

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18156

研究課題名（和文）子宮腺筋症に対する選択的プロゲステロン受容体調節薬の有効性の検討

研究課題名（英文）Effect of selective progesterone receptor modulator for the proliferation and apoptosis in adenomyosis

研究代表者

齊藤 佳子 (Saito, Yoshiko)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20850754

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：子宮腺筋症初代培養細胞に対する、選択的プロゲステロン受容体調節薬Ulipristalの増殖抑制効果を明らかにした。次に重症免疫不全マウス腎移植法を用いた、患者由来子宮腺筋症移植動物実験モデルの作製をめざしたが、実験遂行中にUlipristalが入手困難となり、モデルの作製には至らなかった。びまん性子宮平滑筋腫症の子宮筋腫・子宮筋組織におけるフマル酸ヒドラターゼをコードするFH遺伝子のヘテロ接合性病的変異を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮腺筋症細胞に対する選択的プロゲステロン受容体調節薬Ulipristalの増殖抑制効果が明らかになったことで、子宮腺筋症に対する新規治療薬としてUlipristalが候補となると考えられたが、海外でUlipristalの重篤な副作用報告が相次ぎ、臨床応用困難な状況となった。一方、びまん性子宮平滑筋腫症におけるFH遺伝子のヘテロ接合性病的変異がみられることを明らかにすることができた。この結果は、びまん性子宮平滑筋腫症の病態解明に寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We clarified the inhibitory effect of ulipristal, a selective progesterone receptor modulator, on the proliferation of primary cultured adenomyosis cells in vitro. Next, we aimed to create a patient-derived adenomyosis xenograft model using a non-obese diabetes/severe combined immunodeficient mouse. However, during the course of the experiment, ulipristal became difficult to obtain, and we were unable to complete the model. Instead, we identified a heterozygous pathogenic mutation in the FH gene, which encodes fumarate hydratase, in the uterine fibroids and myometrial tissue obtained from a woman with diffuse uterine leiomyomatosis.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：子宮腺筋症 選択的プロゲステロン調節薬 子宮筋腫 フマル酸ヒドラターゼ

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 子宮腺筋症は過多月経、月経困難の原因となるホルモン依存性疾患でわが国では第4世代プロゲスチンであるジェノゲストが保険適用のある唯一の薬剤である。しかしジェノゲストは排卵を抑制するため、妊娠をめざす場合は使用することができない。また、子宮腺筋症に対する腺筋症切除手術には保険適用はなく、挙児希望のある子宮腺筋症を有する女性に対する治療法は確立されていない。

(2) 子宮腺筋症は、しばしば腺筋症と同じホルモン依存性疾患である子宮筋腫を合併する。選択的プロゲステロン受容体調節薬 (Selective progesterone receptor modulator, SPRM) である Ulipristal は、子宮筋腫による過多月経に対して有効性が示されており、欧州では子宮筋腫の薬物療法の第一選択薬となっている¹⁾。Ulipristal は子宮筋腫に直接作用するため長期間投与しても骨密度低下などの下垂体抑制による副作用は起こらない。また Ulipristal の投与を中止すると速やかに排卵が再開し、挙児希望のある子宮筋腫患者では Ulipristal 投与中止後すぐの妊娠が可能である。

(3) これまで子宮腺筋症に対する Ulipristal の有効性を示した報告は、ほとんどない。また子宮腺筋症への直接作用に関する基礎的な実験データも報告されておらず、子宮腺筋症に対する Ulipristal の効果を in vitro, in vivo で明らかにすべきと考えた。

2. 研究の目的

本研究では子宮腺筋症に対する Ulipristal の増殖抑制効果を in vitro, in vivo で明らかにすることを目的とした。具体的には、(1) 子宮腺筋症初代培養細胞における Ulipristal の増殖抑制効果を明らかにする、(2) 子宮腺筋症初代培養細胞から患者由来マウス xenograft モデルを作製する、(3) 子宮腺筋症 xenograft モデルを使って Ulipristal の増殖抑制効果を明らかにする、ことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 子宮腺筋症初代培養細胞を用いた、Ulipristal の増殖抑制効果実験

