

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592393

研究課題名(和文)mTORシグナル伝達経路を標的とした、新たな子宮筋腫治療法の開発

研究課題名(英文)Role of mTOR signaling pathway for the growth and proliferation of uterine leiomyoma

研究代表者

石川 博士(Ishikawa, Hiroshi)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70553973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：子宮筋腫の増殖・増大におけるmTOR(mammalian target of rapamycin)シグナル経路の関与を検討したが、子宮筋腫で、その活性化は起こっていなかった。

一方、重症免疫不全マウスの腎被膜下移植子宮筋腫xenograftモデルの作製方法を確立した。このモデルでは、xenograftが卵巣ステロイドに依存して増大し、エストロゲン・プロゲステロン受容体の発現とともに遺伝子発現プロファイルが、元の組織と類似していた。遺伝子形質転換を伴わないヒト子宮筋腫細胞を使用したこのモデルは、筋腫の研究、治療薬開発に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway for the growth and proliferation of uterine leiomyoma; however, we did not find any overexpression of protein levels as well as mRNA levels of mTOR signaling pathway-related genes in uterine leiomyoma compared with those in myometrial tissues.

Next, we established a novel in vivo xenograft model for uterine leiomyoma, and evaluated its characters. The non-obese diabetic/severe combined immunodeficient murine xenograft model has shown a sex-steroid dependent growth of xenograft beneath the kidney capsule, a positive expression for both estrogen and progesterone receptors, and a similar representative gene expression compared with original leiomyoma tissue. In this model, we use only non-genetic manipulated primary cultured leiomyoma cells; therefore, we believe this model is a good tool for the research and the development of new therapies for uterine leiomyoma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮筋腫 mTOR 動物モデル xenograft 免疫不全マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 良性腫瘍である子宮筋腫に対して、長期間投与可能な薬剤は存在しない。そのため、治療の第一選択は手術である。現在の筋腫治療薬は卵巣からの性ステロイドホルモン分泌を抑えることで筋腫の発育を阻害するが、副作用も多い。子宮筋腫の性ステロイドを介さない増殖機構の解明、新規薬剤の開発が望まれる。

(2) 子宮筋腫の動物疾患モデルとして Eker rat が汎用されている。このラットでは腫瘍抑制遺伝子 TSC2 が欠失しており、子宮筋腫が高率に発生する。また、mTOR (mammalian target of rapamycin) シグナル経路の異常が指摘されている。mTOR は細胞内の酸素濃度やエネルギー状態、増殖因子の刺激によって活性化され、自身がリン酸化されることにより、その下流の標的遺伝子が次々とリン酸化され、シグナルが伝達される。予備実験では、正常子宮筋よりも AMP/ATP 比が低下し、グルコース濃度が上昇し、アミノ酸が蓄積していた。すなわち、筋腫は低酸素であるにもかかわらず、エネルギーが蓄積された状態であると推測され、mTOR シグナル経路が亢進している可能性が示唆された。

(3) 子宮筋腫の病態解明、および新規治療薬の有効性判定には動物実験モデルが不可欠である。申請者らは、超免疫不全マウスである NOD/SCID IL-2R null (NSG) マウスの腎被膜下にヒト筋腫細胞を移植し、エストロゲン(E)・プロゲステロン(P)投与下で筋腫組織の再構築が起こる子宮筋腫 xenograft モデルを確立した。このモデルでは、筋腫移植片が元の筋腫組織と同程度にエストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PR)の発現を維持しており、疾患モデルとして妥当であると思われた。ところが、NSG マウスは、日和見感染を起こしやすく繁殖力が弱い上に高価である、という問題点があった。

2. 研究の目的

(1) 子宮筋腫と正常子宮筋における mTOR シグナル経路の遺伝子発現、タンパク発現を明らかにする。

(2) 子宮筋腫における低酸素刺激による HIF1 の発現誘導を明らかにする。

(3) 子宮筋腫 xenograft モデルを廉価で感染に強い宿主を用いて改良し、このモデルの妥当性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 子宮筋腫・子宮筋組織の採取と初代培養細胞の作成

