

氏名	鈴木 裕介
(ふりがな)	(すずき ゆうすけ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第 号
学位審査年月日	平成31年1月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Establishment of a novel mouse xenograft model of human uterine leiomyoma (新しいヒト子宮筋腫移植マウスモデルの確立)
論文審査委員	(主) 教授 高井 真司 教授 岡田 仁克 教授 廣瀬 善信

学位論文内容の要旨

《研究目的》

子宮筋腫は女性で最も頻度が高い婦人科領域の良性腫瘍である。多くの症例では無症状であるが、一部の症例では過多月経や疼痛などの症状を示し、不妊の原因となる。筋腫を縮小させる有効な薬物療法はなく、過多月経に対するホルモン療法である gonadotropin releasing hormone agonist (GnRHa) 投与により多少の縮小効果を認めるものの、更年期障害や骨粗鬆症といった副作用が強いため、使用期間は限定される。このことより、子宮筋腫に対しては手術加療が一般的であり、妊孕性温存希望がある症例には子宮筋腫核出術が施行され、希望がない症例に対しては子宮全摘術が施行される。手術加療の患者侵襲性を考慮すると、軽微な副作用のみで子宮筋腫を縮小させる有効な治療薬の開発が望まれている。

子宮筋腫の治療研究が進まない理由の一つとして、ヒトの病態に近い適切な動物実験モ

デルの欠如が挙げられる。近年、新しいヒト子宮筋腫実験動物モデルが報告されてきているが、重度の免疫不全マウス、遺伝子組み換え細胞、血管新生因子含有ゲルの使用など、費用がかかるだけでなく飼育管理などの面で複雑なものが多い。そのため、今回の研究では、より安価かつ簡便なヒト子宮筋腫マウスモデルの作製を目的とした。

《材料および方法》

初めに、無作為に選んだ子宮筋腫手術症例から筋腫組織片を用いて、子宮筋腫移植マウスモデルの作製を試みた。

1. 雌の BALB/c nu/nu マウスに組織を移植する際に血管新生因子含有ゲル Matrigel™ (Corning, NY) を使用し、移植筋腫組織に対する Matrigel™ の有用性を検討した。
2. 雌の BALB/c nu/nu マウスにエストラジオール (E2) とプロゲステロン (P) 含有の薬剤徐放ペレットを背側頸部の皮下に埋め込み、手術により摘出したヒト子宮筋腫組織片をマウスの背部皮下に移植した。移植後 4 週と 8 週に腫瘍を摘出して移植前の組織と比較検討をした。また徐放ペレット埋め込み後のマウスにおける血清 E2 と P 値の推移を ELISA 法で測定した。
3. 異種移植後の筋腫における細胞由来を抗ヒト α 平滑筋アクチン抗体、抗 SM22 α 抗体、抗カルデスモン抗体、抗非筋ミオシン IIB (SMemb) 抗体、抗エストロゲン受容体 α (ER α) 抗体、抗プロゲステロン受容体抗体 (PR)、抗 Ki67 抗体、抗ヒトミトコンドリアリボソーム蛋白 L11 (hMitC) 抗体を用いた蛍光免疫染色法と FITC 標識イソレクチン B4 を用いたレクチン染色法で検討した。
4. 移植子宮筋腫がより発育しやすい条件を模索するため、手術術式、採取する筋腫部位(辺縁および中央)、手術前の GnRH α 投与による偽閉経療法の有無、元々の子宮筋腫の大きさ(最大径 10 cm 未満もしくは 10 cm 以上)を移植前後の組織重量の増大率で比較検討した。
5. GnRH α 投与の有無における移植前筋腫の ER α 、PR、インスリン様成長因子-2 (insulin-like growth factor 2 , IGF2)、胎児平滑筋ミオシン重鎖アイソフォーム

(SMemb) の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法によって、移植前と移植 8 週後の筋腫の ER α と PR の蛋白発現を蛍光免疫染色法によって比較検討した。

