

氏 名	小 野 賀 大
(ふ り が な)	(おの よしひろ)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 号
学 位 審 査 年 月 日	平成 27 年 1 月 28 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 名	Decorin induced by progesterone plays a crucial role in suppressing endometriosis (子宮内膜症細胞におけるプロゲステロンのデコリン分泌を介した増殖抑制作用)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 大 槻 勝 紀 教授 廣 瀬 善 信 教授 岡 田 仁 克

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

子宮内膜症は卵巣を含む子宮内腔外に子宮内膜様組織を認める事を特徴とする生殖可能年齢女性の6・10%に見られる良性疾患であり、月経困難症、骨盤痛、不妊症を呈する。保存的治療としてはゴナドトロピン放出ホルモンアゴニストや低用量ピル製剤、プロゲステロン製剤等を用いたホルモン治療が主であり、中でも有害事象が少ないとされる黄体ホルモン製剤による治療が注目されている。第4世代黄体ホルモン製剤であるジェノゲストは子宮内膜症に対する臨床的治療効果が認められているが、内因性エストロゲン量を減少させる作用が主な機序であると考えられており、エストロゲン量変化以外の作用は明らかにされていない。今回我々はプロゲステロンの内膜症細胞に対する効果について、small leucine-rich proteoglycan familyの一種で血管新生抑制効果や受容体型チロシンキナーゼ

の抑制による抗腫瘍効果を持ち、子宮に高発現しているデコリンとの関連性に注目し研究を行った。

《方 法》

- ① 不死化子宮内膜症上皮細胞株（EMOsis cc/TERT cell）と不死化子宮内膜間質細胞株（CRL-4003 cell）に対しプロゲステロンを投与した時のデコリンmRNA量の変化をreal-time PCR法で、デコリン発現量の変化を抗ヒトデコリン抗体を用いたWestern blot法にて調べた。また、デコリン分泌量の変化をELISA法にて調べた。
- ② EMOsis cc/TERT 細胞、CRL-4003細胞に対しデコリン・プロゲステロン・デコリン中和抗体の投与、デコリンのsiRNAのトランスフェクションを行った時の細胞増殖能の変化をMTS法にて検討した。
- ③ プロゲステロンによるEMOsis cc/TERT 細胞、CRL-4003細胞のデコリン生成能への影響がプロゲステロンレセプターを介する直接的な作用によるものかを見るために、プロゲステロンを投与した両細胞を抗プロゲステロンレセプター抗体にて免疫沈降を行いデコリンのプロモーター領域上のprogesterone response elementsを含むプライマーを用いてChIP法にて検証した。
- ④ EMOsis cc/TERT 細胞、CRL-4003細胞に対しデコリン・プロゲステロンを投与し、細胞周期の変化をFACS法を用いて検討した。また、プロゲステロン・デコリン中和抗体を投与した時のMet、p21発現量の変化をWestern blot法を用いて検討した。さらに、デコリンのsiRNAのトランスフェクションを行ったEMOsis cc/TERT細胞に対しプロゲステロンを投与した時のデコリン発現量の変化をWestern blot法を用いて検討した。
- ⑤ 以上の基礎的検討の妥当性を検証するために、2002年から2012年の間に当院にて卵巣内膜症性嚢胞に対し手術療法を行った50症例をジェノゲストによる術前治療群（25例）と術前無治療群（25例）に分け、デコリンのRNA量の差異をreal time PCR法を用いて、デコリン、Metの発現量の差異を免疫組織科学染色法を用いて検討した。

