

主論文の要旨

**Upregulation of Fibroblast Growth Factors Caused
by Heart and Neural Crest Derivatives Expressed 2
Suppression in Endometriotic Cells: A Possible
Therapeutic Target in Endometriosis**

〔 子宮内膜症細胞における HAND2 抑制による FGFs 亢進を標的とした
子宮内膜症治療の可能性 〕

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：吉川 史隆 教授)

加藤 奈緒

【緒言】

子宮内膜症は子宮内膜類似の組織が子宮外に存在する疾患であり、生殖可能年齢女性の約 10%にみられ、子宮内膜症の約 30-50%で不妊の原因になる。「再発性の慢性疼痛疾患」とも表現され、リプロダクティブ・ヘルスを低下させる疾患として注目されている。発生機序として Sampson の子宮内膜移植説が広く受け入れられており、子宮内膜症細胞は逆流月経血中に含まれる子宮内膜細胞に由来するとされる。しかし、月経逆流現象は多くの女性に認められる現象であるにもかかわらず、子宮内膜症は一部の女性にしか発症しない。子宮内膜細胞と子宮内膜症細胞は異なる性質を有していると考えられ、主に性ステロイドへの反応性が違うとされている。エストロゲン依存性である子宮内膜症において観察されるプロゲステロンへの反応性低下は「プロゲステロン抵抗性」と呼ばれ、子宮内膜症の病態への関与が推察されている。しかしながら、プロゲステロン抵抗性の詳細なメカニズムは十分明らかではない。

HAND2 (Heart and neuralcrest derivatives expressed transcript 2) は神経系、心臓、軟骨などの発生過程で、各種細胞への運命決定を行う転写因子である。子宮内膜において HAND2 はプロゲステロンに発現が誘導され、着床や脱落膜化に関与する。本研究では、子宮内膜症における HAND2 の役割について検討し、さらに HAND2 下流の標的遺伝子である線維芽細胞成長因子 (FGFs ; fibroblast growth factors) に着目して、子宮内膜症の病態形成およびプロゲステロン抵抗性の分子機序解明の一助になることを主眼とした。

【方法】

非子宮内膜症手術患者より正所性子宮内膜間質細胞 (ESC) を、子宮内膜症手術患者より正所性子宮内膜間質細胞 (eESC) と卵巣子宮内膜症性嚢胞間質細胞 (CSC) を分離培養した。免疫組織染色で月経周期別の HAND2 の局在を比較した。Quantitative real-time PCR (qPCR) 法にて初代培養細胞と当研究室で樹立した不死化子宮内膜間質細胞および不死化卵巣子宮内膜症性嚢胞間質細胞における HAND2 発現を比較した。HAND2 を si RNA 法でノックダウンし、qPCR 法で HAND2 抑制下での遺伝子変化を調べ、ボイデンチャンバーを用いて遊走能、浸潤能を比較した。さらにフローサイトメトリーによる細胞周期解析で増殖能を解析した。また FGF 受容体サブタイプ 1、2、3 の選択的阻害薬である AZD4547 を添加し、遊走能、浸潤能および増殖能を検討した。

動物実験モデルとして、卵巣を摘出したレシピエントマウスに、ドナーマウスの碎屑した子宮を腹腔内に注入し、エストラジオールを皮下注射して子宮内膜症モデルマウスを作成した。AZD4547 (25 μ g) を投与して、子宮移植 4 週間後に開腹して子宮内膜症病変を確認し、組織学的評価を行った。

【結果】

HAND2 の免疫組織染色の結果、子宮内膜の増殖期、分泌期いずれにおいても

HAND2 発現がみられ、増殖期に比べ分泌期で HAND2 発現が増強した (Figure 1A, C)。内膜症組織では増殖期、分泌期いずれにおいても同時期の子宮内膜に比べて HAND2 発現は減弱した (Figure 1B, D)。半定量化して4段階評価したところ、増殖期、分泌期ともに正常子宮内膜に比べて子宮内膜症組織では HAND2 染色強度が有意に減少した (Figure 1E)。次に初代培養細胞と不死化細胞で HAND2 発現を比較した。ESC と eESC に比べ CSC では HAND2 発現が低下したが、ESC と eESC では差がみられなかった (Figure 1F)。さらに、HAND2 ノックダウンにより ESC、CSC ともに FGF1、FGF2、FGF9 発現は有意に増加した (Figure 2)。また、HAND2 ノックダウンにより ESC、CSC ともに遊走能および浸潤能が亢進し、FGF 受容体拮抗薬である AZD4547 添加により、HAND2 発現抑制下での遊走能と浸潤能の亢進が抑制された (Figure 3A, B)。細胞周期解析で、CSC において HAND2 抑制により G2-M 期の細胞数の割合は増加したが、AZD4547 添加下での有意な変化は認めなかった (Figure 3C)。

子宮内膜症マウスモデルにおいて、子宮内膜症病変数および表面積は AZD4547 投与群で有意に減少した (Figure 4B, C)。内膜症病変における Ki67 陽性の増殖している上皮細胞数を調べた結果、AZD4547 投与群で Ki67 陽性細胞数の割合は有意な減少を認めた (Figure 4D, E)。

【考察】

子宮内膜症細胞におけるプロゲステロンへの反応性の低下は、子宮内膜症細胞の表現形に影響を与える根本的な性質である。プロゲステロン抵抗性の機序に関与する因子の同定は子宮内膜症の新たな治療戦略を提供する。本研究では、子宮内膜症病変において HAND2 の発現低下を認め、HAND2 依存性に FGF1、FGF2、FGF9 が増加して子宮内膜症細胞の遊走能、浸潤能の亢進を促し、FGF 受容体拮抗薬によりその効果が抑制されることを示した。さらに、子宮内膜症マウスモデルの結果、FGF 受容体拮抗薬の分子機構が子宮内膜症の治療標的となることを支持した。

FGF 受容体拮抗薬である AZD4547 での治療は現在、進行癌の臨床試験に用いられている。本研究で、AZD4547 は比較的低用量の投与で *in vitro* における子宮内膜症細胞の遊走能、浸潤能を抑制し、同様に子宮内膜症マウスモデルにおける子宮内膜症病変を減少させた。今回の結果では *in vitro* における細胞増殖能の抑制効果はみられなかったため、子宮内膜症治療薬として AZD4547 の効能のさらなる検証が今後の課題と考えられる。

子宮内膜症を有する患者の子宮内膜にはプロゲステロン抵抗性が認められることが報告されている。本研究では、正常子宮内膜と子宮内膜症を有する患者の子宮内膜における HAND2 発現に明らかな差がみられなかった。いつどのように子宮内膜症細胞で HAND2 発現低下が生じるかを示すことが期待される。さらに、子宮内膜症病変において HAND2 発現を誘導することで FGFs が低下するかどうかを明らかにする必要がある。子宮内膜症での HAND2 の低下が引き金となった FGFs 亢進が子宮内膜症

の治療標的になり得ることを示すためには、HAND2—FGF の関連をより明確にすることが必要である。

【結論】

FGF1、FGF2、FGF9 はプロゲステロン依存性の転写因子 HAND2 で発現が制御され、子宮内膜症細胞では HAND2 の抑制により発現が亢進することを示した。HAND2 依存性に制御される FGFs は子宮内膜症の病態進展に関与する主要な因子であり、FGF 受容体拮抗薬は子宮内膜症治療薬に結びつく可能性が示唆された。