本研究の実験プロトコールはすべて千葉大学大学院医学研究院倫理委員会の承認を得た。動物実験プロトコールは千葉大学動物

実験委員会の承認を得た。文書にて同意の得られた患者から、子宮筋腫の手術で摘出された子宮から採取した筋腫と正常子宮筋組織を実験に用いた。また、組織を消化し、初代培養細胞としてその後の実験に用いた。

(2) mTOR シグナル経路上のタンパク発現の検討

mTOR シグナル経路の上流にあり、mTOR 活性化を阻害する、リン酸化 AMPK (AMP キナーゼ)の発現を筋腫と正常子宮筋で比較した。また、PI3K-Akt 経路上のリン酸化 Akt、mTOR 複合体構成成分の mTOR, Raptor, Rictor、さらに mTOR シグナル経路の下流にある Cyclin D1, CDK1, p70S6K1, 4E-BP1 のリン酸化タンパクの発現を筋腫と正常筋で比較した。これらはいずれも組織からタンパクを抽出し、ウェスタンブロット法にて検討した。

(3) 子宮筋腫 xenograft モデルの改良と遺伝子発現プロファイルの検討

3種類の免疫不全マウス Balb/c nude マウス、severe combined immunodeficient (SCID) マウス、Non-obese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) マウスの腎被膜下・皮下に子宮筋腫細胞あるいは正常子宮筋細胞からなる異種移植片(xenograft)を挿入した。マウスは、xenograft 移植時に卵巣を摘除し、外因性に E と P を投与した。E/P は毎週投与し、4~8 週後に xenograft を回収し、移植成功率、HE 染色による xenograft の組織像、免疫組織化学染色による ER、PR の発現を検討した。

また、子宮筋腫 xenograft、子宮筋 xenograft からそれぞれ RNA を抽出し、子宮筋腫で特徴的な発現パターンを示す 12 遺伝子の筋腫 xenograft における発現量を定量的 real-time PCR 法にて測定した。

4. 研究成果

(1) 子宮筋腫と正常子宮筋における mTOR シグナル経路のタンパク発現

mTOR 経路関連タンパクである AMPK, Akt, S6K1 およびリン酸化 AMPK, Akt, S6K1 のタンパク発現量を子宮筋腫と正常子宮筋で比較した。その結果、子宮筋腫組織でも初代培養細胞においても、これらタンパクの発現は正常子宮筋と比較して有意な差はみられず、子宮筋腫では mTOR シグナル経路の活性化は起こっていないと考えられた。

そこで、筋腫内部は低酸素状態であるにもかかわらず筋腫が増大し続けることに着目し、癌細胞で低酸素刺激により発現が誘導される転写因子 Hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF1) が筋腫でも、低酸素刺激により、発現誘導されるのかどうかを検討した。

