

[課程-1]

論文の内容の要旨

論文題目 Study towards the Development of New Medical Therapies for Endometriosis

和訳 子宮内膜症に対する直接的な治療効果を持つ薬物の開発に関する基礎研究

指導教官 矢野 哲 准教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 傅 莉

【緒言】

現在、子宮内膜症に対してはいくつかの薬物療法がある。しかし、ほとんどの場合、副作用や治療終了後の再発が問題となっている。よって、さまざまな薬剤を組み合わせ、長期的な展望のもとに個別的な管理が必要となっている。このような背景のもと、子宮内膜症の新たな治療薬物の開発が期待されている。一方、子宮内膜症の発生機序などについては不明な点が多く、新たな子宮内膜症治療薬の開発のためには、その病態に関する研究が必須である。

Dienogest は合成のプロゲステロン薬剤で、高度のプロゲステロン活性および抗アンドロゲン活性、わずかな抗ゴナドトロピン活性を持つ。これまで Dienogest の子宮内膜症に対する治療効果が動物実験および臨床試験により報告されている。これらの作用は中枢抑制によるとされているが、子宮内膜症病変に対する直接作用の可能性も推測されている。本研究では、Dienogest による子宮内膜症間質細胞 (ESC) に対する直接的細胞増殖抑制効果を検証し、さらに、そのメカニズムについて、細胞周期の観点より検討した。

つぎに、Growth hormone releasing hormone(GHRH)に関してであるが、GHRH は中枢組織と同様に末梢組織において広く発現しており、多くの悪性腫瘍においても存在していることが近年報告されている。末梢組織における GHRH の生理的な作用はまだ不明で、悪性腫瘍組織においては成長因子として悪性腫瘍進

展における GHRH の関与が示唆されている。この細胞増殖効果は Spliced variant1(SV1)という受容体を介し、cyclic AMP(cAMP)の産生を伴うことが示されている。一方、子宮内膜組織および子宮内膜癌に GHRH が発現することが報告されている。しかしながら、GHRH が子宮内膜症に関係するか否かは未だ不明である。よって、本研究では子宮内膜症における子宮内膜および子宮内膜症病変において GHRH および GHRH の SV1 受容体 mRNA の発現を検討し、GHRH による子宮内膜症病変の影響について、細胞増殖および細胞周期の観点より調べた。

【方法と結果】

検体の採取および ESC 細胞培養に関し、東京大学倫理委員会により承認を受けている。

(一) Dienogest の子宮内膜症間質細胞(ESC)に対する直接作用についての検討

(1) 細胞増殖抑制効果

Dienogest の ESC 細胞に対する直接的細胞増殖抑制効果をみるために、DNA への 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)取り込み法にて DNA 合成能を解析した。まず、96 ウェルプレートに ESC 細胞を培養し Dienogest を添加後、BrdU で細胞をラベリングした。次に、細胞を固定し抗 BrdU 抗体と反応させ、ELISA 法で Dienogest の DNA 合成能に対する影響を検討した。Dienogest を添加し 24 時間培養後、ESC の DNA 合成能は $10^{-7}M$ と $10^{-6}M$ の濃度で濃度依存的に減少した。すなわち、Dienogest は ESC 細胞に対する直接的な細胞増殖抑制効果を示した。

(2) 細胞周期の G0/G1 arrest の誘導

ESC 培養系に Dienogest $10^{-6}M$ を添加し、24 と 48 時間後に細胞を回収し、70%エタノールで一夜固定した。そして RNase 処理と propidium iodine 染色を施行し、フローサイトメトリーで細胞周期の分布を解析した。Dienogest $10^{-6}M$ 添加 24 時間後に、対照と比較し G0/G1 期は 2.0%増加した。またそれに伴い S 期は 7.1%と G2/M 期は 10.6%減少した。48 時間後もこの効果が持続していた。すなわち、Dienogest は ESC において G0/G1 arrest の誘導効果を示した。

(二) 子宮内膜症の病態における GHRH および GHRH の SV1 受容体の関与についての検討

(1) 子宮内膜および子宮内膜症病変における GHRH および GHRH の SV1 受容体 mRNA の発現

20 人の非子宮内膜症患者からの子宮内膜、27 人の子宮内膜症患者からの子宮内膜および子宮内膜症病変を採取し、Isogen を用いた acid guanidinium-phenol-chloroform 法にて RNA を抽出し、RT-nested PCR 法にて

GHRH および GHRH の SV1 受容体 mRNA の発現を解析した。3 種類の検体において GHRH mRNA の発現の割合はそれぞれ 25%、26%、24% で、ほぼ同程度であった。一方、SV1 受容体 mRNA は子宮内膜症病変に 63% の割合で発現していたが、子宮内膜においては 0% (子宮内膜症患者)、10% (非子宮内膜症患者) と有意に少なかった。11 人の非子宮内膜症患者からの正常卵巣では GHRH mRNA は 100% で、SV1 受容体 mRNA は 0% で発現した。PCR 産物は DNA シーケンサーにより同定された。以上の検体において、全体的に SV2、SV3、SV4 mRNA は発現しなかった。

