

厚生労働科学研究費補助金(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)  
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

研究分担者 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低刺激排卵誘発により副作用を軽減しつつ、より確実に治療を行うために、各治療法の成績、長所、短所を明らかにすることで症例別の治療法選択が可能となる。PCOS 症例に低刺激排卵誘発を行い、排卵率は 70%、周期あたり妊娠率は 10%、流産率は 25%であった。刺激開始から排卵に至るまでの治療に要した日数は約 14 日、多胎率は 9%、卵巣過剰刺激症候群の発生は認めなかった。まずクロミフェン療法を行い、無効症例はメトフォルミン＋クロミフェン併用療法あるいは低用量 FSH 療法を行うことが推奨された。治療中の妊娠は 6 回目までに限られるので、そのような症例には腹腔鏡、ART などの治療を考慮する必要があると考えられた。

A. 研究目的

多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) は不妊患者の 10-15%に認められる比較的多い病態である。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るため、ゴナドトロピン製剤 (hMG, FSH) は相対的禁忌とされている。事実、ゴナドトロピン製剤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、PCOS 症例を多数含む 3 胎以上の超多胎の発生が毎年報告さ

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が周産期医療に与える負担が社会的問題ともなっている。

正確な PCOS 診断基準と患者の特徴に基づき治療方針を個別化できることは、価値観が多様化し肉体的、精神的負担を今まで以上に避けたいと望む現在の不妊女性に対して治療の利点、問題点を詳

細に説明するために重要である。また、女性の晩婚化に伴う卵の質低下に対応した治療を短期集中して実施する場合には、患者個人のライフスタイルに合わせたリスク管理に最も重要と言える。

本年度は本邦における PCOS の診断基準に加えて、昨年度検討した詳細な条件を満たす PCOS に対して従来から行われているゴナドトロピン療法では無い治療方法を適応し、その治療効果と各々の利点、問題点を明らかにし、多彩なライフスタイルや患者の高齢化を前提としている現在の PCOS 患者に対する治療に有用な知見を得ることを目的とした。

## B. 研究方法

昨年の研究により詳細が示された PCOS の診断基準(表 1)に該当する PCOS 症例に対し、現在までに有用性が示唆されている内服治療および副作用軽減を主たる目的とする低刺激ゴナドトロピン療法を行い、その臨床結果、治療に必要な日数、症例あたりの累計妊娠率などを検討した。

倫理面への配慮：治療、調査においては患者名や生年月日など患者が特定される情報を含まないよう匿名化したうえで治療内容、結果を回収するよう配慮しており、問題ないと判断される。

## C. 研究結果

集められた PCOS 症例は 74 症例、治療周期数は 410 周期、妊娠数は 44 例であった。排卵率は 73.4%、周期あたり妊娠率は 10.7%、流産率は 25.0%(11/44)

であった。患者の負担として最も影響を与えるのは治療に要した日数と副作用の発生率であるが、今回の検討では刺激開始から排卵に至るまでの治療に要した日数は  $14.0 \pm 5.3$  日、多胎率は 9.1%(44/410)、卵巣過剰刺激症候群(OHSS)の発生は認めなかった。

治療法(図 1)としてはまずクロミフェン単独療法を行うこととし、クロミフェン無効症例に対してはメトフォルミン+クロミフェン併用療法あるいは低用量 FSH 療法を行った。一部同意が得られた症例に対しては FSH-GnRH pulse 療法を行っている。各治療法別の成績を表 2 に示す。メトフォルミン+クロミフェン併用療法では、排卵率、妊娠率は低いものの 100%が単一卵胞発育であった。排卵に要した日数は最も長い、実際に通院を要する日数はクロミフェン療法と同等であった。低用量 FSH 療法はクロミフェン単独療法と同等の排卵率、妊娠率が得られた。治療に要した日数も同等であった。妊娠率は高いものの、多胎率も高いこと、流産率も今回の検討の中では高いことが示された。FSH-GnRH pulse 療法は最も治療に要した日数が短く、妊娠率も高く、多胎妊娠も認める事は少ないため有用性は高い。

治療周期の大半を占めているクロミフェン単独および低用量 FSH 治療経過中の累積妊娠率を図 2 に示す。クロミフェン単独(32.0%)に比べて低用量 FSH での累積妊娠率は 48.9%と高い傾向にある。いずれの治療でも治療 5 回目までは周期ごとの追加妊娠例を認めているが、

6 周期以降の妊娠例は少なく、特にクロミフェン単独療法では 6 周期以降の妊娠例を認めなかった。

クロミフェン単独療法で妊娠した症例と妊娠しなかった症例の患者背景を検討したが、明らかな差を認めなかった(表 3)。一方、低用量 FSH 療法において妊娠した症例と妊娠しなかった症例の患者背景を検討したところ、年齢、BMI、男性ホルモン値に明らかな差を認めた(表 4)

