

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09269

研究課題名(和文)子宮内膜症の微小環境における酸化還元反応のバランス変化に基づく発癌仮説の構築

研究課題名(英文)The carcinogenesis of ovarian endometrioma due to redox environmentt

研究代表者

山田 有紀(Yuki, Yamada)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20588537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究で、腫瘍内容液と腫瘍組織において、子宮内膜症性嚢胞では酸化ストレスが高く、癌化した場合には抗酸化が優位な環境となっていることがわかった。子宮内膜症の不活化上皮細胞と子宮内膜症から抽出した間質細胞を用いて、子宮内膜症の微小環境を再現した。これまでの結果よりHO-1はマクロファージに発現していることがわかったため、不活化上皮細胞および間質をマクロファージと共培養させ、H2O2を加えて酸化ストレスを与えた。その結果マクロファージでHO-1発現マクロファージが強発現することがわかった。またHO-1発現M2マクロファージと共培養することで、細胞死が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜症は酸化ストレスが強く癌化しやすい環境にある。実際これまでの研究で、内膜症患者では、自然発生卵巣がん比べ8倍以上の高率で癌化が起こることがわかっている。このように高い酸化ストレス環境にあるにもかかわらず、ほとんどの内膜症では卵巣癌が発生しない。今回の研究結果から推察すると、M2マクロファージが内膜症上皮に浸潤し、マクロファージにHO-1が高発現することで、内膜症細胞を酸化ストレスから保護している可能性が考えられた。癌化した組織でHO-1が低下していることから、HO-1の発現低下が癌化に一因となっている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that oxidative stress was high in endometriotic cysts in tumor content fluid and tumor tissue, and antioxidant-dominated environment in the case of cancer. Using immortalized epithelial cells from endometriosis and stromal cells extracted from endometriosis, we reproduced the microenvironment of endometriosis. Since HO-1 was found to be expressed in macrophages, immortalized epithelial cells and stromal cells were co-cultured with macrophages and subjected to oxidative stress by adding H2O2. As a result, we found that HO-1 expressing macrophages were strongly expressed in macrophages.

研究分野：卵巣がん

キーワード：卵巣がん 酸化ストレス 癌化

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は、200 万人以上の女性が罹患する疾患であり、月経痛、不妊症、そして卵巣癌の合併と、女性の QOL を最も低下させる疾患である。我々は前方視的臨床研究により、6,398 人の卵巣子宮内膜症性嚢胞患者から、46 人の卵巣癌患者が発生し、自然発生卵巣がん比べ 8 倍以上の高率で癌化が起こることを初めて証明した (H. Kobayashi et al. Int J Gynecol Cancer, 2007)。その病理組織型は明細胞癌が約 4 割を占める。明細胞癌は漿液性癌と異なり、抗癌剤耐性を示し予後不良であるため、発癌機序の解明と発癌の予防が急がれる。

卵巣に子宮内膜症ができると、月経のたびに出血がおきるため、卵巣に出血を含んだ嚢胞を形成する。そのため一般的にチョコレート嚢胞と呼ばれている。チョコレート嚢胞内では、月経のたびに出血し嚢胞内で出血を繰り返す。溶血によるオキシヘモグロビンの自動酸化、遊離鉄のフェントン反応により強力な活性酸素が生じる。従って、チョコレート嚢胞では鉄による酸化ストレスがきわめて強いため、ほとんどの内膜症上皮細胞は徐々に死滅する。しかし、何らかの方法で一部の細胞が抗酸化能を獲得し、持続的な酸化ストレスを蓄積することで、DNA 損傷を引き起こし、発癌に至ると我々は考えている (図 1)。

