

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592524

研究課題名(和文)子宮平滑筋腫が巨大に発育する分子生物学的機序に関する研究

研究課題名(英文)Molecular biological mechanisms of tumor growth in uterine leiomyoma

研究代表者

佐藤 美紀子(SATO, Mikiko)

横浜市立大学・附属病院・講師

研究者番号：70326049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：子宮筋腫に稀に見られる病態で巨大筋腫によるエリスロポエチン(EPO)産生による続発性多血症が報告されている。本研究はこの病態にヒントに子宮筋腫のEPO発現を検討した。子宮筋腫と正常子宮筋層17例について、Real-Time RT-PCR法でEPO mRNA発現量を検討したところ、筋腫では正常子宮筋層に比して有意にEPO mRNA発現量多く、筋腫腫瘍径との正の相関が認められた。EPO高発現群では低発現群より有意に血管成熟スコアが上昇していた。以上より、一部の子宮筋腫ではEPOが高発現しており、腫瘍内血管成熟を亢進する事によって腫瘍内血流を保持して筋腫の増大に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Some uterine leiomyoma stay small, while others may enlarge tremendously. Myomatous erythrocytosis syndrome is a rare complication of uterine leiomyoma caused by erythropoietin (EPO) that is produced by tumor cells. We hypothesize that EPO may act as a factor that stimulates the enlargement of leiomyomas and assessed the EPO expression in leiomyomas and investigated the effects of EPO on the tumor growth. The mean EPO mRNA expression in the leiomyoma was higher than the corresponding normal myometrium by Real-time RT-PCR. A positive correlation of leiomyoma size and EPO mRNA expression was shown, suggesting the involvement of EPO in leiomyoma growth. Blood vessel maturity was also significantly increased in EPO-producing leiomyomas. As conclusions, EPO is produced in most of conventional leiomyomas and supports a model where EPO accelerates tumor growth, possibly by inducing vessel maturity. Our study suggests one possible mechanism by which some uterine leiomyomas reach a large size.

研究分野：腫瘍内分泌学

キーワード：子宮筋腫 エリスロポエチン 血管成熟

1. 研究開始当初の背景

子宮平滑筋腫(子宮筋腫)は生殖年齢女性の約 30%程度が有するありふれた良性腫瘍である。多くの症例では放置が可能であるが、時に骨盤から腹腔内を占拠するほど巨大化することがあり、健康に影響を及ぼさない腫瘍と巨大化するポテンシャルを有する腫瘍の選別は臨床上重要な課題である。しかし、子宮筋腫の発生に関する研究は多いが、なぜ子宮筋腫が他の臓器には見られないほど急激かつ巨大に増大するかの機序は解明されていない。

1972 年 Spurlin らが巨大子宮筋腫に合併した赤血球増多症 (Myomatous Erythrocytosis Syndrome; MES) の一例を報告し (Obstet Gynecol. 1972; 40(5): 646-51), その後 MES は平滑筋腫細胞自身が赤血球の増殖・分化因子である Erythropoietin (EPO) を分泌することによって発症するとの報告がなされた。その後 Pollio らが妊娠合併 MES 症例を報告するとともに免疫組織化学で MES を呈さない子宮筋腫でも EPO 蛋白が陽性となる症例があること、MES 症例では EPO 受容体が筋腫細胞ではなく腫瘍内血管内皮細胞に存在していたことを示し、EPO が子宮筋腫の血管増生に関与している可能性を示唆した (Hum Pathol. 2005 Jan; 36(1): 120-7)。しかしこの研究は症例報告に補足で上述のデータが示されているに過ぎず、その後も文献上 MES の症例報告の追加は散見されるものの、MES を呈していない一般的な子宮筋腫における EPO の発現に関する研究は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究は子宮筋腫における EPO の発現機序とその作用を検討し、各症例に適した治療計画の選択については治療標的への応用に結びつけることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は学内倫理委員会の認可を得て施行され、使用した臨床データおよび組織検体に関してはすべて定められた文書による本人の同意の下で使用された。

(1) 子宮筋腫および正常子宮筋層における EPO の発現様式と臨床像との相関について

手術により摘出された子宮筋腫組織 114 検体と正常子宮筋層筋層組織 17 例について解析した。Real-time RT-PCR 法にて EPO mRNA 発現量、ELIZA 法にて EPO 蛋白発現量を計測し、臨床像と EPO 発現量について検証した。

