

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09647

研究課題名(和文) 子宮腺筋症の重症度を非侵襲的に予測する質的画像診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a qualitative imaging method to non-invasively predict the severity of adenomyosis

研究代表者

小林 浩 (Kobayashi, Hiroshi)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：40178330

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)：酸化ストレスマーカー(8-OHdG)や抗酸化マーカー(CD44v9、HO-1)を用いて、酸化ストレスの程度、抗酸化活性、炎症、組織修復、線維化を評価し、重症度に寄与するパラメーターを抽出した。鉄濃度は酸化ストレスおよび疾患重症度と相関することが判明したので、鉄濃度と関連する遺伝子群の抽出を行った。その結果、腺筋症の発症および疾患重症度には、組織損傷、炎症、浸潤、血管新生、組織修復、リモデリング、線維症などの複雑なプロセスが関与していることが分かった。したがって、線維化を調節する重要な分子を標的とするいくつかの薬剤は、子宮腺筋症の治療選択肢となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腺筋症は、炎症、浸潤、血管新生、および線維症に関連する一連の分子変化を含む複雑なプロセスを通じて、無症候性から重度の臨床症状の広い範囲を示す。持続的な炎症、脆弱でより透過性の血管形成、ならびに組織損傷およびリモデリングに関連するエストロゲン下流エフェクターの発現は、それぞれ月経困難症、重い月経出血、および不妊症と相関している可能性がある。主要なエストロゲン下流標的(例えば、WNT/ $\beta$ -カテニン、トランスフォーミング成長因子- $\beta$ 、および核因子- $\kappa$ B)は、ハブ遺伝子として機能する可能性がある。腺筋症の発症の根底にある分子メカニズムを検討し、潜在的な非ホルモン療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the degree of oxidative stress, antioxidant activity, inflammation, tissue repair, and fibrosis using oxidative stress markers (8-OHdG) and antioxidant markers (CD44v9, HO-1), and also identified gene sets that contribute to disease severity. Since iron concentration was found to be correlated with oxidative stress and disease severity, we verified gene groups associated with iron concentration. We found that complex processes such as tissue damage, inflammation, invasion, angiogenesis, tissue repair, remodeling, and fibrosis are involved in the development and disease severity of adenomyosis. Therefore, several agents that target key molecules that control fibrosis may be therapeutic options for adenomyosis.

研究分野：子宮内膜症

キーワード：子宮内膜症

## 1. 研究開始当初の背景

我々は子宮内膜症の研究を長年行っており、疾患の進展、重症化には出血に含まれる鉄濃度が重要であることを報告してきた (Yoshimoto C, Shigetomi H, Kobayashi H. Magn Reson Med Sci. 2017)。出血が起こると自動酸化によりオキシヘモグロビンがメトヘモグロビン (Fe<sup>3+</sup>) に変換され、放出される活性酸素種 (O<sub>2</sub>-および・OH) により炎症、DNA 障害、組織破壊が起こる (Iwabuchi T, Yoshimoto C, Shigetomi H, Kobayashi H. Oncol Lett. 2016)。その結果、マクロファージが組織内に集積し、M1 と M2 マクロファージの極性が変化する。M1 マクロファージは炎症性サイトカインを産生し、M2 マクロファージは TGF- $\beta$  など組織修復に関与するサイトカインを産生する。完成した内膜症は M2 マクロファージ優位であり TGF- $\beta$  による組織修復が線維化や疾患重症度と相関する (Yamada Y, Kawahara N, Kobayashi H. Pathol Res Pract. 2019)。したがって、組織内鉄濃度が高い 酸化ストレス 炎症 M2 マクロファージ集積 組織修復 線維化 疾患重症度、という構図が推定される。一方、組織内の酸化・抗酸化バランス (酸化ストレスマーカー [8-OHdG]、抗酸化ストレス [CD44v9, HO-1])、炎症としての M1, M2 マクロファージ数やその比率、線維化マーカー [1 型コラーゲン、TGF- $\beta$ ] は既存の免疫組織染色で評価することができるが、子宮を摘出した後でないと診断できない。

過去の報告から内膜症では鉄濃度と炎症、線維化は相関することがわかっている (Iwabuchi T, Yoshimoto C, Shigetomi H, Kobayashi H. Oncol Lett. 2016) が腺筋症におけるデータはない。しかし腺筋症の線維化は疾患重症度と関連する可能性は臨床的に支持されているので (Leyendecker et al. Arch Gynecol Obstet. 2015) 非侵襲的に腺筋症組織内鉄濃度を測定することができれば、将来の線維化、疾患重症度や予後を推定し、個別化医療に貢献することができるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