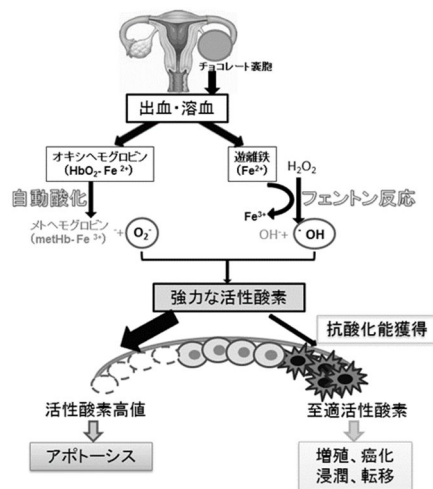


図1 チョコレート嚢胞の発癌仮説

我々はチョコレート嚢胞の癌化に必要な抗酸化能の獲得において転写因子 Nrf2 に注目している (Yamada et al. Int J Gynecol Cancer, 2011)。Nrf2 は、様々な有害物質に反応して生体防御遺伝子群 (ヘムオキシゲナーゼ等) の発現を誘導する重要な転写因子である。通常、転写因子 Nrf2 はユビキチン化修飾で分解され負に制御されている。一方、有害物質の環境下では、Nrf2 のユビキチン化修飾が阻害されるため、Nrf2 は蓄積し、プロモーター領域に結合して、下流の生体防御遺伝子群を発現させる (図 2 上)。ヒトの他のがんにおいては Nrf2 の恒常的な活性化が報告されている。

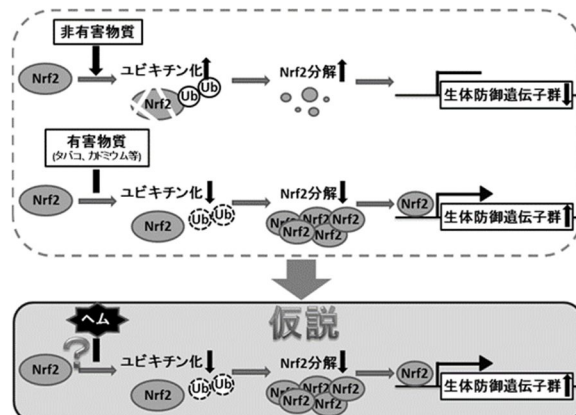


図2 Nrf2の制御機構

我々は、チョコレート嚢胞が癌化する際に、Nrf2 が恒常的に活性化している可能性を推測している。つまり、嚢胞内で月経の度に出血が起こり、赤血球が溶血することで放出されるヘムは、強力な活性酸素を生成する有害物質であるため、Nrf2 を持続的に活性化させるという仮説である (図 2 下)。強力な酸化ストレス環境下では通常は細胞死が誘導されるが、Nrf2 が活性化されて抗酸化物質が相対的に増えている微小環境下では、細胞死を免れ生存する可能性がある。特に、Nrf2 によって誘導されるヘムオキシゲナーゼは、ヘムを分解し活性酸素の生成を抑制する抗酸化酵素である。この作用により、腫瘍内は至適な酸化ストレス環境下となり、細胞は DNA 障害や遺伝子不安定性を保持したまま生存・増殖を続け、やがて癌化に至ると考えた。

2. 研究の目的

これまででは、子宮内膜症は過剰な「鉄」による過酷な酸化ストレス環境下で遺伝子変異を起こすとされてきた。子宮内膜症由来と推定される明細胞癌に特異的かつ高頻度に認められる遺伝子異常として、癌遺伝子 PIK3CA (約 30%) やクロマチン再構成蛋白 ARID1A の変異 (約 50%) が見いだされ、癌化との関連について注目を集めている。この様に癌遺伝子/癌抑制遺伝子変異をターゲットとした研究はされているが、活性酸素を生み出す「鉄」自体に着目し、酸化還元反応の動態から発癌メカニズムを解明した研究はない。今回は「鉄」と「酸化還元反応」に着目し、子宮内膜症の癌化における HO-1 と Nrf2 の働きを明らかにすることである。

