

厚生労働科学研究費補助金子ども家庭総合研究事業  
分担研究報告書

ライフスタイルの変化に伴う PCOS 婦人に対する生殖医療対策

分担研究者 苛原 稔 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部  
発生発達医学 教授  
研究協力者 桑原 章 徳島大学産科婦人科 講師

研究要旨

多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) は排卵誘発治療で 80 %以上が妊娠するが、OHSS や多胎妊娠の高リスク群であり、治療の成否だけでなく生活の質を考えた低侵襲性治療が必要とされる。また、女性の晩婚化に伴い卵の質低下に対応した治療を短期集中して実施する必要性が高まる一方、価値観が多様化している現在、正確な診断はリスクを回避し、PCOS 特異的な治療を選択するために重要である。診断として超音波検査と内分泌検査を詳細に検討した。画像では少なくとも一側の卵巣に 2-9mm の小卵胞が 10 個以上存在することを必須とする。男性ホルモンはテストステロン、遊離テストステロンまたはアンドロステンジオンのいずれかが有用であり、LH はスパック-S による測定の場合は  $LH \geq 7 \text{ mIU/ml}$  かつ  $LH \geq FSH$  が有用である。また内分泌検査は大きな卵胞が存在しない時期に行わないと再現性が低い。これらの診断基準を用いるとにより PCOS を正確に診断し、適切な治療法を選択することが容易となると考えられる。

A. 研究目的

不妊患者の 10-15%に認められる多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) を有する妊娠希望女性の診断と治療におけるライフスタイルの変化に伴う諸問題を検討する。PCOS は排卵誘発治療で 80 %以上が妊娠するが、OHSS や多胎妊娠の高リスク群であり、治療の成否だけでなく生活の質を考えた低侵襲性治療が必要とされる。また、女性の晩婚化に伴い卵の質低下に対応した治療を短期集中して実施する必要性が高まる一方、価値観が多様化し負担に見合う治療を検討する必要もある。

PCOS では OHSS や多胎妊娠の高リスク群であるため、ゴナドトロピン製剤

(hMG,FSH) による排卵誘発治療では排卵数を厳密にコントロールすることが難しく 3 胎以上の超多胎の発生が毎年多数報告されている。多胎妊娠は妊娠中の母体に大きな負担を与えるだけでなく、早期産、低出生体重児などのリスクも大きく、不妊症治療の増加に伴い多胎妊娠の与える医学的、医療的問題が問題ともなっている。従って、まず正確な PCOS 診断を検討し、それに従い治療方針を個別化できることは、NICU などを含めた医療資源の活用という面でもリスクを正確に診断することとなる。加えて、女性の晩婚化に伴い卵の質低下に対応した治療を短期集

中して実施する必要のある現在、患者個人のライフスタイルに合わせたリスク管理に重要と言える。

本邦における PCOS の診断は臨床所見、内分泌所見、卵巣所見の 3 項を必須項目にしているが、各基準に関して曖昧な点が含まれていると正確な診断は困難となる。臨床症状の詳細な定義、卵巣所見に関しては主に超音波診断による定義が重要である。一方、内分泌所見に関しては測定系が多様となっている現在、実際に即した検討が必要であることに加え、従来より混乱の見られる男性ホルモン値あるいは男性ホルモン過剰に基づく症状に関して何らかの基準を設ける必要があると考えられる。

よって本年度は PCOS の正確な診断に必要な基礎的データを集積し、診断基準を明確にする。

## B. 研究方法

PCOS の診断基準を検討するため、全国の生殖補助医療登録施設から得られた調査結果を基に PCOS の診断の感度、特異度を検討し今回用いるべき診断基準を検討した。結果の判定に際してホルモン測定値は測定系により正常範囲が異なるので使用した測定系に関しても検討を加えた。

倫理面への配慮: 患者および治療施設が特定されないよう調査結果には施設名、患者名や生年月日など患者が特定されうる情報を含まないよう配慮しており、問題ないと判断した。

## C. 研究結果

集められた症例を PCOS、PCOS 疑い、

その他の 3 群に分類しその患者背景を表 1 に、初診時の主訴および症状を表 2 に示す。症状は希発月経、第 1 度無月経が多く、無排卵周期症を含めた 3 種類の月経異常が大半を占めた (表 3)。

卵巣所見では PCOS のほぼ全例、PCOS 疑い群の多数が PCO パターンを示しており、PCOS 疑い群は内分泌所見 (LH 基礎値高値) を満たさないために PCOS と診断されていないものが多いと考えられた (表 4)。超音波所見における客観的基準としては小卵胞の数を採用することが有用と思われた。数える卵胞のサイズを諸外国での基準との整合性を考え 2~9mm としたところ、2~9mm の卵胞 10 個以上は感度 86%、特異度 90% に該当し、検討した中でも最大の感度が得られた判定基準であった。

内分泌検査項目で注目すべきことは、診断時に LH 基礎値高値により PCOS と診断された症例でも、管理中に LH が継続的に高値を示したのは 68.2% と再現性が高くなかったこと、また PCOS 疑い例では LH 基礎値高値例が 37.7% にとどまっていたことである (表 5)。血中 LH 基礎値の高値を判定するのに使用する指標としては、LH 値かつ LH/FSH 比が有用と考えられた。男性ホルモンに関しては過半数で総テストステロンを測定していた。男性ホルモンについては、遊離テストステロン、アンドロステンジオンはそれぞれ PCOS、PCOS 疑いの過半数の症例において高値を示し、LH で診断しきれない

PCOS 疑い例でも診断上有用であることが示唆された (表 5)。測定値が高値を示す症例の割合を検討した結果、LH 高値単独よりも、LH または男性ホルモン高値例とすれば陽性率は顕著に高くなった (表 6)。LH、テストステロン、アンドロステンジオンの 3 項目の測定値が全て揃っている症例に限り、陽性率を検討したところ、LH が測定時に正常であった症例のうちで男性ホルモン (テストステロンまたはアンドロステンジオン) が高値であった症例の割合は、PCOS で 37.3%(50/134)、PCOS 疑いで 40.6%(28/69)であった (表 7)。尚、各施設で採用されていた各ホルモン測定系は表 8 のように種々のものが含まれていた。

