

図2 PCOS排卵障害の治療法

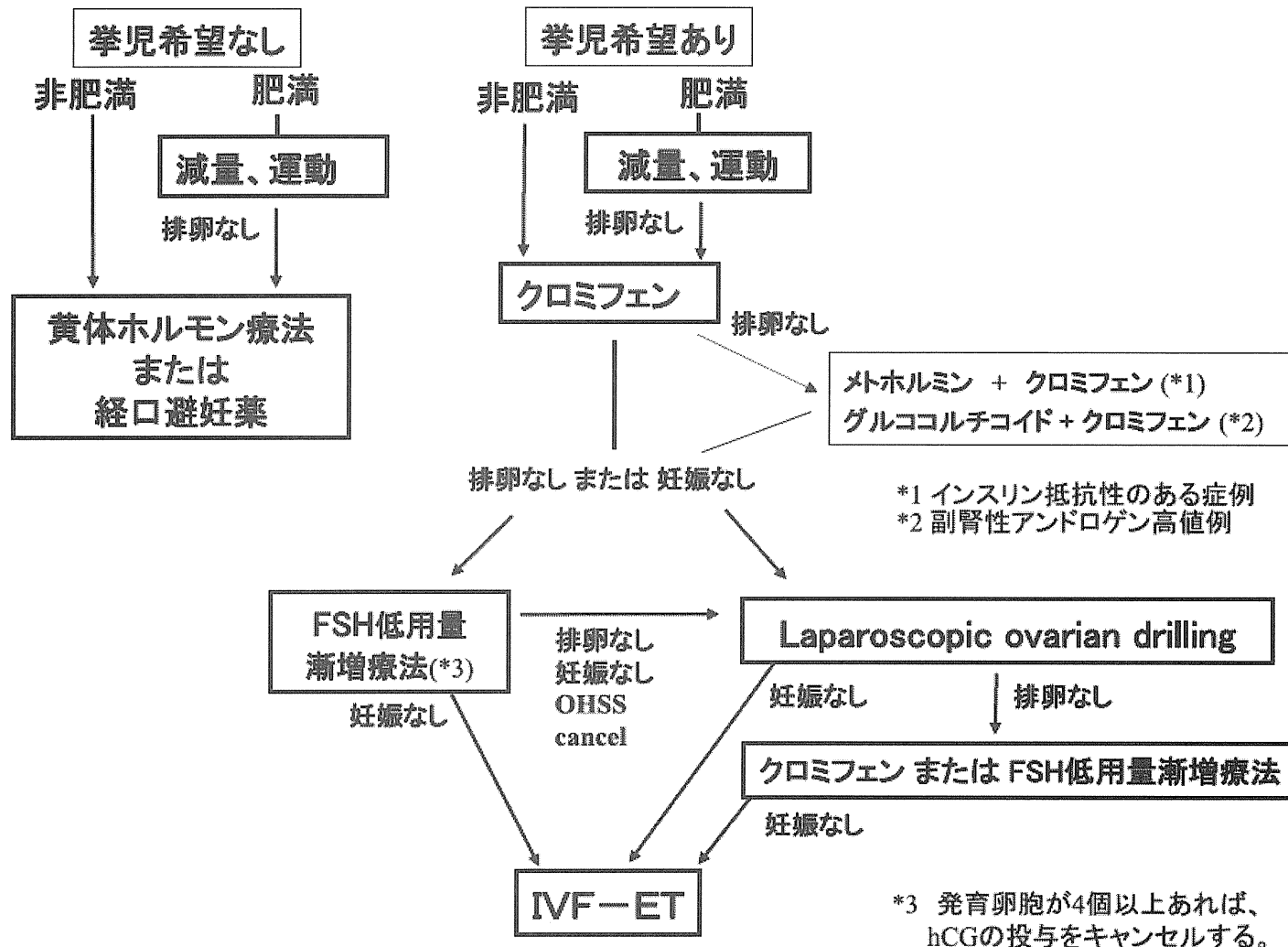
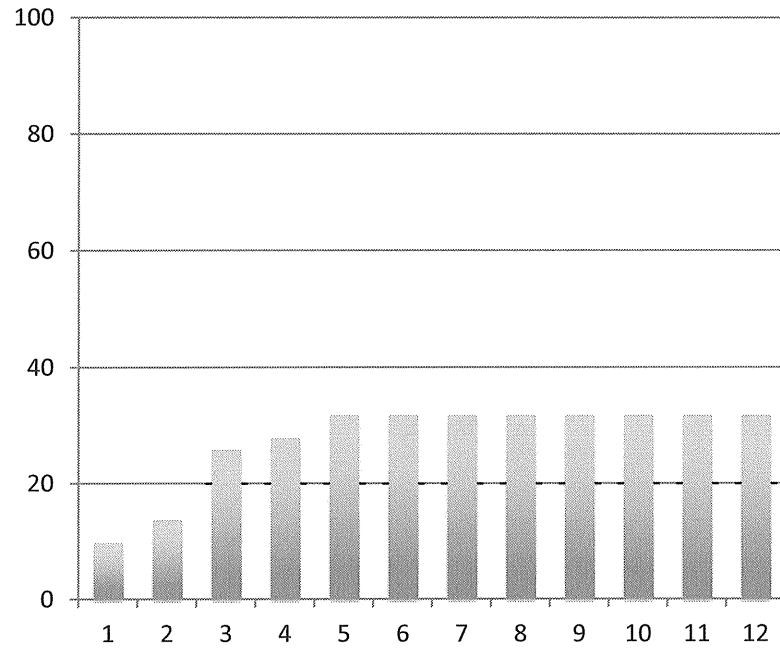