#### D. 考察

今回、診断基準を満たす PCOS に対するクロミフェン療法、メトフォルミン+クロミフェン併用療法、低用量 FSH 療法、FSH-GnRH pulse 療法の臨床的特徴が明らかになり、治療日数や副作用発生率、累積妊娠率等を含め患者のライフスタイルに合わ治療方法を選択する指標が示された。PCOS に対する排卵誘発治療として排卵率 73.4%、周期あたり妊娠率 10.7%と満足できる結果であったが、流産率 25.0%、多胎率 9.1%と一般排卵障害症例より高い流産率、多胎率であり、PCOS に対する治療は注意が今後も必要と考えられた。治療に要する日数は約 2 週間を要するため、患者への説明と、場合によって消退出血を起こす時期を考慮し、多忙な時期や曜日に治療を避ける対策が重要と思われた。OHSS の発生が危惧される多数の卵胞発育時に hCG 投与基準を遵守するなどの予防策が徹底されたこともあり、OHSS の発生は無かった。治療開始前に hCG 投与キャンセルの可

能性を十分説明しておくことで、OHSS 発生に伴う入院や治療脱落を防ぐことは患者のライフスタイルを守る観点からも今後重要と考えられた。

メトフォルミン+クロミフェン併用療法は多胎率が低い可能性が示唆される。メトフォルミン+クロミフェン併用療法は治療に要した日数が平均で 17 日と最も長い、通院を要する日数はそれほどではないので、クロミフェン無効例に重要な選択肢であると考えられた。FSH-GnRH pulse 療法は注射用ポンプを装着する必要があること、保健診療適応外であることから実施に困難を伴うが治療に要する期間も短く、症例によっては適した治療となる可能性が示唆された。

クロミフェン療法、低用量 FSH 療法を比較すると、周期あたり妊娠率、累積妊娠率ともに低用量 FSH 療法が高いが、治療に要するコストを考慮するとクロミフェン療法にもメリットはあり、症例事での選択が重要である。ただし低用量とはいえ FSH 療法でのみ多胎が発生しているので、十分な説明が必要である。さらに、累計妊娠をみると 6 周期を越えて妊娠する症例は限られており、6 周期以降の治療では ART や腹腔鏡手術など、より負担の大きい選択肢を考慮し説明する必要がある。さらに FSH 療法での妊娠例、非妊娠例の比較検討ではアンドロゲン値が高く、肥満傾向にある症例ほど妊娠しないことが明らかであり、これらの症例では排卵誘発に加えて減量指導などが重要である可能性が示唆された。

#### E. 結論

PCOS 症例に低刺激排卵誘発を行い、排卵率は70%、周期あたり妊娠率は10%、流産率は25%であった。刺激開始から排卵に至るまでの治療に要した日数は約14日、多胎率は9%、卵巢過剰刺激症候群の発生は認めなかった。まずクロミフェン療法を行い、無効症例はメトホルミン＋クロミフェン併用療法あるいは低用量FSH療法を行うことが推奨された。治療中の妊娠は6回目までに限られるので、そのような症例には腹腔鏡、ARTなどの治療を考慮する必要がある。

