

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2015
課題番号：26861315
研究課題名(和文)子宮内膜症における線維化、EMTについての検討

研究課題名(英文)The study about EMT of endometriosis

研究代表者

齊藤 亜子(Saito, Ako)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：50713179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：不死化子宮内膜症上皮細胞にTGF β を添加することで、snail、SMAの発現が上昇することを定量的PCR法にて確認した。TGF β 添加にて子宮内膜症上皮細胞invasion assayにて浸潤能が亢進した。さらにsnailのoverexpressionベクターを作成し、子宮内膜症上皮細胞に導入しinvasion assayにて、その浸潤能を測定すると、浸潤能が亢進していた。子宮内膜症組織と正所性子宮内膜との比較において、子宮内膜症においてSnailの発現が高いことを免疫化学染色にて確認した。子宮内膜症において、EMT関連分子としてsnailが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Transforming growth factor (TGF β) increased the gene expression of snail and SMA in immortalized endometrial epithelial cells (EECs). And TGF β increased invasive potential of EECs by invasion assay. We made the overexpression vector of snail. The overexpression of snail in EECs increased invasive potential by invasion assay. We checked the gene expression of snail in the endometrioma tissue and the endometrium. The snail expression of the endometrioma tissue was higher than that of the endometrium by immunohistochemistry. It is suggested that snail made the important role for the factor of EMT in endometriosis.

研究分野：子宮内膜症

キーワード：EMT 子宮内膜症

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症とは、子宮内膜に類似した組織が子宮以外の部位に異所性に発生し増殖する疾患である。良性疾患であるにもかかわらず、増殖、浸潤し、周囲臓器と癒着を形成する。月経痛、慢性骨盤痛、性交痛などの疼痛の原因となり、不妊をしばしば合併することにより生殖能の低下の原因疾患とも考えられている。生殖年齢の約 10%、不妊患者の約 50%に発症するといわれている(1)。最近数十年における生活様式の変化、少子化に代表される女性のライフスタイルの変容、検査法の進歩などの種々の要因で子宮内膜症と診断される女性は急速に増加している。

骨盤内子宮内膜症の発生機序として諸説あげられているが、今日多くの支持を得ているものは Sampson によって提唱された月経時の逆流子宮内膜細胞の移植説である(2)。これは月経時に経卵管的に月経血とともに子宮内膜細胞が腹腔内に逆流し、腹膜、卵巣などに移植され、そこで生着、増殖するという説である。子宮内膜症が初経後に発症すること、患者においては少なくとも一側の卵管が開存している頻度は極めて高いこと、卵管を結紮した人では骨盤腹膜に子宮内膜症の発症が認められないこと、子宮奇形などで月経血の逆流が多くなる場合に子宮内膜症の頻度が増すことなど、月経現象と子宮内膜症の関係を示唆する事象は非常に多い。さらに逆流月経血中に混ざり腹腔内に排泄された子宮内膜細胞の中に生存している細胞が存在することなどにより、この移植説は多くの人に支持されてきている。しかし、月経血の逆流は多くの婦人に起こることであるが、そのすべてが子宮内膜症を発症するわけではない。その理由として子宮内膜症の発症また進展には、月経血の逆流のみでなく、様々な因子が関与しているためと考えられている。これらの因子には腹腔内環境の変化、免疫学的要因、正所性子宮内膜の変化、遺伝的素因などがあげられる。正常婦人であれば逆流した子宮内膜細胞は免疫的な機序などにより排除される。しかし子宮内膜症患者では逆流した子宮内膜の細胞増殖能の増加や、腹腔内環境の変化により子宮内膜細胞は排除されず、腹膜細胞への接着および浸潤が起こり、さらに血管新生、炎症、線維化を惹起して子宮内膜症が発症、進展すると考えられている。

しかし、これまでに上記子宮内膜組織移植説、体腔上皮化生説、胎生組織遺残説などの説が唱えられてきたが、発症の本質は未だ説明されていない。

子宮内膜症は組織学的には子宮内膜上皮、間質、それを取り巻く線維化組織からなる。深部子宮内膜症ではほとんどに線維化が見られる(3)。腎の線維化についての先行研究により、線維化については Epithelial to mesenchymal transition (EMT) という現象がその主な誘因であり、EMT の結果発生した筋