#### D. 考察

PCOS の診断は臨床症状、内分泌検査所見、卵巣所見から構成されているが、月経異常、卵巣の多嚢胞所見を必須項目とすることは、PCOS の疾患概念から妥当であり、加えて内分泌的な裏付けも必須とすることが診断に不可欠と考えられた。

##### 1、LH の取り扱い

PCOS と診断されてもその後 LH 高値を示す率は 68.2%と再現性が低い。また、肥満例では LH 値が低い症例が増えるため、LH の絶対値よりは LH/FSH を重視する必要があると考えられた。

##### 2、男性ホルモンの取り扱い

血中男性ホルモン値を反映した診断基準は臨床的に重要であり、諸外国の診断基準でも重視されている。しかし、本邦の PCOS 症例が男性ホルモン高値を示すこ

とは多くないため、必須とすることは混乱を招く。しかし、病態や欧米の基準等との整合性を考え男性ホルモン高値を十分条件として加えることは必要と考える。

PCOS 疑い群の約 60%は LH 値が正常であるが、LH の再検査か男性ホルモン測定を併用することにより PCOS と診断できる余地がある。すなわち PCOS 疑い群の LH 正常例のうち、40.6%はテストステロンまたはアンドロステンジオンが高いこと、LH または遊離テストステロンのいずれかが高値を示すものを PCOS とすると PCOS 疑いの 76.1%が PCOS と診断可能であることから、男性ホルモン測定と LH 測定を補完的に用いることによりさらに正確に PCOS と診断できることが考えられる。

#### E. 結論

本研究で用いる PCOS の診断基準は以下の通りである (表 9)。

1、月経異常：PCOS の月経異常は、希発月経、第 1 度無月経、無排卵周期症である。

2、卵巣所見：小卵胞 (2~9mm) のカウントを明記することとし、2~9mm の卵胞 10 個以上では感度 86%、特異度 90%に該当した。

##### 3、内分泌所見：

1) LH 値：特に採血時期を明確にした。つまり、卵胞発育がない時期に採血すること、女性ホルモン剤の服薬中を避ける。特に消退出血を起こしたり、排

卵誘発で月経を起こした場合には、10日間程度は LH 値が抑制されることにも留意が必要である。

2) 男性ホルモン：測定する男性ホルモンの種類として、テストステロン、遊離テストステロン、アンドロステンジオンを例示し、これらの卵巣由来のホルモンの測定を推奨した。

#### F. 研究発表

第54回日本生殖医学会シンポジウム  
「適切な卵巣刺激の選択 –PCOS and non-PCOS」平成21年11月22日、金沢市

G. 知的財産権の出願・登録状況なし。

表1 個別調査(症例調査)の患者背景

	PCOS 1028例	PCOS疑い 771例	その他 470例
平均年齢(歳) (平均±標準偏差)	28.1 ± 4.9	28.4 ± 5.3	28.4 ± 6.9
平均身長(cm) (平均±標準偏差)	158.1 ± 5.2	158.0 ± 5.4	157.9 ± 5.6
BMI(平均±SE) ≥ 25	23.1 ± 6.0 <sup>a</sup> 肥満例 25.9% <sup>a</sup> (266/1028)	23.3 ± 6.1 <sup>a</sup> 肥満例 24.5% <sup>a</sup> (189/771)	21.9 ± 5.8 肥満例 17.9% (84/470)
高血圧	無 89.2%(917/1028) 有 3.0% (31/1028) 不明 6.2% (64/1028)	無 86.8%(669/771) 有 3.5% (27/771) 不明 6.5% (50/771)	無 90.0%(423/470) 有 2.1% (10/470) 不明 6.0% (28/470)
糖尿病	無 88.7% (912/1028) 有 3.7% (38/1028) 不明 5.6% (58/1028)	無 81.2% (626/771) 有 3.4% (26/771) 不明 11.8% (90/771)	無 87.2% (410/470) 有 2.6% (12/470) 不明 8.3% (39/470)
高脂血症	無 78.4% (806/1028) 有 4.0% (41/1028) 不明 15.6% (160/1028)	無 65.8% (507/771) 有 3.6% (28/771) 不明 26.7% (206/771)	無 76.2% (358/470) 有 3.6% (17/470) 不明 18.3% (86/470)

<sup>a</sup>: P<0.01 vs. その他の症例

表2 初診時の主訴および症状

	PCOS	PCOS疑い	その他
月経不順	99.9% <sup>a,c</sup> (1027/1028)	96.4% <sup>b</sup> (743/771)	98.7% (463/469)
多毛	10.5% <sup>a</sup> (108/1028)	8.2% <sup>a</sup> (63/771)	3.4% (16/469)
多毛以外の男性化徴候 にきび 低声音 陰核肥大	2.5% (26/1028) 73.0% (19/26) 7.7% (2/26) 7.7% (2/26)	2.3% (18/771) 77.8% (14/18) 5.6% (1/18) 27.8% (5/18)	1.3% (6/469) 66.7% (4/6) 0.0% (0/6) 16.7% (1/6)
肥満	14.3% <sup>b,d</sup> (147/1028)	10.5% (81/771)	10.0% (47/469)
やせ	1.7% <sup>a,d</sup> (17/1028)	3.2% (25/771)	4.1% (19/469)
乳汁漏出	0.5% (5/1028)	0.4% (3/771)	0.4% (2/469)
その他	3.7% (38/1028)	4.8% (37/771)	5.8% (27/469)

a : P<0.01 vs. その他の症例

b : P<0.05 vs. その他の症例

c : P<0.01 vs. PCOS疑い

d : P<0.05 vs. PCOS疑い

表3 月経異常の程度

	PCOS	PCOS疑い	その他
月経異常を呈する症例の割合	99.9% (1027/1028)	96.4% (743/771)	98.5% (463/470)
無排卵周期症	16.8 % <sup>b,c</sup> (173/1027)	24.5 % (182/743)	21.6 % (100/463)
希発月経	44.0 % <sup>a</sup> (452/1027)	42.7 % <sup>b</sup> (317/743)	30.9 % (143/463)
第1度無月経	34.9 % <sup>a,c</sup> (358/1027)	25.6 % (190/743)	22.7 % (105/463)
第2度無月経	4.9 % <sup>c</sup> (50/1027) 重複選択:6例	6.1 % <sup>c</sup> (45/743) 重複選択:3例	24.8 % (115/463)