#### F. 研究発表

なし。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



表 1 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

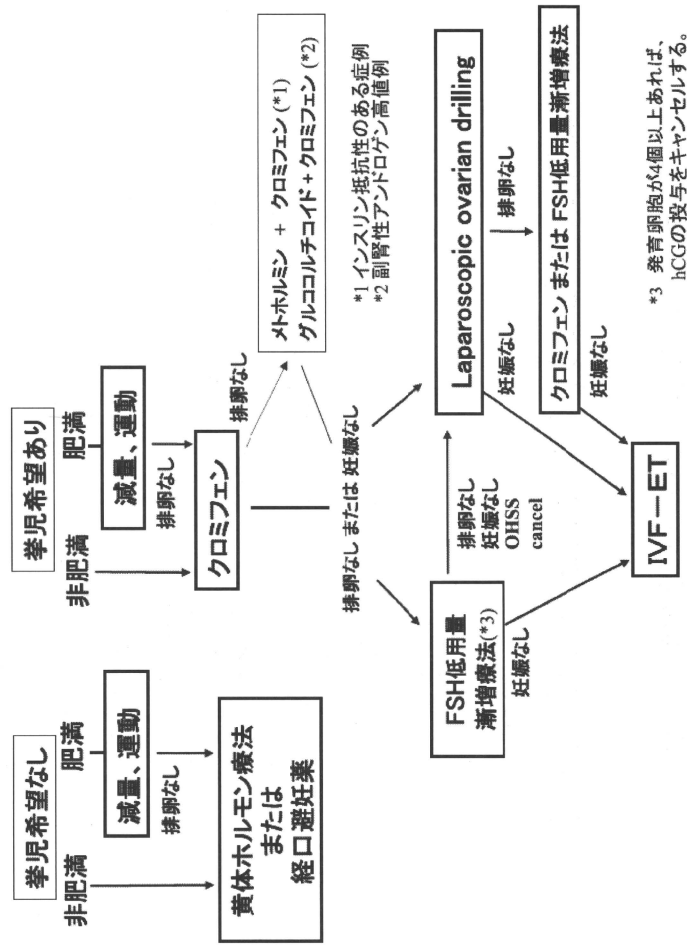
2. 多嚢胞卵巣

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、無排卵周期症のいずれかとする。  
注2) 多嚢胞卵巣は、超音波断層検査で高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、スバック-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。  
その他の測定系による場合は、スバック-Sとの相関を考慮して判定する。  
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。

# 図1 PCOS排卵障害の治療法



\*1 インスリン抵抗性のある症例  
\*2 副腎性アンドロゲン高値例

\*3 発育卵胞が4個以上あれば、  
hCGの投与をキャンセルする。

表2 多嚢胞性卵巣症候群の治療成績

	全症例	クロミフェン	外ホルモン/クロモニエン	低用量FSH	FSH-GnRH pulse	その他
患者数	74	50	18	45	7	5
周期数	410	186	40	161	7	16
排卵に要した日数	14.0±5.3	13.6±4.9	17.2±5.2	13.8±5.2	9.7±2.4	18.5±8.3
排卵率	73.4% (301/410)	71.0% (132/186)	42.5% (17/40)	87.6% (141/161)	100% (7/7)	25.0% (4/16)
発育周期の卵胞数	1.3±0.7(1-5)	1.2±0.5(1-4)	1.1±0.3(1-2)	1.4±0.8(1-5)	2.4±0.8(1-3)	1.0±0.0(1)
単一卵胞発育率 (全周期中)	54.4% (223/410)	53.8% (100/186)	42.5% (17/40)	62.7% (101/161)	14.3% (1/7)	66.7% (4/16)
単一卵胞発育率 (排卵周期中)	74.0% (223/301)	75.8% (100/132)	100% (17/17)	71.6% (101/141)	14.3% (1/7)	100% (4/4)
累積妊娠率	59.5% (44/74)	32.0% (16/50)	16.7% (3/18)	48.9% (22/45)	28.6% (2/7)	20% (1/5)
妊娠率 (周期あたり)	10.7% (44/410)	8.6% (16/186)	7.5% (3/40)	13.7% (22/161)	28.6% (2/7)	6.3% (1/16)
妊娠率 (排卵周期あたり)	14.6% (44/301)	12.1% (16/132)	17.6% (3/17)	15.6% (22/141)	28.6% (2/7)	25% (1/4)
多胎率	9.1% (4/44)	0% (0/16)	0% (0/3)	18.2% (4/22)	0% (0/2)	0% (0/4)
流産率	25.0% (11/44)	18.8% (3/16)	0% (0/3)	31.8% (7/22)	0% (0/2)	100% (1/1)
OHSS	0%	0%	0%	0%	0%	0%

