は体積を計測し、免疫組織化学染色にて、Ki-67 index を算出した。これらを PX-478 投与群、Echinomycin 投与群、および Vehicle 投与群で比較した。

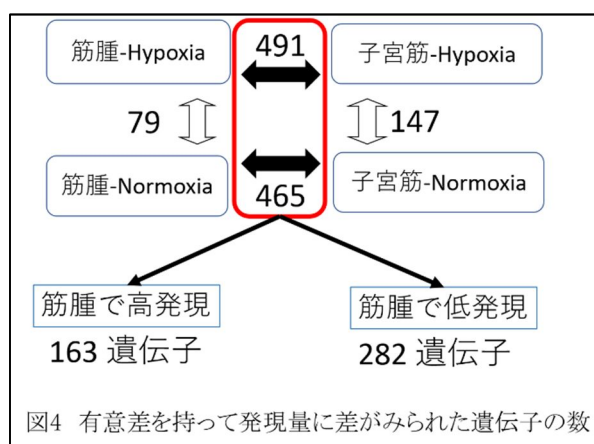
(4) 統計解析は、JMP software (SAS, Inc)を用いて行った。VEGF、VEGFR1、VEGFR2 の mRNA 発現量は筋腫を 1 としたときの相対発現量で表示した。筋腫と子宮筋腫周囲筋層、正常子宮筋と子宮筋腫周囲筋層の発現を paired t-test で解析した。Xenograft の体積、および Ki-67 index に関して、PX-478 群、Echinomycin 群、Vehicle 群の分散は一元配置の分散分析を用いて検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 子宮筋腫にて有症状のある患者から、子宮全摘の際子宮筋腫、子宮筋腫周囲筋層、および正常子宮筋を採取した。子宮筋腫周囲筋層は、血管神経束を含み、血管ネットワークを形成している。VEGF、VEGFR1、VEGFR2 の mRNA 発現を検討した結果、これらの mRNA 発現は子宮筋腫周囲筋層で最も高く、次いで子宮筋層で高く、子宮筋腫では VEGF の発現は子宮筋よりも低下していた。以上の結果から血管新生は子宮筋腫周囲筋層で活発に起こっていることが示唆された(図3)。



(2) 子宮筋腫細胞、子宮筋細胞を Normoxia, Hypoxia 条件下で培養した際の遺伝子発現プロファイルを検討した。細胞を筋腫-Hypoxia, 筋腫-Normoxia, 子宮筋-Hypoxia, 子宮筋-Normoxia の 4 群に分け、遺伝子発現プロファイルを検討した。その結果、酸素濃度に関係なく筋腫で高発現している遺伝子が 163、筋腫で低発現している遺伝子が 282 個見られた(図4)。これらの遺伝子は酸素濃度の影響を受けず、筋腫で子宮筋よりも発現が高い、あるいは低い遺伝子であることから、筋腫本来の特徴を表す遺伝子群であることが推定された。



(3) 子宮筋腫のマウス xenograft モデルのホルモン投与量、投与方法の検討を行った。エストロゲン、プロゲステロン投与注射針を太めのものに変更し、かつ注射後の針穴を瞬間接着剤で閉じることにより、投与ホルモンの漏れを最小限にすることを試みた。この注射方法の改良により、ホルモン剤の体表への漏れがなくなり、xenograft が増大する比率が上昇した。ところが一定の割合で性ホルモンを漏れなく投与しても増大しない筋腫 xenograft が存在した。この原因として xenograft を構成する初代子宮筋腫細胞の増殖速度が遅い場合、xenograft も増大しないことを突き止めた。初代培養細胞を用いているため、患者あるいは検体自体の影響を受ける可能性が

示唆された。マウス移植片を作成する時点で増殖速度の速い筋腫細胞を使用すること、エストロゲン、プロゲステロン投与注射針を太いものに変えることで、この xenograft の増大率が上昇した。

(4) 子宮筋腫はもともと低酸素状態であり、HIF-1 の発現が亢進している。そこで子宮筋腫周囲筋層の血流を阻害すると、筋腫における HIF-1 の発現が阻害されると考えた。そこでこの改良型筋腫 xenograft モデルを用いて、HIF-1 阻害剤の筋腫増大抑制効果を検討した。HIF-1 阻害剤の PX-478, Echinomycin を投与した群では、非投与群と比較して有意に xenograft 増大効果が抑制された(図 5)。また、xenograft の細胞増殖の指標となる Ki-67 index も有意に HIF-1 投与群で低下した(図 6)。