表10 多嚢胞性卵巣症候群の治療成績

	全症例	クロミフェン	メトホルミン+クロミフェン	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1 PCOS治療中の累積妊娠率

クロミフェン単独



低用量FSH

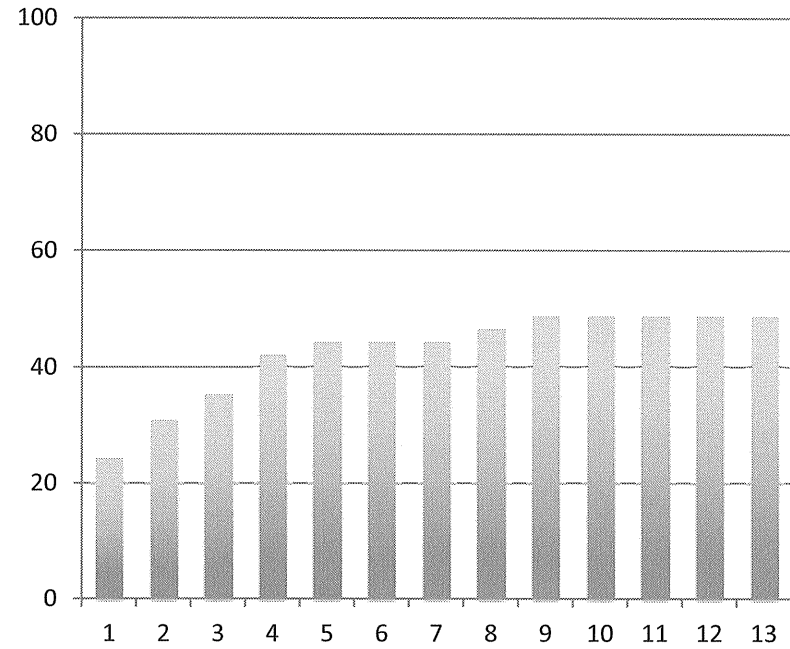


表11. 低用量FSHによる妊娠症例と非妊娠症例の背景の比較

	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

表12 ART症例の背景

	PCOS	Non-PCOS
症例数	21	255
年齢	33.0±5.1	34.4±4.2
BMI	23.5±5.2 *	21.5±3.2
FSH	6.98±1.79 **	9.27±5.46
LH	6.52±4.06 **	3.72±2.23
採卵周期数	40	518
採卵中止率	0.0%	10.2%
採卵回数	1.91±1.51	2.11±1.73