子宮腺筋症は月経困難症や異常子宮出血を合併し女性の QOL を悪化させる代表的疾患である。我々は子宮内膜症の研究から、血管外に流出した赤血球はオキシヘモグロビンからメトヘモグロビンに変換され、3 価の鉄 (Fe<sup>3+</sup>) が活性酸素を介し酸化ストレス、炎症を惹起し、M2 マクロファージの集積による組織修復、線維化を助長し疾患重症度に関連することを報告した。また非侵襲的に鉄濃度を測定する手法として MR スペクトロスコピーと近赤外光を用いた経腔光学プローブを開発した。今回、腺筋症の重症度として線維化を早期に予測するため、質的画像診断と組織内鉄濃度、免疫組織学的パラメータ (酸化ストレス、抗酸化能、M1, M2 マクロファージ数・比率、線維化マーカー) との関連を評価し、腺筋症の重症度を早期に、非侵襲的に予測する新たな質的画像評価の有用性を検討するとともに、各種パラメータを評価して腺筋症治療のための標的遺伝子を同定する。

## 3. 研究の方法

術前に MR スペクトロスコピーおよび経腔光学プローブによる筋層内鉄濃度測定【2020~2021 年】両装置の鉄濃度の換算係数はすでに検討済みであり、腺筋症と診断し手術を行う患者を登録 (年間 20 例) し同意を得たのちに、術前に組織内鉄濃度を計測する。

摘出腺筋症の組織内鉄濃度を ex vivo 測定【2020~2021 年】上記症例に対して摘出組織内の総鉄、ヘム鉄、自由鉄濃度を測定する。この研究は内膜症で 5 年前から実施している。

摘出切片の免疫染色により酸化ストレス、抗酸化、炎症、組織修復、線維化の程度を評価【2020~2021 年】酸化ストレスマーカー (8-OHdG)、抗酸化マーカー (CD44v9, HO-1)、炎症としての M1, M2 マクロファージ数やその比率、線維化マーカー (1 型コラーゲン、TGF- $\beta$  とその下流シグナル) を免疫組織染色で評価する。

疾患重症度 (月経困難症、過多月経、貧血、不妊症、産科合併症の既往等) との関連を評価【2022 年】質的画像診断、各免疫染色マーカーと疾患重症度 (月経困難症、異常子宮出血、不妊症、周産期合併症、治療効果や副作用など) を多変量解析し、重症度に最も寄与する因子を抽出する。その後、質的画像診断による鉄濃度がどの程度疾患重症度を予知できるか後方視的に評価する。

## 4. 研究成果

腺筋症の鉄濃度および組織内染色範囲の程度は、内膜症と同様に疾患の重症度と相関することがわかった。

さらに、腺筋症が発症するためには、図 1 の A から D までのステップが必要であり、今回の研究は B, C および D ステップに関する責任遺伝子の決定を行った。

B ステップ：子宮内膜と子宮筋層の界面で起こる持続的な組織損傷

子宮内膜と子宮筋層の境界面（接合部）で発生する組織損傷プロセスで、機械的、外傷性、または医原性損傷に続発するか、または自然発生的に発生する。図 1B には組織損傷に関連する主要な分子を示す。子宮内膜細胞が子宮筋層に侵入するには、接合領域の破壊が必要である。組織損傷により、腺筋細胞は低酸素や酸化ストレスなどの好ましくない微小環境に適応して応答することができる。さらに、局所的な創傷部位における低酸素と酸化ストレスは、組織損傷の加速、炎症過程、エネルギー代謝障害、侵害受容性疼痛を引き起こし、低酸素誘導因子の過剰発現による低酸素関連分子や神経炎症因子の発現の上方制御を引き起こす。HIF-1、HIF-2、血管内皮増殖因子（VEGF）組織因子（TF）、オキシトシン受容体（OTR）、神経成長因子（NGF）、プロスタグランジン E2（PGE2）、各種インターロイキン、インターロイキン-1（IL-1）などの過剰発現が観察された。PG と OTR は子宮平滑筋の収縮と蠕動を誘発し、接合部に反復的な微小損傷を引き起こすと考えられる。シクロオキシゲナーゼ 2（COX-2）による PG の産生は、腫瘍壊死因子アルファ（TNF- $\alpha$ ）、IL-1、および IL-6 の過剰発現を伴う炎症の悪化を引き起こす。炎症は、組織損傷によって引き起こされる防御反応である。外因性凝固経路のイニシエーターである凝固促進剤 TF は、血管内皮細胞の損傷に迅速に反応する凝固活性化マーカーである。腺筋症病変は、主に HIF および炎症性サイトカインの活性化によって開始される低酸素状態に適応するメカニズムを獲得すると考えられる。組織損傷に関連する重要な分子には、低酸素症、神経炎症、および PG に関連する分子が含まれる。腺筋細胞は、低酸素症、酸化ストレス、組織損傷によって引き起こされる炎症などの好ましくない微小環境に対処するために進化したと考えられる。