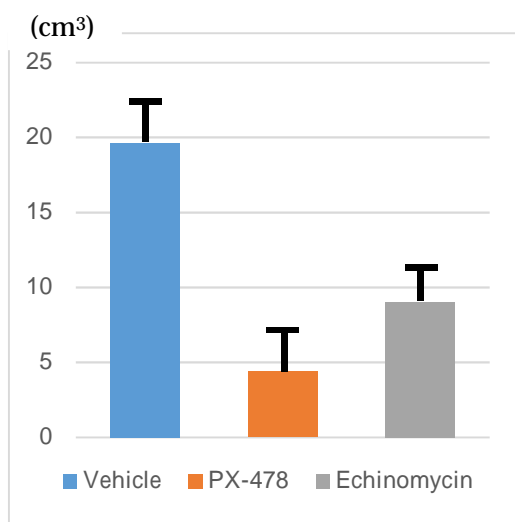


図 5 筋腫 xenograft 縮小効果

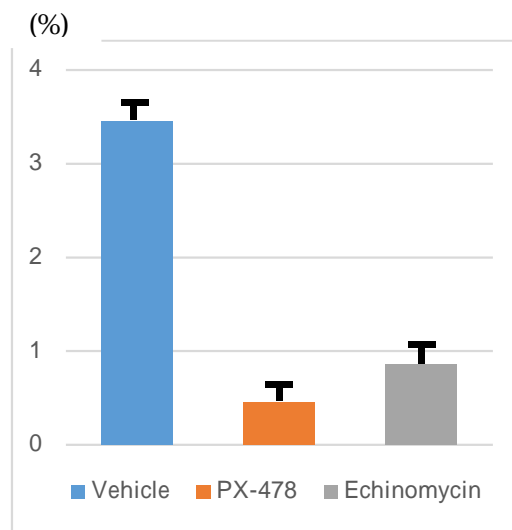


図 6 筋腫 xenograft Ki 67 index

以上より、子宮筋腫周囲筋層では正常子宮筋、子宮筋腫と比較して VEGF-VEGF 受容体の interaction が活発であることが示唆された。また、子宮筋腫で HIF-1 を阻害すると筋腫の発育が制限される可能性が示唆された。

#### <引用文献>

Ishikawa H, Xu L, Sone K, Kobayashi T, Wang G, Shozu M. Hypoxia Induces Hypoxia-Inducible Factor 1 and Potential HIF-Responsive Gene Expression in Uterine Leiomyoma. *Reprod Sci.* 2019;26(3):428-435.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Wang G, Ishikawa H, Sato A, Shozu M   | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Torsion of a Large Myomatous Uterus Associated with Progressive Renal Failure and Paralytic Ileus in an 86-Year-Old Woman. | 5. 発行年<br>2019年 |
| 3. 雑誌名<br>Case Rep Obstet Gynecol   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1155/2019/1601368.  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-       |

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>石川博士                                       |
| 2. 発表標題<br>子宮筋腫の治療戦略 Common diseaseに対するオーダーメイド治療を目指して |
| 3. 学会等名<br>第94回 日本内分泌学会（招待講演）                         |
| 4. 発表年<br>2021年                                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yanruo Zhou, Hiroshi Ishikawa, Taichi Wake, Tetsuji Nishiwaki, Makio Shozu |
| 2. 発表標題<br>VEGF and VEGF receptor expression in pseudocapsule of uterine leiomyoma    |
| 3. 学会等名<br>第73回 日本産科婦人科学会   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>石川博士                           |
| 2. 発表標題<br>子宮筋腫・子宮内膜症に対する治療法の選択 標準化から個別化へ |
| 3. 学会等名<br>第142回 近畿産科婦人科学会（招待講演）          |
| 4. 発表年<br>2020年                           |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hiroshi Ishikawa, Taichi Wake, Makio Shozu   |
| 2. 発表標題<br>HIF-1 inhibition attenuates cell proliferation, induces apoptosis, and forms tissue calcification in uterine leiomyoma |
| 3. 学会等名<br>第72回 日本産科婦人科学会   |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Taichi Wake, Hiroshi Ishikawa, Hirokazu Usui, Makio Shozu  |
| 2. 発表標題<br>Gene expression profiles of uterine leiomyoma cells cultured in extracellular matrix-free and hypoxic conditions |
| 3. 学会等名<br>第72回 日本産科婦人科学会   |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>石川博士                            |
| 2. 発表標題<br>子宮筋腫の薬物療法-GnRHアンタゴニストの使用経験を含めて- |
| 3. 学会等名<br>水戸臨床婦人科懇話会                      |
| 4. 発表年<br>2019年                            |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>石川博士                        |
| 2. 発表標題<br>子宮筋腫の薬物療法 -働く女性のQOL向上をめざして- |
| 3. 学会等名<br>第24回 日本女性医学会ワークショップ(招待講演)   |
| 4. 発表年<br>2019年                        |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>石川博士                             |
| 2. 発表標題<br>産婦人科における黄体ホルモン療法 -妊娠合併症から子宮がんまで- |
| 3. 学会等名<br>第92回 日本内分泌学会                     |
| 4. 発表年<br>2019年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ishikawa H, Xu L, Kobayashi T, Shozu M   |
| 2. 発表標題<br>Inhibition of HIF-1 blocks uterine leiomyoma growth both in vitro and in vivo. |
| 3. 学会等名<br>5th ,Congress of SEUD, Society of endometriosis and uterine disorders (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ishikawa H, Nishiwaki T, Shozu M  |
| 2. 発表標題<br>Inhibition of HIF-1 using echinomycin inhibits cell proliferation and induces apoptosis in uterine leiomyoma. |
| 3. 学会等名<br>第71回 日本産科婦人科学会  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|               | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|---------------|---|---|----|
| 研究<br>分担<br>者 | 生水 真紀夫<br><br>(Shozu Makio)<br><br>(30226302) | 千葉大学・大学院医学研究院・教授<br><br><br><br>(12501) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|