(2) 子宮筋腫における HIF1 の発現

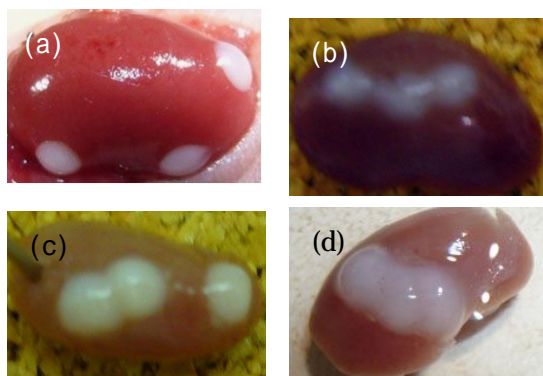
子宮筋腫組織では、正常子宮筋組織と比較して HIF1 の mRNA、タンパク発現に有意な差を認めなかった。次に子宮筋腫細胞と子宮筋細胞を通常酸素培養下(20%酸素)と低酸素培養下(1%酸素)で培養し、HIF1 mRNA とタンパクの発現を比較検討した。その結果、低酸素により子宮筋腫、正常子宮筋ともに HIF1 の mRNA 発現が低下したが、子宮筋腫細胞では、発現低下の程度が軽度であった。一方 HIF1 のタンパク発現量は、子宮筋腫、正常筋ともに低酸素により変化しなかった。HIF1 は通常酸素条件下ではユビキチン化され絶えずプロテアソームで分解されている。しかし、低酸素条件下では、このユビキチン化が阻害され、分解されなかった HIF1 が HIF1 と 2 量体を形成し、核内に移行して、標的遺伝子の HIF 結合部位に結合する。今回の結果から、子宮筋腫の低酸素に対する反応には HIF1 以外の因子が関与していると考えられた。

(3) 子宮筋腫 xenograft モデルの改良と妥当性の検証

3 種類の免疫不全マウス(ヌードマウス、SCID マウス、NOD/SCID マウス)の腎被膜下に筋腫 xenograft を移植し、生着率を比較した。その結果、NOD/SCID マウスに移植した筋腫 xenograft は、卵巣ステロイドに依存して最も高頻度(54%)に増大した(表1、図1a-d)。一方、子宮筋 xenograft は全く増大しなかった。

	移植成功率 (%)	Xenograft 体積 Mean ± SD(mm ³)
ヌード	0/8 (0%)	
SCID	2/6 (33%)	2.80 ± 1.32
NOD/SCID	14/26 (54%)	3.07 ± 1.61

(表1) マウス別の腎被膜下移植成功率



(図1) ホルモン依存性増殖を示す子宮筋腫
(a) xenograft 移植時
(b) ホルモン投与なし(移植8週目)
(c) 2週に1回のホルモン投与
(d) 毎週ホルモン投与

次に腎被膜下移植よりも手技が容易な皮下移植法でこのモデルが代用できるかどうか

かを検討した。NOD/SCID マウスの腎被膜下に移植した筋腫 xenograft は皮下 xenograft よりも有意に増大した(表2、図2)。

	移植成功率 (%)	Xenograft 体積 Mean ± SD(mm ³)
腎被膜下	14/26 (54%)	3.07 ± 1.61 ^{ab}
皮下	5/10 (50%)	1.10 ± 0.43 ^a
皮下2倍	8/13 (62%)	1.59 ± 0.11 ^b

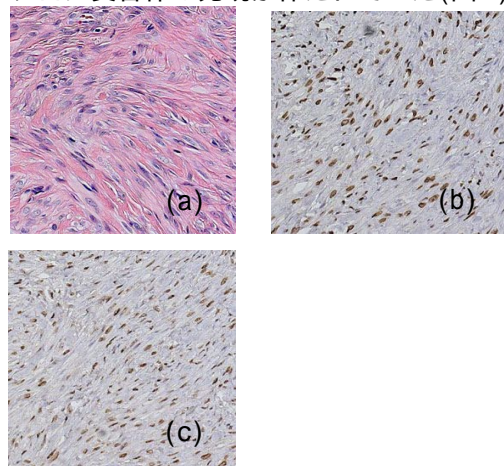
(表2) 移植部位の検討 (NOD/SCID マウス)
a, b: P<0.05 Mann Whitney U test



(図2) 同一マウスによる腎被膜下・皮下移植 xenograft
(上段)皮下移植
(下段)腎被膜下移植

皮下に2倍量の細胞からなる xenograft を移植しても、4 週後の増大度は腎被膜下移植 xenograft よりも有意に低かったため、腎被膜下移植がこのモデルに適していると考えられた。

筋腫 xenograft では子宮筋腫組織の再構築が起こり、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体の発現が保たれていた(図3)。