(一部複数選択あり)

a : P<0.01 vs. その他の症例

b : P<0.05 vs. その他の症例

c : P<0.01 vs. PCOS疑い

表4 卵巣所見

	PCOS	PCOS疑い	その他
卵巣腫大	無	無	無
	有	有	有
	不明	不明	不明
多嚢胞パターン	無	無	無
	有	有	有

a :  $P < 0.01$  vs. その他の症例

b :  $P < 0.01$  vs. PCOS疑い



表5 各種血中ホルモンの異常高値率(%)

	PCOS	PCOS疑い	その他
LH	68.2 <sup>a,b</sup> (546/801)	37.7 <sup>a</sup> (209/554)	25.0 (80/320)
LH/FSH比	74.6 <sup>a,b</sup> (592/794)	36.2 <sup>a</sup> (192/531)	17.5 (54/308)
PRL	3.9 (28/709)	4.5 (21/464)	6.7 (19/284)
テストステロン	14.3 <sup>a</sup> (105/734)	15.6 <sup>a</sup> (90/578)	6.3 (18/285)
遊離テストステロン	65.3 (94/144)	64.8 (70/108)	70.7 (29/41)
アンドロステンジオン	67.5 <sup>a,c</sup> (102/151)	53.2 (42/79)	34.3 (12/35)
DHEA	16.7 (3/18)	16.7 (1/6)	100.0 (2/2)
DHEA-S	13.1 (41/312)	11.2 (21/188)	11.9 (8/67)
エストロン	44.4 <sup>c</sup> (12/27)	13.2 (5/38)	0 (0/1)
エストロン/エストラジ オール比	100.0 <sup>b</sup> (26/26)	61.1(22/36)	

a: P<0.01 vs. その他の症例

b: P<0.01 vs. PCOS疑い

c: P<0.05 vs. PCOS疑い

表6 LH,T,Aの測定値がすべて揃っている症例における  
LHおよび男性ホルモンの測定値高値の関係

PCOS	LH		計	
	正常	異常		
T 正常, A 正常	26	15	41	
TまたはA異常	50	T 正常, A 異常	33	76
		T 異常, A 異常	10	93
		T 異常, A 正常	0	0
計	76	58	134	

PCOS疑い	LH		計	
	正常	異常		
T 正常, A 正常	25	6	31	
TまたはA異常	28	T 正常, A 異常	5	27
		T 異常, A 異常	5	38
		T 異常, A 正常	0	0
計	53	16	69	

その他	LH		計	
	正常	異常		
T 正常, A 正常	17	4	21	
TまたはA異常	5	T 正常, A 異常	2	6
		T 異常, A 異常	0	7
		T 異常, A 正常	0	0
計	22	6	28	

T: テストステロン      A: アンドロステンジオン

表7 LH高値と男性ホルモン高値の関係

	PCOS	PCOS疑い	その他
<u>LH、テストステロン、アンドロステンジオンの測定値がある症例</u>	134例	69例	28例
LH高値	43.3% (58/134)	23.2% (16/69)	21.4% (6/28)
LHまたは男性ホルモン高値	80.6% (108/134)	63.8% (44/69)	39.3% (11/28)
男性ホルモン高値 (男性ホルモン高値はテストステロン、アンドロステンジオンの少なくとも1つ。)	69.4% (93/134)	55.1% (38/69)	25.0% (7/28)
<u>LHとテストステロンの測定値がある症例</u>	713例	488例	264例
LH高値	67.7% (483/713)	36.1% (176/488)	26.5% (70/264)
LHまたはテストステロン高値	71.7% (511/713)	43.9% (214/488)	29.5% (78/264)
テストステロン高値	14.3% (102/713)	12.7% (62/488)	5.7% (15/264)
<u>LHとアンドロステンジオンの測定値がある症例</u>	145例	74例	34例
LH高値	44.5% (66/145)	23.0% (17/74)	20.6% (7/34)
LHまたはアンドロステンジオン高値	82.1% (119/145)	60.8% (45/74)	44.1% (15/34)
アンドロステンジオン高値	68.3% (99/145)	51.4% (38/74)	32.4% (11/34)
<u>LHと遊離テストステロンの測定値がある症例</u>	123例	88例	38例
LH高値	62.6% (77/123)	36.4% (32/88)	34.2% (13/38)
LHまたは遊離テストステロン高値	90.2% (111/123)	76.1% (67/88)	81.6% (31/38)
遊離テストステロン高値	63.4% (78/123)	61.4% (54/88)	68.4% (26/38)