3. 研究の方法

子宮内膜症上皮細胞の特性を保持する子宮内膜症上皮不死化細胞株が 2012 年に樹立された。我々はこの細胞株を使用して以下の実験を行った。

(1) 手術で摘出したチョコレート嚢胞と内膜症関連卵巣癌の嚢胞液、摘出組織から抽出したライセートを用いて、活性酸素種と抗酸化物質の評価を行う。また、それぞれのパラフィン包埋切片を用いて、活性酸素による DNA ダメージの指標である 8-OHdG や DNA 二本鎖切断の指標となる H2AX、抗酸化酵素であるヘムオキシゲナーゼやグルタチオン関連の免疫組織染色を行い、良性的

チョコレート嚢胞と癌化した場合の違いを検討する。

(2) 培養細胞に「H2O2」と「ヘム」を添加し、マイクロアレイにより動いた遺伝子群を網羅的に解析する。

(3) 培養細胞に「H2O2」と「ヘム」で酸化ストレスを加える。内膜症性嚢胞の環境を再現するために、マクロファージとの共培養を行い、2の解析で候補にあがった遺伝子群の働きについて検討する。

4. 研究成果

(1) 腫瘍内容液と酸化・抗酸化マーカーの関係

当院で手術を行い病理学的に診断がついている子宮内膜症性嚢胞 44 例と子宮内膜症関連卵巣癌 (endometriosis-associated ovarian cancer: EAO) 14 例を対象とした。

酸化ストレスマーカーとして 8-OHdG (8-Hydroxy-2-deoxyguanosine) と HO-1 を、抗酸化ストレスマーカーとして総抗酸化能 (Total antioxidant capacity: TAC) を測定した。

その結果、内膜症性嚢胞では酸化ストレスマーカーである 8-OHdG と HO-1 が優位に高く、反対に癌化した EAO では抗酸化マーカーである TAC が高くなった (図 3)。良性では酸化ストレスが高い環境であり、癌化した場合には反対に抗酸化が優位な環境となっていることがわかった。

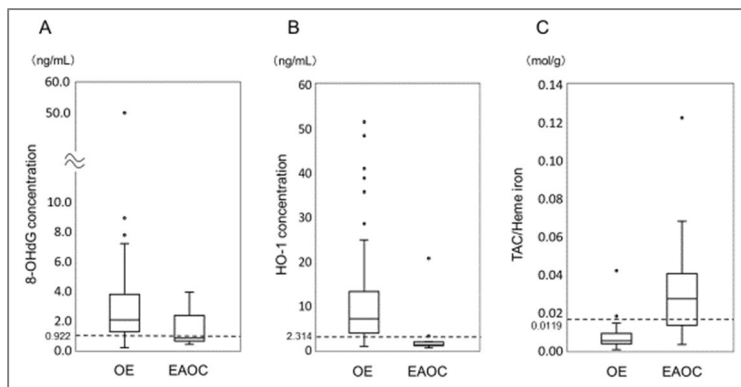


図 3 OE と EAO における酸化・抗酸化マーカー

当院で手術をおこなった症例 (子宮内膜症性嚢胞 178 例、非子宮内膜症性嚢胞 58 例) を対象として、鉄関連物質 (総鉄、ヘム鉄、遊離鉄、オキシヘモグロビン、メトヘモグロビン) 8-OHdG、HO-1、ビリルビン、総抗酸化能を測定した。

総鉄、ヘム鉄、遊離鉄、metHb、oxyHb は、子宮内膜症では非子宮内膜症と比較して顕著に高かった。ビリルビン、HO-1、TAC は、子宮内膜症患者では非子宮内膜症患者に比べて有意に高かった。子宮内膜症では総鉄が HO-1 と正の相関を示したが ($r=0.518$, $p=0.001$)、非子宮内膜症では鉄と相関のある抗酸化物質はなかった。これより、HO-1 は子宮内膜症性嚢胞の嚢胞液における酸化ストレスのバランスを調整している可能性が考えられた。