(2) 腹腔内骨髄由来細胞(PBMC)における GHRH の mRNA の発現

10 人の子宮内膜症患者および 6 人の非子宮内膜症患者から腹水を採取し、Ficoll-Paque を用いて PBMC を分離した。先述のように、RT-nested PCR より、PBMC において、GHRH mRNA が発現を調べた。子宮内膜症患者の PBMC および非子宮内膜症患者の PBMC において、70%、100% の割合で発現した。

(3) hGHRH(1-29)NH2 刺激による ESC での cAMP 産生

まず、培養 ESC における SV1 受容体 mRNA の発現を解析した。SV1 受容体 mRNA の発現を認められた ESC 細胞を (3)、(4)、(5) の実験に用いた。24 ウエルプレートに ESC を血清不含の培養液で 48 時間培養した。その後、hGHRH(1-29)NH2 を添加し 2 時間刺激した後の培養上清を回収し EIA 法を行った。培養上清中の cAMP は hGHRH(1-29)NH2 10^{-9} M ~ 10^{-6} M の範囲で濃度依存性に増加した。

(4) hGHRH(1-29)NH2 により ESC の細胞増殖亢進効果

BrdU 取り込み法を用いた細胞増殖についての検討では、hGHRH(1-29)NH2 10^{-7} M を添加し 24、48 時間後の ESC 細胞の DNA 合成能は、各々対照の 20%、27% に亢進していた。また、hGHRH(1-29)NH2 10^{-6} M 添加では、23% と 33% に亢進した。しかしながら、SV1 受容体の発現が認められなかった ESC では、hGHRH(1-29)NH2 による増殖亢進作用は認められなかった。

(5) hGHRH(1-29)NH2 により ESC の細胞周期の促進誘導

ESC に hGHRH(1-29)NH2 10^{-6} M 刺激 24、48 時間後、上述のように、細胞を処理し、フローサイトメトリーで細胞周期について検討した。hGHRH(1-29)NH2 10^{-6} M により、S 期と G2/M 期細胞の割合は対照群と比較して有意に高値であった。一方、G0/G1 期細胞の割合は減少していた。

【考察】

(一) Dienogest の子宮内膜症間質細胞(ESC)に対する直接作用についての検討

本研究により、ESC における Dienogest による直接的な細胞増殖抑制効果が認められた。細胞周期の分析により、Dienogest は G0/G1 arrest を誘導した。

すなわち、Dienogest の ESC 細胞増殖抑制作用には、G0/G1 arrest の誘導が関与していることが示唆された。また、この直接作用は Dinogest の臨床治療濃度で誘導できることが示された。プロゲステロン抵抗性は子宮内膜症の病因の一つとして考えられており、子宮内膜症の治療において問題となるとされている。しかしながら、本研究では Dienogest の局所作用が示され、子宮内膜症の新たな薬物療法の選択肢となる可能性が考えられた。

(二) 子宮内膜症の病態における GHRH および GHRH の SV1 受容体の関与についての検討

本研究により、子宮内膜および子宮内膜症病変における GHRH および GHRH の SV1 受容体の mRNA の発現が明らかにされた。また、PBMC において GHRH の mRNA の発現が示された。SV1 受容体の発現がある ESC において、GHRH により cAMP が産生され、BrdU 取り込み法とフローサイトリ一法にて GHRH の直接的細胞増殖亢進や細胞周期の促進誘導作用が示された。すなわち、GHRH は ESC における成長因子として作用する可能性が示唆された。同時に、SV1 受容体の発現が子宮内膜および子宮内膜病変の間で有意差をもって、子宮内膜症病変において高い発現割合を認めた。子宮内膜症病変は子宮内膜より GHRH に対して高い感受性を持つ可能性が考えられた。また、GHRH の mRNA は子宮内膜と子宮内膜症病変において発現割合が同程度に低く、PBMC における GHRH の mRNA の発現が局所因子として注目された。すなわち、子宮内膜症病変および腹腔 PBMC 由来の GHRH が局所因子として子宮内膜症の発症、病態の進展に影響を与えている可能性がと考えられた。この結果より、GHRH アンタゴニストの子宮内膜症の局所的な治療としての可能性が推測された。

【結論】

1. Dienogest の ESC に対する直接的な細胞増殖抑制効果が認められた。この増殖抑制作用は、細胞周期の G0/G1 arrest の誘導によるものと考えられた。
2. 子宮内膜症において、GHRH および GHRH の SV1 受容体 mRNA の発現が認められた。ESC における SV1 受容体を介した GHRH の作用が示唆され、GHRH による直接的細胞増殖亢進や細胞周期の促進誘導作用が示された。子宮内膜症病変および腹腔 PBMC 由来の GHRH は局所因子として子宮内膜症の発症、進展に影響を与えている可能性があると考えられた。