表8 使用された測定系の一覧

LH	<p>アーキテクトLH 34.12%(577/1691)</p> <p>エクルーシス試薬LH 16.26% (275/1691)</p> <p>バイダスアッセイキットLH 12.18% (206/1691)</p> <p>Eテスト「TOSOH」II (LH II) 11.77% (199/1691)</p> <p>DPC-イムライズ LH III 9.70% (164/1691)</p> <p>スパック-S LHキット 6.68% (113/1691)</p> <p>ケミルミACS-LH II 5.56% (94/1691)</p> <p>Access2試薬LH 2.07% (35/1691)</p> <p>ルミパルスLH 1.60% (27/1691)</p> <p>エバテストLH 0.06% (1/1691)</p>	<p>エクルーシス試薬テストステロン 44.89% (723/1611)</p> <p>アーキテクトテストステロン 19.80% (319/1611)</p> <p>DPCトータルテストステロンキット 16.39% (264/1611)</p> <p>ケミルミACS-テストステロン 10.43% (168/1611)</p> <p>バイダスアッセイキットテストステロン 7.57% (122/1611)</p> <p>Access2試薬テストステロン 0.87% (14/1611)</p> <p>Eテスト「TOSOH」II (テストステロン) 0.06% (1/1611)</p>
FSH	<p>アーキテクトFSH 33.17% (551/1661)</p> <p>エクルーシス試薬FSH 16.38% (272/1661)</p> <p>バイダスアッセイキットFSH 12.40% (206/1661)</p> <p>Eテスト「TOSOH」II (FSH) 11.86% (197/1661)</p> <p>DPC-イムライズ FSH IV 9.93% (165/1661)</p> <p>スパック-S FSHキット 6.80% (113/1661)</p> <p>ケミルミACS-FSH 5.66% (94/1661)</p> <p>Access2試薬FSH 2.11% (35/1661)</p> <p>ルミパルスFSH 1.63% (27/1661)</p> <p>エバテストFSH 0.06% (1/1661)</p>	<p>DPCアンドロステンジオン 100% (275/275)</p> <p>BML自家調整試薬 85.71% (24/28)</p> <p>DPC・DHEA(販売中止) 14.29% (4/28)</p> <p>DPC・DHEA-S 99.84% (616/617)</p> <p>Access DHEA-S 0.16% (1/617)</p> <p>BML自家調整試薬 2.99% (2/67)</p> <p>帝国臓器製薬自家調整試薬 65.67% (44/67)</p> <p>シオノギ 自家調整試薬 31.34% (21/67)</p> <p>(3つとも同じ)</p>
PRL	<p>アーキテクトプロラクチン 36.85% (541/1468)</p> <p>エクルーシス試薬プロラクチン 20.03% (294/1468)</p> <p>バイダスアッセイキットプロラクチン 11.17% (164/1468)</p> <p>DPC-イムライズ プロラクチン 8.45% (124/1468)</p> <p>ケミルミACS-プロラクチン 6.95% (102/1468)</p> <p>スパック-Sプロラクチンキット 6.47% (95/1468)</p> <p>Eテスト「TOSOH」II (PRL) 5.31% (78/1468)</p> <p>Access2試薬プロラクチン 2.86% (42/1468)</p> <p>ルミパルスPRL 1.84% (27/1468)</p> <p>エバテストPRL 0.07% (1/1468)</p>	<p>エクルーシス試薬 E2 37.65% (486/1291)</p> <p>DPCイムライズ エストラジオール II 23.47% (303/1291)</p> <p>アーキテクトエストラジオール 12.55% (162/1291)</p> <p>バイダスアッセイキットエストラジオール II 10.69% (138/1291)</p> <p>Eテスト「TOSOH」II (E2) 9.22% (119/1291)</p> <p>ケミルミACS-エストラジオール6 5.81% (75/1291)</p> <p>Access2試薬エストラジオール 0.31% (4/1291)</p> <p>エバテストE2 0.31% (4/1291)</p>
テストステロン		
遊離テストステロン		
アンドロステンジオン		
DHEA		
DHEA-S		
エストロン		
エストラジオール		

## 表9 多嚢胞性卵巣症候群の診断基準

以下の1～3の全てを満たす場合を多嚢胞性卵巣症候群とする

1. 月経異常
2. 多嚢胞卵巣
3. 血中男性ホルモン高値  
または

LH基礎値高値かつFSH基礎値正常

- 注1) 月経異常は、無月経、希発月経、希発月経、無排卵周期症のいずれかとする。
- 注2) 多嚢胞卵巣は、超音波断層検査で両側卵巣に多数の小卵胞がみられ、少なくとも一方の卵巣で2-9 mmの小卵胞が10個以上存在するものとする。
- 注3) 内分泌検査は、排卵誘発薬や女性ホルモン薬を投与していない時期に、1 cm以上の卵胞が存在しないことを確認の上で行う。また、月経または消退出血から10日目までの時期は高LHの検出率が低いことに留意する。
- 注4) 男性ホルモン高値は、テストステロン、遊離テストステロンまたはアンドロステンジオンのいずれかを用い、各測定系の正常範囲上限を超えるものとする。
- 注5) LH高値の判定は、スパック-Sによる測定の場合は $LH \geq 7$  mIU/ml (正常女性の平均値+1×標準偏差)かつ $LH \geq FSH$ とし、肥満例( $BMI \geq 25$ )では $LH \geq FSH$ のみでも可とする。
- 注6) クッシング症候群、副腎酵素異常、体重減少性無月経の回復期など、本症候群と類似の病態を示すものを除外する。

子宮内膜症に関する研究

研究分担者 小林 浩 奈良県立医科大学 婦人科腫瘍学 教授

研究要旨

子宮内膜症に特異的に発現している遺伝子群をマイクロアレイ解析で検討した結果、酸化ストレス、糖代謝関連酵素、解毒機構関連タンパク、抗アポトーシス、細胞周期調節因子がパスウェイ解析で抽出された。転写因子である hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta)が最重要遺伝子として同定された。代表的 44 遺伝子のうち酸化ストレスは 4/5 を占め、病態との関連につき検討している。HNF-1beta 遺伝子をノックダウンすると細胞増殖が抑制される事が判明した。以上より、子宮内膜症の特異的発現遺伝子解析による酸化ストレス関連遺伝子発現が過剰発現する事を証明した。