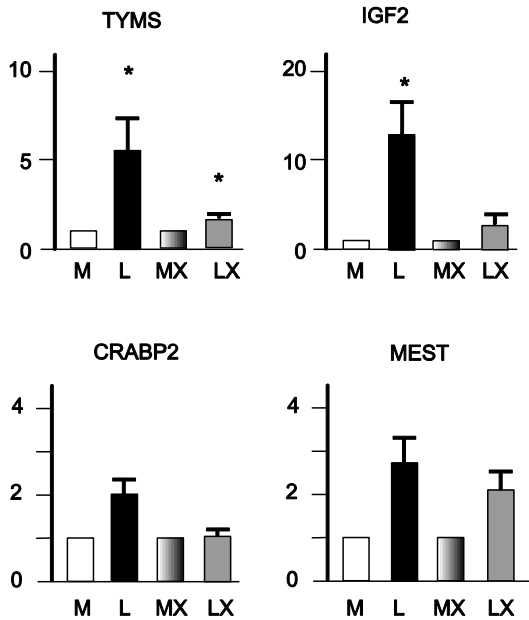


(図3) xenograft の組織像
(a) HE 染色
(b) エストロゲン受容体発現
(c) プロゲステロン受容体発現

次に、この子宮筋腫 xenograft モデルの遺伝子発現プロファイルを検討した。過去に報告されている発現アレイの情報をもとに、筋腫で子宮筋よりも発現が高い4 遺伝子 (TYMS, IGF2, CRABP2, MEST)、逆に発現が低い8 遺伝子 (ALDH1, PTGER3, EMP1, CTGF, EGR1,

DUSP1, ATF3, CYR61) を抽出した。これら 12 遺伝子の mRNA 発現レベルを本研究で用いた子宮筋腫組織と正常子宮筋組織、子宮筋腫 xenograft と子宮筋 xenograft からそれぞれ RNA を抽出し検討した。

その結果、過去に子宮筋腫で、発現が高いと報告された 4 遺伝子、発現が低いと報告された 8 遺伝子は、組織では同じ傾向を示した。また、筋腫 xenograft では、MEST, CYR61, PTGER3 の 3 遺伝子の発現が異なっていたが、他の 9 遺伝子は同じ傾向を示した(図 4a, b)。



(図 4a)筋腫で発現が高いと報告された 4 遺伝子の発現

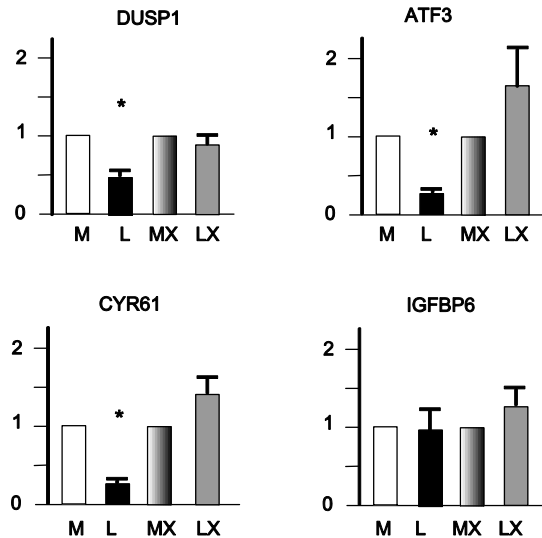
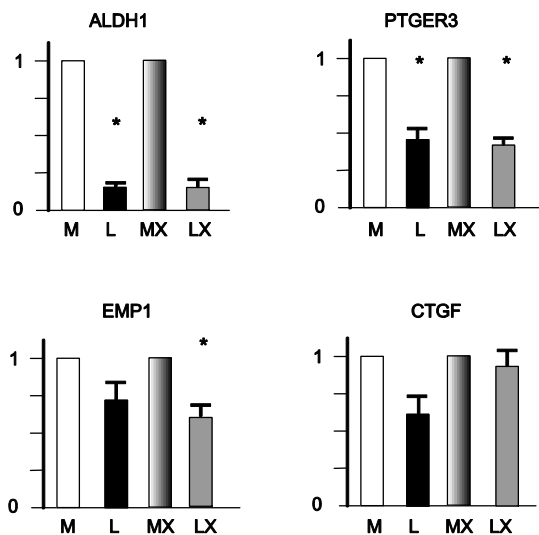
M: 子宮筋組織