(2) EPO 発現が子宮筋腫細胞の増殖に及ぼす影響について

EPO 発現が腫瘍細胞増殖に及ぼす影響を分裂細胞のマーカーである Ki-67 免疫組織化学法を用いて検討した。腫瘍の中心に近い部位で、変性が少なく最も筋腫細胞密度の高い部位を強拡大 (400x) でランダムに 5 カ所選定し、Ki-67 陽性細胞/全腫瘍細胞数を計測した。

(3) EPO 発現が腫瘍の血管新生に及ぼす影響について

EPO には vascular endothelial growth factor (VEGF) を介した血管新生作用があることが知られている。EPO 発現が腫瘍内血管新生に及ぼす作用を検討するために CD34 免疫組織化学法を用いて腫瘍内血管密度を測定した。Real-time RT-PCR 法で EPO mRNA 発現を計測した摘出子宮筋腫症例のうち、最も EPO mRNA 発現量が高かった 20 例と発現量の低かった 20 例について、組織内血管密度を比較した。また、子宮筋腫組織の Real-time RT-PCR 法で血管新生因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) とその受容体の発現量を測定した。

(4) EPO 発現が腫瘍の血管成熟に及ぼす影響について

血管新生のみならず、EPO は創傷治癒過程において組織の血管成熟を促進することが報告されている。そこで、CD34 免疫組織化学法を用いて血管成熟を評価した。血管成熟評価には独自の半定量的血管成熟スコアを設定した。Real-time RT-PCR 法で EPO mRNA 発現を計測した摘出子宮筋腫症例のうち、最も EPO mRNA 発現量が高かった 20 例と発現量の低かった 20 例について、血管成熟スコアを比較した。また、血管成熟の主要な調節因子である Angiopoietin とその受容体 (Tie-2) mRNA の発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 子宮筋腫の多くが EPO を発現している

子宮筋腫 114 例と正常筋層 17 例の検討では、114 例中 108 例の筋腫で Real-time RT-PCR にて EPO mRNA の検出が可能であり、子宮筋腫の EPO mRNA 発現量の平均は正常筋層の平均よりも優位に高値であった (3836 ± 4122 vs. 1455 ± 2141 , $P=0.025$, Wilcoxon rank test, 図 1) 各症例における Real-time RT-PCR で得られた EPO mRNA 発現様式は ELIZA 法で測定した EPO タンパク発現様式と一致しており、多くの子宮筋腫が EPO mRNA とタンパクを異常に発現している可能性が示唆された。

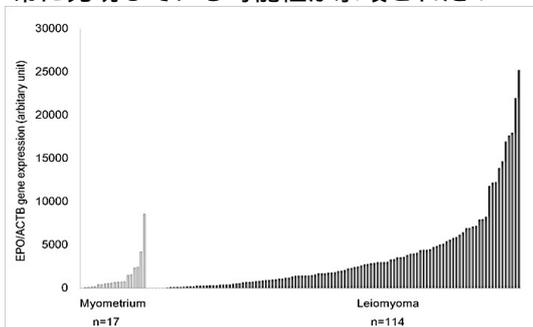


図 1. 正常子宮筋層および筋腫における EPO mRNA 発現 (Real-time RT-PCR 法): 筋腫では多くの症例で正常筋層より EPO mRNA 発現量が多い。

(2) 子宮筋腫における EPO 発現は腫瘍径と正の相関がある

114 例の子宮筋腫組織を用いた検討で、腫瘍内の EPO mRNA 発現量は術前 MRI で計測した最大腫瘍径と正の相関があった ($r=0.294$, $p=0.001$, Spearman rank correlation coefficient, 図 2). その他の臨床的因子 (年齢, 閉経の有無, 経妊・経産回数, 術前ホルモン治療の有無などと EPO の発現様式には相関が認められなかった。