A. 研究目的

卵巣チョコレート嚢胞の 0.5~1.0%が卵巣癌に移行する可能性が示唆されている(1-4)。子宮内膜症全体のがん化に関しては、高いものではその頻度は 2.5%以上との報告もあり(5)、子宮内膜症と悪性化がクローズアップされている。さらに日本では明細胞腺癌が高頻度であることも両者の因果関係を理解する上で興味深い。

我々はチョコレート嚢胞患者を前方視的に追跡調査した国内の疫学研究により、チョコレート嚢胞から 0.72%の頻度で悪性化をきたすことを報告した。チョコレート嚢胞から発生する卵巣癌は、明細胞腺癌と類内膜腺癌が主体であった。

癌化の危険因子は、45 歳以上で 6 cm 以上(そのほとんどは 9 cm 以上)の腫瘍径を有するチョコレート嚢胞であり、初診時から癌化するまでは約 5 年の歳月を有し、最初に子宮内膜症と診断されてから 10 年以上経過した。特に、チョコレート嚢胞の最大径が 10 cm 以上、閉経周辺期に増大するチョコレート嚢胞、腫瘍マーカーCA125 が増加する場合(実際には有意な上昇を示さない場合も多いので注意する)。画像診断で隆起性病変

を認めた場合、腫瘍内に血流を認めた場合などは悪性化を見逃さないようにする。Gn-RH アゴニストによるホルモン療法を実施してチョコレート嚢胞のサイズが縮小しても、将来、卵巣癌にならないことを保障するものではない。また、妊孕性温存を考慮して cystectomy することが癌化を予防できるというエビデンスは現在ない。

以上より、20 代の臨床的チョコレート嚢胞は腫瘍径が 10 cm 以上のときは悪性化を考慮し手術(oophorectomy)を勧める。妊孕性温存の場合は、cystectomy を行い迅速診断で組織を確認する。良性と判断しても、術後も定期的に悪性化を念頭において経過観察することを我々は提案してきた。

次に我々は子宮内膜症と卵巣明細胞腺癌の病態を分子生物学的手法を駆使して解明しているが、過剰発現している遺伝子として転写因子である hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta)が最重要遺伝子として同定された。この下流遺伝子を同定する事により子宮内膜症の本体に迫る事ができる。

B. 研究方法

1. 卵巣がん検診サンプルから得られた

検体を用いた臨床研究の評価を継続する。

2. Affymetrix® Human Genome U219 Array Plate を利用し、一度に 96 サンプルのハイスループットの発現プロファイリングを実施する。本アレイのデザインに用いられているシークエンスは、UniGene データベース 219 (2009 年 3 月 30 日 ビルド)、RefSeq version 36 (2009 年 7 月 13 日)、および GenBank® (2009 年 5 月 12 日ダウンロード) の完全長ヒト mRNA から選択されている。特徴は 1 サンプル当たり 36,000 以上の転写産物の遺伝子発現の測定が可能であること、さらに単一アレイプレートでの 96 サンプル処理が可能である。

子宮内膜症の臨床検体 34 症例を用いた解析である。これらの研究は当院の倫理委員会を承認を得ている。

#### 倫理面への配慮

患者から組織等を採取することに対しては、倫理委員会での承認が済んでいる。本研究にかかわる医師は個人情報保護法に基づいて、被験者の個人情報を厳格に管理する。そのため生体サンプルは連結可能匿名化をする。

### C. 研究結果

#### 1. 「卵巣がん検診」事業から得られた結果

静岡県で実施されている卵巣がん検診事業（あくまで研究的な試みである）により、17 年間に 416 例の新規発生卵巣癌患者を発見することができた。卵巣がんの組織型を漿液性腺癌と非漿液性腺癌（これには粘液性腺癌、類内膜腺癌、明細胞腺癌が含まれる）に分類して解析した結果 2)、漿液性腺癌は 1 年前の検診でその 15% のみが小さな卵巣嚢腫を指摘され経過観察されていた。換言すると、80% 以上の患者が、1 年前に卵巣腫大を認めていないことになる。一方、非漿液性腺癌は逆に、80% 以上が 1 年

前に卵巣腫大を認めていることが判明した。したがって、漿液性腺癌は 1 年以内の短期間で癌化するのに対して、非漿液性腺癌は長期間かけて癌化していることが示唆された。したがって、子宮がん検診時にエコーで卵巣を評価し、形態的に異常がなくても 1 年以内に漿液性腺癌になる可能性がある、「卵巣がん検診」という言葉は慎むべきである。

なぜ、漿液性腺癌はいきなり III 期の癌性腹膜炎を呈するのであろうか。単層の卵巣表層上皮細胞から発生した卵巣癌は卵管上皮や腹膜中皮からも同時（あるいは異時）多発的に癌化する可能性はないだろうか。発生源を同一にしたこれらの臓器に p53 の遺伝子変異が同時に起こり、その結果、卵巣や腹膜から同時に癌化して III 期の癌性腹膜炎を呈することも考えられる。

発癌には、チョコレート嚢胞から発癌する場合と、正常卵巣や腹膜上皮細胞からいきなり発癌してくる場合がある 6)。前者には明細胞腺癌や類内膜腺癌が多く、後者には漿液性腺癌が多い。また、チョコレート嚢胞を合併した卵巣癌患者は、明細胞腺癌や類内膜腺癌の発生母地と考えられ 7,8)、また早期がんや高分化型が多い 9-12) ことも知られている。明細胞腺癌や類内膜腺癌はチョコレート嚢胞から発癌するケースが多いといわれるが、その発癌遺伝子変異は同じではない。類内膜腺癌は k-ras と PTEN 変異による発癌が示唆されているが、明細胞腺癌の遺伝子異常は特定されていない。

#### 2. チョコレート嚢胞と発癌の関係

正常卵巣の表層上皮細胞は腹膜中皮細胞をその発生起源としているが、排卵後に invagination を起こし組織修復の結果、inclusion cyst を形成するようになる。上皮のマーカーである EMA と中皮のマーカーであるカルレチニンの免疫染色を行うと、この inclusion cyst の一部は環境の変化により、腹膜としての中皮の性格から上皮の性格に変化しており、