* P<0.05, ** P<0.01

表 13 PCOS ARTの結果

	PCOS	Non-PCOS
刺激日数	10.5±1.4	10.5±1.3
FSH使用量(IU)	2092±848 **	2805±1142
OHSS率 (／採卵あたり)	7.5% (3/40) *	1.9% (10/518)
採卵個数	17.0±12.0 **	10.0±7.1
受精卵数	7.25±5.8	6.11±4.84
移植可能胚数	2.88±2.42	2.28±2.33
移植胚数	1.75±0.68	1.68±0.85
妊娠率 (採卵あたり)	27.5% (11/40)	26.4% (137/518)
流産率 (妊娠あたり)	18.2% (2/11)	22.7% (30/137)
症例あたり妊娠率	57.1%	53.7%

* P<0.05, ** P<0.01

表14 PCOS LOD後のART

	LOD後	LOD無し
症例/周期数	5 / 8	16 / 32
年齢	33.8±3.2	32.6±5.6
BMI	23.5±5.5	23.5±5.3
FSH	8.45±2.64 **	6.39±1.75
LH	4.34±1.70 **	6.31±4.23
刺激日数	10.9±1.4	11.3±3.9
FSH使用量(IU)	2737±949 *	1907±734
採卵数	10.5±6.9 **	18.4±12.7
移植可能胚数	2.38±1.9	3.04±2.59
妊娠率 (採卵あたり)	25.0% (2/8)	28.1% (9/32)

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

子宮内膜症の異所子宮内膜腺管上皮細胞は毎月の出血にさらされることにより、その中の鉄がフェントン反応を介した酸化ストレスを惹起する。そのため細胞は微小環境の変化のため遺伝子変異を起し、解毒酵素・解毒関連タンパクを大量に産生することによりストレス抵抗性を獲得している。我々はこのストレス抵抗性を規定している重要な遺伝子として HNF-1beta を候補遺伝子として報告した。この遺伝子は酸化ストレス、糖代謝関連酵素、解毒機構関連タンパク、抗アポトーシス、細胞周期調節因子を誘導するマスター遺伝子であり、子宮内膜症の癌化に密接に関与することが判明した。一方、癌化の初期イベントとしてクロマチン再構築遺伝子である ARID1A の遺伝子変異が報告されるようになった ARID1A はクロマチン再構築を修飾する遺伝子であり、この変異が遺伝子不安定性を助長している。すなわち、子宮内膜症の癌化の過程では、出血による酸化ストレスに抵抗するために HNF-1beta が過剰発現し、細胞周期チェックポイントが作動し G2/M 停止を起すため、細胞は抗アポトーシスになり細胞死は起こらない。しかし、この状態が長時間持続することにより各種遺伝子が障害を受けたまま修復されないことになる。ARID1A および PIK3CA もその一連の遺伝子群であり、これらの変異遺伝子の蓄積により不安定性がおり癌化を助長することになる。子宮内膜症からの発癌には P53 の遺伝子異常は認められないが、p53 パスウェイの異常と同じ現象が起こっていることが推察された。

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。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、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）。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ことが重要である。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ことも分かった。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

ト嚢胞は腫瘍径が 10 cm 以上のときは悪性を考慮し手術(oophorectomy)を勧めることが望ましいと考える。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。

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。

最近癌化の初期イベントとしてクロマチン再構築遺伝子である ARID1A の遺伝子変異が報告されるようになったため、この遺伝子機能についても検討した。

さらに疫学的調査を実施し、本邦における卵巣明細胞腺癌の発現頻度および明細胞腺癌になりやすい遺伝子変異についても検討したので報告する。

B. 研究方法

1. 臨床的・疫学的検討

日本産科婦人科学会の婦人科腫瘍委員会から発行している本邦における婦人科がん発生頻度報告を参考に解析した。

2. 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。

3. 遺伝子解析

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ケンスは、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。

