

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09495

研究課題名(和文)MED12変異(+)と(-)子宮筋腫の異種移植モデルを用いた治療効果の検討

研究課題名(英文) Investigation of the pathogenesis of uterine leiomyomas grown in a hormone-independent manner using single-cell analysis

研究代表者

佐藤 俊 (Sato, Shun)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10534604

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)：子宮筋腫には組織構成の異なるMED12(+)とMED12(-)のサブタイプがあり、これらが報告されている選択的プロゲステロン受容体調整剤UPAの効果の個人差に關与する可能性がある。そこで、本研究では異種移植モデルを用いてサブタイプ毎におけるUPA効果を検討した。UPA投与により、MED12(+)では全検体で腫瘍が縮小した一方、MED12(-)では7割の検体は同様に縮小したが、残り3割の検体はE・P感受性が低く、UPAによる縮小効果がみられないという差異があった。また、UPA投与による腫瘍の縮小効果はE・P消退より高く、UPAは本来有するPGR機能の阻害だけではない作用機序を持つことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮筋腫の根治には子宮摘出等の外科的手術が必要であり、子宮温存に有効な治療薬が求められている。有効な薬剤の1つと期待されるUPAは、実用化されている欧米では効果に個人差が報告されており、この効果の個人差に患者が有する筋腫サブタイプの違いが關与する可能性がある。本研究により、UPAはMED12(+)により有効な可能性が示され、また、トランスクリプトーム・パスウェイ解析からサブタイプ間で共通してあるいは特異的に影響を受けるシグナル経路も判明した。これらの成果は、学術的に新規なだけでなく、患者毎に子宮温存を考慮した適切な治療を提供する基礎となるため、少子化問題を抱える本邦にとって社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：There are two subtypes of uterine leiomyomas with different histological and cellular composition, MED12(+) and MED12(-), which may contribute to the individual differences in the efficacies of UPA, a selective progesterone receptor modulator. In this study, we investigated the effect of UPA in each subtype using a xenograft model, and found that UPA administration resulted in tumor reduction of xenografts in all MED12(+) specimens, while in MED12(-), 70% of specimens showed similar reduction, but the remaining 30% of specimens had low E and P sensitivity and were not affected any effect of UPA on tumor shrinkage. In addition, the effect of tumor reduction in xenografts by UPA administration was higher than that by withdrawal of E and P, suggesting that UPA has a mechanism of action other than the intrinsic function in inhibition of PGR.

研究分野：ライフサイエンス / 産婦人科学 ・ ライフサイエンス / 分子生物学

キーワード：子宮筋腫 MED12変異 異種移植モデル 選択的プロゲステロン受容体調整剤

### 1. 研究開始当初の背景

子宮筋腫は、重度の月経痛、貧血、不妊症や流産の原因になり女性の QOL を損なううえ、根治には子宮摘出等が必要なため、少子化問題を抱える本邦では看過できない疾患である。子宮温存に有効な薬剤療法には GnRH アナログの投与があるが、この薬剤は血中エストロゲン(E)濃度の低下による骨粗鬆症等の副作用を伴うため、投与期間が限定される。そのため、副作用の少ない有効な薬剤の開発が望まれており、プロゲステロン(P)受容体(PGR)に作用し、血中 E 濃度に影響しない、選択的プロゲステロン受容体調整剤 (SPRM)であるウリプリスタル酢酸エステル(UPA)が注目されている。

