

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791800

研究課題名（和文） 新規ヒト化マウス子宮筋腫モデルを用いた子宮筋腫治療薬の開発

研究課題名（英文） Development of therapeutic agent for uterine leiomyoma using a novel mouse model of human uterine leiomyoma.

## 研究代表者

築地 謙治（TSUIJI KENJI）

東北大学・大学院医学系研究科・助手

研究者番号：40528155

研究成果の概要（和文）：クルクミンの子宮筋腫への抑制効果を *in vitro*、*in vivo* の両面より検証してきた。結果、クルクミンはラット子宮筋腫細胞株において、その細胞周期を停止させることで抑制効果を示すことが示唆された。また、ヒト子宮筋腫移植モデルマウスにおいてもクルクミンの子宮筋腫への抑制効果が確認され、その効果は腸管からの吸収率を高めた高吸収性クルクミン（ナノクルクミン）においてより強かった。

研究成果の概要（英文）：Inhibitory effect of curcumin on uterine leiomyoma has been verified both *in vitro* and *in vivo*. The results showed that curcumin inhibited rat uterine leiomyoma cell proliferation by arresting cell cycle *in vitro* study. *In vivo* study, curcumin inhibited the cell proliferation of xenografts and nano-curcumin showed highly absorbent rate from the intestinal absorption compared with curcumin in the mouse model transplanted of human uterine leiomyoma.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：産婦人科学

科研費の分科・細目：婦人科学

キーワード：子宮筋腫、移植モデルマウス、クルクミン、ナノクルクミン、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

子宮筋腫は良性腫瘍であるが、生殖年齢女性の約 70% にみられる頻度の高い疾患である。また、それに伴う過多月経・月経困難症・圧迫症状・貧血などにより多くの女性の QOL を著しく障害する。外科治療が標準治療とされるが、女性にとって子宮を失う喪失感・心理的ショックは大きく、患者サイドからの子宮温存治療の要望は強い。筋腫はエストロゲン依存性に増殖するため、卵巣機能を有する期間の筋腫増殖速度を抑制し閉経まで乗り切れば子宮温存のための薬物療法の目的は達成されるが、このような持続

投与可能な薬物療法は確立されていない。

漢方治療をはじめとする伝統医学のなかでは、西洋医学では用いられてない生薬成分が多数存在するが、これらのなかには現代医学のなかで応用可能なものも存在し、新たな創薬への可能性を秘めた物質の宝庫ともいえる。これまでの研究成果のなかでも動物実験や分子生物学的手法により生薬成分の有効性を科学的に証明してきた（Genom Inform. 2007, J Trad Med. 2006）。

クルクミンは、香辛料（ターメリック）・生薬（ウコン）中の有効成分として単離

された物質であり、抗腫瘍効果、抗酸化効果、抗炎症効果等の多彩な生物学的作用が証明されている。特に、癌治療に関する多数の基礎的・臨床的報告がされており、癌細胞増殖における複数の重要なシグナル伝達経路を抑制することが、*in vitro*・*in vivo*の実験系で証明されている (Goel A, *Biochem Pharmacol.* 2008)。細胞内情報伝達系からの解析では、クルクミンは多くの転写因子、キナーゼ、レセプター等に作用し、抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。

筋腫に対するクルクミンの効果については、すでに筋腫モデル細胞である ELT-3 細胞を用いた *in vitro* での細胞増殖抑制効果を報告した (Tsuiji K, et al. *Gynecol Endocrinol.* 2010)。また、マウス心筋線維化モデルに対するクルクミンの線維化抑制効果ならびに改善効果が報告されており (Li, *J Clin Invest.* 2008)、子宮筋腫の病態においても線維化は重要な役割をはたすことからクルクミンによる筋腫細胞線維化抑制効果も期待される。癌治療においてはすでに膀胱癌・直腸癌などの複数の癌種に対するクルクミンを用いた臨床試験が実施されており、大量投与においても大きな副作用は報告されておらずヒトに対する安全性についてもかなり確立されたものと考えられる (Hatcher, *Cell Mol Life Sci.* 2008)。