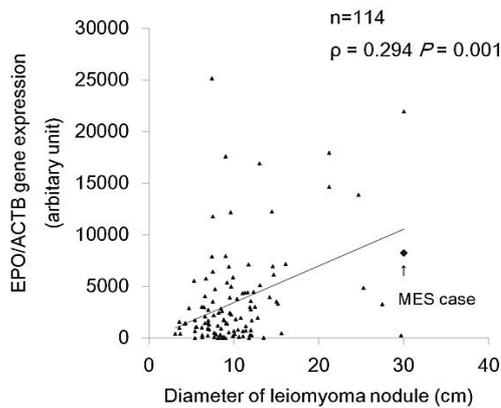


図 2 . EPO mRNA 発現と筋腫径には正の相関があり, EPO が子宮筋腫の発育に参与している可能性が示唆される。

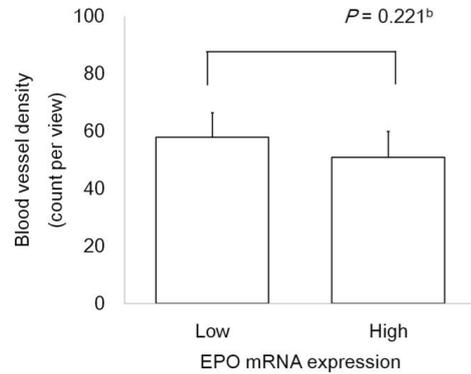
(3) 子宮筋腫における EPO 発現は子宮筋腫細胞の増殖には影響を及ぼさない可能性がある

摘出子宮筋腫において Ki-67 免疫組織化学分裂細胞の指標である Ki-67 蛋白陽性細胞の出現割合を検討したが, EPO 発現の多寡によって Ki-67 陽性細胞数は変化が見られなかった。従って, 少なくとも子宮筋腫において, EPO 発現は腫瘍細胞の増殖に強い影響を及ぼさない可能性があると考えられた。

(4) 子宮筋腫における EPO 発現は筋腫内血管新生には影響を及ぼさない可能性がある

Real-time RT-PCR 法にて EPO 発現量が低値であった 20 例と高値であった 20 例において組織内血管密度を比較したところ, 両者には有意な差異はなく, 子宮筋腫における EPO 発現は腫瘍内血管新生に影響を及ぼさない可能性が示唆された (図 3, $P=0.221$, Fisher's exact test)。また, 各症例における筋腫組織の VEGF および VEGF 受容体 mRNA 発現量と EPO 発現様式には相関が認められなかった。

図 3 . EPO mRNA 発現量による腫瘍内血管密

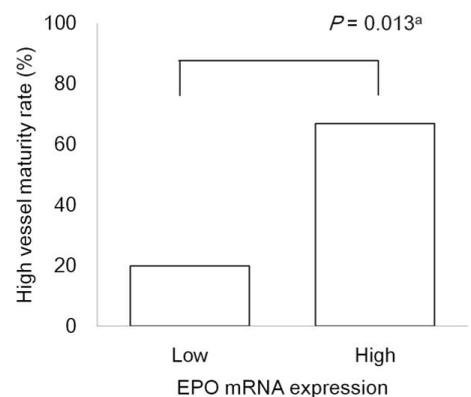


度の差異は認められなかった。

(5) 子宮筋腫における EPO 発現は筋腫内血管成熟に影響をおよぼす可能性がある

Real-time RT-PCR 法にて EPO 発現量が低値であった 20 例と高値であった 20 例において組織内血管成熟スコアを比較したところ, EPO mRNA 高発現群では低発現群に比して有意に血管成熟スコアが高値であった (図 4, $P=0.013$, Fisher's exact test)。一方で, 各症例における筋腫組織の Angiopoietin および Tie-2 mRNA 発現量と EPO 発現様式には相関が認められなかった。従って, EPO は筋腫組織の血管成熟に影響を及ぼしている可能性はあるが, その機序は単純に Angiopoietin や Tie-2 蛋白発現量調節に基づくものでないと推測される。

図 4 . EPO mRNA 高発現群では有意に腫瘍内血



管成熟が亢進していた。

(6) 結果まとめ

MES を呈さない通常の子宮筋腫でも, 多くの症例が EPO を過剰発現しており, EPO mRNA 高発現の症例では筋腫腫瘍径が大きい傾向があった。さらに EPO 高発現の腫瘍では腫瘍内血管成熟が亢進している傾向のあったことから, EPO は腫瘍内血管を成熟させ腫瘍内血流を保持する事によって子宮筋腫が巨大に増大する現象に関与している可能性が示唆された。