この部位の化生により子宮内膜症が発生すると考えられる。発生初期の子宮内膜症の免疫染色により過半数は上皮マーカーである EMA が染色陽性であるが、一部の子宮内膜症はカルレチニンが染色される。つまり、子宮内膜症の一部は中皮の性格を持っていると考えられる。また、明細胞腺癌の 20~30%がカルレチニン陽性で中皮の性格を有しており、他の組織型の腫瘍ではすべて上皮由来マーカーのみ陽性であったことを考えると、チョコレート嚢胞と明細胞腺癌の発生学的な共通性が推察された。

最近、HNF-1beta という転写因子が明細胞腺癌で過剰発現していることが報告されている (13,14)。この転写因子の発現を詳細に検討すると、分泌期子宮内膜(核下空胞を有する細胞)、子宮内膜症腺管上皮細胞、明細胞腺癌で良性でも悪性でも共通に発現していることが判明した。また、妊娠時のアリアスステラ反応にも局在する。つまり、HNF-1beta は明細胞腺癌への直接の発癌遺伝子ではないが、子宮内膜症からの癌化を考える上で大きな示唆に富むバイオマーカーとしての転写因子である。また、明細胞腺癌にはグリコーゲン貯留がみられるが、その原因は HNF-1beta の下流には糖代謝に関する酵素群が存在するため、gluconeogenesis, glucolysis, glucogenolysis に異常が生じてグリコーゲン貯留が起こっていると考えている。その遺伝子連鎖も同定した。グリコーゲン貯留は細胞が極めて苛酷な環境で生き続けるための手段であると考えている。HNF-1beta の遺伝子異状により若年発症の糖尿病が発生することも明細胞腺癌の発生を考える上で非常に興味がある事実である。また、HNF-1beta の下流には、解毒酵素として UGT1A1 やアネキシン A4 が過剰発現することも確認した(未発表データ)。前者は CPT-11 の解毒酵素であり、後者はパクリタキセルの解毒酵素である。これらの解毒酵素が過剰発現している限り、明細胞腺癌の

抗癌剤耐性は克服できない。将来の明細胞腺癌の治療は HNF-1beta の発現を制御する分子標的治療が最も有力であろう。さらに、明細胞腺癌にはフェリチンが過剰発現している。これも HNF-1beta の下流遺伝子産物である。なぜ、フェリチンが過剰発現しているかという点、チョコレート嚢胞内に出血すると、凝固→線溶→溶血→ヘモグロビン→ヘムとグロビン→鉄の放出となり、過剰な鉄を除去する必要があると考えられる。過剰鉄による酸化ストレスにより細胞や遺伝子 DNA が障害され、癌化へ向けて進んでいくことが報告されている (15)。

### 3. ノックダウン実験結果

子宮内膜症に特異的に発現している遺伝子群をマイクロアレイ解析で検討した結果、酸化ストレス、糖代謝関連酵素、解毒機構関連タンパク、抗アポトーシス、細胞周期調節因子がパスウェイ解析で抽出された。転写因子である hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) が最重要遺伝子として同定された。代表的 44 遺伝子のうち酸化ストレスは 4/5 を占め、病態との関連につき検討している。HNF-1beta 遺伝子をノックダウンすると細胞増殖が抑制される事が判明した。

### D. 考察

チョコレート嚢胞患者を前方視的に追跡調査した国内の疫学研究により、チョコレート嚢胞から 0.72%の頻度で悪性化をきたすことが報告された。

我々が実施した疫学研究の結果をまとめると、

①チョコレート嚢胞から発生する卵巣癌は、明細胞腺癌と類内膜腺癌が主体であった。

②癌化の危険因子は、45 歳以上で 6 cm 以上(そのほとんどは 9 cm 以上)の腫瘍径を有するチョコレート嚢胞である。

③診断されてからから癌化するまでは約 5 年の歳月を有した。



④特に、チョコレート嚢胞の最大径が10 cm 以上、閉経周辺期に増大するチョコレート嚢胞、腫瘍マーカーCA125が増加する場合(実際には有意な上昇を示さない場合も多いので注意する)、画像診断で隆起性病変を認めた場合、腫瘍内に血流を認めた場合などは悪性化が多い。

⑤Gn-RH アゴニストによるホルモン療法を実施してチョコレート嚢胞のサイズが縮小しても、将来、卵巣癌にならないことを保障するものではない。また、妊孕性温存を考慮して cystectomy することが癌化を予防できるというエビデンスは現在ない。以上より、20 代の臨床的チョコレート嚢胞は腫瘍径が10 cm 以上のときは悪性化を考慮し手術(oophorectomy)を勧める。妊孕性温存の場合は、cystectomy を行い迅速診断で組織を確認する。良性と判断しても、術後も定期的に悪性化を念頭において経過観察する。

子宮内膜症は HNF-1beta を過剰発現することにより、①グリコーゲン蓄積、②抗アポトーシス作用、③酸化ストレスによる活性酸素により解毒酵素が過剰発現する、事が判明した。

さらに、子宮内膜症に特異的に発現している遺伝子群をマイクロアレイ解析で検討した結果、酸化ストレス、糖代謝関連酵素、解毒機構関連タンパク、抗アポトーシス、細胞周期調節因子がパスウェイ解析で抽出された。転写因子である hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta)が最重要遺伝子として同定された。代表的 44 遺伝子のうち酸化ストレスは 4/5 を占め、病態との関連につき検討している。HNF-1beta 遺伝子をノックダウンすると細胞増殖が抑制される事が判明した。

以上より、子宮内膜症の特異的発現遺伝子解析による酸化ストレス関連遺伝子発現が過剰発現する事を証明した。

## E. 結論

チョコレート嚢胞内に出血すると、凝固→線溶→溶血→ヘモグロビン→ヘムとグロビン→鉄の放出となり、酸化ストレスの過剰産生により活性酸素種が産生される。

過剰鉄による酸化ストレスにより細胞や遺伝子 DNA が障害され、妊孕性の低下および癌化へ向けて進んでいくことが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Kobayashi H, Yamada Y, Kanayama S, Furukawa N, Noguchi T, Haruta S, Yoshida S, Sakata M, Sado T, Oi H. The role of iron in the pathogenesis of endometriosis. *Gynecol Endocrinol*. 2009 Jan;25(1):39-52.

