

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09236

研究課題名（和文）ハイリスク卵巣内膜症性嚢胞を選別する新規バイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Identification of novel biomarkers for high-risk endometrial cyst of the ovary

研究代表者

小林 陽一（Kobayashi, Yoichi）

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：90205493

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：内膜症患者の嚢胞内容液のプロテオミクス解析の結果から薬剤抵抗性の新規バイオマーカーとして数種類のタンパクを同定し、その中のazurocidin (AZU) に着目した。AZUは内膜症由来不死化培養細胞に対し炎症性サイトカインの産生を亢進しDNGの作用を減弱させた。またAZUはEmosis細胞においてエストロゲン受容体とプロゲステロン受容体Bの発現を亢進させた。臨床検体での検討では、DNG抵抗性患者の血清および尿中のAZU濃度は有意に高値であった。以上のことからAZUは薬剤抵抗性のバイオマーカーとなり得るとともに卵巣内膜症性嚢胞の治療方針の決定に有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣内膜症性嚢胞は月経困難症をきたし女性のQOLを損なうばかりではなく、不妊症の原因にもなる。治療法としては薬物療法と手術療法に大別されるが、はっきりとした治療指針は確立されていない。本研究で新規バイオマーカーにより薬剤抵抗性の患者を拾い上げることができれば、治療方針の決定に大きく寄与することが期待され、また女性のQOL向上による社会的生産性の増加や、大きな意味では少子化対策の一環ともなり得る。また未だ癌化との関連性は明らかではないが、薬剤抵抗性ということが判明すればより積極的な手術療法による病巣の除去により、将来的な癌化のリスクを減少させることも期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have identified some proteins from endometrial cyst fluid those were candidate as resistant against Dienogest (DNG), therapeutic drug for endometriosis, by proteomics analysis. One of the, we focused on azurocidin (AZU), and analyzed its characterizations. We revealed that AZU promotes expression of inflammatory cytokines those exacerbate endometriosis, and AZU suppresses effect of DNG. One of the mechanisms, we also revealed AZU promotes expression of estrogen receptor and progesterone-B receptor those both exacerbate endometriosis. Then AZU shows inhibitory effect for DNG via hormone receptors. In clinical samples, concentrations of serum and urine AZU was significantly higher in the patients with DNG-resistant compared to others patients. In conclusions, it revealed that AZU is associated with exacerbation and drug-resistance, then AZU could be a novel biomarker for drug-resistant, and it could be useful for determination of therapeutic strategy.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮内膜症性嚢胞 薬剤抵抗性 黄体ホルモン アズロシジン 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

卵巣内膜症性嚢胞は不妊症や月経困難症の原因となっているが、加齢に伴い癌化のリスクが高くなることが明らかになっており、特に我が国においては欧米諸国に比較して内膜症由来の卵巣癌患者が多いことが知られている。しかしながら現時点では癌化を予測するバイオマーカーは存在しない。また、一部の卵巣内膜症性嚢胞はホルモン治療薬に抵抗性であることが知られており、これら薬剤抵抗性の因子が癌化と何らかの関連性がある可能性がある。我々は内膜症性嚢胞治療薬であるディナゲストに対して抵抗性を示す症例があること、またそれら症例の嚢胞内容液中にはいくつかのタンパクが高発現していることを同定し¹⁾、その中でもazurocidin (AZU) に注目して検討を行った。その理由はAZUがIGFBP-1のproteaseであること、また内膜症性嚢胞が癌化した場合には組織型として明細細胞癌の形態をとることが多いが、他の組織型の卵巣癌と比較して卵巣明細細胞癌ではIGFBP-1が高率に発現していることが報告されており²⁾、卵巣内膜症性嚢胞の癌化と何らかの関連性がある可能性があるかと推察されたためである。

2. 研究の目的

本研究では

- 1) AZU が内膜症細胞に対してどのような影響を及ぼすかを明らかにする
- 2) 内膜症治療薬であるディナゲストに対してどのような機序で薬物の作用に拮抗しているのかを明らかにする

ことを目的とした。

3. 研究の方法

1) 基礎的検討：ヒト内膜症由来の不死化培養細胞株 (Emosis)を用いて、Emosis に対するAZU の作用について、以下の項目に関して検討を行った。

Emosis の増殖に対する AZU の直接作用

Emosis に対してディナゲストが及ぼす作用に対する AZU の影響

Emosis における、サイトカイン (IL-6,IL-8) 産生能に及ぼす AZU の影響

ディナゲストはプロゲステロン製剤であり、内膜症細胞のプロゲステロン受容体に結合することによって効果を発揮する。一方内膜症細胞はエストロゲンの作用により増悪することが知られている。そこで Emosis におけるエストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体に対する AZU の作用を検討した。