4. ARID1A 遺伝子変異の関与

ARID1A の機能は腎癌における VHL 遺伝子の変異と類似しているため ARID1A の分子モデルを考案した。

5. 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. 卵巣癌の組織型別発生頻度

子宮内膜症の悪性化の報告が最近急増している。PubMed で調べたところ、図 1 の前列の棒グラフが内膜症から間葉系への悪性化が報告された論文数であり、後列の棒グラフが内膜症から上皮系への悪性化が報告された論文数である。いずれも増加しているのがわかる。

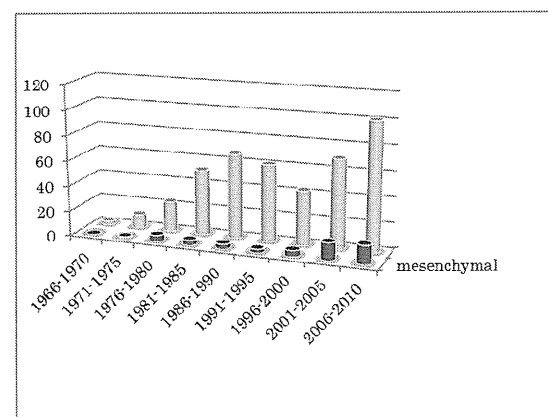


図 1

卵巣癌の組織型別頻度を調べると、図 2 のように米国とカナダでは漿液性腺

癌が 60%以上を占め、明細胞腺癌は 10%であるのに対して本邦は漿液性腺癌が 46%であり、明細胞腺癌は 24%であり、やはり卵巣癌に占める明細胞腺癌の高頻度が確認された。

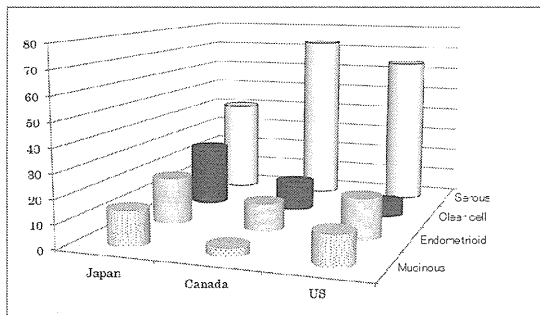


図 2

本邦では明細胞腺癌の発生頻度が高いと言われているが、むしろ漿液性腺癌の発生頻度が少ないために相対的に明細胞腺癌の発生頻度が高いのではないかとも思われる。

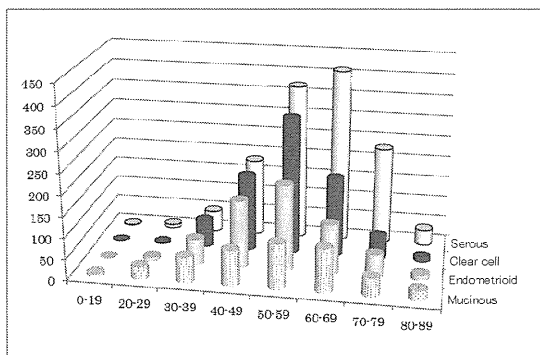


図 3

2. 「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、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ため、「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。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、また早期がんや高分化型が多い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機会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かった。

3. 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。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（核下空砲を有する細胞）、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, 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。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。

4. 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。

さらに子宮内膜症の進展と自然炎症の破綻に着目し、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。外的要因である LPS や鉄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 が病態形成に関与し、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、ひいては癌化に密接に関与していることが考えられた。

5. ARID 遺伝子群の作用機序

ARID ファミリーには ARID1A, ARID3A, JARID1B/KDM5B が存在する。下流遺伝子を同定するためにパスウェイ解析をすると、図 4 に示したように ARID1A は HIC1 および HOXA9 を介し、間接的に p53 遺伝子に影響を及ぼし、アポトーシス、細胞周期調節、クロマチン再構築に関与する重要な遺伝子であった。また、ARID3A の下流にも p53 が存在することにより、ARID ファミリーはすべてアポトーシス、細胞周期調節、クロマチン再構築に関与する重要な遺伝子であることが判明した。