# 図2 PCOS治療中の累積妊娠率

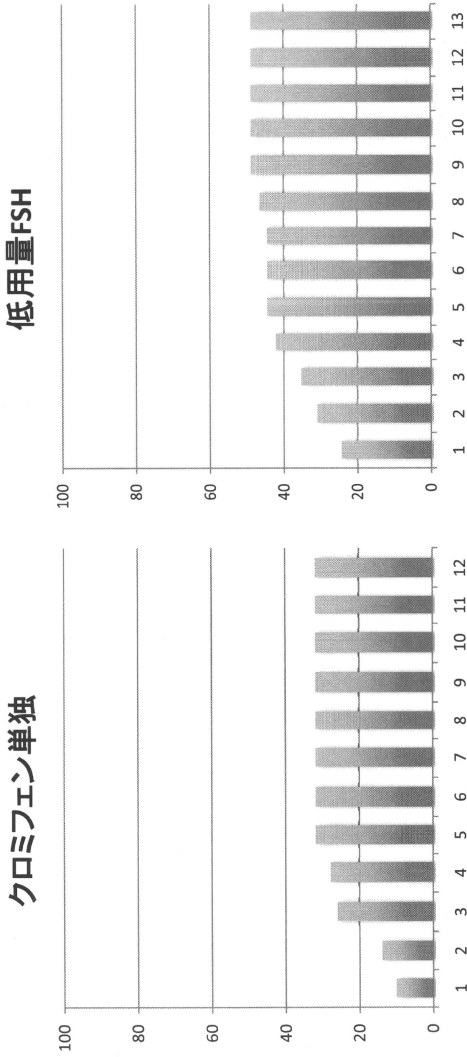


表3. クロミフェンによる妊娠症例と非妊娠症例の背景の比較

	全症例	妊娠例	非妊娠例	P値 (妊娠vs非妊娠)
年齢	29.2±3.9	27.7±3.8	29.9±3.8	0.053
過去の妊娠回数	0.7±0.8	0.9±0.8	0.6±0.9	0.079
不妊期間(月)	19.6±14.5	19.9±14.2	19.5±14.8	0.93
無月経の割合	24.0% (12/50)	31.3% (5/16)	20.6% (7/34)	0.41
BMI	24.4±6.5	22.7±3.1	25.1±7.5	0.85
LH	8.8±4.1	10.3±4.9	8.2±3.6	0.095
FSH	7.5±1.6	7.5±1.5	7.5±1.7	0.86
T	0.4±0.2	0.3±0.2	0.4±0.2	0.11
Free T	1.3±1.0	1.2±0.6	1.4±1.1	0.60
DHEA	4.2±1.9	4.0±1.1	4.2±2.2	0.71
AN	2.3±0.7	2.3±0.6	2.2±0.8	0.69

表4. 低用量FSHによる妊娠症例と非妊娠症例の背景の比較

	全症例	妊娠例	非妊娠例	P値(妊娠vs非妊娠)
年齢	29.3±3.1	30.5±1.7	28.2±3.7	0.011
過去の妊娠回数	0.7±1.1	0.7±0.9	0.7±1.2	0.86
不妊期間(月)	18.3±15.9	16.1±10.8	20.5±19.5	0.38
無月経の割合	31.1%(14/45)	36.4%(8/22)	26.1%(6/23)	0.46
BMI	23.5±6.4	21.6±4.7	25.3±7.3	0.021
LH	9.0±4.7	9.4±4.6	8.6±4.8	0.54
FSH	7.4±1.6	7.4±1.7	7.5±1.5	0.78
T	0.4±0.2	0.3±0.2	0.5±0.2	0.016
Free T	1.3±1.1	0.9±0.4	1.6±1.3	0.066
DHEA	4.2±2.1	3.3±0.9	4.8±2.5	0.054
AN	2.1±0.8	1.8±0.8	2.4±0.8	0.013

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 産婦人科 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として、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。代表的 44 遺伝子のうち酸化ストレスは 4/5 を占め、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。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。過剰な酸化ストレスに対する解毒機構の破綻、すなわち stress-resistance な状態から stress-response な状態に移行することががん化の引き金になる可能性が示唆された。

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ことが示唆されている(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)。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ことができる。

今回の検討では、子宮内膜症で過剰発現している酸化ストレスと解毒機構及びそのバランスの破綻が自然炎症の破綻、すなわちがん化と密接に関連しているこ

とを報告する。

## B. 研究方法

### 1. 臨床的・疫学的検討の継続

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および疫学研究を継続する。

### 2. 子宮内膜症およびそのがん化に及ぼし遺伝子変異の関与

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。

### 3. 子宮内膜所、内膜症合併卵巣癌における EMA, Calretinin, HNF-1beta の免疫染色

組織発生を確認するために上皮系マーカー-EMA、中皮由来マーカー-Calretinin および明細胞腺癌特異的転写因子である HNF-1beta を免疫染色し、子宮内膜症の組織学的発生を検討した。

### 4. 子宮内膜症の進展と自然炎症の破綻に関する研究

子宮内膜症に過剰発現している TLR および RAGE とそのリガンドの関連性を検討する。解毒機構が酸化ストレスを上回っている場合は stress-resistance であり、その逆に解毒機構の破綻により酸化ストレス過剰で自然炎症の破綻を呈した状態を stress-response と定義した。マイクロアレイ、RT-PCR、ウエスタンブロッ

ットおよび免疫染色により解析した。

## 5. 組織検体

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

## 6. 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

静岡県で実施されたいわゆる卵巣がん検診事業により、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ので、「卵巣がん検診」という言葉は慎むべきである。

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<sup>7, 8)</sup>、また早期がんと高分化型が多い<sup>9-12)</sup>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が最近ARID1Aの遺伝子変異が推定されている。

## 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calretinin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calretinin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calretinin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<sup>13, 14)</sup>。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, glycolysis, glycogenolysis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の遺伝子異常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。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と、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<sup>15)</sup>。