これまでの子宮筋腫研究の遅れの原因の1つとして、適切なモデル動物の欠如があげられるが、ヒト化マウスとして知られる NOD/Shi-*scid*, IL-2R $\gamma$  KO マウス (NOG マウス) を用いることにより、新規のヒト子宮筋腫モデルマウスの作製に成功している (Tsuiji K, et al. *Tohoku J Exp Med.* 2010)。NOG マウスは同じく免疫不全マウスである SCID マウスをもとに開発されたが、SCID マウスにおいても数週間の子宮筋腫移植は可能であるという報告はある (Hassan MH, et al. *Am J Obstet Gynecol.* 2008)。しかし長期間の移植組織の生着維持には遺伝子導入が必要であり、元々の移植組織の性質を維持した状態で生着している保証がない。対してこのモデルは麻酔下で皮下に移植するだけで技術的に非常に簡便な上、さらに8週という長期にわたる生着維持も確認し、組織学的な安定さらには移植組織内に血流も維持されていることを証明している。本モデルを用いることにより、種々の薬剤の子宮筋腫に対する効果を長期にわたり検討することが可能であると期待される。

クルクミンには腸管からの低吸収性と

いう問題が存在する。これに対しては、様々のクルクミン誘導体やナノパーティクルを用いた検討がなされている。そこで株式会社セラバリュー社との共同研究で高吸収性クルクミン(ナノクルクミン)の供給を受け、移植組織の組織学的検討を用いてクルクミンとどのような差が生じるかの検討も行う。

## 2. 研究の目的

本研究ではクルクミンの子宮筋腫増殖・線維化抑制メカニズムを検討を *in vitro*、さらに独自に作製したヒト化マウス子宮筋腫モデルを用いて *in vivo* で検討することを目的とする。そのため下記の項目を明らかにする。

- (1) 子宮筋腫モデル細胞株である ELT-3 細胞を用いて、筋腫細胞増殖・線維化に対するクルクミンの抑制メカニズムを *in vitro* で検討する。
- (2) 独自に開発したヒト子宮筋腫モデルマウスを用いてクルクミンの経口投与を行い、子宮筋腫増殖に対するクルクミンの抑制効果を検討し、抑制効果のさらに詳細なメカニズムを解析する。また、同時に高吸収性クルクミン(ナノクルクミン)を用いることで、天然クルクミンに比ベどの程度低濃度で抗腫瘍効果を示すか組織学的解析にて検討する。

## 3. 研究の方法

- (1) ラット子宮筋腫細胞株 (ELT-3) を用いて、クルクミンの細胞増殖抑制効果及び細胞周期に対する影響を確認した。細胞増殖の評価は 0~500  $\mu$ M のクルクミン添加から 72 時間後に MTS アッセイで行った。細胞周期に対する影響は 0~200  $\mu$ M のクルクミン添加から 6 時間後に各種マーカー (Cyclin D1, Cyclin D3, cdk4, p15, p27) の Western blot にて評価した。内部標準は  $\beta$ -actin とした。
- (2) 8 週齢の雌の NOG マウスを実験動物中央研究所より購入し、十分な血中エストロゲン濃度を維持するために、ヒト子宮筋腫組織の移植 2 日前に 1.5 mg の 60 日間の 17 $\beta$ -エストラジオール徐放性ペレットを移植した。ヒト子宮筋腫組織は、患者より十分なインフォームドコンセントを得たうえで、手術で摘出した子宮より採取した。組織は 3 mm $\times$ 3 mm $\times$ 2 mm の直方体のサイズに細切した。NOG マウスにネンブタールで麻酔をかけ、移植を行った。各マウスの左右の背