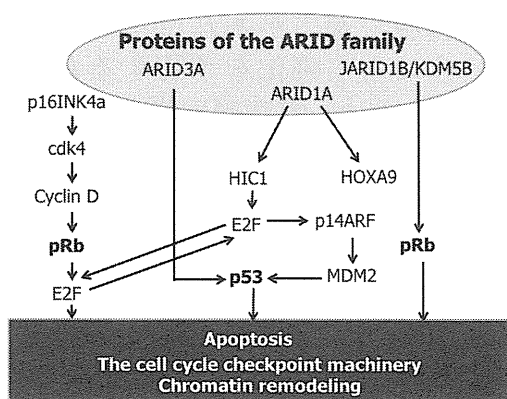


図 4

6. ARID1A の生物活性と癌化機序

まず、腎明細胞腺癌(ccRCC)の発癌はすでに解明されている。図 5 上段に示すように ccRCC の発癌は VHL 遺伝子の変異で起こることが知られている。VHL 遺伝子産物は ElonginC を介して結合しこれに

HIF-1 alpha が結合する。HIF-1 alpha は低酸素における血管新生に作用し VEGF 等を産生し癌の転移に深くかかわっている。

VHL が正常に作用すれば HIF-1 alpha は図上左に示すようにユビキチン化され、分解されるため、VEGF の産生は停止する。しかし、図 5 上右に示すように、VHL 遺伝子に変異が起こると VHL タンパクの立体構造が変化し ElonginC-VHL-HIF-1 alpha 複合体が形成されないため HIF-1 alpha にユビキチン化が起こらず、持続的に HIF-1 alpha が産生されるため血管新生が過剰に起こり癌化するとされている。

ARID1A も ElonginC に結合するため、ccRCC と同様のモデルが考えられる。すなわち、図 5 下左のように ARID1A が正常であれば、ヒストンタンパクである H2B が ElonginC-ARID1A-H2B 複合体を形成し、不要なヒストンタンパクは処理される。しかし、図 5 下右に示すように、ARID1A 遺伝子に変異が起こると ARID1A タンパクの立体構造が変化し ElonginC-ARID1A-H2B 複合体が形成されないため H2B にユビキチン化が起こらず、ヒストンタンパクが処理されないため、クロマチン再構築に影響を来し癌化することが考えられる。

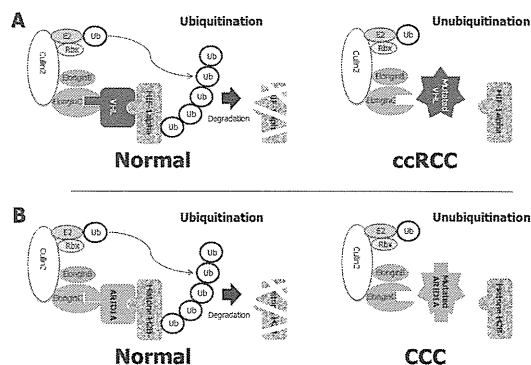


図 5

7. 卵巣明細胞腺癌と類内膜腺癌の病態 鉄による酸化ストレスにより活性酸素 ROS が産生され、この結果図 6 に示すよ

うに細胞内シグナルが大きく変動する。ROSにより例えば、ERKのリン酸化、PTEN活性低下、NOX過剰反応、遺伝子変異、EMTが惹起される。DNA障害がおこれば細胞周期を停止させ、修復かアポトーシス化に向かうことになる。しかし、HNF-1betaが過剰発現しているため、細胞周期チェックポイントが作動せず、アポトーシスシグナルが発動しない。その結果、遺伝子変異が蓄積した癌細胞が増えていくことになる。この状態が前癌状態である。この状態にARID1A, PIK3CAの遺伝子変異が加味されることにより癌化することが推測された。