(2) HO-1 に着目した解析

HO-1 は M2 マクロファージに発現しているとの既報があるため、内膜症・卵巣癌の組織内の HO-1 とマクロファージについて検討をおこなった。当科で手術を施行し病理学的検査が施行された 53 症例 (OE: 33 症例、EAO: 20 例) を対象とし、後方視的検討を行った。摘出標本のブロックより 2 μ m のパラフィン切片を採取し、HE 染色および CD68、CD11c、CD163、HO-1 の免疫組織化学染色を行った。CD68 を汎マクロファージのマーカー、CD11c を M1 マクロファージのマーカー、CD163 を M2 マクロファージのマーカーとした。

免疫組織化学染色の結果を図 4 に示す。CD68 陽性細胞 (図 4 b・g)、CD11c 陽性細胞 (図 4 c・h)、CD163 陽性細胞 (図 4 d・i) の数は、EAO 群の方が OE 群に比べて少なかった。また、また内膜症組織と癌組織が同一切片上に存在するスライドでも同様の結果が確認され、癌組織では CD68、CD11c および CD163 の発現が低下していた。

マクロファージのカウント数は、CD68、CD11c、CD163 陽性細胞数は、OE 群と比較して EAO 群で有意に低かった。また M1/M2 比を分析す

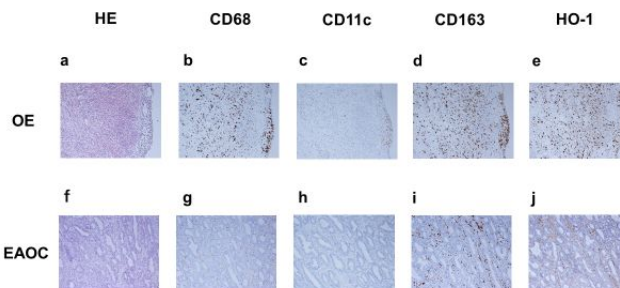


図 4 OE と EAO におけるマクロファージの発現

ると、OE 群と比較して EAOC 群で有意に低かった。

H0-1 の免疫組織化学染色の結果では、H0-1 陽性細胞は OE 群と比較して EAOC 群で有意に低かった (図 4 e・j、表 1)。H0-1 は M2 マクロファージの標的として作用することから、OE 組織と EAOC 組織における H0-1 と CD163 の共発現パターンについて評価した。OE 組織の連続した切片を検査すると、H0-1 は CD163 を発現する細胞の大部分で発現しており、H0-1 が M2 マクロファージに発現していることが示唆された(図 4 d・e)。CD163 陽性細胞数と H0-1 陽性細胞数の関連を比較すると、CD163 陽性細胞数と H0-1 陽性細胞数の間に統計的に有意な相関を認められた ($r=0.201$ 、 $p=0.003$) (図 5)。

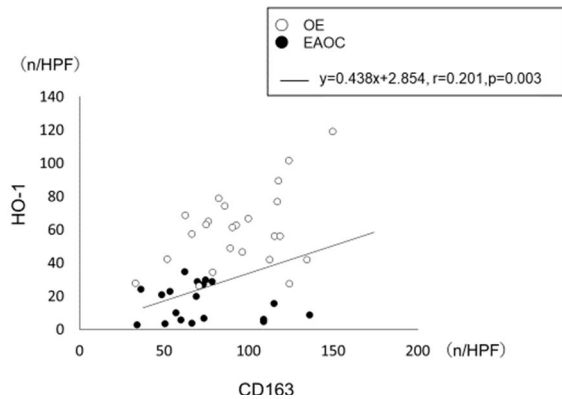
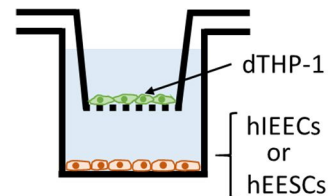


図 5 M2 マクロファージと H0-1 の相関

。OE 群では EAOC 群と比較してマクロファージの数が多く、そのほとんどが H0-1 を発現する M2 マクロファージであった。EAOC では抗酸化マーカーである H0-1 の発現低下があり、H0-1 を発現する M2 マクロファージの数の減少が、OE の癌化を促進する上で重要な役割を果たしている可能性があると考えられた。