## 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 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。G2/M arrest に関与する遺伝子の動態に着目して更なる検討を行っているところである。

#### 4. 子宮内膜症の進展と自然炎症の破綻

子宮内膜症に過剰発現している TLR および RAGE とそのリガンドの関連性を検討した結果、図 1 のようなシグナル伝達経路を抽出することができた。外的要因である LPS や iron により酸化ストレスが誘導される。さらに内因性リガンドである HSP, S100, Fibronectin, ox-LDL などの Danger signal が病態形成に重要であった。結局ほとんどのシグナルは NF-kappaB を介して悪循環することにより内膜症の進展に関与していることを発見した。解毒機構が酸化ストレスを上回っている stress-resistance な状態から、解毒機構の破綻により酸化ストレス過剰で自然炎症の破綻を呈した stress-response への移行が子宮内膜症の進展、ひいてはがん化に密接に関与していると考えられる 16)。

図 1 子宮内膜症と自然炎症

#### 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を報告した。我々が実施下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診断されてから癌化するまでは約 5 年の歳月を有した。初診時から追跡できた症例では 10 年以上の歳月を経てがん化していた。

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ある)、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。

今回の基礎的解析により、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 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。

HNF-1beta だけでは発がんしないが、これに TLR, RAGE およびそのリガンドが関与した自然炎症の破綻が加わることでより子宮内膜症の病態進展ならびにがん化に向かうことが推定された。この自然炎症の破綻により stress-resistance な状態から stress-response な状態に変化することが確認できた。

以上より、子宮内膜症の特異的発現遺伝子解析により以下の仮説を提案する。

1) 子宮内膜症嚢胞内の出血に含まれる鉄による刺激により、酸化ストレス関連遺伝子発現が過剰発現する。

2) 同時に過剰な酸化ストレスを防御するために解毒遺伝子も過剰発現する。通常は解毒機構が酸化ストレスを上回っているため急激な病態の進展を抑制している。

3) TLR, RAGE およびそのリガンドの過剰発現により病態形成に自然炎症が関与している。自然炎症の破綻、すなわち病態の進展とともに酸化ストレスが解毒機構を凌駕すると慢性炎症の持続によりがん化に向かう。

## 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自然炎症の破綻が起こる。過剰鉄による持続的酸化ストレスにより慢性炎症が起こり、細胞や遺伝子 DNA が障害され、妊孕性の低下およびがん化へ向けて進展していくことが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Kuk C, Gunawardana CG, Soosaipillai A, Kobayashi H, Li L, Zheng Y, Diamandis EP. Nidogen-2: A new serum biomarker for ovarian cancer. Clin Biochem. 2010

Mar;43(4-5):355-61.

Kobayashi H. Screening, epidemiology, molecular biology, and treatment strategies for endometriosis-associated ovarian cancer. Reprod. Med. Biol. 2010; 9 (1): 17-22.

Yaguchi C, Oi H, Kobayashi H, Miura K, Kanayama N. A case of intravenous leiomyomatosis with high levels of hyaluronan. J. Obstet. Gynaecol. Res. 2010; 36(2): 454-458.

Shigetomi H, Onogi A, Kajiwarra H, Yoshida S, Furukawa N, Haruta S, Tanase Y, Kanayama S, Noguchi T, Yamada Y, Oi H, Kobayashi H. Anti-inflammatory actions of serine protease inhibitors containing the Kunitz domain. Inflamm Res. 2010 Sep;59(9):679-87.

Oi H, Naruse K, Noguchi T, Sado T, Kimura S, Kanayama N, Terao T, Kobayashi H. Fatal Factors of Clinical Manifestations and Laboratory Testing in Patients with Amniotic Fluid Embolism. Gynecol Obstet Invest. 2010 Apr 24;70(2):138-144.

Kajihara H, Yamada Y, Kanayama S, Furukawa N, Noguchi T, Haruta S, Yoshida S, Sado T, Oi H, Kobayashi H. Clear cell carcinoma of the ovary: potential pathogenic mechanisms (Review). Oncol Rep. 2010 May;23(5):1193-203.

Inoue S, Abe R, Kawaguchi M, Kobayashi H, Furuya H. Beta blocker infusion decreases the magnitude of core hypothermia after anesthesia induction. Minerva Anesthesiol. 2010

Sep 13.

Inoue S, Abe R, Kawaguchi M, Kobayashi H, Furuya H. Metoclopramide does not prolong duration of action of landiolol attenuating the hemodynamic response to induction of anesthesia and tracheal intubation. *J Anesth.* 2010 Aug;24(4):649-52.

