

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09802

研究課題名(和文) レクチンを用いた子宮内膜症発症を制御する糖鎖構造の解明

研究課題名(英文) The role of lectins in the development of endometriosis.

研究代表者

橋本 香映 (Hashimoto, Kae)

大阪大学・医学部附属病院・特任准教授(常勤)

研究者番号：90612078

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)：子宮内膜症症例の子宮内膜と正常子宮内膜における糖鎖の発現を比較検討することで、子宮内膜症の発症原因を探るべく研究を開始したが、当初予定していた新鮮組織検体では比較検討が難しく、初代培養細胞を用いることとした。しかしながら、初代培養を行うに適した薬物療法の行われていない症例の確保に難渋し、初代培養条件の検討に多くの時間を費やしたが、添加したエストラジオールなどが糖鎖発現に与える影響を除外できず、保存されていた薬物療法をうけていない症例のホルマリン固定パラフィン包埋切片からレーザーマイクロディセクションを行い子宮内膜上皮および間質の蛋白を抽出して再検討予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜症の発症にかかわる因子が明らかになることで、新しい治療法の開発に役立つ可能性がある。また、子宮内膜症の症状がなくとも子宮内膜症発症を予測できるバイオマーカーを見つければ、早期治療により重症化を防ぐことができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate the difference of glycan expression in the endometrium of endometriosis and clarify the cause of the endometriosis. First, we planned to perform lectin microarray by fresh tissue samples from surgical specimen. However, we came to conclude that it is more suitable to compare the primary culture cells than tissue. However, there are few cases that have not received hormone therapy, and it has become difficult to obtain samples suitable for primary culture. Though we modulate the plan to use the formalin-fixed paraffin-embedded sections with laser microdissection. The protein extraction from endometrial epithelial lesion and stromal lesion will be analyze.

研究分野：子宮内膜症

キーワード：子宮内膜症 レクチン

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は生殖期女性に発症する良性腫瘍性疾患であるが、月経困難症、性交痛、慢性骨盤痛、不妊などの原因となり、患者のQOLを著しく損なうことのある疾患である。子宮内膜症病変は生殖期女性の6-10%に存在し、このうち35-50%に前述のような症状を生じる。また治療法は手術療法、ホルモン療法が主であるが、いずれも再発・無効例が少なからず存在し、新規治療法の開発が望まれる。子宮内膜症はその病因、成因について数多くの研究がなされてきているが、現在、最も支持され

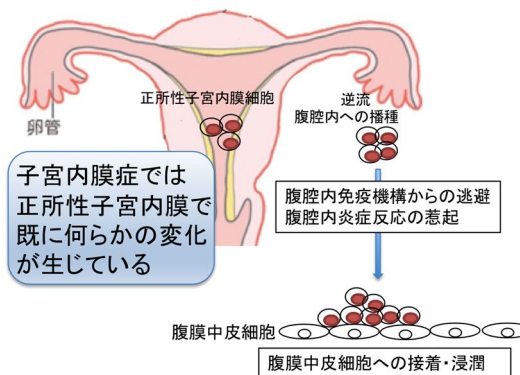


図1 子宮内膜症発症のメカニズム(仮説)

ている発症機序の一つに1927年にSampsonが提唱した「月経血の逆流に伴って腹腔内に流入した子宮内膜が、腹腔内に生着し増殖する」とする子宮内膜播種説がある。しかしながら月経血の経卵管的逆流は月経中の女性の82~90%に認められる一般的なものであり、月経血の逆流をみるすべての症例が子宮内膜症を発症するわけではない。また『癌ではない子宮内膜細胞が異所である骨盤腹膜にどのようにして接着し生着するのか?』という問いについても未だ明らかになっていない。本研究は『子宮内膜症ではすでに正所性の子宮内膜において何らかの変化が生じている』との仮説(図1)を明らかにするため、子宮内膜細胞における糖鎖の発現変化に焦点をあて、研究を開始した。

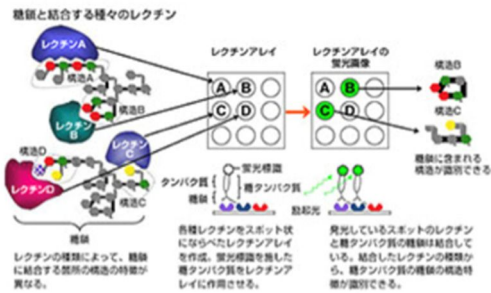
2. 研究の目的

子宮内膜症発症における最初のステップである『癌ではない子宮内膜細胞が異所である骨盤腹膜にどのようにして接着し生着するのか?』を明らかにすることで、子宮内膜症の発生メカニズムを解明する。発生メカニズムが明らかになることで、これまでの手術もしくはホルモン療法とは異なるの新しいアプローチでの治療法の実現につなげる。また、子宮内膜症と診断するには超音波などで確認できる卵巣嚢胞などがある場合は確定診断可能であるが、中にはブルーベリースポットのような腹腔鏡でのみ診断される病変により症状が引き起こされている場合もある。子宮内膜症で増加する糖鎖とレクチンが明らかになることで、確定診断の難しい症例や、症状が明らかでない初期病変の診断が可能となるようなバイオマーカーの開発にもつながることができる可能性がある。バイオマーカーが明らかになれば、重症化する前にホルモン療法を開始するなどして、病状進行を抑えることが可能となり、将来的な不妊の予防にもつながる。