近年、子宮筋腫では約 70%の検体で検出されるドライバー変異として Mediator complex subunit 12(MED12)遺伝子の体細胞変異が見出され、この変異の有無により、子宮筋腫は2種類のサブタイプに分類される。最近、これらのサブタイプ間では組織構成や性質が異なることが報告され、実際、我々の解析結果においても、MED12 変異を持つ子宮筋腫(MED12(+))筋腫は膠原繊維が豊富で、約 70%の平滑筋細胞(SMC)と約 30%の線維芽細胞(FB)で構成されるのに対し、MED12 変異を持たない子宮筋腫(MED12(-))筋腫は膠原繊維が少なく、約 90%の SMC と約 10%の FB で構成されていた。また、トランスクリプトーム・パスウェイ解析から MED12(+))筋腫においては細胞外基質産生関連のシグナル経路が活性化されており、一方 MED12(-))筋腫では血管新生関連のシグナル経路が活性化されていることが判明した(佐藤;平成 30-令和 2 年度「基盤研究(C)」, Sci. Rep. 2022)。SMC と FB は女性ホルモンの感受性が異なるので、これらの構成比が異なるサブタイプ間では女性ホルモンを介して作用する UPA の効果が異なる可能性がある。UPA が実用化されている欧州における第 3 相試験では、子宮筋腫の縮小率は患者によって 12~42%であり、UPA が有効な患者とそうでない患者がいることが判明している。我々は、この UPA 効果の個人差に、患者が有する筋腫検体のサブタイプの違いが一因として関与する可能性を考えている。また、UPA は SPRM であるため、その作用は PGR を高発現する SMC が主な対象と予想されるが、FB への影響についてはこれまで検討されていない。そこで本研究では、子宮筋腫検体においてサブタイプ毎に UPA の効果、および SMC と FB それぞれに対する UPA の作用について検討する。これらを明らかにすることは、UPA の子宮筋腫治療における有用性を裏付け、さらに、UPA をより有効に処方するための基礎的知見になると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、子宮筋腫サブタイプ間における UPA の効果の差異を検討するため、(1) MED12(+))筋腫および MED12(-))筋腫の子宮筋腫細胞をマウスに移植する異種移植モデルを用いて UPA の効果・作用機序を解明する。また、SMC および FB における UPA の作用を明らかにするため、(2) SMC と FB を分離培養して、それぞれの細胞における UPA の効果・作用機序を調べる。

### 3. 研究の方法

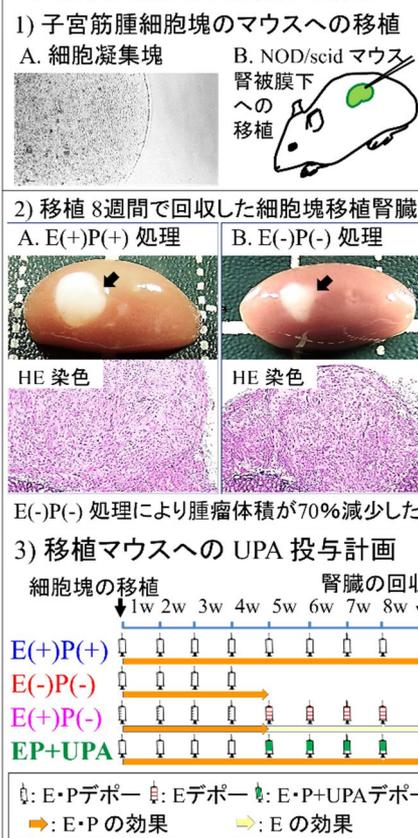
#### (1) 異種移植モデルによる MED12(+))筋腫・MED12(-))筋腫における UPA の作用機序の解析

性ホルモン感受性の研究において、最も有効な実験系である異種移植モデルを用いて子宮筋腫における UPA の作用機序の解明を試みる(図 1)。各筋腫サブタイプの初代培養細胞を培養 3 日目で細胞塊にし、卵巣除去した重度免疫不全マウスの腎被膜下に移植する(図 1-1)。移植 4 週目まで週 1 回 E・P デポを投与し腫瘍を増大させる。UPA 効果の検討のため、移植マウスを次の 4 群に分けて維持する:4 週目以降も E・P デポを継続投与する E(+))P(+))群、E・P の投与を止める E(-))P(-))群、P 消退の影響をみるため P デポ投与を止める E(+))P(-))群、E・P と UPA デポを同時に投与する EP+UPA 群(図 1-3)。移植後 8 週間で移植腎臓を回収し、腫瘍サイズ、膠原繊維および SMC の構成比率を調べ、各群間で比較する。さらに、それぞれの腫瘍から total RNA を抽出し、トランスクリプトーム・パスウェイ解析を行い、UPA 投与により影響を受けたシグナル経路を特定することで、UPA の作用機序を推察する。

#### (2) 分離培養した SMC および FB それぞれにおける UPA の作用機序の解析

子宮筋腫細胞の培養には性ホルモン感受性が維持されないという問題があったが、我々はまず、予備実験により初代培養 7 日目までは、E・P 受容体が維持されることを確認した。培養 1 日目

図1. 異種移植モデルを用いた子宮筋腫における UPA の作用機序の解析



の子宮筋腫細胞から抗 FB 抗体を用いて SMC と FB を分離し、それぞれの細胞を E・P を添加培養する (E(+)/P(+))、E・P を添加しない (E(-)/P(-))、P 消退の影響をみる (E(+)/P(-))、E・P と UPA を添加する (EP+UPA) の 4 つの処理群に分け 6 日間培養する。各細胞の各処理群について、細胞増殖および膠原繊維の比率を比較する。さらに、各処理をした細胞についてトランスクリプトーム・パスウェイ解析を行い、UPA により影響を受けたシグナル経路を特定する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 異種移植モデルによる MED12(+)/筋腫・MED12(-)筋腫における UPA の作用機序の解析