Yamada Y, Shigetomi H, Onogi A, Haruta S, Kawaguchi R, Yoshida S, Furukawa N, Nagai A, Tanase Y, Tsunemi T, Oi H, Kobayashi H. New insights into pattern recognition receptors and their ligands in gynecologic pathologies. *Hum Immunol.* 2010 Dec 15.

Sado T, Kitanaka T, Naruse K, Oi H, Noguchi T, Yoshida S, Kajihara H, Shigetomi H, Onogi A, Kobayashi H. Anticytokine Therapy in Preterm Labor: Current Knowledge and Future Perspectives. *Gynecol Obstet Invest.* 2010 Dec 15;71(1):1-10.

Noguchi T, Sado T, Naruse K, Shigetomi H, Onogi A, Haruta S, Kawaguchi R, Nagai A, Tanase Y, Yoshida S, Kitanaka T, Oi H, Kobayashi H. Evidence for activation of Toll-like receptor and receptor for advanced glycation end products in preterm birth. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:490406.

Mizutani S, Wright J, Kobayashi H. A new approach regarding the treatment of preeclampsia and preterm labor. *Life Sci.* 2011 Jan 3;88(1-2):17-23. Epub 2010 Oct 27.

Mizutani S, Wright JW, Kobayashi H. Placental Leucine Aminopeptidase- and Aminopeptidase A- Deficient Mice Offer Insight concerning the Mechanisms

Underlying Preterm Labor and Preeclampsia. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:286947. Epub 2010 Dec 6.

Kajihara H, Yamada Y, Kanayama S, Furukawa N, Noguchi T, Haruta S, Yoshida S, Sado T, Oi H, Kobayashi H. New insights into the pathophysiology of endometriosis: from chronic inflammation to danger signal. *Gynecol Endocrinol.* 2011 Feb;27(2):73-9.

## 2. 学会発表

Shigetomi H, Yoshizawa Y, Yamada Y, Kawaguchi R, Yoshida S, Furukawa N, Oi H, Kobayashi H. Investigation into the biological functions of Hepatocyte Nuclear Factor-1beta in the clear cell adenocarcinoma of ovary(Poster) The First Asian Conference on Endometriosis Shanghai China October15-17 2010

小林 浩.「子宮内膜症の癌化とその取扱い」第15回きたの産婦人科セミナー 大阪 2010年1月30日

小林 浩.「子宮内膜症の癌化とその取扱い」第24回武庫川産婦人科セミナー 西宮 2010年2月13日

小林 浩.子宮内膜症の癌化とその取り扱いについて 第2回熊本エンドメトリオーシス研究会 熊本 2010年5月7日

小林 浩.子宮内膜症発がんの分子メカニズム 第2回文京子宮内膜症カンファレンス 東京 2010年7月22日

小林 浩.子宮内膜症の癌化とその機序 第12回婦人科臨床腫瘍研究会 千葉 2010年11月19日

小林 浩.子宮内膜症の癌化を見逃さないコツ 尼崎市産婦人科医学会学術講演会 尼崎 2010年11月27日

小林 浩, 梶原宏貴, 重富洋志, 吉澤順子, 山田嘉彦. 子宮内膜症の癌化・疫学と自然史 第31回日本エンドメトリオーシス学会 2010年1月16-17日

重富洋志, 吉澤順子, 山田嘉彦, 川口龍二, 吉田昭三, 古川直人, 大井豪一, 小林 浩, 島田啓司. 卵巣明細胞腺癌における転写因子HNF-1betaのターゲット遺伝子の網羅的検索 第31回日本エンドメトリオーシス学会 2010年1月16-17日

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

参考文献

1. Brinton LA, Sakoda LC, Sherman ME, Frederiksen K, Kjaer SK, Graubard BI, Olsen JH, Møller L. Relationship of benign gynecologic diseases to subsequent risk of ovarian and uterine tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Dec;14(12):2929-35.

2. 小林 浩 卵巣チョコレート嚢胞と癌化 日本産科婦人科学会雑誌 57(9); N351-N355, 2005.

3. 小西郁生、伊東和子、堀内晶子 内膜症を母地とする卵巣癌の特徴と予後 臨床婦人科産科 60(2): 134-139, 2006.

4. Kobayashi H, Sumimoto K, Moniwa N, Imai M, Takakura K, Kuromaki T, Morioka E, Arisawa K, Terao T. Risk of

developing ovarian cancer among women with ovarian endometrioma: a cohort study in Shizuoka, Japan. *Int J Gynecol Cancer.* 2007;17:37-43.

5. Van Gorp T, Amant F, Neven P, Vergote I, Moerman P. Endometriosis and the development of malignant tumours of the pelvis. A review of literature. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004 Apr;18(2):349-71.

