

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890038

研究課題名（和文）腎被膜下移植法によるヒト子宮筋腫の新しい実験モデルの作成とその応用

研究課題名（英文）Establishment of a new xenograft model for uterine leiomyoma using sub-renal grafting technique in immunodeficient mice.

研究代表者

石川 博士 (ISHIKAWA HIROSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：70553973

研究成果の概要（和文）：超免疫不全マウスの腎被膜下にヒト子宮筋腫細胞を移植し、エストロゲン・プロゲステロン投与下に増大する、新しい動物実験モデルを作成した。このモデルを用いて抗プロゲステロン剤である RU486 の筋腫に対する縮小効果を検証し、このモデルが薬剤効果判定スクリーニングに有用であることを示した。さらに、超免疫不全マウスに代えて重症免疫不全マウスを用いることを示し、より廉価で扱いやすい実験モデルを開発した。

研究成果の概要（英文）：We established a new xenograft model for uterine leiomyoma in which leiomyoma cell pellets were grafted beneath the kidney capsule of super immunodeficient mice. The xenografts enlarged under coadministration of estrogen and progesterone in ovariectomized mice. Then we evaluated the efficacy of RU486, which is a progesterone antagonist, for the reduction of leiomyoma xenograft size in this model. We found that RU486 significantly inhibited the growth of the xenograft even in the presence of both estrogen and progesterone. Finally, we proved that severe immunodeficient mice are suitable as hosts instead of super immunodeficient mice. Our model would be useful for the screening of potential therapeutic agents for the uterine leiomyoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：子宮筋腫、免疫不全マウス、移植モデル、エストロゲン、プロゲステロン、xenograft

## 1. 研究開始当初の背景

子宮筋腫は子宮摘出原因として最も頻度の高い疾患であるだけでなく、月経過多・不正子宮出血・貧血・不妊・早産など、女性の QOL を大きく低下させる。このため、子宮筋腫に対する新しい治療法の開発が強く望まれていた。子宮筋腫の発育は、卵巣から分泌されるエストロゲン(E)とプロゲステロ

ン(P)に依存する。ところが、子宮筋腫細胞を体外で培養すると、早期にエストロゲン受容体(ER)とプロゲステロン受容体(PR)の発現が消失するため、体外培養系は *in vivo* の増殖効果をみるためのモデルとはならない。また、Guniea pig や Eker rat などの動物モデルは宿主に筋腫が自然発生するものの、E・P 投与に対しては反応を示さない。した

がって、筋腫のホルモン依存性増殖を評価できる適切な疾患モデルを確立することが、筋腫に対する新しい治療法を評価するために重要であると考えられた。

われわれは予備実験でヒト子宮筋腫組織を超免疫不全マウスの腎被膜下に移植すると E・P 依存性に腫瘍が発育すること、逆にヒト子宮筋腫組織を同じ手法で移植しても腫瘍は全く形成されないことを確認した。

## 2. 研究の目的

- (1) この新しい子宮筋腫の *in vivo* 実験モデルの安定した作製方法を確立する。
- (2) このモデルを用いて抗プロゲステロン剤 RU486 の筋腫に対する薬剤効果判定実験を行う。
- (3) このモデルを子宮筋腫に対する薬剤効果判定スクリーニングに適した廉価で扱いやすいモデルに改良する。

## 3. 研究の方法

(1) ①十分なインフォームド・コンセントの後、文書にて同意の得られた患者から手術時に摘出した子宮筋腫組織と組織から分離・培養した  $1 \times 10^6$  個の筋腫細胞をコラーゲンゲルと混合し筋腫ペレットとした。このペレットをあらかじめ卵巣を摘除した超免疫不全マウスの腎被膜下に移植した。移植時に E・P の徐放ペレットをマウス頸部皮下に挿入し、8 週後にマウスを解剖し、腎被膜下への筋腫組織、筋腫ペレットの生着率、E・P の投与方法の違いによる増大率をそれぞれ比較した。

②移植片の組織学的変化を HE 染色、および ER・PR の免疫組織化学染色を用いて検討した。また、移植片の細胞増殖能を評価するために Ki67 指数を算出した。

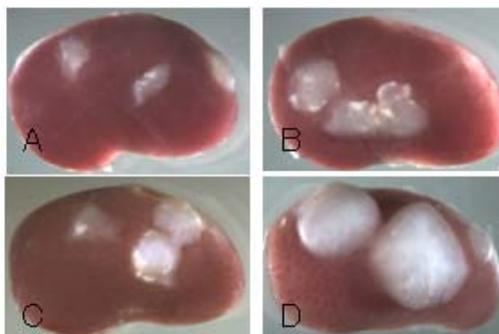
(2) このモデルに、E・P 投与下に RU486 を同時に投与し、8 週間後にマウスを解剖し、RU486 投与群と、非投与群で移植片の体積、ER・PR の発現、および Ki67 指数を比較した。