《結 果》

- ① プロゲステロンを添加した EMOSis cc/TERT 細胞、CRL-4003 細胞ではデコリンの mRNA 量、発現量、分泌量の増加を認めた。
- ② プロゲステロンとデコリンにおいて、EMOSis cc/TERT 細胞、CRL-4003 細胞に対する用量依存的な細胞増殖抑制効果を認め、デコリン中和抗体の添加やデコリンの siRNA のトランスフェクションを行うことで、細胞増殖抑制効果の消失を確認した。
- ③ プロゲステロンを添加した EMOSis cc/TERT 細胞、CRL-4003 細胞ではデコリンプロモーター領域へのプロゲステロンレセプターの結合亢進が認められた。
- ④ 無治療時の細胞において、細胞周期が G0/G1 周期にある割合が EMOSis cc/TERT 細胞で 53%、CRL-4003 細胞で 57%であったのに対し、プロゲステロン（100 nM、500nM）を投与した時の G0/G1 周期の割合は EMOSis cc/TERT 細胞で 66%、80%、CRL-4003 細胞で 67%、78%で、デコリン（3mg/ml、6mg/ml）を投与した時の G0/G1 周期の割合は、EMOSis cc/TERT 細胞で 68%、77%、CRL-4003 細胞で 65%、75%であり、用量依存的な G0/G1 期での細胞周期停止効果を両薬剤で認めた。また、プロゲステロンを添加した両細胞株では Met 発現量の低下と p21 発現量の増加を認め、デコリン中和抗体の添加によるそれらの効果の消失を確認した。デコリンの siRNA トランスフェクションを行った EMOSis cc/TERT 細胞ではプロゲステロンを投与した時のデコリン、Met、p21 発現量の変化は見られなかった。
- ⑤ 内膜症組織において、術前ジェノゲスト治療群では術前無治療群と比較して有意にデコリンの mRNA 発現量が高い事を real-time PCR 法で認めた。また、免疫組織染色法にて術前ジェノゲスト治療群では有意なデコリン発現の増加と Met 発現の減少を認めた。

《結 論》

プロゲステロンは子宮内膜症細胞においてデコリンプロモーター領域へのプロゲステロン

レセプターの結合を亢進することで細胞でのデコリンの生成、分泌を促進する作用を持つ事が証明された。また、生成されたデコリンは受容体型チロシンキナーゼの一種である **Met** の発現減少を伴う細胞増殖抑制効果と、細胞周期阻害因子である **p21** の発現増加を伴う細胞周期停止効果を有していることから、プロゲステロンには内膜症細胞に対してデコリンを介する増殖抑制作用があり、この作用機序がプロゲステロン製剤の子宮内膜症病変に対する臨床的效果に寄与していることを明らかにした。

論文審査結果の要旨

《目 的》

子宮内膜症は子宮内腔外に子宮内膜様組織を認める事を特徴とする生殖可能年齢女性の6-10%に見られる良性疾患である。黄体ホルモン製剤は子宮内膜症に対する臨床的治療効果が認められているが、内因性エストロゲン量を減少させる作用が主な機序であると考えられており、エストロゲン量変化以外の作用は明らかにされていない。今回我々はプロゲステロンの内膜症細胞に対する効果について、血管新生抑制効果や受容体型チロシンキナーゼの抑制による抗腫瘍効果を持ち、子宮に高発現しているデコリンとの関連に注目し観察を行った。

《方 法》

不死化子宮内膜症上皮細胞株 (EMOsis cc/TERT) と不死化子宮内膜間質細胞株 (CRL4003) を用いてプロゲステロンを投与し、細胞増殖、mRNA量、発現量、分泌量等を検討した。また、卵巢内膜症性嚢胞に対し手術療法を行った50症例をジェノゲストによる術前治療群 (25例) と術前無治療群 (25例) に分け、デコリン、Met発現の差異を観察した。

《結 果》

プロゲステロンを添加した不死化子宮内膜症上皮細胞株と不死化子宮内膜間質細胞株でデコリンの mRNA、発現、分泌量の増加を認め、プロゲステロンとデコリンは不死化子宮内膜症上皮細胞と不死化子宮内膜間質細胞に対し用量依存的な増殖抑制効果と G0/G1 期での細胞周期停止効果を示した。また、プロゲステロンを添加した不死化子宮内膜症上皮細胞と不死化子宮内膜間質細胞では Met 発現量の低下と p21 発現量の増加を認めた。これらの効果はデコリン中和抗体の添加やデコリンの siRNA のトランスフェクションを行うことで消失した。さらに内膜症組織において、術前治療群では術前無治療群と比較して有意にデコリンの mRNA と発現量が高く Met 発現量の低い事を認めた。

《結 論》

プロゲステロンは子宮内膜症細胞においてデコリンの生成を促進する事で、Metの減少を伴う細胞増殖抑制効果とp21の発現増加を伴う細胞周期停止効果を有していることが証明され、この機序がプロゲステロン製剤の内膜症に対する臨床的效果に関連があると考えられた。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 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）

Journal of Endocrinology 223(2): 203-216, 2014