

## 主論文の要旨

### **Ovarian endometriosis-associated stromal cells reveal persistently high affinity for iron**

〔 卵巣子宮内膜症の間質細胞は鉄に対する  
高い親和性を持続的に有する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻

発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

森 正彦

## 【緒言】

子宮内膜症は、子宮内膜類似の上皮および間質が子宮内腔以外の場所に存在する良性のエストロゲン依存性慢性炎症性疾患であるが、子宮内膜症を有する患者から卵巣癌が発生することが報告されている。

鉄は生体にとって最も豊富にある重金属であり、生体内で電子の授受という重要な役割を果たすために必要不可欠な元素である。その一方で、過剰な鉄は中皮腫や肝癌など様々な障害を引き起こす。二価鉄はフェントン反応の触媒として作用し、過酸化水素から反応性の極めて高いヒドロキシルラジカルを生成するために酸化ストレスを引き起こし、脂質や蛋白質の損傷や DNA 鎖の切断を起こす。卵巣子宮内膜症性嚢胞内貯留液の鉄濃度の上昇が指摘されており、子宮内膜症の癌化との関連が示唆されている。

間葉系組織である血液や骨格筋などは、代表的な鉄の貯蔵庫としてあげられる。生殖器官である子宮はミュー管由来であり、子宮内膜上皮はミュー管上皮由来であるが、内膜間質は間葉系由来の組織である。

現在まで子宮内膜症と触媒二価鉄に関する報告はなく、私たちは生細胞（不死化子宮内膜間質細胞 ESCs、n-euESC：内膜症のない正所性子宮内膜間質細胞、e-euESC：内膜症を有する正所性子宮内膜間質細胞、ecESC：異所性子宮内膜間質細胞）および組織（チョコレート嚢胞組織、正所性内膜組織）において触媒二価鉄を探索できる蛍光プローブ（HMRhoNox-M）を用いて、子宮内膜症の病変部における触媒二価鉄の貯留について調べた。次に、異所性子宮内膜間質細胞を、鉄を貯留しやすい間葉系組織と考慮し、チョコレート嚢胞内に鉄が豊富に存在する子宮内膜症の間質細胞は、上皮細胞と比べ鉄に親和性があるのではと仮定した。

## 【結果】

子宮内膜症および子宮腺筋症または子宮頸がんに対する手術を受けた患者の検体から凍結標本を作成した。子宮内膜症のない子宮頸がん患者の正常子宮内膜をコントロールとして、卵巣チョコレート嚢胞や、子宮腺筋症における子宮内膜および腺筋症病変における触媒二価鉄を HMRhoNox-M による蛍光染色にて調べたところ、子宮内膜症の間質細胞および上皮において、他の部位と比較し、HMRhoNox-M の強い染色を認めた（Figure 1A）。チョコレート嚢胞における異所性内膜間質においてはその上皮と比べてより強く染色していた。子宮内膜症を有する患者の正所性内膜と腺筋症病変を比較すると、病変部により強い染色を認めた（Figure 1）。正常な子宮内膜における染色は弱かった（Figure 1）。また組織中の三価鉄を調べるために Prussian blue 染色を行ったところ、触媒二価鉄の貯留部位とは無関係にヘモジデリン沈着部位が染色された（Figure 1）。次に ESCs に対し、各濃度の塩化鉄（III）（ $\text{FeCl}_3$ ）を培地に投与して 6 時間後の間質細胞における鉄の取り込みを観察したところ、n-euESC と比較し、e-euESC や ecESC において、濃度依存性に触媒二価鉄の貯留が有意に上昇していた（Figure 2A）。また、 $50\mu\text{M}$  の  $\text{FeCl}_3$  を培地に投与して各時間経過した時点での間質細胞

胞における鉄の取り込みを観察したところ、n-euESC や e-euESC では 6 時間をピークに触媒二価鉄の貯留が減少するのに比べ、ecESC においては、時間依存性に上昇していた (Figure 2B)。

ESCs において、触媒二価鉄の取り込みに差がある原因として、鉄の取り込みに関わる Transferrin receptor 1 (TfR1) の発現についてウェスタンブロット法にて確認した。各細胞の培地に鉄ニトリロトリ酢酸 [Fe(III)-NTA] を 0, 50, 100  $\mu$  M で投与して、6 時間培養した際の TfR1 の発現は濃度依存性に増加することがわかった (Figure 3A)。また各細胞に Fe(III)-NTA を 50  $\mu$  M 投与し、6h, 12h, 24h 培養した際の TfR1 の発現は、n-euESC においては、12 時間をピークに低下するものの、ecESC においては、時間依存性に増加することがわかった (Figure 3A)。また、e-euESC においては、24 時間で低下するものの、どの時間においても高発現しており、免疫組織化学にて、確認したところ、正常な内膜間質より、内膜症を有する子宮内膜間質組織や内膜症性嚢胞の間質組織において、TfR1 は高発現していることがわかった (Figure 3B)。さらに細胞内からの鉄の排出に関わるタンパク質である Ferroportin に関しては、子宮内膜症性嚢胞の間質組織において低下していることがわかった (Figure 3B)。

次に異所性の子宮内膜間質細胞における鉄の取り込みの増加は、子宮内膜上皮細胞との鉄の受け渡しに関連があると考え、子宮内膜上皮細胞を模して高分化型子宮内膜上皮癌細胞のセルラインである Ishikawa 細胞 (EpCs) を用いて、EpCs と ESCs で共培養を行った。EpCs もしくは ESCs のいずれかに FeCl<sub>3</sub> を 50 $\mu$ M で投与し、12h 鉄を負荷した。ESCs を CMFDA にてラベルして共培養し、6 時間後、触媒二価鉄の各細胞内の取り込みを調べた (Figure 4A)。共培養の結果、FeCl<sub>3</sub> の前負荷を EpCs、ecESC のどちら行っても、ecESC に有意に触媒二価鉄が集積していることがわかった (Figure 4B)。EpCs と ecESC の細胞数を変化させると、EpCs が ecESC の半数の時、ecESC に有意に触媒二価鉄が残り、EpCs が ecESC の 2 倍数の時、両者に差を認めなかった (Figure 4C)。また同様に EpCs と n-euESC および e-euESC で実験を行ったところ、n-euESC では有意に EpCs に蓄積し、e-euESC では両者に差を認めなかった (Figure 4D)。最後に ecESC の TfR1 を siRNA にてノックダウンして、EpCs と共培養した結果、鉄取り込みは両者に差を認めなかった (Figure 4E)。

## 【結論】

子宮内膜症病変における触媒二価鉄の貯留は、異所性子宮内膜間質細胞における鉄の取り込みや排出の役割を持つ、TfR1 や Ferroportin の発現変化によるものと考えられた。また子宮内膜症組織における間質細胞には上皮細胞から鉄を吸収する性質がある可能性が示唆された。