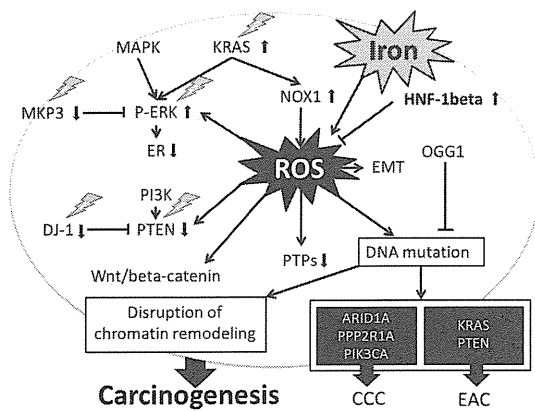
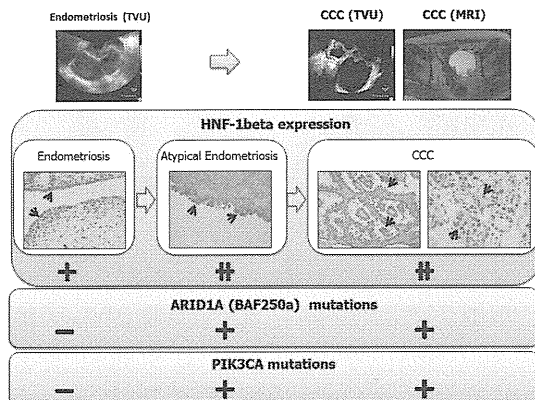


図 6

8. 免疫染色結果

子宮内膜症の癌化を規定する遺伝子変異の免疫染色結果を図7に示す。HNF-1betaの過剰発現、ARID1AおよびPIK3CAのタンパク発現低下が将来の明細胞腺癌の診断に有用であると思われた。



9. 発がんに関与する遺伝子群の同定
マイクロアレイや SNP を網羅的に探索することにより表 1 に示す遺伝子群を同定することができた。この中から late event に関与する遺伝子群を同定するための研究を進める必要がある。

10. 手術により癌化は防げるか

卵巣癌に占める明細胞腺癌の頻度は日本が米国に比べて 2~3 倍高率である。子宮内膜症の発生頻度はおそらく日本も米国も同じで、成熟婦人の約 10%を占めるといわれている。この事実を考えると、日本のチョコレート嚢胞は癌化しやすいといえる。そこで平成 19 年より日本産科婦人科学会婦人科腫瘍委員会（小委員会 寺川委員長）により全国的な疫学調査が開始された。手術的に摘出することが癌化を予防できるか追跡調査が開始されたところである。

子宮内膜症細胞が癌化する前であれば、酸化ストレスにより遺伝子変異が起これば、その原因である出血を取り除くことは遺伝子変異を抑制できる可能性があり、手術をすることが勧められるかもしれない。したがって、チョコレート嚢胞で適応があれば積極的に手術を行うことも癌化を予防するためには大切であろう。嚢胞摘出術か卵巣摘出術かは患者の背景により異なるが、閉経期前後の場合はできるだけ卵巣摘出術を勧めたほうが賢明であると考えている。最近の卵巣癌の発癌機序を考慮すれば卵管も同時に切除すべきであると考えられる。

11. ホルモン療法により癌化は防げるか

ホルモン療法と一口に言っても OC や Gn-RH アゴニストなど多岐にわたる。一般的に OC は卵巣癌発生を抑制するといわれており、すべての組織型の卵巣がん

発生を抑制している。したがって、チョコレート嚢胞を有しない患者に OC を投与すれば明細胞腺癌や類内膜腺癌の発生も減少すると思われる。しかし、最近のホルモン治療薬である「ジェノゲスト」や「ルナベル」に関するデータはない。すでに monoclonality を獲得したチョコレート嚢胞に対してホルモン療法を行うことにより癌化を防げるかどうかは不明である。明細胞腺癌の発癌機序が酸化ストレスによる慢性持続炎症であることを考えると、ホルモン療法によりチョコレート嚢胞内での出血を防ぐことにより「OCCC Signature」状態が回避され、癌化しにくい環境になることも考えられる。今後の臨床的データの蓄積が待たれる。

D. 考察

チョコレート嚢胞からの発癌機序として最近大きな進展が見られた。我々を含めた複数の施設から hepatocyte nuclear factor (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。この転写因子の発現を詳細に検討すると、チョコレート嚢胞から発癌すると考えられている類内膜腺癌には HNF-1beta の過剰発現が見られない。HNF-1beta は子宮内膜症から明細胞腺癌へ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。HNF-1beta の下流には、抗癌剤耐性遺伝子、抗アポトーシス関連遺伝子や酸化ストレス・解毒遺伝子が多く存在するため治療法の開発にも最適なバイオマーカーであると考えられる。

