

主論文の要旨

**Novel ovarian endometriosis model causes infertility  
via iron-mediated oxidative stress in mice**

新規卵巣子宮内膜症モデルマウスでは  
鉄関連酸化ストレスを介して不妊症を生じる

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導: 梶山 広明 教授)

林 祥太郎

## 【緒言】

子宮内膜症とは月経時に骨盤内に逆流した子宮内膜が、生着、増生し、炎症、癒着等を起こす疾患である。生殖年齢女性の約 10-15%に発生する。特に卵巣病変は鉄過剰や、酸化ストレスが卵胞発育に影響し不妊症の原因と考えられているが、その機序は明らかでない。子宮内膜症の基礎研究では、若年患者から正常な卵巣を採取し研究試料として使用する事が困難であるため、モデル動物を用いる必要がある。主なモデルは、ドナー子宮を細切しレシピエントの腹腔内に散布し腹膜病変を形成するものであった。しかし、マウス、ラットの卵巣は卵巣嚢と呼ばれる構造で覆われており、卵巣病変を再現する事はできなかった。本研究は、新たに卵巣子宮内膜症モデルを開発し、卵巣機能も観察可能とした。

## 【対象及び方法】

全 83 匹（雌 79 匹、雄 4 匹）の C57BL/6N マウス（8 週齢）を日本 SLC より購入し 1 週間の順応後、Fig.1A の如く実験を行った。9 週齢のドナーから子宮を摘出し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で周囲の脂肪組織を除去し、長軸方向に切開し細切した後、コラゲナーゼ 1mg/ml 中で 37°C、30 分加温した。その後、8,000xg、5 分で遠心し上清を破棄しコラゲナーゼの除去後、PBS100  $\mu$ l に再懸濁し、再度 8,000xg、5 分で遠心沈降し、子宮組織のペレットを作成した。24 匹の雌を Ovarian endometriosis (OE)群のレシピエントとした。イソフルレンによる全身麻酔下に、背側を 5-7mm 切開し、卵巣嚢内に PBS を注入、嚢胞壁を切開した。露出した卵巣にペレット状の子宮組織を付着させ閉創した(Fig.1B)。一方で、卵巣嚢に PBS 注入のみを行った 9 匹を Sham operation (S)群とした。麻酔、手術を行わなかった 17 匹を No treatment control (C)群とした。

各群 10、11、13 週齢で解剖した。付属器をパラフィン包埋し組織学的に解析した。H&E 染色、Masson trichrome 染色（線維化）、Berlin blue 染色（鉄染色）を行い、子宮内膜症の特徴を確認した。免疫組織化学を用いて、卵胞の脂質過酸化の指標として 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins (4-HNE)、顆粒膜細胞の DNA 損傷の指標として 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)をそれぞれ検討した。また、卵胞刺激ホルモン受容体(FSHR)の発現を比較した。さらに、13 週齢より同齢雄と交配させて、各群での妊娠仔数を比較した。

## 【結果】

子宮移植から 4 週間後の時点で、OE 群の 85.7%(12/14)で卵巣周囲に嚢胞性病変を認めた(Fig.2A)。病変は漿液性の内容を含み、1、2、4 週と経時的に増大していた。組織学的には、嚢胞性病変は単層の上皮と間質で構成されていた。C、S 群では卵巣の形態が保たれている一方で(Fig.2Bab)、OE 群では病変が浸潤し卵巣を変形させていた(Fig.2Bcd)。さらに、OE 群の病変は腸、脾、腹壁等の周囲臓器に癒着しており(Fig.2Be-g)、病変間質にはヘモジデリン沈着(Fig.2Bh)と免疫染色での CD10 陽性(Fig.2C)を認め、ヒト子宮内膜症と同様の所見を得た。Masson trichrome 染色では、OE 群で有意な線維

組織の増加をみとめた(Fig.3AB : OE vs C、 $P<0.001$  ; OE vs S、 $P<0.01$ )。手術から 1、2、4 週後、即ち 10、11、13 週齢で解剖し、線維化の経時的変化を確認したところ、1、2 週の間では差はなかったが、4 週時点では有意に増加していた(Fig.3CD : 1 週 vs 2 週 :  $P=0.56$ 、2 週 vs 4 週: $P<0.01$ )。4 週時点での Berlin blue 染色では、病変の間質で有意に鉄沈着が増加した(Fig.3EF: OE vs C:  $P<0.01$ , OE vs S:  $P<0.01$ )。