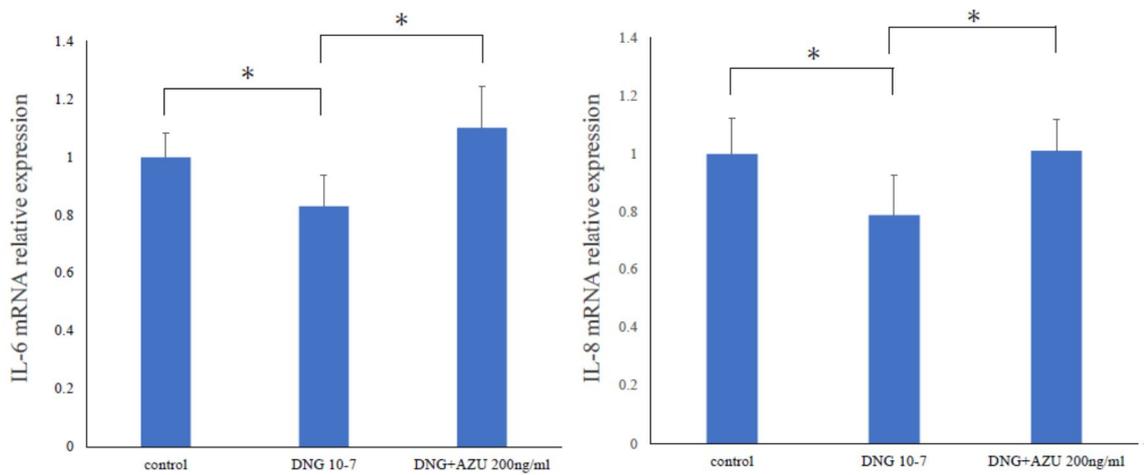
2) 臨床的検討：当院 IRB の承認のもと、内膜症性嚢胞患者における末梢血および尿中のAZU 濃度と、ディナゲストの臨床的効果の関連性についての検討

4. 研究成果

1) 基礎的検討

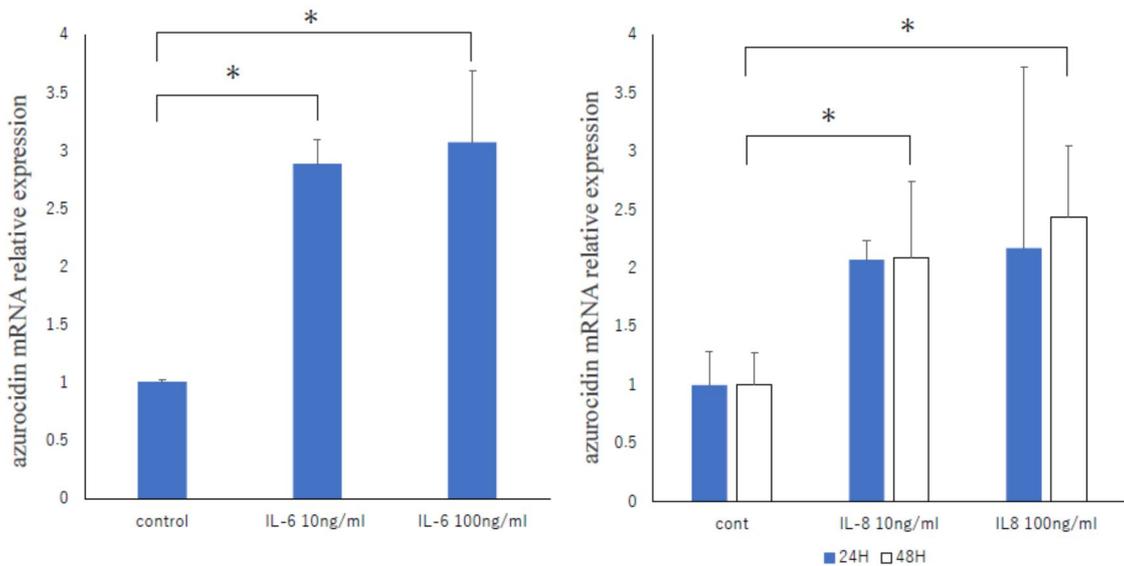
Emosis細胞の増殖に及ぼすAZU の作用の検討を行ったが、AZU 単独ではEmosis の増殖には有意な影響は認められなかった。