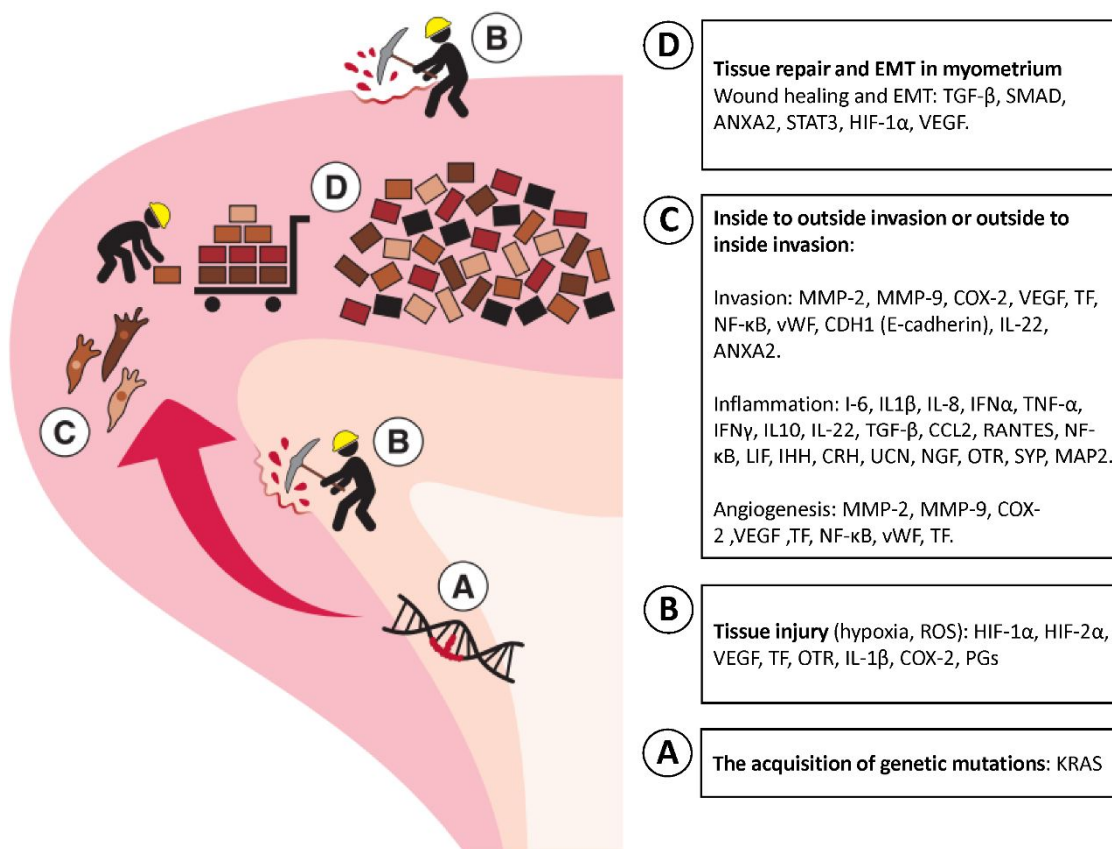


図 1

C ステップ: 内側から外側への侵入(子宮内膜側から子宮壁へ)または外側から内側への侵入(漿膜側から子宮壁へ)

次のステップは、子宮内膜細胞の子宮筋層への侵入である(図 1C)。組織損傷後に子宮内膜細胞が子宮筋層結合部または子宮漿膜に侵入する能力は、主に持続性炎症および血管新生に関連する分子の発現変化に依存します。これには図 1C に示した遺伝子変化を伴うことがわかった。