6. Horiuchi A, Itoh K, Shimizu M, Nakai I, Yamazaki T, Kimura K, Suzuki A, Shiozawa I, Ueda N, Konishi I. Toward understanding the natural history of ovarian carcinoma development: a clinicopathological approach. *Gynecol Oncol.* 2003 Mar;88(3):309-17.

7. 小畑孝四郎、小池英、椎名昌美 卵巣子宮内膜症の悪性化 病理と臨床 24(3): 249-255, 2006.

8. 小林 浩 卵巣子宮内膜症の悪性化とその原因究明 産婦人科の進歩 58(2): 250-251, 2006.

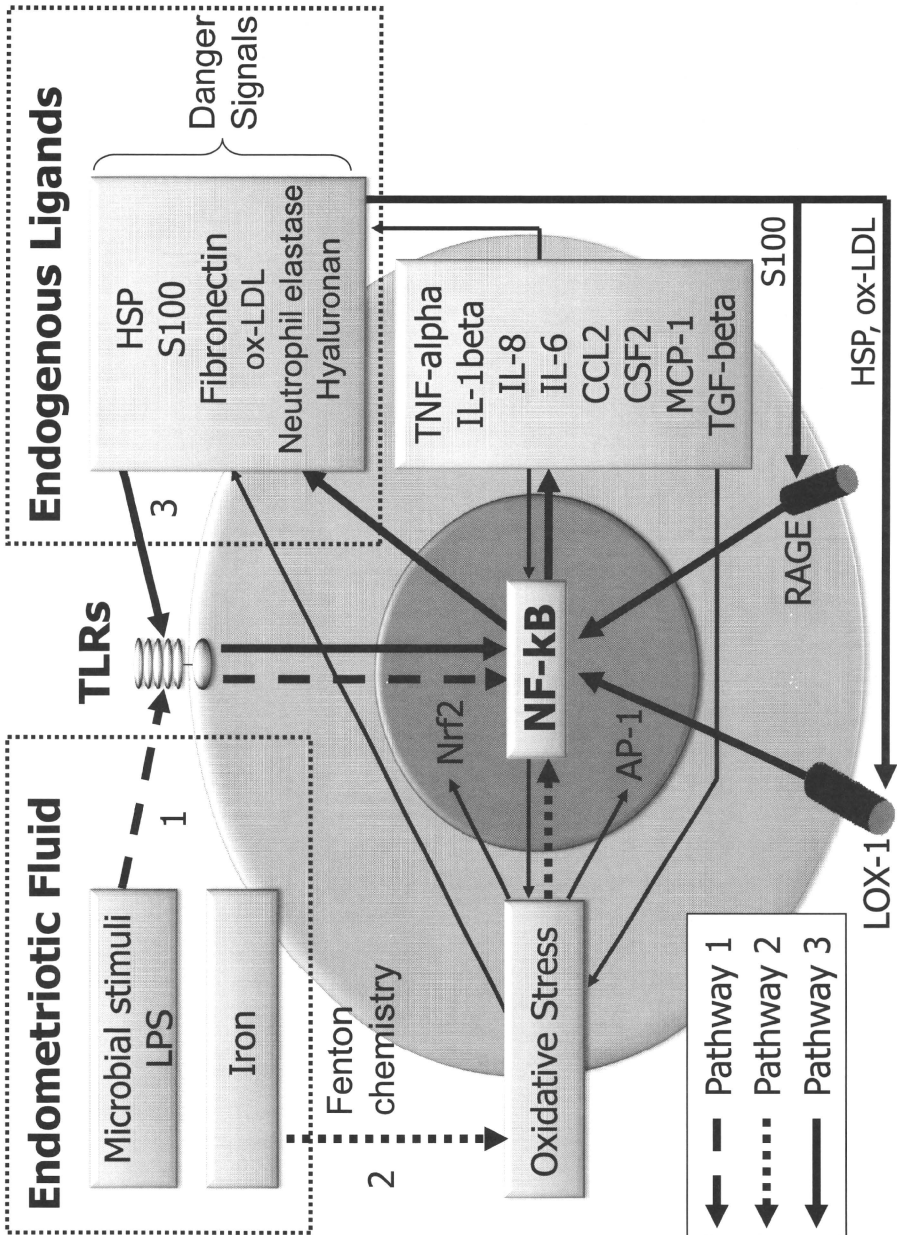
9. Modesitt SC, Tortolero-Luna G, Robinson JB, Gershenson DM, Wolf JK. Ovarian and extraovarian endometriosis-associated cancer. *Obstet Gynecol.* 2002 Oct;100(4):788-95.

10. Yoshikawa H, Jimbo H, Okada S, Matsumoto K, Onda T, Yasugi T, Taketani Y. Prevalence of endometriosis in ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invest.* 2000;50 Suppl 1:11-7.