Emosis における IL-6,IL-8 の mRNA の発現は、ディナゲスト添加で抑制されたがその効果は AZU200ng/ml を添加することでキャンセルされた。すなわち AZU はディナゲストの IL-6/8 産生能の抑制効果をキャンセルすることが示された(図2)。



Emosis に IL-6,IL-8 を添加すると AZU の mRNA の発現は有意に増加した。すなわち炎症性サイトカインは Emosis において AZU 産生を亢進することが示された (図 3)

図 3



Emosis におけるエストロゲン受容体の mRNA の発現は AZU 添加により濃度依存性に亢進した(図 4)。また内膜症に促進的に働くプロゲステロン受容体 B(PR-B) について検討したところ、PR-B の発現はディナゲスト単独投与で減弱したが、AZU の単独投与およびディナゲストとの併用投与においては、PR-B の発現抑制効果は認められなかった(図 5)。このことから AZU の Emosis に対する作用機序としてはエストロゲン受容体と PR-B の発現を増強させることにより治療薬であるディナゲストの作用を減弱させる可能性が示唆された。

図 4

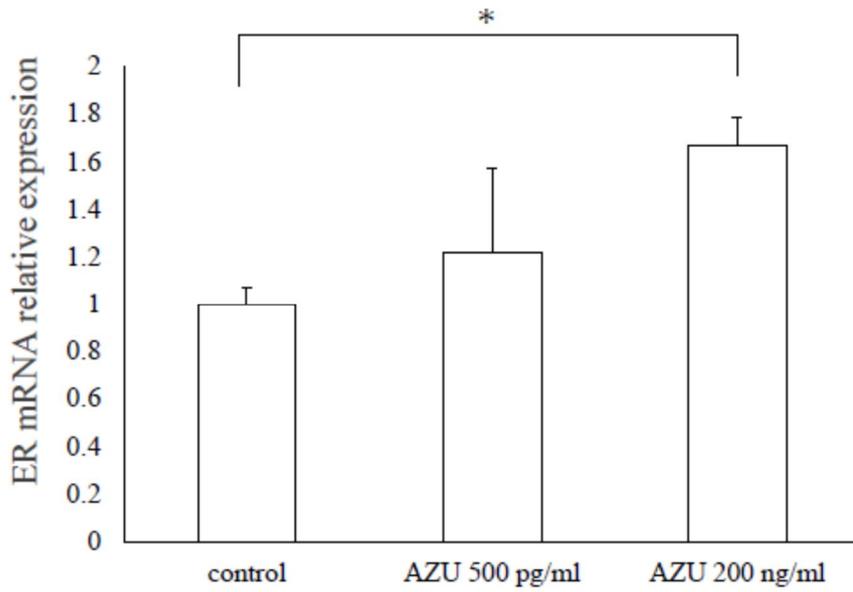


図5 A

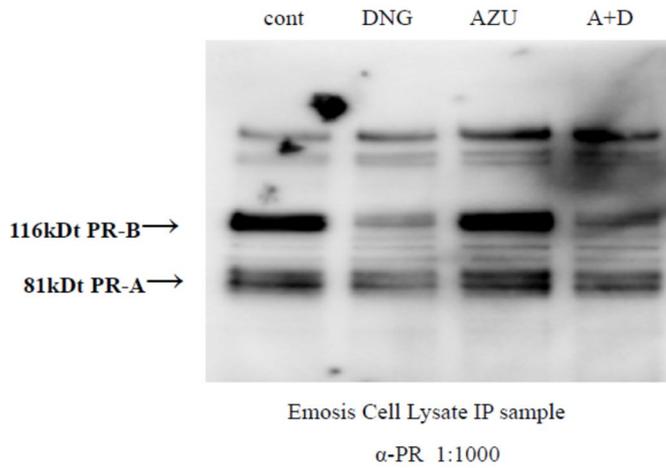
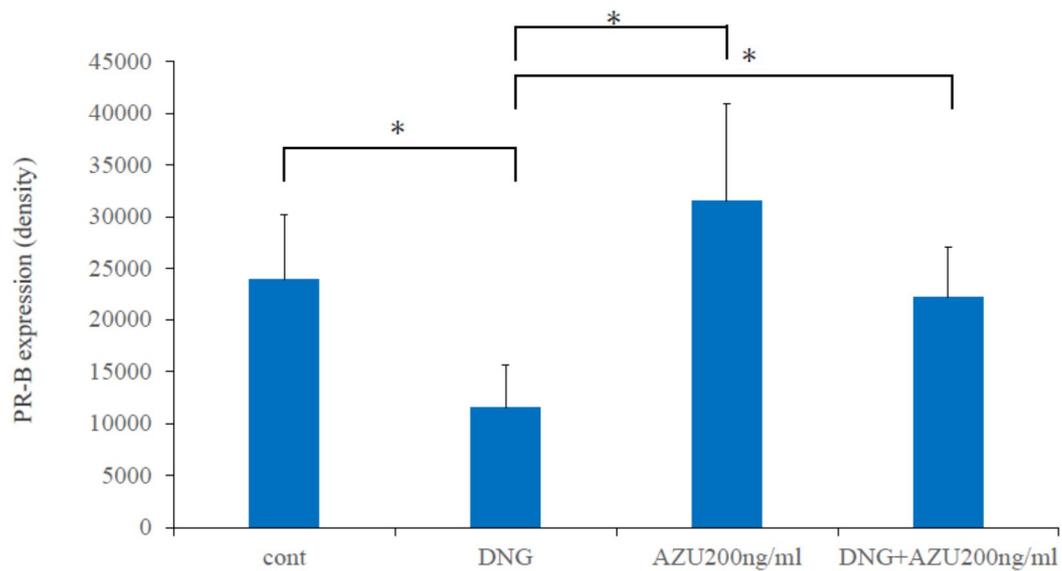