(3) このモデルでの筋腫ペレット内の細胞数を  $5 \times 10^5$  に半減させた。また、このモデルへのホルモン投与方法を E・P の徐放ペレットから E・P の注射デポ剤に変更し、モデルにおける移植片の増大度を比較した。

(4) このモデルの宿主を超免疫不全マウスから、免疫不全度が劣るヌードマウス、SCID マウス、NOD/SCID マウスに変更して、腎被膜下移植による実験モデルの再現を行った。免疫不全度の異なる宿主に同一患者から得られた筋腫ペレットを移植し、8 週間後にマウスを解剖し、移植片の増大度、増大率を宿主間で比較検討した。

## 4. 研究成果

(1) ①超免疫不全マウスの腎被膜下に子宮筋腫組織を移植したところ、E・P 同時投与下に 8 週間で有意に移植片は増大した(図 1)。

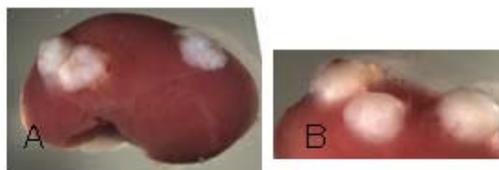


【図 1】超免疫不全マウス腎被膜下へのヒト子宮筋腫組織移植

手術で得られた筋腫組織を卵巣摘除後の超免疫不全マウス腎被膜下へ移植後、8 週後にマウスを解剖した。

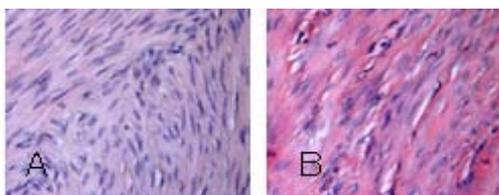
(A) ホルモン投与なし、(B) E のみ投与、(C) P のみ投与、(D) E・P 同時投与

②次に筋腫組織から分離・培養した筋腫細胞で筋腫ペレットを作成し、ペレット間の細胞密度のばらつきをなくすことで、移植片の均等な発育を保つことができた(図 2)。



【図 2】筋腫組織移植 (A) と細胞ペレット移植 (B)

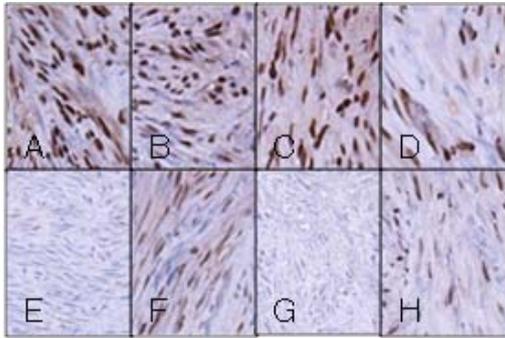
③筋腫ペレットをマウス腎被膜下に移植した後の組織学的変化を検討した。H&E 染色では、E・P 同時投与群で、移植前のもとの筋腫組織と比較して、移植片内の個々の細胞が肥大するとともに、細胞外マトリックスも増加した(図 3)。



【図 3】もとの筋腫組織 (A) と E・P の同時投与にて増大した移植片 (B)

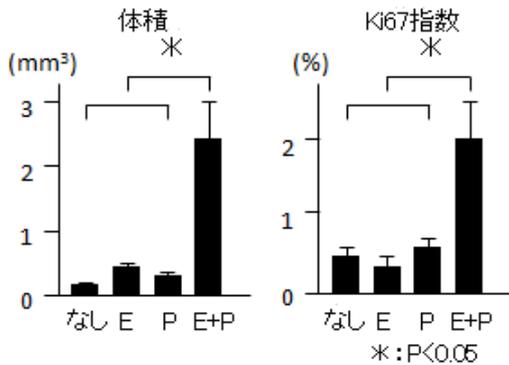
④ER の発現はホルモン投与の有無にかかわ

らず高かったが、PRの発現はEを投与した群でのみ、高いレベルで発現していた。以上よりモデル内の移植片ではE投与によりPRの発現が誘導されることが示唆された(図4)。



【図4】筋腫移植片におけるE・P投与方法の違いによるER・PRの発現  
(A)～(D)：ERに対する免疫組織化学染色  
(E)～(H)：PRに対する免疫組織化学染色  
(A・E) ホルモン投与なし  
(B・F) Eのみ投与  
(C・G) Pのみ投与  
(D・H) E・P同時投与