4-HNE は OE 群の原始卵胞(Fig.4B: C vs OE,  $P<0.001$ ; S vs OE,  $P<0.001$ )、前胞状卵胞(Fig.4E; C vs OE,  $P<0.001$ ; S vs OE,  $P<0.01$ ; C vs S,  $P=0.6206$ )、胞状卵胞(Fig.4F; C vs OE,  $P<0.05$ ; S vs OE,  $P<0.01$ ; C vs S,  $P=0.2150$ )で有意に増加した。8-OHdG は OE 群の全ての段階の卵胞で有意に上昇した (原始卵胞: C vs OE,  $P<0.01$ ; S vs OE,  $P<0.05$ ; C vs S,  $P=0.3152$  [Fig.5B]; 一次卵胞: C vs OE,  $P<0.01$ ; S vs OE,  $P<0.01$ ; C vs S,  $P=0.2303$  [Fig.5C]; 二次卵胞: C vs OE,  $P<0.01$ ; S vs OE,  $P<0.05$ ; C vs S,  $P=0.9273$  [Fig.5D]; 前胞状卵胞: C vs OE;  $P<0.01$ , S vs OE;  $P<0.05$ , C vs S;  $P=0.3524$  [Fig.5E]; 胞状卵胞: C vs OE;  $P<0.01$ , S vs OE;  $P<0.05$ , C vs S;  $P=0.7619$  [Fig.5F])。一方、前胞状卵胞以降の FSHR 発現は、OE 群において有意に低下していた (前胞状卵胞: C vs OE,  $P<0.001$ ; S vs OE;  $P<0.01$ , C vs S;  $P=0.1624$  [Fig.6B]; 胞状卵胞: C vs OE,  $P<0.001$ ; S vs OE,  $P<0.001$ ; C vs S,  $P=0.9624$  [Fig.6C]; 排卵前卵胞: C vs OE,  $P<0.01$ ; S vs OE,  $P<0.05$ ; C vs S,  $P=0.2493$  [Fig.6D])。

さらに、13 週齢より交配させ妊孕性を確認すると、妊娠仔数の平均値 (範囲) は C 群、S 群、OE 群でそれぞれ、9.0(6-12)、9.0(7-11)、2.3(1-3)であり、OE 群で有意に低下した(Fig.7AB; C vs S,  $P=0.8544$ ; C vs OE,  $P<0.05$ ; S vs OE,  $P<0.05$ )。

### 【考察】

本研究では、新規に卵巣子宮内膜症モデルマウス作成の方法を確立し、卵胞への酸化ストレスの影響を組織学的に評価した。本法の特徴は卵巣嚢の除去と、コラゲナーゼ処理したペレット状子宮を移植するという点である。この方法により、卵巣選択的に子宮内膜症病変を形成する事ができた。本モデルでは線維化が増加しており、卵胞発育の場が減ると考えられた。子宮内膜症間質は鉄親和性が高いという報告のように、鉄が Reactive oxygen species (ROS)を発生させたと考えられる。4-HNE は原始卵胞、前胞状卵胞、胞状卵胞で有意に増加していた。シスプラチン投与により原始卵胞の 4-HNE が上昇する報告がある。前胞状卵胞以降はステロイド合成が増加し、脂質過酸化の標的が多いと考えられる。また、既報より、酸化ストレスはエピジェネティックな機序により FSHR を減少させると考えられる。酸化ストレスや FSHR の抑制が卵胞発育を阻害し、妊娠仔数の減少を招いたと考えられる。

### 【結語】

本研究では、初めて妊孕性の評価が可能な卵巣子宮内膜症モデルマウスを確立した。本モデルは、触媒性鉄が卵胞の酸化ストレスを生じ、FSHR 発現と妊孕性が低下した。本モデルは、子宮内膜症関連不妊症の治療法の開発に役立つと期待される。