Kobayashi H, Yamada Y, Kanayama S, Furukawa N, Noguchi T, Haruta S, Yoshida S, Sakata M, Sado T, Oi H. The role of hepatocyte nuclear factor-1beta in the pathogenesis of clear cell carcinoma of the ovary. *Int J Gynecol Cancer*. 2009 Apr;19(3):471-9.

### 2. 学会発表

特になし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3.その他

特になし

ミトコンドリアとストレスに関する研究

研究分担者 末岡 浩 慶應義塾大学医学部産婦人科学 准教授

研究要旨

少子化高齢化がもたらす社会構造の変化は国の社会保障制度をもゆるがす問題となり女性の社会進出や結婚年齢の上昇もその一端をなしている。社会生活の多様化の中で生殖に携わる年齢は大きく変化したにもかかわらず、生殖能は維持向上されていない実情があり、さらに、内分泌攪乱物質や種々人為的要因によって低下の危機が指摘されている。これに対し多様な生殖補助技術が発展し、重症不妊に対しても妊娠の成立を可能にしたが、高齢による生殖能低下への有効な解決策は提示されていない。卵の細胞質に着目し、酸化的リン酸化代謝機能に不可欠であるミトコンドリアに着目し、妊孕性の中で受精・胚発生に関わる卵子、および卵子に強い関わりを有する顆粒膜細胞についてミトコンドリア(mt)DNAの量的・質的分析を介して、加齢との関係の解明を試みた。卵子、顆粒膜細胞において加齢とともに mtDNA copy 数は減少し、卵子、顆粒膜細胞における mtDNA copy 数は妊孕性に大きく影響を与えていることが示唆された

A. 研究目的

加齢に伴い、妊娠率が低下する事実がある。卵の細胞質に着目し細胞質移植法というドナーの細胞質をレシピエント卵に注入することにより細胞質機能が改善され、妊娠が報告されている。加齢とともに細胞質変化を起こすが、常に生体内では活性酸素が発生しており、これが細胞に障害を与える。加齢とともに superoxide dismutase (SOD) 活性が低下するため、細胞質内で生じる活性酸素が細胞に障害を与え、変化を起こすことが示唆されている。その活性酸素の約90%が細胞質内のミトコンドリアの中で発生することが推定されており、ミトコンドリア機能の低下によって酸化的リン酸化機能低下から ATP 産生が低下し妊孕性の低下を来す。酸化的リン酸化代謝機能に不可欠であるミトコンドリアに着目し、妊孕性の中で受精・胚発生に関わる卵子、および卵子に強い関わりを有する顆粒膜細胞についてミトコン

ドリア(mt)DNAの量的・質的分析を介して、加齢との関係を解明し、妊孕性改善等に有用な基礎データを集積することを目的とした。mtDNAの代表的な変異として、point mutation では ATPase6 領域 8993 位の T から G への点変異（以下 T8993G）、また deletion では ATPase6 領域の 4,977bp の deletion が報告されていることから、この変異を質的評価した。

B. 研究方法

《対象》2005年8月から2009年12月まで当院当科で行われた IVF で廃棄される未受精卵、分割異常胚、顆粒膜細胞についてインフォームド・コンセントを得て検体とした。1)未受精卵および未分割胚 (n=30) (31~44歳) 受精後48時間目で分割が認められないもの。2)2 cell 以上の分割胚 (n=13) (32~47歳) 受精後48~72時間目で Veeck 分類 grade III ~ IV のもの。3)顆粒膜細胞 (n=22) (31~45歳) 卵

に付着していた顆粒膜細胞, (IVF でヒアルロニダーゼ処理し, 廃棄された卵丘細胞)。

#### 4)変性卵 (n=4) (41歳)

年齢と受精能・胚発生能との関わり、顆粒膜細胞の mtDNA との関係について解明した。

##### 《顆粒膜細胞, 卵子の preparation》

未受精卵、異常分割胚、顆粒膜細胞それぞれ、セルバンカーに入った状態で一時凍結保存し、PBS で遠心、洗浄した。顆粒膜細胞は PBS で遠心、洗浄後、カウンティングチェンバー (Burker-Turk 式血球計算板) を用いて濃度計算を行った。卵子との mtDNA レベルに合わせるため、顆粒膜細胞 100 個分を基準として用いた。サンプルを cell lysis buffer(0.2 % sarcosyl + 10mM の EDTA 添加 TE buffer) 4 $\mu$ l の入ったマイクロチューブに注入し、100 細胞/ $\mu$ l となるように希釈した。これを 1 $\mu$ l ずつ real time PCR マイクロチューブに入れ、反応液を 24  $\mu$ l ずつ加えて real time PCR で分析を行った。