子宮腺筋症にて子宮摘出手術を受けた患者から文書にて同意を得て、子宮腺筋症組織を採取し、子宮筋腫平滑筋細胞の初代培養方法に準じて子宮腺筋症細胞の初代培養を行った。次に、この細胞に 17β エストラジオール添加細胞培養液中に、Ulipristal、ジェノゲスト、プロゲステロンを添加し、細胞増殖の変化をみた。細胞増殖抑制効果は Cell counting kit-8 (CCK-8, Doujinsya) を用いて検討した。

(2) 患者由来子宮腺筋症 xenograft モデルの作製

子宮腺筋症の手術検体から腺筋症組織を採取し、初代培養を行い得られた腺筋症細胞と I 型コラーゲンを混ぜて腺筋症 xenograft を作製した。1 個の xenograft には 5×10^6 個の腺筋症細胞を含めた。研究者の所属研究室で作製方法を確立した患者由来子宮筋腫 xenograft モデルと同様、重症免疫不全マウスとして Non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) マウスを使用した²⁾。麻酔下に 6 週齢雌の NOD/SCID マウスの両側卵巣を摘除し、腎被膜下に患者由来腺筋症 xenograft 小片を移植した。移植手術終了時にエストロゲン (E) とプロゲステロン (P) のデポー剤を皮下注射し、以降毎週 E, P を皮下注射した。また、薬剤投与群として xenograft 移植 2 週間後から Ulipristal 10-7M、ジェノゲスト 10-7M を毎日 10 日間マウスに皮下注射した。4 週間後にマウスを解剖し、腎被膜下に移植した xenograft の発育を計測した。

(3) 研究遂行中に海外にて子宮筋腫に対して Ulipristal を投与した患者に、肝移植が必要な重篤な肝障害が生じたとの報告が複数なされた。そのため、Ulipristal の国内での入手が困難な状況となり研究開始当初予定していた研究の遂行が困難となった。

(4) びまん性子宮平滑筋腫症患者の子宮筋腫における遺伝学的解析

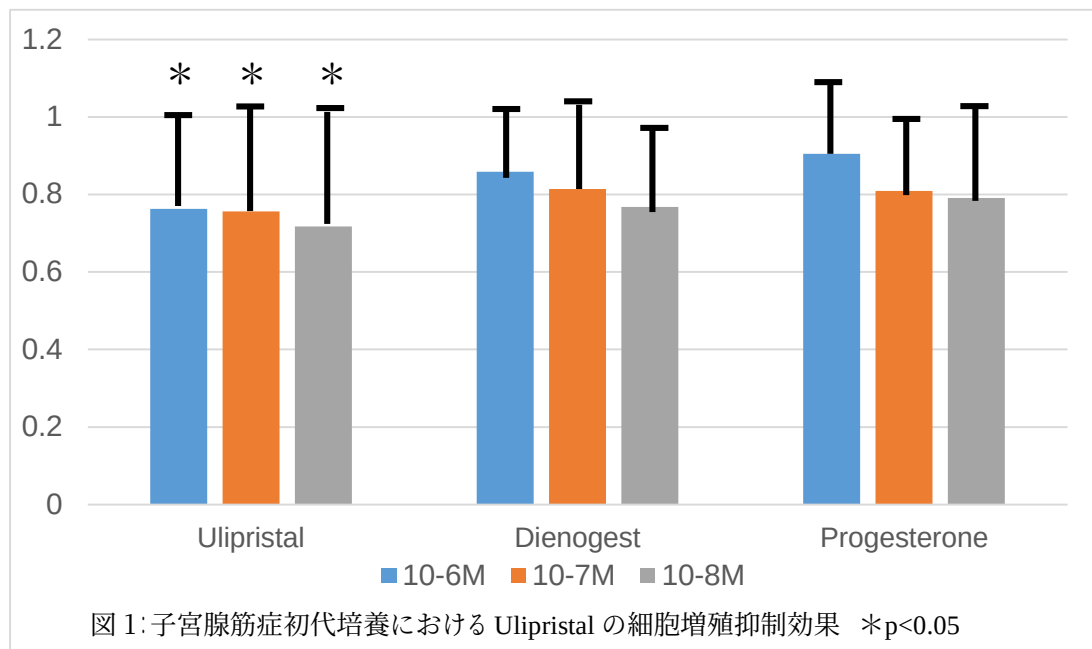
そこで子宮腺筋症と同じホルモン依存性疾患で過多月経、難治性不妊の原因となる、びまん性子宮平滑筋腫症 (Diffuse Uterine Leiomyomatosis, DUL) の病態解析を行うことにした。われわれはエネルギー合成経路である TCA 回路上の酵素であるフマル酸ヒドラターゼをコードする FH 遺伝子に着目した。FH の生殖細胞系列変異を有する女性は FH 腫瘍易罹患性症候群と呼ばれ、多発性子宮筋腫、皮膚の平滑筋腫、腎細胞がんを発症する。DUL のため子宮摘出手術を施行した患