今後は子宮筋腫における EPO 発現の分子生物学的機序について検討して行く予定である。特に近年は, 子宮筋腫発生には種々の染色体異常や遺伝子変異が関与していること

が報告されており (Mäkinen N et.al, Science. 2011; 334: 252-5), 病理学的には同じように見える平滑筋腫でも多彩な細胞遺伝学的異常により, さまざまな形質を有している事が着目されているため, EP0 発現様式とこれら染色体・遺伝子異常様式の相関について詳細に検討して行く。

子宮筋腫が巨大に増大する機序解明がなされることは臨床的にも以下のような効果をもたらさう。子宮筋腫の治療は手術・子宮動脈塞栓法・集束超音波治療などがあるが, いずれも侵襲的であり, 妊孕性に影響を与える影響があるため施行には熟慮が必要である。各々の筋腫の予後が推定出来るようになれば, 各症例における治療介入時期の決定などが適切に行なわれるようになり, 特に将来妊娠を希望している女性や閉経が近い女性に与える恩恵は大きいと考えられる。子宮筋腫の新たな薬物治療 (分子標的療法) 開発の糸口となりうる。

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)

Asano R, Asai-Sato M, Miyagi Y, Mizushima T, Koyama-Sato M, Nagashima Y, Taguri M, Sakakibara H, Hirahara F, Miyagi E. Aberrant expression of erythropoietin in uterine leiomyoma: implications in tumor growth. Am J Obstet Gynecol. (査読あり) 2015 Feb 25. pii:S0002-9378(15)00152-0.doi:10.1016/j.ajog.2015.02.016. [Epub ahead of print]

[学会発表](計5件)

平田豪, 祐森明日菜, 宇佐見友希, 古野敦子, 北川雅一, 片山佳代, 大島綾, 村瀬真理子, 吉田浩, 平原史樹: 子宮筋腫核出術後の筋腫再発の予後因子, 第65回日本産科婦人科学会学術講演会, 札幌プリンスホテル(北海道札幌市) 2013年5月12日

上西園幸子, 横田奈朋, 太田幸秀, 佐藤団, 小山麻希子, 佐藤美紀子, 宮城悦子, 榊原秀也, 平原史樹: 閉経後手術となった子宮筋腫および子宮肉腫症例の検討. 第65回日本産科婦人科学会学術講演会, 札幌プリンスホテル(北海道札幌市), 2013年5月10日

笠井絢子, 倉澤健太郎, 今井雄一, 持丸綾, 望月昭彦, 青木茂, 奥田美加, 高橋恒男, 平原史樹: 当院における子宮筋腫合併妊娠症例の検討. 第65回日本産科婦人科学会学術講演会, 札幌市教育文化会館(北海道札幌市), 2013.5月10日

持丸綾, 今井雄一, 笠井絢子, 片山佳代, 望月昭彦, 倉澤健太郎, 青木茂, 吉田浩, 奥田美加, 高橋恒男, 平原史樹: 当院における筋腫核出後妊娠の検討. 第65回日本産科婦人科学会学術講演会, 札幌市教育文化

会館(北海道札幌市), 2013年5月10日
太田幸秀, 上園幸子, 小河原由貴, 佐藤団, 長谷川哲哉, 小山麻希子, 横田奈朋, 沼崎令子, 佐藤美紀子, 宮城悦子, 榊原秀也, 平原史樹: 閉経後に手術となった子宮筋腫および子宮肉腫症例の検討. 第124回関東連合産科婦人科学会総会・学術集会, 甲府富士屋ホテル(山梨県甲府市), 2012, 10月28日。

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 美紀子 (SATO, Mikiko)
横浜市立大学・附属病院・講師
研究者番号: 70326049

(2)研究分担者

宮城 洋平 (MIYAGI, Yohei)
地方独立行政法人神奈川県立病院機構
神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・がん分子病態研究部門・部門長
研究者番号: 00254194

(3)連携研究者

平原 史樹 (HIRAHARA, Fumiki)
横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号: 30201734

宮城 悦子 (MIYAGI, Etsuko)
横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号: 40275053

長嶋 洋治 (NAGASHIMA, Yoji)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10217995

山中 正二 (YAMANAKA, Shoji)
横浜市立大学・附属病院・准教授
研究者番号 80264604

幡多 政治 (HATA, Masaharu)
横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号: 60285145