##### 《受精卵, 異常分割胚, 顆粒膜細胞における mtDNA の量的評価》

卵子、顆粒膜細胞の量的評価は、mtDNA を 1 細胞中に 9100copy 含むヒトリンパ球由来の細胞株 (ATCC, 143B; bone, osteocarcinoma: CRL-8393) を PBS で洗浄した後、顕微鏡下でカウンティングチェンバーを用いて細胞濃度を測定し、精製水で希釈して、各コピー数の異なる希釈系を作成。これらを 1 $\mu$ l ずつマイクロチューブにとり、反応液を加えて real time PCR で増幅させた。対応するプライマーと TaqMan® 蛍光プローブを作成し、ABI PRISM 7000 を用いて TaqMan® real time PCR を施行した。データの解析には縦軸にサイクル数での蛍光強度と base line での蛍光強度の差をとり、横軸にそのサイクル数をとったグラフを作成した。このグラフの指数関数的に増幅する領域の中央に

threshold line を 0.11 と定め、検量線を作成。その検量線もとに顆粒膜細胞、卵子の mtDNA copy 数を定量した。

##### 《T8993G 点変異 mtDNA の検出方法》

T8993G 点変異 mtDNA の検出法は、45% の heteroplasmy 率をもつ Leigh 脳症保因者由来の B 細胞株を作製し、株化したリンパ球より抽出した DNA を使用し、mtDNA を単一細胞 DNA レベルの 1pg/ $\mu$ l に濃度調整を行い、mutation 比率が 0~100% の希釈系を作製。対応するプライマーと TaqMan® 蛍光プローブを作成し、real time PCR を施行。threshold line を 0.11 と定め、検量線を作成。その検量線もとに顆粒膜細胞、卵子の T8993G 点変異 mtDNA の存在を確認した。

##### 《4,977bp deletion mtDNA の検出方法》

4,977bp deletion mtDNA の検出法は、野生型および 4,977bp deletion (8483~13459) の各 mtDNA プラスミドを作製し、mtDNA を単一細胞 DNA レベルの 1pg/ $\mu$ l に濃度調整を行い、deletion 比率 0%~100% の各希釈系を作成した。対応するプライマーと TaqMan® 蛍光プローブを作成し、real time PCR を施行。threshold line を 0.11 と定め、検量線を作成した。その検量線をもとに顆粒膜細胞、卵子の 4,977bp deletion の存在を確認した。

## C. 研究結果

### 《未受精卵, 未分割胚の mtDNA copy 数》

最少 copy 数で 231,530, 最多で 1,037,653 と copy 数にばらつきを認めた。また同一人物における未受精卵内でも 580,510 から 722,346 と mtDNA copy 数に大きな幅が認めることが示された。卵巣において 40 歳以上で deletion が増加する報告から、40 歳未満の群と 40 歳以上群とに分け、比較した。

未受精卵、未分割胚では mtDNA copy 数は、40 歳未満群 (n=15、平均  $\pm$  SE

686,224 ±43,973 copy)と比較したところ、40歳以上群(n=15、553,639 ±46,814 copy)において有意に減少を認めた(p=0.048)。

#### 《分割胚の mtDNA copy 数》

分割胚は有意差は認めないものの、40歳未満群(n=4、平均±SE 619,795 ±57,416copy)と比較し、40歳以上群(n=9、599,217 ±88,441 copy)において mtDNA copy 数は減少傾向を示した。

未受精卵、未分割胚の mtDNA copy 数平均値と分割胚の mtDNA copy 数平均値の間に有意差は認めなかった。

#### 《顆粒膜細胞の mtDNA copy 数》

顆粒膜細胞も加齢にて質の低下がみられるという報告があり顆粒膜細胞の100個あたりの mtDNA copy 数を40歳未満の群と40歳以上の群の2群間を比較した。

40歳未満(n=3)平均±SE 652,745±128,431 40歳以上(n=19)平均±SE 490,279±33,297 有意差は認めないものの40歳以上の群で減少傾向を認めた。

#### 《変性卵の mtDNA copy 数》

変性卵(n=4)の平均は177,194 ±35,122 copyであった。変性卵の全てが40歳以上であることから、40歳以上の未受精卵、未分割胚、分割胚(n=24)の平均(570,731 ±43,303copy)と比較したところ、著しい mtDNA copy 数の減少を確認した(p<0.0001)。

#### 《T8993G点変異、4,977bp deletionの検出》

全ての検体においてT8993G点変異、ならびに4,977bp deletionは今回検出されなかった。

### D. 考察

ミトコンドリアの機能は oocyte の quality に強く関わっており、受精や胚の成長に重要な役割を果たしているといわれている。

ミトコンドリアは、細胞内小器官としてヒトの着床前の胚の23%を占めている

といわれている。ミトコンドリアは adenosine diphosphate が adenosine triphosphate に変化させる酸化リン酸化に重要な器官である。卵細胞内の ATP 活性の状況が着床や胚の発育の障害の原因になると考えられている。mtDNA に deletion や点変異が存在すると、free radicals clearance が低下し、mtDNA の酸化損傷の結果である 8-hydroxyguanosine の蓄積を認める。mtDNA の酸化損傷は呼吸鎖蛋白の合成障害を引き起こし、活性酸素の産生増大や新たな mtDNA の変異を引き起こす悪循環が生まれる。それにより細胞が障害され、着床障害の原因となると考えられている。また mtDNA が変異すると ATP の産生が低下し、減数分裂時の紡錘体の形成異常をきたし、aneuploidy の原因となり着床障害の原因となると考えられている。

しかしこれは mtDNA の変異に限らず、量的な問題も同様と考えられる。mtDNA 量の減少により ATP の産生が低下し、着床障害の原因となることが示唆される。

我々は未受精卵、未分割胚において、mtDNA copy 数は、40歳未満群と比較して、40歳以上で有意に減少を認めた。

加齢とともに mtDNA の量が減少することで ATP の産生が低下し、結果として妊孕性が低下する原因の1つになりうることを示唆された。また、変性を起こしている卵においては mtDNA コピー数が低下することが示され、卵の質の低下は mtDNA copy 数減少と関連があることが示唆された。顆粒膜細胞も加齢にて質の低下がみられるという報告があるが本研究においても顆粒膜細胞の100個あたりの mtDNA copy 数を40歳未満の群と40歳以上の群で、有意差は認めないものの減少傾向を認めた。

多くの研究で顆粒膜細胞は卵子の成熟、初期胚発生に寄与し、受精率、妊娠率に影響を及ぼすことが示されているが、こ