⑤さらにE単独群、P単独群に比べて、E・P同時投与群では有意にKi67指数の増加を認めた(図5)。すなわち、EがPRの発現を誘導し、そこにPが作用して初めて、細胞増殖能が亢進することが示唆された。

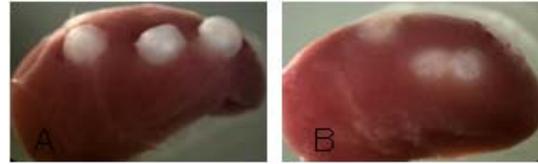


【図5】ホルモン投与方法の違いによる筋腫移植片の体積変化とKi67指数  
(なし) ホルモン投与なし、(E) Eのみ投与、(P) Pのみ投与、(E+P) E・P同時投与

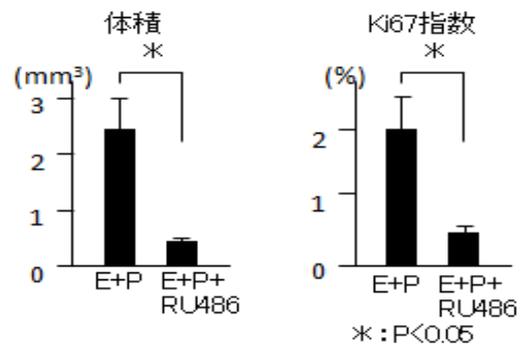
(2) このモデルを用いて、抗プロゲステロン剤であるRU486の筋腫に対する有効性を検討した。卵巣を摘除した超免疫不全マウスの腎被膜下に筋腫ペレットを挿入し、E・Pと、RU486を同時投与した(図6)。すると、RU486投与群では非投与群に比べ、有意に移植片の発育が阻害された。この時、RU486投与群では、非投与群と同様、ER・PRの発現レベルが高く保たれていたが、RU486投与群ではKi67

指数が非投与群に比べて有意に減少していた(図7)。

以上より本モデルを使ってRU486の筋腫に対する有用性が示唆された。また、本モデルは筋腫に対する薬剤効果判定スクリーニングに有用であることが示された。



【図6】RU486による筋腫移植片の縮小効果  
(A) E・P同時投与  
(B) E・P・RU486同時投与



【図7】RU486投与による筋腫細胞移植片の体積変化とKi67指数

(3) ① $1 \times 10^6$ の細胞で1個の筋腫ペレットを作成すると大量の筋腫細胞が必要となる。そこで、筋腫ペレット内の細胞数を半減させてモデルが再現できるかどうかを検討した。その結果、筋腫ペレット内の細胞数を $5 \times 10^5$ としても十分にペレットはモデル内で増大することが確認された。

②ホルモン徐放ペレットが高価であるため、ホルモン投与方法を徐放ペレットから注射デポ剤に切り替えた。ホルモン投与方法を注射デポ剤に代えても、移植片の増大率、増大度に違いは見られなかった。したがってこれ以降の実験ではホルモン投与方法を注射デポ剤に変更した。

(4) 薬剤効果判定スクリーニングに用いるためには、当初宿主に用いた超免疫不全マウスの繁殖力が弱く、高価であるため、大量に使用することができないことが問題であった。そこで、超免疫不全マウスよりは免疫不全度は劣るものの、廉価で繁殖力の強い、ヌードマウス、SCIDマウス、NOD/SCIDマウスを用いて、このモデルの再現を試みた。

その結果、ヌードマウス(T細胞欠失)、SCIDマウス(T・B細胞欠失)ではE・Pを同時に投

与した時に、移植片の増大度が超免疫不全マウスよりも小さくなったが、NOD/SCID マウス (T・B 細胞欠失、マクロファージ・補体機能低下) では超免疫不全マウスとほぼ同等の増大度を示した (図 8)。NOD/SCID マウスは長期間飼育すると胸腺腫を発症するという欠点があるが、今回の検討では最長でも 8 週間の経過観察にとどまるため、胸腺腫を発症して死亡した NOD/SCID マウスは見られなかった。



【図 8】重症免疫不全マウス腎被膜下への筋腫細胞移植

- (A) ホルモン投与なし  
(B) E・P 同時投与

以上の結果から超免疫不全マウスよりも廉価で繁殖力の強い NOD/SCID マウスはこの移植モデルの宿主として適切であると思われる。当初確立した超免疫不全マウスの腎被膜下移植モデルからホルモン投与方法と宿主を変更することにより、より簡便な薬剤効果判定スクリーニングに使える実験モデルを確立することができた。今後、このモデルを活用して、筋腫に対する新規治療薬の薬剤効果判定スクリーニングを行う予定である。