移植後 8 週で回収した移植腎臓について、組織学的に評価したところ、MED12(+)/筋腫の全ての検体と MED12(-)筋腫の約 70% の検体では、E(+)/P(+), E(+)/P(-), E(-)/P(-) および EP+UPA の順で腫瘍のサイズと平滑筋細胞の比率は減少し、膠原線維比は増加した (図 2)。一方、MED12(-)筋腫の残りの 30% の検体では、いずれの群でも腫瘍体積等にほぼ差がなく、UPA の効果はみられなかった。次に UPA 効果をサブタイプ毎に統計的に評価した。本研究では、女性ホルモン感受性を有する筋腫における、UPA の効果を検討したかったため、女性ホルモン感受性がみられない検体は解析から排除した。腫瘍サイズは E(+)/P(+ )と比較した場合、両サブタイプに共通し、E(-)/P(-), E(+)/P(-) および EP+UPA で有意に減少した (図 3)。腫瘍の高さにおいても同様の傾向がみられた。また、EP+UPA においては E(+)/P(+ )と比較し、両サブタイプとも平滑筋細胞比が有意に減少し、膠原線維比が有意に増加した (図 3)。UPA が有効な検体についてトランスクリプトーム・パスウェイ解析を行ったところ、UPA 投与により両サブタイプに共通して免疫系のシグナル経路が活性化され、細胞増殖および細胞外器質の産生に関わるシグナル経路が不活性化される傾向が得られた (図 4)。以上の結果から、UPA は SPRM だが、筋腫の縮小効果は E・P 消退より高く、PGR 機能の阻害だけではない作用機序を持つことが示唆された。MED12(-)筋腫には E・P の感受性が低く、UPA 効果がみられない検体が 30% 程度存在した。UPA 投与により膠原線維比は上昇したが、その原因は膠原線維の産生による増加ではなく、細胞成分の減少により結果的に比率が上昇したと考えられる。現在、以上の結果について論文投稿の準備を進めている。

(2) 分離培養した SMC および FB それぞれにおける UPA の作用機序の解析

子宮筋腫の初代培養については、当初、FB 抗体を用いることで SMC と FB を分離する予定であったが、有効な表面抗原がないため、それらの分離は困難だった。また、初代培養細胞はサブタイプの別にかかわらず SMC の比率が 80 以上を占めることが分かったため、この初代培養を SMC として扱い、解析も SMC のみに絞るように変更した。まず平面培養を試したが、それぞれの受容体が維持されていても E・P 感受性がないという問題は解消されなかった。そこで、*in vivo* をより反映するスフェロイドによる三次元培養を検討したところ、E・P に依存してサイズを増大 (あるいは維持) し、UPA により縮小する培養系が樹立された (図 5)。しかしながら本研究期間中に樹立以降の解析が間に合わなかったため、こちらの研究は期間終了後も継続した後、上記 (1) とは別個にまとめて投稿する。

<引用文献>

Different DNA methylome, transcriptome and histological features in uterine fibroids with and without MED12 mutations. Ryo Maekawa, Shun Sato, Tetsuro Tamehisa, Takahiro Sakai, Takuya Kajimura, Kotaro Sueoka, Norihiro Sugino. Scientific reports 2022;12:8912-8912