(3) 共培養実験

子宮内膜症の環境を *in vitro* で再現し、微小環境におけるマクロファージ・H0-1 の働きを調べた。共培養実験は右図の実験系でおこなった。cell culture insert を使用。上段には THP-1 分化誘導マクロファージを、下段には子宮内膜症不活化上皮細胞および手術標本から抽出した子宮内膜症間質細胞を培養した。細胞をそれぞれ培養した 24 時間後に共培養し、48 時間後に H2O2 を添加、そこから 72 時間の細胞増殖と上皮細胞・間質細胞・マクロファージにおける H0-1 の発現を測定した。



上皮・間質には H0-1 はほとんど発現せず、マクロファージに H0-1 の発現を認めた。またマクロファージと共培養を行うことで、H₂O₂ 添加時の上皮・間質の細胞障害性が低下した (図 6)。OE では強い酸化ストレスに対して H0-1 は高発現し、細胞を保護している。H0-1 の発現が低下する因子があれば細胞障害性が高まり、癌化のリスクが高くなる可能性がある。

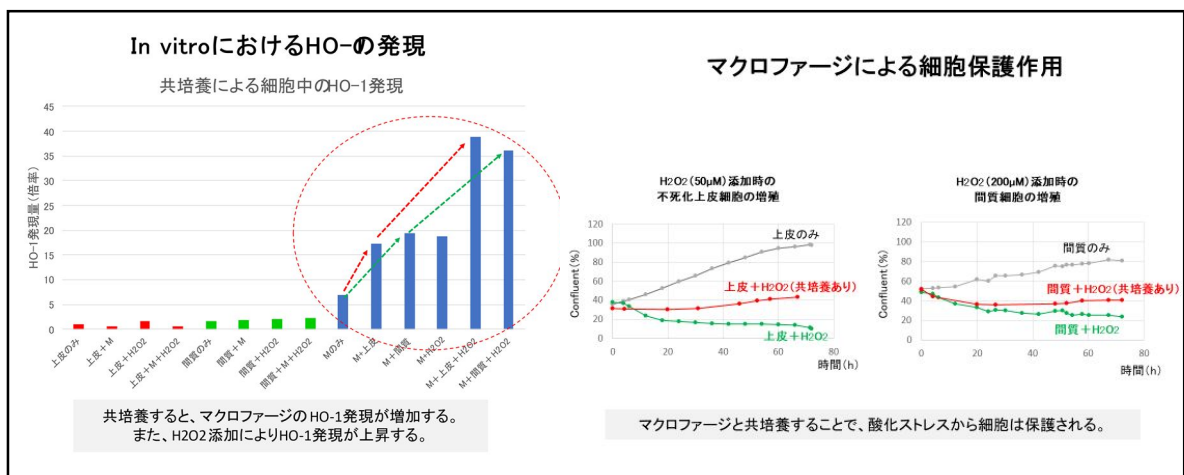


図 6 共培養によるマクロファージの働き

共培養後の上皮細胞・間質細胞・マクロファージのマイクロアレイ

上記共培養実験をおこなった細胞を回収し、マイクロアレイをおこない、強発現している因子の解析をおこなった。共培養する前の上皮細胞・間質細胞との比較をおこなった。13 遺伝子が候補として挙げられ、マクロファージの働きに関与する遺伝子を抽出し、DEGs, TGF- β , IL-10 and IL-6 を最終の候補遺伝子とした。これらの *in vitro* における働きについては、現在解析中である。