中を 3 mm ほど切開し、各切開部位に 1 切片ずつマトリゲルに浸した組織切片を挿入した。挿入後、0.05 ml のマトリゲルをさらに移植部位に注入し、切開部位を手術用糊にて閉じた。

上記のモデルマウスを作成後、4 匹ずつ 5 群(生食投与群、クルクミン 30 および 120 mg/kg/day 投与群、ナノクルクミン 30 および 120 mg/kg/day 投与群)にランダムに割り振った。投与は 1 日 1 回、連日強制経口投与した。移植および投与 8 週後、全てのマウスを解剖し、組織片を回収した。組織学的評価には HE、Ki-67、TUNEL 染色を用いた。統計解析は、Excel 2007 のアドインソフトであるエクセル統計 2006 (SSRI) を用いて行った。解析は ANOVA の Scheffe' s F-test で行った。データは平均±S.D. で表記し、統計学的有意は  $p < 0.05$  とした。

#### 4. 研究成果

- (1) ELT-3 細胞へのクルクミンの添加により、200  $\mu$ M より増殖抑制効果が確認された(図 1)。
- さらに、クルクミン添加 6 時間後の細胞周期の Western blot では、細胞周期を活性化させる Cyclin D1、Cyclin D3 および CDK4 といったタンパク発現が減少しており、また、細胞周期に対し抑制的に働く p15、p27 のタンパク発現が増加していた(図 2)。

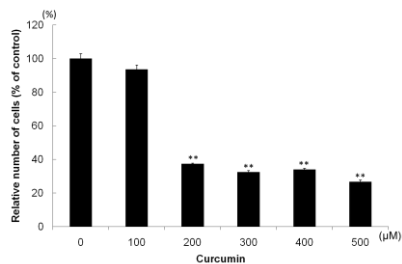


図 1

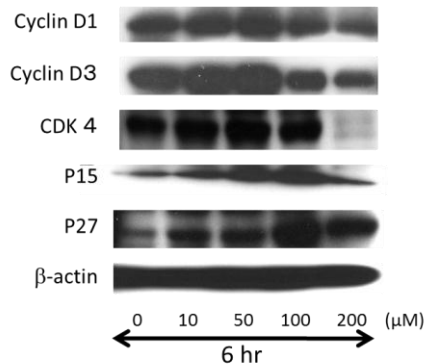


図 2

- (2) NOG マウスを用いたヒト子宮筋腫移植モデルマウスへのクルクミンの投与では、全 5 群(生理食塩水、クルクミン 30, 120 mg/kg/day、ナノクルクミン 30, 120 mg/kg/day 投与)においてヒト子宮筋腫移植組織は、8 週間にわたりサイズに変化はみられなかった(図 3)。

さらに、クルクミン投与による細胞像、細胞数の変化を確認するため HE 染色を行った。結果、クルクミン 120 mg/kg/day、ナノクルクミン 30, 120 mg/kg/day 投与群においてコントロールと比べ有意な細胞数の減少がみられた。また、クルクミンとナノクルクミンとの比較では、同用量においてナノクルクミンの方でより強い減少が確認された(図 4)。また、その組織像においてクルクミン 120 mg/kg/day、ナノクルクミン 30, 120 mg/kg/day 投与群において子宮筋腫に特徴的な渦状の細胞配列の崩れや、一部で壊死巣や平滑筋細胞が失われた硝子化領域も確認された。細胞増殖の評価を行う Ki-67 の免疫染色において、クルクミン 120 mg/kg/day、ナノクルクミン 30, 120 mg/kg/day 投与群においてコントロールと比べ有意な Ki-67 陽性細胞率の減少がみられた。また、クルクミンとナノクルクミンとの比較では、同用量においてナノクルクミンの方でより強い減少が確認された(図 5)。アポトーシスの評価をする TUNEL 染色では、クルクミン 120 mg/kg/day、ナノクルクミン 30, 120 mg/kg/day 投与群においてコントロールと比べ有意な TUNEL 陽性細胞率の増加がみられた。また、クルクミンとナノクルクミンとの比較では、同用量においてナノクルクミンの方でより強い増加が確認された(図 6)。