図2. 回収した移植腎臓の組織学的解析結果の一例

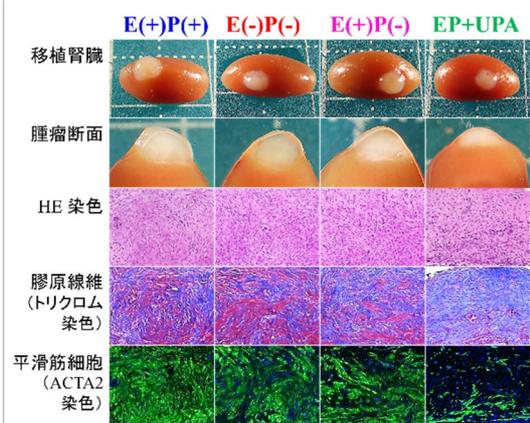


図3. 筋腫サブタイプ毎における組織学的解析結果

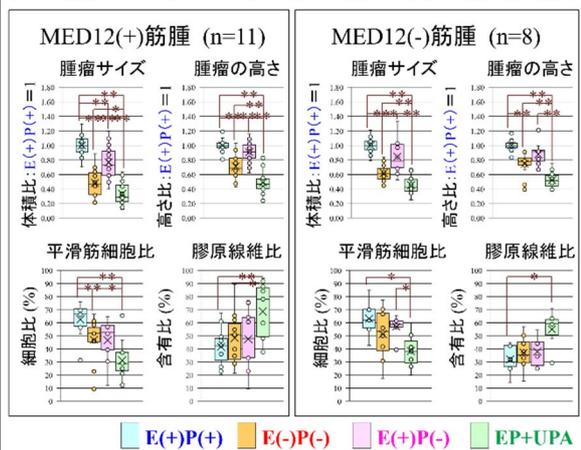
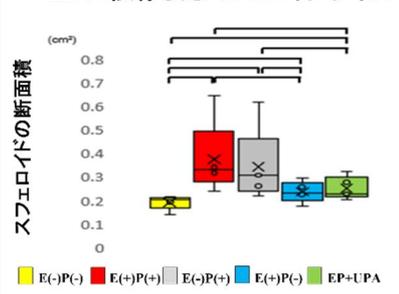


図4. UPA投与により活性化・不活性化されたパスウェイ

	MED12(+)/筋腫		MED12(-)筋腫	
#	Positive 282 pw	Negative 77 pw	Positive 94 pw	Negative 188 pw
1	Phagosome Formation	Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)	Molecular Mechanisms of Cancer	Extracellular matrix organization
2	Molecular Mechanisms of Cancer	Actin Cytoskeleton Signaling	Dilated Cardiomyopathy Signaling Pathway	Integrin cell surface interactions
3	S100 Family Signaling Pathway	ILK Signaling	Leukocyte Extravasation Signaling	Serotonin Receptor Signaling
4	Breast Cancer Regulation by Stathmin1	Response to elevated platelet cytosolic Ca <sup>2+</sup>	Semaphorin Neuronal Repulsive Signaling Pathway	Phagosome Formation
5	G-Protein Coupled Receptor Signaling	Integrin Signaling	Class A/1 (Rhodopsin-like receptors)	Pulmonary Fibrosis Idiopathic Signaling Pathway