11. Stern RC, Dash R, Bentley RC, Snyder MJ, Haney AF, Robboy SJ. Malignancy in endometriosis: frequency and comparison of ovarian and extraovarian types. *Int J Gynecol Pathol.* 2001 Apr;20(2):133-9.

12. Feeley KM, Wells M. Precursor lesions of ovarian epithelial

- malignancy. *Histopathology*. 2001 Feb;38(2):87-95.
13. Kato N, Sasou S, Motoyama T. Expression of hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) in clear cell tumors and endometriosis of the ovary. *Mod Pathol*. 2006 Jan;19(1):83-9.
14. Kato N, Toukairin M, Asanuma I, Motoyama T. Immunocytochemistry for hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta): a marker for ovarian clear cell carcinoma. *Diagn Cytopathol*. 2007 Apr;35(4):193-7.
15. Yamaguchi K, Mandai M, Toyokuni S, Hamanishi J, Higuchi T, Takakura K, Fujii S. Contents of endometriotic cysts, especially the high concentration of free iron, are a possible cause of carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress. *Clin Cancer Res*. 2008;14:32-40.
16. Kajihara H, Yamada Y, Kanayama S, Furukawa N, Noguchi T, Haruta S, Yoshida S, Sado T, Oi H, Kobayashi H. New insights into the pathophysiology of endometriosis: from chronic inflammation to danger signal. *Gynecol Endocrinol*. 2011 Feb;27(2):73-9.



ミトコンドリアとストレスの研究

研究分担者 末岡 浩 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室 准教授

研究要旨

加齢に伴い妊娠率が低下する事実に関し、卵子由来のミトコンドリア遺伝子の質的・量的変化がもたらす胚発生効率に対する影響を明らかにするために、単一細胞から遺伝子を増幅する手法について基礎的検討を行った。

まず、ミトコンドリア遺伝子が多くの変異遺伝子によるヘテロプラスミーを有する可能性が指摘されることから、網羅的解析が必要となることを前提に、2種類の Whole genome amplification による基礎的検討を行った。Phi29 polymerase を用いた multiple displacement amplification 法および、PCR の原理による Genomplex 法を増幅効率、exon レベルの増幅精度、配列分析における精度、定量性に関する精度について遺伝子抽出法を含めて検討した。単一細胞レベルの抽出 DNA および単一細胞からは multiple displacement amplification 法で 70% の増幅効率を確保し、exon レベルにおいても、また塩基配列レベルにおいても正確性は保たれた。その一方で増幅産物に対する定量性については MLPA 法による比較定量系を用いて検討した結果、十分な再現性を有する比較定量検索には至らなかった。定性的にはミトコンドリア遺伝子における多様な変異のヘテロプラスミーを胚細胞から検索可能であることを示す結果を得た。mtDNA コピー数について 40 歳未満群に比較し、40 歳以上群では胚および顆粒膜細胞について有意な差は認めなかったが、減少傾向を示した。卵子（未受精卵）および胚（受精卵）のミトコンドリア(mt)DNA コピー数はその周囲に付着する顆粒膜細胞の mtDNA コピー数を正の相関を示した。加齢による生殖細胞の妊孕性の低下が not DNA の量的劣化による可能性を示唆した。

A. 研究目的

卵子・顆粒膜細胞において加齢とともにミトコンドリア(mt)DNA コピー数は減少しており、mtDNA コピー数は妊孕性に影響すると考えられる。mtDNA はヒストンなどの核タンパクで保護されたクロマチン構造はなく、ミトコンドリア内で発生する活性酸素によって障害を受けやすく、修復機構も不十分なため mtDNA は容易に変異を起こし、核DNA に比較して変異の生じる速度が 10 倍程度速突然変異や欠失が蓄積しやすいことが知られている。この検証のためには、単一細胞（卵細胞や顆粒膜細胞）由来の mtDNA の相対コピー数解析と、その mtDNA 複製を制御

する核遺伝子異常の同定が必要となる。特定の遺伝子の定量解析には、定量 PCR 法が実施されるが、稀少な DNA においては一度に解析可能な遺伝子数に制限を伴うことが障壁となる。稀少な DNA から、複数箇所の遺伝子変異を同時に診断するために、全ゲノム増幅法: whole genome amplification (WGA) が求められ、そのなかで multiple displacement amplification (MDA) 法を用いた WGA による単一細胞に対する遺伝子増幅の条件設定の検討を行い、特に核ゲノムにおける欠失型変異の診断精度の向上について検討した。さらに実際に mtDNA のコピー数より定量的分析によって、胚発生状況と