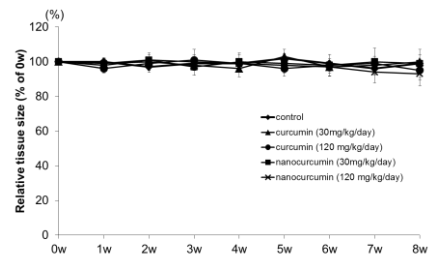


図 3

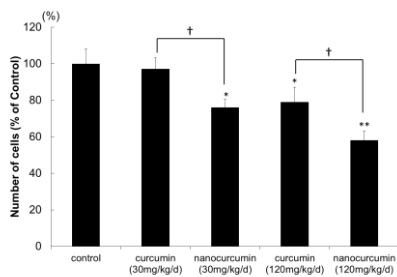


図 4

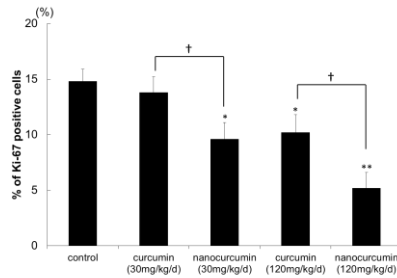


図 5

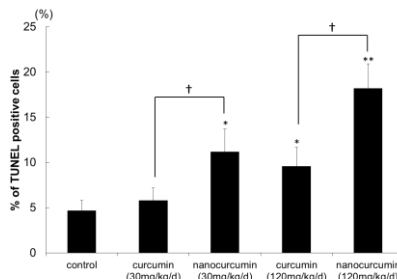


図 6

本研究により、クルクミンの子宮筋腫抑制効果が *in vitro*、*in vivo*において世界ではじめて証明された。また、クルクミン研究で最も課題となる低吸収性についても、ナノクルクミンを用いることで改善できることを *in vivo*の研究において証明した。

クルクミンは生薬のウコンや香辛料のターメリックの成分であり、中国・インドの伝統医学のなかで使用されてきた実績がある。さらに癌患者への大量投与試験でも有害事象の報告はなく長期投与可能、安全かつ安価な治療法といえる。本研究で得られた結果より、クルクミンで子宮筋腫のコントロールができれば全く新たな治療法となり、手術療法の回避による医療費削減、子宮温存による QOL 改善、最終的には全体的な医療費削減につながると考えられる。また、クルクミンは前述のように日本のみならず世界的に馴染みのある成分である。よって、本研究結果は日本のみならず世

界へと波及していく結果といえる。

## 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 1 件)

Tsuiji K, Takeda T, Li, B, Wakabayashi A, Kondo A, Kimura T, Yaegashi N. Inhibitory effect of curcumin on uterine leiomyoma cell proliferation. *Gyneacol Endocrinol*. 査読有、2011;27(7):512-517 DOI: 10.3109/09513590.2010.507287

[学会発表] (計 2 件)

1. 築地謙治、武田卓、李賓、黄志方、近藤亜希子、八重樫伸生、超免疫不全マウスを用いた新規ヒト子宮筋腫移植モデルマウスの確立 日本産科婦人科学会、2012年4月13日、神戸

2. 築地謙治、武田卓、李賓、黄志芳、近藤亜希子、八重樫伸生、天然物ターメリック・ウコン中の有効物質クルクミンによる子宮筋腫治療薬開発～ヒト子宮筋腫モデルマウスを用いた *in vivo*での検討～ 日本産科婦人科学会、2011年8月30日、大阪

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

築地 謙治 (TSUIJI KENJI)

東北大学・大学院医学系研究科・助手

研究者番号：40528155

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：