6. GnRHa 投与の有無における移植後腫瘍の増殖活性を評価するために移植前と移植 8 週後の筋腫の Ki67、SM α -アクチン発現を二重蛍光免疫染色法によって解析した。

《結果》

1. 移植時に Matrigel™ を使用した方が毛細血管は増加していたが、逆に移植腫瘍組織の大きさは減少し、移植組織内の線維形成が著明であった。このため、今回の研究では Matrigel™ を使用しない方針とした。
2. E2 と P の血清中濃度は、埋め込み 4 週後で最高値に達しその後漸減していったが、埋め込み 8 週後の時点においても移植筋腫の増大を認めた。
3. 異種移植組織がマウス由来の細胞とヒト平滑筋腫組織由来の細胞から構成されていることを免疫組織化学的解析によって確認した。
4. 腹式子宮筋腫核出術、手術前の GnRHa 投与、10 cm 以上の子宮筋腫が、移植後の筋腫の発育により適した条件であった。また、組織採取部位については、筋腫中央よりも筋腫辺縁の方が移植後より良好に発育する傾向を示した。
5. GnRHa 非投与群と比較して、GnRHa 投与群の筋腫組織で ER α 、ER β 、PR、IGF2、SMemb 遺伝子発現は有意に上昇していた。埋め込み前の筋腫では ER α と PR 蛋白発現は GnRHa 投与群で有意に上昇していたが、移植 8 週後では差を認めなかった。
6. GnRHa 投与群の移植前において、筋腫組織での Ki67、SM α -アクチン蛋白発現は GnRHa 非投与群に比べて有意に減少していたが、移植 8 週後の時点では逆に GnRHa 投与群で有意に増加していた。

《結論》

本研究において、我々はヒト子宮筋腫の新しいマウスモデルを確立した。本モデルは、

- ①移植後に筋腫が発育し続け、②移植手技が比較的単純であり、③血管新生因子含有ゲル

を必要とせず、④入手や管理が容易な BALB/c nu/nu マウスの使用といった特徴を持つ。
更に、移植に理想的な子宮筋腫の条件としては、手術前の GnRHα 投与、腹式子宮筋腫核
出術で摘出、10 cm 以上の子宮筋腫、筋腫辺縁組織が挙げられた。

また、GnRHα 投与投与群と非投与群の比較では、*IGF2* と *SMemb* 遺伝子が GnRHα 投
与群で有意に発現増加しており、これらの因子が子宮筋腫の発育に関与している可能性が
示唆された。

論文審査結果の要旨

子宮筋腫は最も頻度が高い婦人科領域良性腫瘍であるが、有効な薬物療法がなく、手術加療が一般的である。子宮筋腫の治療研究における薬物療法開発が進まない原因の一つとして、適切な実験動物モデルの欠如が挙げられる。近年、幾つかの新しい実験モデルが報告されているが、作製が繁雑で実用的でないものが多い。本研究では、ヒト筋腫組織を用いた簡便なマウス皮下異種移植モデルを確立することを目的とし、移植前後の子宮筋腫を分子生物学的および組織学的な解析を行うことによって移植に適した条件と因子を探索した。

申請者は、ヌードマウス皮下移植モデルを用い、既存の報告でよく用いられている血管新生因子含有ゲルの有用性についてまず検証したところ、その必要性はむしろ無かった。次に、薬剤徐放システムを用いたエストラジオールとプロゲステロンの持続的な投与を検討したところ、本処置は移植した筋腫の発育に必要であることが確認された。この移植組織を免疫組織化学的に解析したところ、マウス組織由来の線維芽細胞とヒト組織由来の平滑筋細胞から構成されていることが確認された。

続いて、移植に適した子宮筋腫の条件等を検討し、腹式子宮筋腫核出術、術前 GnRHa 投与、最大径 10 cm 以上の子宮筋腫、組織採取部位が筋腫辺縁部位であることが、移植後の筋腫の発育に重要な因子であることを明らかにした。中でも、GnRHa 投与が移植筋腫の発育に重要な因子の一つと考えられたため、筋腫組織の遺伝子発現解析を行ったところ、投与群では *IGF2*、*SMemb*、*ERα*、*ERβ*、*PR* 遺伝子が有意に発現増加していた。この結果により *IGF2* 遺伝子の発現増加は成長因子として働き、*SMemb* 遺伝子の発現増加はいわゆる増殖型様の平滑筋細胞あるいは筋線維芽細胞が増加した可能性が考えられた。また、*ERα*、*PR* の発現増加により、リガンドであるエストラジオールとプロゲステロンの持続投与が効果的に筋腫発育に寄与したものと考えられた。

申請者は本研究で、作製が容易で移植後も発育する新しいヒト子宮筋腫マウスモデルを確立した。このマウスモデルは、子宮筋腫における病態解明および新規治療法等の開発に少なからず貢献するものと考えられる。

以上により、本論文は本学学位規程第3条第2項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

（主論文公表誌）

Scientific Reports

8(1): 8872, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-27138-1 <オンライン掲載>