3. 研究の方法

当初計画では新鮮手術検体から得た組織から直接タンパクを抽出し、レクチンマイクロアレイにて子宮内膜症症例の内膜と正常内膜を比較検討することとしていた。しかしながら、新鮮組織そのものでは子宮内膜上皮細胞、子宮内膜間質細胞、子宮筋層が含まれ、またそれぞれの組織の含有率を揃えることも困難であることから、子宮内膜間質細胞および子宮内膜上皮細胞を、それぞれ初代培養を行ってからレクチンマイクロアレイにて比較検討を行うこととした。しかしながら、初代培養を行う場合、手術前にGnRHアナログ、GnRHアゴニスト、ジエノゲストなどの

ホルモン療法をうけていた症例からの検体では、細胞増殖が不良となり十分な細胞量が採取できない。これは過去の研究にて既知であったため、これまでは薬物療法を用いていない症例もしくは短期間のみ使用している症例の検体を研究に用いてきた。しかしながら、これらの薬剤を使用していない症例は少なく、ホルモン療法を受けた検体からの細胞培養について培養液に細胞増殖因子を添加するなどして、培養し用いることとした。至適条件を検討した。細胞増殖はやや改善したものの、添加したエストラジオールなどが糖鎖発現に対する影響を否定できず、初代培養細胞を用いる検討も断念した。過去の手術に伴い保管されているホルマリン固定パラフィン包埋ブロックであれば、ホルモン療法の行われていない症例をピックアップすることが可能であり、かつ内膜症症例と非内膜症症例で近い周期になるものを選択することができるため、委託会社に問い合わせ、パラフィン包埋切片から抽出した蛋白にてレクチンマイクロアレイを行うべく、レーザーマイクロディセクションを用いて上皮部分と間質部分に検体をわけてタンパク抽出を行うこととした。1切片から得られるタンパク量は微量であり、次回解析にむけてタンパク抽出中である。



NEDO:国立研究開発法人新エネルギー産業開発機構より

図2 レクチンアレイで糖鎖を識別できる仕組み

4. 研究成果

レクチンマイクロアレイを行うべく内膜症症例と非内膜症症例の正所性子宮内膜からのタンパクを抽出したが、上記のごとく比較検討するには不均一なサンプルであったため断念した。手術時に採取した子宮内膜症症例とその他の良性疾患症例の子宮内膜より子宮内膜間質細胞および上皮細胞を初代培養した。しかしながら、上記のごとく薬物療法をうけていた症例がほとんどであり、エストラジオール、MPA、インスリンなどの添加をこころみ、ホルモン療法をもちいていた症例からの初代培養細胞の細胞増殖を増加させるべく検討した。エストラジオール添加にて増殖速度はやや改善したものの、継代3における間質細胞の脱落膜化(子宮内膜としての性質を保っている)ことは確認できたが、添加したエストラジオールなどの糖鎖発現に対する影響が否定できず、すでに長期にホルモン療法をうけている症例からの初代培養細胞を用いたレクチンマイクロアレイは中止した。

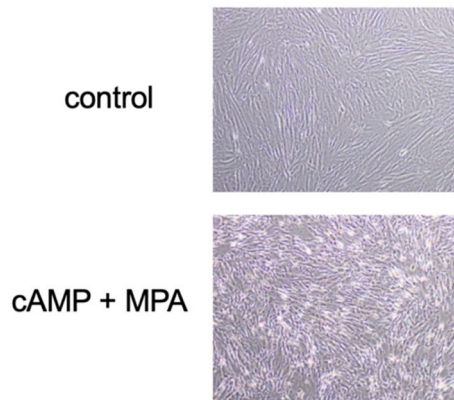


図3 ホルモン療法後初代培養継代3における子宮内膜間質細胞の脱落膜化

過去の手術に伴い保存した、ホルマリン固定パラフィン包埋切片であれば、ホルモン治療を受けていない症例、かつ月経周期の近い症例を選択できることからレーザーマイクロディセクションをもちいて、上皮部分と間質部分をきりわけ、それぞれからタンパクを抽出してレクチンマイクロアレイを行う方針とした。引き続き検討予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	澤田 健二郎 (Sawada Kenjiro) (00452392)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	小玉 美智子 (Kodama Michiko) (70791391)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	松本 有里 (Matsumoto Yuri) (90756488)	大阪大学・医学部附属病院・助教 (14401)	

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