者から文書にて同意を得て複数個の子宮筋腫と子宮筋組織を採取し、フマル酸ヒドラターゼをコードする FH 遺伝子の遺伝学的解析を行った。文書により同意を得て筋腫 9 個と正常筋層から DNA, RNA を抽出し、Sanger 法により FH の全エクソン、筋腫のドライバー遺伝子変異である MED12 のエクソン 2 を解析した。検出した FH のバリエントは Polyphen2 解析により、病原性を推定した。

4. 研究成果

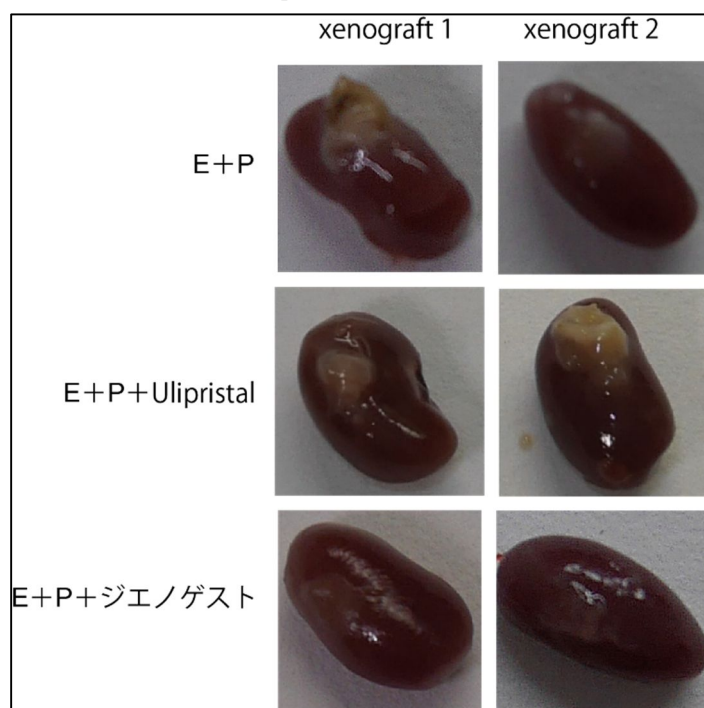
(1) 子宮腺筋症初代培養細胞における Ulipristal の増殖抑制効果

Ulipristal, ジエノゲスト, プロゲステロンを子宮腺筋症初代培養細胞に添加するといずれも、細胞増殖抑制効果を示した。このうち、Ulipristal の腺筋症細胞増殖抑制効果は 10-6M, 10-7M, 10-8M のいずれにおいても統計学的な有意差を示した (図 1)。



(2) 患者由来子宮腺筋症 xenograft モデルの作製と Ulipristal の効果

患者由来腺筋症 xenograft は腎被膜下に生着していたものの、子宮筋腫 xenograft と異なり、E, P を投与しても増大がみられなかった (n=6)。また、この xenograft モデルに Ulipristal とジエノゲストを投与した薬剤投与群を薬剤非投与群と比較しても xenograft の大きさに変化は認められなかった (n=2, 図 2)。