図5 B



2) 臨床的検討

内膜症性嚢胞の手術前に嚢胞の縮小を目的としてディナゲストを術前に投与した患者において、ディナゲストの臨床的効果が認められなかった症例と、効果を認めた、もし

くは効果判定不能の患者において、術前の血中・尿中および嚢腫内容中の AZU 濃度を比較したところ、嚢腫内容液中の AZU 濃度は有意差を認めなかったが、血中・尿中の AZU 濃度は、ディナゲスト治療抵抗性患者において有意に高値であった（表 1）。このことから、血中あるいは尿中の AZU 濃度はディナゲスト抵抗性の患者の選別に有用である可能性があることが示唆された。

表 1

	DNG non-responders	others	<i>p</i>
urine azurocidin	43.04 ± 39.79 (n=14)	18.71 ± 26.88 (n=73)	0.010
serum azurocidin	1019.99 ± 1702.06 (n=15)	751.71 ± 753.65 (n=58)	0.047
ovarian cyst fluid azurocidin	5820.73 ± 15832.37 (n=13)	2190.15 ± 2497.61 (n=38)	0.740

serum azurocidin : pg/ml

urine azurocidin : pg/dl/creatinine

ovarian cyst fluid azurocidin: pg /100mg protein

参考文献

- 1) Kobayashi Y, Fukutomi T, Mita S, Watanabe M, Suzuki S. Identification of biomarkers for drug-resistant endometriosis using clinical proteomics. *Hum Cell.* 34:394-399, 2021.
- 2) Sugita S, Morishita Y, Kano J, Furuya S, Shiba-Ishii A, Noguchi M. IGFBP-1 is expressed specifically in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Histopathology.* 2011 Apr;58(5):729-38. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.03817.x. Epub 2011 Apr 4. PMID: 21457161.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi Yoichi, Fukutomi Toshiyuki, Mita Shizuka, Watanabe Momoe, Suzuki Atsushi	4. 巻 34
2. 論文標題 Identification of biomarkers for drug-resistant endometriosis using clinical proteomics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 394 ~ 399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13577-020-00465-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊百恵、石田愛美、田中啓、小林陽一
2. 発表標題 卵巣内膜症性嚢胞の薬剤耐性にかかわるバイオマーカーの検討
3. 学会等名 第37回日本ヒト細胞学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 渡邊百恵、田中啓、谷垣伸治、小林陽一
2. 発表標題 卵巣内膜症性嚢胞の薬剤抵抗性にかかわるバイオマーカーの検討
3. 学会等名 第41回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 竹森聖、渡邊百恵、田中啓、小林陽一
2. 発表標題 子宮内膜症関連卵巣がんにおける新規バイオマーカーの検索
3. 学会等名 第8回婦人科バイオマーカー研究会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 渡邊百恵、田中啓、谷垣伸治、岩下光利、小林陽一
2. 発表標題 Azurocidinは卵巣内膜症性嚢胞の薬剤抵抗性に関する新規バイオマーカーとなりうる
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------