L: 子宮筋腫組織

MX: 子宮筋 xenograft

LX: 子宮筋腫 xenograft

* P<0.05 Mann Whitney U test



(図 4b)筋腫で発現が低いと報告された 8 遺伝子の発現

以上より、NOD/SCID マウスを用いたヒト子宮筋腫 xenograft モデルは卵巣ステロイド依存性発育を示し、組織像、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体の発現、代表的遺伝子の発現パターンから、ヒト子宮筋腫の特性を保っており、疾患モデルとして妥当であると考えられた。

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)

[雑誌論文](計 4 件)

Wang G, Ishikawa H, Sone K, Kobayashi T, Kim JJ, Kurita T, Shozu M. Nonobese diabetic/severe combined immunodeficient murine xenograft model for human uterine leiomyoma. Fertil Steril. 査読有 2014

DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.01.054

Ishikawa H, Kiyokawa T, Utsuno E, Matsushita K, Nomura F, Shozu M. Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma in a Japanese Woman with a Deleterious BRCA1 Mutation. Jpn J Clin Oncol 査読有、2014 DOI:10.1093/jjco/hyu035

Ishikawa H, Kiyokawa T, Takatani T, Wang GW, Shozu M. Giant multilocular sex cord tumor with annular tubules associated with precocious puberty. Am J Obstet Gynecol. 査読有 206(1): e1-6 2012

DOI: 10.1016/j.ajog.2011.09.025.

石川博士、生水真紀夫、婦人科内分泌療法 腫瘍・類腫瘍 1 子宮筋腫、臨床婦人科産科、査読無、65 巻、2011、585-589

[学会発表](計 6 件)

石川博士、川野みどり、王 桂文、河原

井麗正、大見健二、生水真紀夫、子宮筋腫低酸素培養下における Hypoxia inducible factor-1 の発現低下、第 65 回日本産科婦人科学会、2013 年 5 月 10～12 日、札幌市

Ishikawa H, Kawarai Y, Takizawa S, Wang GW, Shozu M. Altered expression of hypoxia inducible factor-1 in uterine leiomyoma under hypoxic and normoxic condition. 15th International Congress of Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, 2012 年 11 月 15～17 日、金沢市

Ishikawa H, Wang GW, Ohmi K, Sone K, Kawano M, Kihara M, Shozu M. Optimization of a uterine leiomyoma xenograft model using different immunodeficient mice and grafting procedures. 15th International Congress of Endocrinology, 2012 年 5 月 5～9 日、Florence, Italy

石川博士、王桂文、曾根国瑞、大見健二、川野みどり、木原真紀、生水真紀夫、子宮筋腫の免疫不全マウス移植モデルにおける、宿主と移植方法の検討、第 64 回日本産科婦人科学会、2012 年 4 月 29～31 日、神戸市

石川博士、子宮筋腫の Xenograft model、第 3 回婦人科ホルモン依存性疾患研究会、2012 年 5 月 26 日、東京

石川博士、王桂文、曾根国瑞、藤田真紀、大見健二、生水真紀夫、子宮筋腫のマウス腎被膜下移植モデルへの遺伝子導入実験-子宮筋腫の分子標的治療を目指して-、第 63 回日本産科婦人科学会、2011 年 8 月 29～31 日、大阪市

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/gyne/research/5/index.html>

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

(2) 研究分担者

生水 真紀夫 (SHOZU Makio)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：30226302