図5. 樹立した3次元培養系における EP に依存したスフェロイドサイズ



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Tamehisa Tetsuro, Sato Shun, Sakai Takahiro, Maekawa Ryo, Tanabe Masahiro, Ito Katsuyoshi, Sugino Norihiro	4. 巻 143
2. 論文標題 Establishment of Noninvasive Prediction Models for the Diagnosis of Uterine Leiomyoma Subtypes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Obstetrics & Gynecology	6. 最初と最後の頁 358 ~ 365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/AOG.0000000000005475	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 Hayashi Okada Maki, Sato Shun, Nakashima Kengo, Sakai Takahiro, Tamehisa Tetsuro, Kajimura Takuya, Tamura Isao, Sueoka Kotaro, Sugino Norihiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Identification of long noncoding RNAs downregulated specifically in ovarian high grade serous carcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	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) 10.1002/rmb2.12572	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 Tamura Isao, Shiroshita Amon, Fujimura Taishi, Tanaka-Doi Yumiko, Shirafuta Yuichiro, Maekawa Ryo, Taketani Toshiaki, Sato Shun, Sugino Norihiro	4. 巻 29
2. 論文標題 Genome-wide analysis of histone modifications that underlie the dynamic changes in gene expression during decidualization in human endometrial stromal cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Human Reproduction	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) 10.1093/molehr/gaad019	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 Maekawa Ryo, Ota Yoshiaki, Ota Ikuko, Mihara Yumiko, Takasaki Hitomi, Sato Shun, Tamura Isao, Shirafuta Yuichiro, Shinagawa Masahiro, Fujimura Taishi, Shiroshita Amon, Yoneda Toshihide, Kawamoto Jozaki Mai, Matsui Fuka, Taketani Toshiaki, Sugino Norihiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Combined histological and DNA methylome profiling approaches may provide insights into the pathophysiology of ovarian endometriomas	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	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) 10.1002/rmb2.12548	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 Tamura Isao, Shiroshita Amon, Fujimura Taishi, Tanaka-Doi Yumiko, Shirafuta Yuichiro, Taketani Toshiaki, Sato Shun, Sugino Norihiro	4. 巻 70
2. 論文標題 Glucose and lipid metabolisms in human endometrial stromal cells during decidualization	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 465 ~ 472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endoerj.ej23-0099	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 Nakamura Michihiro, Nakamura Junna, Mochizuki Chihiro, Kuroda Chika, Kato Shigeki, Haruta Tomohiro, Kakefuda Mayu, Sato Shun, Tamanoi Fuyuhiko, Sugino Norihiro	4. 巻 4
2. 論文標題 Analysis of cell-nanoparticle interactions and imaging of in vitro labeled cells showing barcoded endosomes using fluorescent thiol-organosilica nanoparticles surface-functionalized with polyethyleneimine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nanoscale Advances	6. 最初と最後の頁 2682 ~ 2703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1na00839k	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 Maekawa Ryo, Sato Shun, Tamehisa Tetsuro, Sakai Takahiro, Kajimura Takuya, Sueoka Kotaro, Sugino Norihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Different DNA methylome, transcriptome and histological features in uterine fibroids with and without MED12 mutations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-022-12899-7	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 Takagi Haruka, Tamura Isao, Fujimura Taishi, Doi-Tanaka Yumiko, Shirafuta Yuichiro, Mihara Yumiko, Maekawa Ryo, Taketani Toshiaki, Sato Shun, Tamura Hiroshi, Sugino Norihiro	4. 巻 298
2. 論文標題 Transcriptional coactivator PGC-1 contributes to decidualization by forming a histone-modifying complex with C/EBP and p300	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101874 ~ 101874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101874	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 Tamura Isao, Fujimura Taishi, Doi-Tanaka Yumiko, Takagi Haruka, Shirafuta Yuichiro, Kajimura Takuya, Mihara Yumiko, Maekawa Ryo, Taketani Toshiaki, Sato Shun, Tamura Hiroshi, Sugino Norihiro	4. 巻 297
2. 論文標題 The essential glucose transporter GLUT1 is epigenetically upregulated by C/EBP and WT1 during decidualization of the endometrium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101150 ~ 101150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101150	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 Shirafuta Yuichiro, Tamura Isao, Ohkawa Yasuyuki, Maekawa Ryo, Doi-Tanaka Yumiko, Takagi Haruka, Mihara Yumiko, Shinagawa Masahiro, Taketani Toshiaki, Sato Shun, Tamura Hiroshi, Sugino Norihiro	4. 巻 162
2. 論文標題 Integrated Analysis of Transcriptome and Histone Modifications in Granulosa Cells During Ovulation in Female Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 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) 10.1210/endo/bqab128	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 Tamura Isao, Tamura Hiroshi, Kawamoto-Jozaki Mai, Doi-Tanaka Yumiko, Takagi Haruka, Shirafuta Yuichiro, Mihara Yumiko, Maekawa Ryo, Taketani Toshiaki, Sato Shun, Sugino Norihiro	4. 巻 251
2. 論文標題 Long-term melatonin treatment attenuates body weight gain with aging in female mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 15 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JOE-20-0462	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤 俊, 爲久 哲郎, 坂井 宜裕, 前川 亮, 杉野 法広
2. 発表標題 子宮筋腫の異種移植モデルを用いたSPRM の効果の検討
3. 学会等名 第44回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 為久 哲郎, 佐藤 俊, 坂井 宜裕, 前川 亮, 田辺 昌寛, 伊東 克能, 杉野 法広
2. 発表標題 MRI による子宮筋腫のサブタイプおよび組織構成の非侵襲的な予測法の確立
3. 学会等名 第44回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 為久 哲郎, 前川 亮, 佐藤 俊, 坂井 宜裕, 三原 由実子, 竹谷 俊明, 田村 博史, 杉野 法広
2. 発表標題 子宮平滑筋腫におけるMED12変異の有無によるDNAメチローム、トランスクリプトームおよび組織学的特徴の差異
3. 学会等名 第27回日本生殖内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 T.Tamehisa, R.Maekawa, S.Sato, T.Sakai, Y.Mihara, T.Taketani, H.Tamura, N.Sugino
2. 発表標題 Different DNA methylome, transcriptome, and histological features in uterine leiomyomas with and without MED12 mutations
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Maekawa Ryo, Sato Shun, Tamehisa Tetsuro, Sakai Takahiro, Okada Maki, Shimizu Natsuko, Shirafuta Yuichiro, Mihara Yumiko, Tamura Isao, Taketani Toshiaki, Tamura Hiroshi, Sugino Norihiro
2. 発表標題 Transcriptome and histopathological comparisons between MED12 mutation-positive and -negative uterine fibroids
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 子宮筋腫のサブタイプ予測プログラム、予測方法および予測装置	発明者 為久哲郎，佐藤俊， 杉野法広	権利者 国立大学法人山 口大学
産業財産権の種類、番号 特許、特開2023-69207	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------