#### 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)

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

1. Zhang B, Shozu M, Okada M, Ishikawa H, Kasai T, Murakami K, Nomura K, Harada N, Inoue M. Insulin-Like Growth Factor I Enhances the Expression of Aromatase P450 by Inhibiting Autophagy. *Endocrinology*. 2010;151(10):4949-58. 査読有
2. Luo X, Coon JS 5th, Su E, Pearson EK, Yin P, Ishikawa H, Bulun SE. LAT1 Regulates Growth of Uterine Leiomyoma Smooth Muscle Cells. *Reprod Sci*. 2010;17(9):791-7. 査読有
3. Ishikawa H, Ishi K, Serna VA, Kakazu T, Bulun SE, Kurita T. Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma. *Endocrinology*. 2010;151(6):2433-42. 査読有
4. Yin P, Lin Z, Reierstad S, Wu J, Ishikawa H, Marsh EE, Innes J, Cheng Y, Pearson K, Coon V JS, Kim JJ, Chakravarti D, Bulun SE.

Transcription Factor KLF11 Integrates Progesterone Receptor Signaling and Proliferation in Uterine Leiomyoma Cells. *Cancer Res*. 2010;70(4):1722-30. 査読有

5. Bulun SE, Cheng YH, Pavone ME, Yin P, Imir G, Utsunomiya H, Thung S, Xue Q, Marsh EE, Tokunaga H, Ishikawa H, Kurita T, Su EJ. 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase-2 Deficiency and Progesterone Resistance in Endometriosis. *Semin Reprod Med*. 2010;28(1):44-50. 査読有

6. Luo X, Yin P, Reierstad S, Ishikawa H, Lin Z, Pavone ME, Zhao H, Marsh EE, Bulun SE. Progesterone and Mifepristone Regulate L-Type Amino Acid Transporter 2 and 4F2 Heavy Chain Expression in Uterine Leiomyoma Cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94(11): 4533-9. 査読有

7. Ishikawa H, Reierstad S, Demura M, Rademaker AW, Kasai T, Inoue M, Usui H, Shozu M, Bulun SE. High Aromatase Expression in Uterine Leiomyoma Tissues of African-American Women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94(5): 1752-6. 査読有

〔学会発表〕 (計 8 件)

1. 王 桂文、石川博士、大見健二、生水真紀夫。マウス腎被膜下移植法を用いた、ヒト子宮筋腫動物実験モデルの作製。平成 22 年度千葉医学会例会産婦人科部会 (2010 年 12 月 11 日 千葉)
2. Ishikawa H, Wang GW, Sone K, Kurita T, Shozu M. Evaluation of NOD/SCID and nude mice as the host for human uterine leiomyoma xenografts. *Advances in Uterine Leiomyoma Research: 3<sup>rd</sup> NIH International Congress*. Bethesda, MD, USA. (2010 年 11 月 23 日)
3. Ishikawa H, Ishi K, Shozu M, Bulun SE, Kurita T. Novel in vivo disease model for human uterine leiomyoma: a powerful tool for discovering new therapies. 20th World Congress on Fertility and Sterility. Munich, Germany. (2010 年 9 月 15 日)
4. 石川博士、確井宏和、川野みどり、木原真紀、生水真紀夫。子宮筋腫増殖の鍵はエストロゲンではなくプロゲステロンである：マウス腎被膜下移植法を用いた、新しい動物実験モデルによる検討から。第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会 (2010 年 4 月 23 日 東京)
5. Ishikawa H, Ishi K, Shozu M, Bulun SE, Kurita T. Progesterone is a key player for the growth maintenance of uterine leiomyoma. 14th International Congress of Endocrinology. Kyoto, Japan, (2010 年 3 月 27 日)

6. 石川博士、金谷裕美、川野みどり、木原真紀、生水真紀夫. 子宮筋腫はプロゲステロン依存性腫瘍である—新しい動物実験モデルを使った検証から—。第14回日本生殖内分泌学会 (2009年11月28日 東京)

7. Ishikawa H, Ishi K, Kakazu R, Bulun SE, Kurita T. Estrogen and progesterone are concurrently required for uterine leiomyoma enlargement in a novel in vivo model. American Society for Reproductive Medicine, 65th Annual Meeting. Atlanta, USA (2009年10月17日)

8. 石川博士、碓井宏和、木原真紀、川野みどり、金谷裕美、生水真紀夫. 重症免疫不全マウス腎被膜下移植法を用いた新しい子宮筋腫in vivo実験モデル. 第140回日本生殖医学会関東地方部会 (2009年6月13日 千葉)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石川博士 (ISHIKAWA HIROSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：70553973