1. Yoshikatsu Fujimoto, Shogo Imanaka, Yuki Yamada, Kenji Ogawa, Fuminori Ito, Naoki Kawahara, Chiharu Yoshimoto, Hiroshi Kobayashi. Comparison of redox parameters in ovarian endometrioma and its malignant transformation. *Oncol Lett.* 2018 Oct; 16(4): 5257-5264. doi: 10.3892/ol.2018.9242
2. Yamada Y, Uchiyama T, Ito F, Kawahara N, Ogawa K, Obayashi C, Kobayashi H. Clinical significance of M2 macrophages expressing heme oxygenase-1 in malignant transformation of ovarian endometrioma. *Pathol Res Pract.* 2019 Apr;215(4):639-643. doi: 10.1016/j.prp.2018.12.017.
3. Imanaka S, Yamada Y, Kawahara N, Kobayashi H. A delicate redox balance between iron and heme oxygenase-1 as an essential biological feature of endometriosis. *Arch Med Res.* 2021 Apr 13:S0188-4409(21)00077-1. doi: 10.1016/j.arcmed.2021.03.006.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Yoshikatsu Fujimoto, Shogo Imanaka, Yuki Yamada, Kenji Ogawa, Fuminori Ito, Naoki Kawahara, Chiharu Yoshimoto, Hiroshi Kobayashi. | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 Comparison of redox parameters in ovarian endometrioma and its malignant transformation. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Oncology letters | 6. 最初と最後の頁 5257-5264 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2018.9242 | 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 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Yamada Y, Uchiyama T, Ito F, Kawahara N, Ogawa K, Obayashi C, Kobayashi H. | 4. 巻 215 |
| 2. 論文標題 Clinical significance of M2 macrophages expressing heme oxygenase-1 in malignant transformation of ovarian endometrioma. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice | 6. 最初と最後の頁 639-643 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.prp.2018.12.017 | 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 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Imanaka S, Yamada Y, Kawahara N, Kobayashi H | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 A delicate redox balance between iron and heme oxygenase-1 as an essential biological feature of endometriosis. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Archives of Medical Research | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.arcmed.2021.03.006. | 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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 小川憲二, 河原直紀, 山田有紀, 吉元千陽, 川口龍二, 佐道俊幸, 小林 浩 |
| 2. 発表標題 子宮内膜症に類似した微小環境でのヘムオキシゲナーゼ1 (HO-1) の発現機序 |
| 3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yamada Y, Yoshimoto C, Ogawa K, Kawahara N, Kawaguchi R, Sado T, Kobayashi H |
| 2. 発表標題 Discrimination of malignant transformation from benign endometriosis using near-infrared approach |
| 3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小川憲二, 山田有紀, 河原直紀, 吉元千陽, 川口龍二, 佐道俊幸, 小林 浩 |
| 2. 発表標題 子宮内膜症の癌化におけるヘムオキシゲナーゼ1 (HO - 1) の抗酸化作用 |
| 3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ogawa K, Yamada Y, Kawahara N, Yoshimoto C, Kawaguchi R, Sado T, Kobayashi H |
| 2. 発表標題 Role of heme oxygenase 1(ho-1) in malignant transformation of ovarian endometriosis. |
| 3. 学会等名 The 17th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山田有紀, 内山智子, 竹田善紀, 松原 翔, 河原直紀, 新納恵美子, 川口龍二, 小林 浩 |
| 2. 発表標題 子宮内膜症の癌化におけるマクロファージの役割 |
| 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 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山田有紀, 松原 翔, 竹田善紀, 河原直紀, 川口龍二, 岩淵拓也, 小林 浩 |
| 2. 発表標題 酸化還元反応のバランス変化に基づく発癌仮説 |
| 3. 学会等名 第42回日本エンドメトリーシス学会学術講演会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2021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 |
|-------|---|-------------------------------------|------------------------------|
| 研究分担者 | 棚瀬 康仁 (TANASE YASUHITO) (20423915) | 奈良県立医科大学・医学部・助教 (24601) | 研究分担者期間：2018年4月1日～2019年3月31日 |
| 研究分担者 | 小林 浩 (HIROSHI KOBAYASHI) (40178330) | 奈良県立医科大学・医学部・研究員 (24601) | |
| 研究分担者 | 川口 龍二 (RYUJI KAWAGUCHI) (50382289) | 奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601) | |
| 研究分担者 | 松原 翔 (SHO MATSUBARA) (20825236) | 奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員 (24601) | 研究分担者期間：2019年4月1日～2021年3月31日 |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|