D ステップ: 子宮筋層における組織の修復と再構築

最終ステップ(図 1D)では、子宮筋層に侵入した子宮内膜細胞が隣接する平滑筋細胞の過形成と肥大を引き起こす。腺筋症の進行には、慢性損傷、筋線維芽細胞の持続的な活性化、創傷治癒反応、および組織修復が含まれる。間葉細胞と筋線維芽細胞は、組織損傷に応答した上皮間葉移行(EMT)および筋線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化転換(FMT)を介して、創傷治癒と線維化に関与している。EMT/FMT 関連の分子標的には、細胞の運動性、浸潤、血管新生、抗ア

ポトース、および線維形成を促進する遺伝子が含まれる。重要な線維形成促進メディエーターである TGF- $\beta$  は、線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化と形質転換を促進する。いくつかの前臨床研究では、マウス腺筋症モデルを使用したことが報告されている。腺筋症発症中の EMT は、 $\beta$ -カテニンの発現と活性化を促進することにより TGF- $\beta$  によって誘導される。活性化血小板由来 TGF- $\beta$  が、線維形成遺伝子発現を引き起こす SMAD シグナル伝達経路を活性化することにより、線維症の発症に重要な役割を果たすことが考えられる。エストロゲンは、TGF- $\beta$  依存性の ANXA2 シグナル伝達を活性化することにより EMT を誘導する。エストロゲンと TGF- $\beta$  は、それぞれ ANXA2/HIF-1 $\alpha$ /VEGF 経路と ANXA2/STAT3 経路を活性化することにより、ECM リモデリングと EMT を誘導する。ANXA2 は、過剰な ECM タンパク質分解と組織リモデリングに關与する重要なメディエーターである。したがって、エストロゲン、TGF- $\beta$ 、および WNT/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達経路間の機能的クロストークは、EMT の主要な推進要因であり、線維症の発症に重要な役割を果たしていると考えられる。

子宮内膜細胞と間質細胞に加えて、マクロファージは腺筋症の微小環境の主要な構成要素で

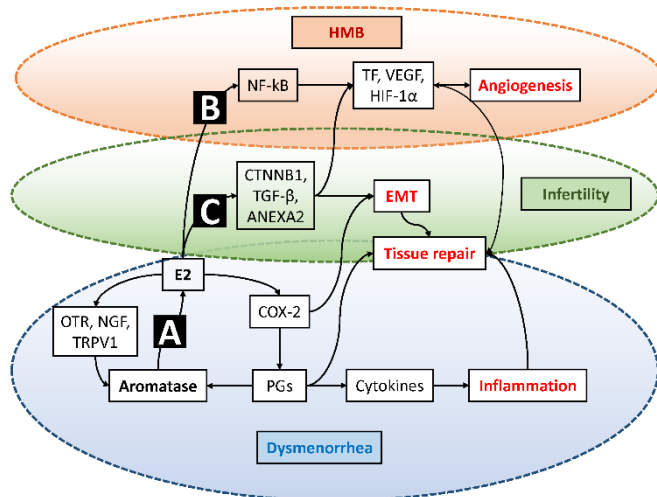


図 2

あり、EMT 中の ECM の分解、沈着、およびリモデリングに寄与するため、疾患の進行に不可欠である。したがって、マクロファージと子宮内膜細胞間のクロストークは、腺筋症における EMT に必要である。長年にわたる EMT および FMT の活性化は、腺筋症病変の線維化を引き起こす可能性がある。これらに基づいて、子宮筋層の組織修復とリモデリングに關連する重要な分子には、WNT/ $\beta$ -カテニン、TGF- $\beta$ 、ANXA2、およびそれらの下流シグナル SMAD および STAT3 が含まれる。