繊維芽細胞の増殖が尿管の委縮を引き起こすことが報告されている(4)。EMT とは、上皮細胞が間葉系細胞に形態変化する現象であり、初期胚発生に必須の現象である。また、成体においては EMT が亢進することにより、細胞の運動性、浸潤能の獲得、細胞外基質の蓄積が起こり、癌細胞の浸潤や線維症との関連が報告されている。子宮内膜様の上皮細胞の存在が子宮内膜症の診断に重要であるのだが、線維化や間質の増殖や炎症惹起が病態の本質であることを考えると、この EMT という現象が、子宮内膜症の発生、進展、増悪に関与している可能性が高いと考えられる。深部子宮内膜症においては病変の浸潤にも関連していると考えられる。実際、正所性の子宮内膜上皮と子宮内膜症の上皮細胞において EMT のマーカーの違いを調べると、子宮内膜症上皮ではサイトケラチンや E カドヘリンなどの上皮系マーカーの発現が低く、S100A4 といった間葉系のマーカーの発現が強かった。これは、子宮内膜症上皮細胞に間葉系の性格が強いことを示唆する結果である(5)。さらには、SMA、actin stress fiber、vimentin、フィブロネクチン、RhoA、ROCK-I、ROCK-II などの分子の発現上昇が、子宮内膜症における線維化の亢進に関連しているという報告もある。特に SMA は筋繊維芽細胞のメジャーなマーカーであり(6)、さらに子宮内膜症性間質細胞は SMA 陽性の筋繊維芽細胞に分化する(7)という報告もある。しかし、実際に子宮内膜症における EMT の現象を in vitro においてさえも証明した研究はない。そこで、子宮内膜症における EMT を実証し、EMT とそれに伴う線維化の抑制が新規治療ターゲットになると考え、今回の研究を行った。

EMT を引き起こす物質の中で最も重要と思われる因子は TGF- β である(8)。TGF- β は古くより線維症との関連が示唆され、さらに子宮内膜症においても TGF- β は重要な増悪因子である。子宮内膜症においては腹腔内貯留液、また卵巣子宮内膜症性嚢胞内容液に TGF- β 濃度の増加がみられる(9、10)。また、TGF- β は、正所性内膜に比較し、卵巣子宮内膜症性嚢胞の上皮細胞に強く発現している(11)。TGF- β が子宮内膜症の増悪因子である macrophage colony-stimulating factor (CSF)-1 を促進し、また腹膜中皮細胞に子宮内膜上皮細胞が侵入する細胞侵入モデルにおいてその作用を促進するという報告がある(12)。また、これまでに我々は子宮内膜症において炎症に関与する Proteinase-activated receptor (PAR)2 の作用を増強し TGF- β が子宮内膜症の増悪を促進することを示した。

2. 研究の目的

子宮内膜症における EMT と TGF- β の関連につき検討することにした。EMT 誘導転写因子には、E-cadherin を直接抑制する zinc

finger 型転写因子の Snai ファミリー (Snail, Slug) がある。これらの分子と子宮内膜症における EMT との関連についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 検体

子宮内膜症もしくはその他の良性疾患のために手術を施行する患者より書面によるインフォームドコンセントの上で、切除した子宮内膜症病変の一部、子宮全摘症例に関しては子宮内膜の一部を採取した。病理組織学的に子宮内膜症と診断されたものを用いた。月経周期が順調、かつ手術直前の少なくとも3カ月はホルモン療法などおこなっていない患者を対象とした。以上の行程は、以前より東京大学の研究倫理委員会の承諾を得ている。

(2) 不死化子宮内膜上皮細胞

手術検体より採取した子宮内膜症性卵巣のう胞の内腔よりセルスクレーパーにて上皮細胞を回収し、さらに分離、培養した。ただし、初代培養の後、1回継代するとほとんどの細胞が死滅してしまうため、子宮内膜症上皮細胞に *eric campeau* らが作製したレンチウイルスベクターの backbone (13) に CDK4, hTERT, CyclinD1 を導入して作製したレンチウイルスの発現ベクターを感染させ、不死化子宮内膜症上皮細胞を作成した。

(3) TGF の作用

上記不死化子宮内膜症上皮細胞に TGF- を添加し、細胞の morphology の変化、上皮マーカー、間質系のマーカーの発現の変化を継続的に検討した。

また、TGF- を添加群、非添加群に対し、定量的 PCR 法にて snail、SMA の発現を測定した。

また、TGF- 添加群、非添加群に対し、子宮内膜症上皮細胞 invasion assay にて浸潤能を測定した。

(4) EMT 転写因子の検討

Snail は EMT に関連する転写因子である。この overexpression ベクターが作成した。特にこれらの遺伝子をドキシサイクリン (Dox) で遺伝子の on/off ができるような発現ベクターを作成し子宮内膜症上皮細胞に導入した。Dox を添加する場合としない場合で細胞の性質を RT-PCR, 免疫染色、細胞増殖、遊走能などを比較検討した。