(図 2) 子宮腺筋症の患者由来 xenograft

(3) びまん性子宮平滑筋腫症患者の子宮筋腫における遺伝学的解析

びまん性子宮平滑筋腫症による過多月経のため、子宮全摘を行った45歳女性より文書にて同意を得て、9個の子宮筋腫と1個の子宮筋組織を採取し、FH遺伝子の遺伝学的解析を行った。その結果、遺伝学的解析を行ったすべての組織において、FHの活性ドメインに261番目のアルギニンがストップコドンになるヘテロ接合性ナンセンス変異が筋腫と子宮筋の両方で認められた(表1)。他の変異として、3つの筋腫で病的変異と判断できるヘテロ接合性変異、1個の筋腫で261番目のアルギニンのホモ接合性変異が認められた。またいずれの筋腫、子宮筋もMED12変異は認められなかった。

Sample	size of leiomyoma (cm)	Status of FH_R261*	Other mutation	Polypen2 analysis	Full length cDNA expression	MED12 mutation
Leio 1	4.0	Hetero	M195L	Benign	+	-
Leio 2	3.0	Hetero	-	-	+	-
Leio 3	0.3	Hetero	Exon 9 splicing acceptor site	-	N.A.	-
Leio 4	1.0	Hetero	C377W	Probably Damaging	+	-
Leio 5	2.0	Hetero	-	-	+	-
Leio 6	1.0	Variant homo	-	-	-	-
Leio 7	1.0	Hetero	Exon 9 splicing acceptor site	-	-	-
Leio 8	1.0	Hetero	-	-	+	-
Leio 9	1.5	Hetero	S366S	Benign	+	-
Myo	-	Hetero	-	-	+	-

(表1) びまん性子宮平滑筋腫症の子宮筋腫・子宮筋組織のFH遺伝学的解析

以上より、選択的プロゲステロン受容体調節薬であるUlipristalは子宮腺筋症初代培養細胞の増殖を抑制する可能性が示唆された。また、びまん性子宮平滑筋腫症の筋腫、子宮筋組織でFHのヘテロ接合性病的変異がみられることが明らかとなった。

<引用文献>

- 1) Donnez J, Tararchuk TF, Bouchard P, et.al. Ulipristal acetate versus placebo for fibroid treatment before surgery. New Engl J Med 2012;366(5):409-20.
- 2) Wang G, Ishikawa H, Sone K, et al. Nonobese diabetic/severe combined immunodeficient murine xenograft model for human uterine leiomyoma. Fertil Steril 2014;101(5):1485-92.

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 1件）

1. 著者名 Ishikawa Hiroshi、Kobayashi Tatsuya、Kaneko Meika、Saito Yoshiko、Shozu Makio、Koga Kaori	4. 巻 71
2. 論文標題 RISING STARS: Role of MED12 mutation in the pathogenesis of uterine fibroids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Endocrinology	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） 10.1530/JME-23-0039	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 —

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齊藤佳子、小林達也、片山恵里、奥谷理恵、金子明夏、佐藤明日香、中村名律子、石井久美子、宇津野恵美、石川博士
2. 発表標題 フマル酸ヒドラターゼ遺伝子の未報告バリエントを認めた多発性子宮筋腫の1例
3. 学会等名 第67回 日本生殖医学会 学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齊藤佳子、石川博士、小林達也、中田恵美里、宇津野恵美、甲賀かをり
2. 発表標題 FH 腫瘍易罹患性症候群患者の子宮筋腫における FH 遺伝子の体細胞変異解析
3. 学会等名 第23回 日本抗加齢医学学会総会 学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 後藤優希、石川博士、小林達也、石井久美子、齊藤佳子、甲賀かをり
2. 発表標題 拳児希望を有する3例のびまん性子宮平滑筋腫症罹患女性に対する治療経験
3. 学会等名 第68回 日本生殖医学会 学術講演会
4. 発表年 2023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
連 携 研 究 者	石川 博士	千葉大学・大学院医学研究院・講師	
	(Ishikawa Hiroshi)		
	(70553973)	(12501)	

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