図 2 には A, B, C ステップに關連した遺伝子群と症状との相互関係をまとめたものである。

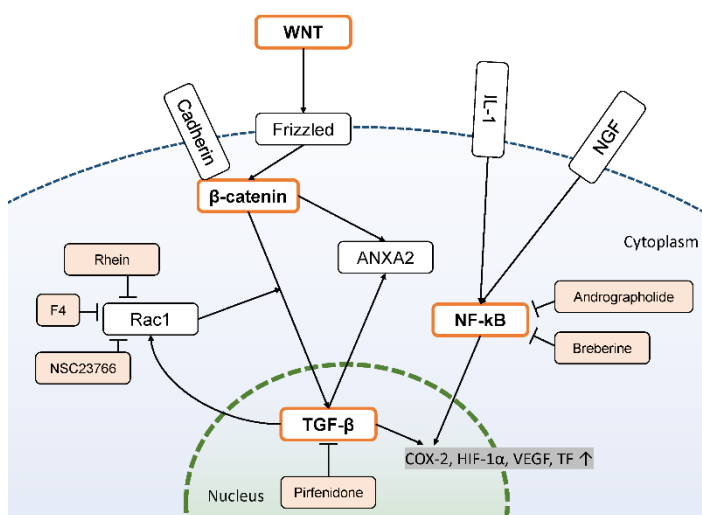


図 3

図 3 には D ステップに關連した線維化に影響を及ぼす遺伝子群の相互関係をまとめた。

要約すると、腺筋症の発症には、組織損傷、炎症、浸潤、血管新生、組織修復、リモデリング、線維症などの複雑なプロセスが關与する。

現在、近赤外光を用いた経膈プローブによる鉄濃度測定結果と遺伝子発現変化を比較しているところである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Imanaka S, Shigetomi H, Kawahara N, Kobayashi H.	4. 巻 20
2. 論文標題 Clinicopathological characteristics and imaging findings to identify adenomyosis-related symptoms.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reprod Med Biol.	6. 最初と最後の頁 435-443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12409.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Hiroshi, Matsubara Sho, Imanaka Shogo	4. 巻 1
2. 論文標題 Relationship between magnetic resonance imaging based classification of adenomyosis and disease severity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology 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） 10.1111/jog.14803	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 Shogo, Yamada Yuki, Kawahara Naoki, Kobayashi Hiroshi	4. 巻 1
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 -
1. 著者名 Imanaka Shogo, Maruyama Sachiyo, Kimura Mai, Nagayasu Mika, Kawahara Naoki, Kobayashi Hiroshi	4. 巻 1
2. 論文標題 Relationship between Cyst Fluid Concentrations of Iron and Severity of Dysmenorrhea in Patients with Ovarian Endometrioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gynecologic and Obstetric Investigation	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000514972	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 Kobayashi Hiroshi, Kimura Mai, Maruyama Sachiyo, Nagayasu Mika, Imanaka Shogo	4. 巻 258
2. 論文標題 Revisiting estrogen-dependent signaling pathways in endometriosis: Potential targets for non-hormonal therapeutics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology	6. 最初と最後の頁 103 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejogrb.2020.12.044	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 Nagayasu Mika, Imanaka Shogo, Kimura Mai, Maruyama Sachiyo, Kobayashi Hiroshi	4. 巻 1
2. 論文標題 Nonhormonal Treatment for Endometriosis Focusing on Redox Imbalance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gynecologic and Obstetric Investigation	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000512628	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 Kawahara Naoki, Mizutani Ayano, Matsubara Sho, Takeda Yoshinori, Kobayashi Hiroshi	4. 巻 20
2. 論文標題 GSK-3 mediates the effects of HNF-1 overexpression in ovarian clear cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2020.9250	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 Maruyama Sachiyo, Imanaka Shogo, Nagayasu Mika, Kimura Mai, Kobayashi Hiroshi	4. 巻 253
2. 論文標題 Relationship between adenomyosis and endometriosis; Different phenotypes of a single disease?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology	6. 最初と最後の頁 191 ~ 197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejogrb.2020.08.019	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 Kobayashi Hiroshi、Matsubara Sho	4. 巻 85
2. 論文標題 A Classification Proposal for Adenomyosis Based on Magnetic Resonance Imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gynecologic and Obstetric Investigation	6. 最初と最後の頁 118 ~ 126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000505690	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小林 浩
2. 発表標題 子宮内膜症・子宮腺筋症の発生病理と分類に基づいた治療のコツ
3. 学会等名 奈良県婦人科疾患研究会
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	吉元 千陽 (Yoshimoto Chiharu) (00526725)	奈良県立医科大学・医学部・研究員  (24601)	
研究分担者	山田 有紀 (Yamada Yuki) (20588537)	奈良県立医科大学・医学部・助教  (24601)	
研究分担者	松原 翔 (Matsubara Sho) (20825236)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員  (24601)	

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
---------	---------