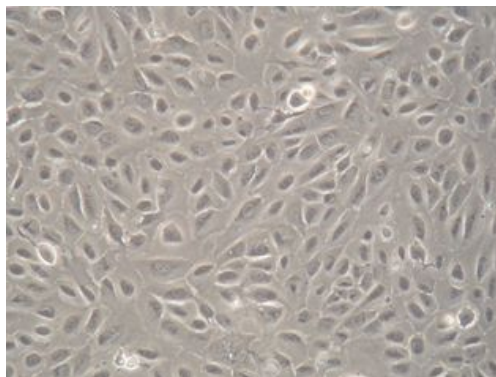
子宮内膜症組織と正所性の子宮内膜を免疫化学染色し Snail の発現を確認した。

4. 研究成果

(1) 不死化子宮内膜上皮細胞

作成した子宮内膜症上皮細胞は癌遺伝子を用いていないため、初代培養の上皮の形態を失わず、核型も正常であった。上記により

子宮内膜症上皮細胞の不死化細胞を5ライン樹立することに成功した。Cytokeratin などの上皮マーカー、ミュー管上皮細胞である PAX8 発現も免疫染色法にて確認した。



(2) TGF の作用

TGF- を添加により、子宮内膜症上皮細胞が spindle 様の間質細胞様に形態の変化がみられた。

また、定量的 PCR 法では TGF- を添加により、snail、SMA の発現が上昇することを確認した。

また、子宮内膜症上皮細胞 invasion assay では TGF- 添加にて浸潤能が亢進することが分かった。

(3) EMT 転写因子の検討

Snail の overexpression ベクターを子宮内膜症上皮細胞に導入し、invasion assay にて、その浸潤能を確認したところ、明らかに浸潤能が亢進していた。

子宮内膜症組織と正所性の子宮内膜との比較において、子宮内膜症において Snail の発現が高いことを免疫化学染色にて確認した。

以上より子宮内膜症において、不死化子宮内膜上皮は研究に有用であること、TGF が EMT を促進し子宮内膜症の増悪に関与している可能性、また EMT 関連分子として snail が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

参考文献

1. Giudice et al. *N Engl J Med.* **362** p2389-98
2. Sampson, J.A. *Am J Pathol* **3**, 93-110 143 .
3. Itoga et al. *Pathol Int*, 2003. **53**p371-5
4. Zeisberg et al. *J Mol Med*, 2004. **82**p175-81
5. Matsuzaki et al. *Hum Reprod.* **27**p712-21
6. Yuge et al. *Hum Reprod* 2007. **22**p938-44
7. Anafet al. *Hum Reprod*, 2000 **15**p767-71

- 8 . Miettinen et al. J Cell Biol. 1994p2021-36
- 9 . Oosterlynck et al. Obstet Gynecol 1994 .83p287-92
- 10 . Komiyama et al. J Reprod. Med. 2007. 52p306-12
- 11 . Kyama et al. Fertil Steril, 2006 85p1667-75
- 12 . Liu et al. Mol Hum Reprod, 2009
- 13 . Eric Campeau et al. PLoS One. 2009 e6529

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1 . 齊藤亜子 久保田佳穂里 細川有美 長谷川亜希子 藤本晃久 腹腔鏡下子宮筋腫核出術における筋腫の体外摘出法による処方時間の比較 産婦人科内視鏡学会 2015 年 9 月 10 日 12 日
- 2 . 細川有美 西森裕美子 齊藤亜子 久保田佳穂里 長谷川亜希子 藤本晃久 膀胱子宮内膜症に対し腹腔鏡下手術を施行した後に自然妊娠に至った一例 産婦人科内視鏡学会 2015 年 9 月 10 - 12 日
- 3 . 藤本晃久 齊藤亜子 久保田佳穂里 細川有美 長谷川亜希子 産婦人科減少に対応した術者 1 名による腹腔鏡下手術の導入 産科婦人科内視鏡学会 2015 年 9 月 10 - 12 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

齊藤亜子 (Saito, Ako)

東京大学 医学部附属病院

登録研究員研究番号 : 50713179