すなわち、長期間子宮内膜症性嚢胞内で出血を繰り返すことにより、過剰鉄による酸化ストレスを介して遺伝子やタンパク質の酸化が起こったり、LOH が高頻度に観察されるようになる。この状態はすでに組織学的に良性の子宮内膜症

のときにも起こっており、monoclonality を持つようになる。これら酸化ストレスや炎症環境の持続的暴露により、癌抑制遺伝子が失われたり、癌遺伝子が活性化する細胞が出現する可能性がある。このような機序を介して癌のイニシエーション、プロモーション、そしてプログレッションが起こり、明細胞腺癌が発生するものと考えられる。

その時に ARID1A の遺伝子変異が発生するとクロマチン再構築が不完全になり、細胞周期チェックポイントが作動せず、抗アポトーシス能を保有する反面、遺伝子損傷を受けた多くの細胞が悪性度を増すための環境を作ることになる。

また、子宮内膜症からの癌化と考えられる類内膜腺癌はエストロゲン受容体やプロゲステロン受容体が発現しており、ホルモンの影響下に癌化するのに対して、明細胞腺癌はこれらホルモン受容体の発現は消失している。このようなホルモン環境の相違が発癌時の組織型を決定している可能性がある。

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。

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と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。
- 2) 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子宮内膜症ががん化に向かう。すなわち 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に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。
 - 4) 子宮内膜症の癌化の early event として、HNF-1beta, ARID1A, PIK3CA の遺伝子変異が証明されたがいまだに late event が同定されていない。今後はこの研究を継続することにより後者の遺伝子変異の発見に努める必要がある。

F. 研究発表

1. 英文論文発表

1. 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.
2. 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.
3. Kobayashi H, Kajiwara H, Kanayama S, Yamada Y, Furukawa N, Noguchi T, Haruta S, Yoshida S, Sakata M, Sado T, Oi H. Molecular pathogenesis of endometriosis-associated clear cell carcinoma of the ovary (Review). *Oncol. Rep.* 22: 233-240, 2009.
4. Kobayashi H, Ovarian Cancer CANCER REPORT 2010 ASIAN PACIFIC ORGANIZATION for CANCER PREVENTION (APOCP) Most Common Cancers in Asia-Pacific Region Editor. A. Murat Tuncer 241-246. (著書)
5. Nagase K, Kobayashi H, Yoshikawa E, Kurita N. Ab initio molecular orbital calculations on specific interactions between urokinase-type plasminogen activator and its receptor. *J Mol Graph Model.* 2009 Aug;28(1):46-53.
6. Yoshida S, Furukawa N, Haruta S, Tanase Y, Kanayama S, Noguchi T, Sakata M, Yamada Y, Oi H, Kobayashi H. Theoretical model of treatment strategies for clear cell carcinoma of the ovary: Focus on perspectives. *Cancer Treat Rev.* 2009 Nov;35(7):608-15.
7. Yoshida S, Furukawa N, Haruta S, Tanase Y, Kanayama S, Noguchi T, Sakata M, Yamada Y, Oi H, Kobayashi H. Expression profiles of genes involved in poor prognosis of epithelial ovarian carcinoma: a review. *Int J Gynecol Cancer.* 2009 Aug;19(6):992-7.
8. Naruse K, Lash GE, Innes BA, Otun HA, Searle RF, Robson SC, Bulmer JN. Localisation of matrix

- metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and tissue inhibitors for MMPs (TIMPs) in uterine natural killer cells in early human pregnancy. *Hum Reprod.* 2009 Mar; 24(3): 553-561.
9. Kobayashi H. Ovarian cancer in endometriosis: epidemiology, natural history, and clinical diagnosis. *Int J Clin Oncol.* 2009 Oct;14(5):378-82. Review.
 10. 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.
 11. Kobayashi H. Screening, epidemiology, molecular biology, and treatment strategies for endometriosis-associated ovarian cancer. *Reprod. Med. Biol.* 2010; 9 (1): 17-22.
 12. Shigetomi H, Onogi A, Kajiwara 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.
 13. 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.
 14. Shigemitsu A, Furukawa N, Koike N, Kobayashi H. Endometrial cancer diagnosed by the presence of bone metastasis and treated with zoledronic Acid: a case report and review of the literature. *Case Rep Oncol.* 2010 Sep;3(3):471-6. Epub 2010 Dec 13.
 15. 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.* 2011 Mar;72(3):213-8.
 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.
 17. Furukawa N, Oi H, Yoshida S, Shigetomi H, Kanayama S, Kobayashi H. The usefulness of photodynamic eye for sentinel lymph node identification in patients with cervical cancer. *Tumori.* 2010 Nov-Dec;96(6):936-40.
 18. Kobayashi H., Kajihara H, Yamada Y, Tanase Y, Kanayama S, Furukawa N, Noguchi T, Haruta S, Yoshida S, Naruse K, Sado T, Oi H. Risk of carcinoma in women with ovarian endometrioma. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011 Jan 1;3:529-39.
 19. Kawaguchi R, Furukawa N, Yamada Y, Ooi H, Kobayashi H. Carcinosarcoma of the uterine corpus with alpha-fetoprotein-producing

- hepatoid adenocarcinoma: a report of two cases. *Case Rep Oncol.* 2011;4(2):358-62.
20. Yoshizawa Y, Yamada Y, Kanayama S, Shigetomi H, Kawaguchi R, Yoshida S, Nagai A, Furukawa N, Oi H, Kobayashi H. Signaling pathway involved in cyclooxygenase-2 up-regulation by hepatocyte growth factor in endometrial cancer cells. *Oncol Rep.* 2011 Oct;26(4):957-64. doi: 10.3892/or.2011.1348. Epub 2011 Jun 15.
21. Furukawa N, Kawaguchi R, Kajihara H, Kobayashi H. Evaluation of the vessels of the cardinal ligament by transrectal ultrasonography with color Doppler imaging. *J Clin Ultrasound.* 2011 Jun 6. doi: 10.1002/jcu.20844. [Epub ahead of print]
22. Yamada Y, Shigetomi H, Onogi A, Haruta S, Kawaguchi R, Yoshida S, Furukawa N, Nagai A, Tanase Y, Tsunemi T, Oi H, Kobayashi H. Redox-Active Iron-Induced Oxidative Stress in the Pathogenesis of Clear Cell Carcinoma of the Ovary. *Int J Gynecol Cancer.* 2011 Aug 19. [Epub ahead of print]
23. Furukawa N, Kawaguchi R, Kobayashi H. Use of high-dose cisplatin with aprepitant in an outpatient setting. *Eur J Cancer Care (Engl).* 2011 Aug 25. doi: 10.1111/j.1365-2354.2011.01284.x. [Epub ahead of print]
24. Kawaguchi R, Furukawa N, Yamada Y, Ooi H, Kobayashi H. Carcinosarcoma of the uterine corpus with alpha-fetoprotein-producing hepatoid adenocarcinoma: a report of two cases. *Case Rep Oncol.* 2011;4(2):358-62.
2. 和文論文発表
1. 小林 浩, 梶原弘貴, 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 日本エンドメトリオーシス学会会誌 31;59-63, 2010.7
 2. 小林 浩. 子宮内膜症の癌化とその機序 日本産婦人科学会・千葉地方部会雑誌4(2):94-96, 2011.1
 3. 小林 浩. 【妊孕能温存の婦人科がん治療】妊孕能温存の婦人科がん治療 子宮内膜症性嚢胞のがん化と妊孕性温存 産婦人科の実際 58(3);391-395, 2009.3
 4. 小林 浩. 【子宮内膜症の適切な治療法選択】チョコレート嚢胞に対する治療法の選択 悪性転化を中心として 産婦人科の実際 58(8);1159-1167 2009.08
 5. 小林 浩. 【子宮疾患・子宮内膜症の臨床 基礎・臨床研究のアップデート】子宮内膜症 子宮内膜症の癌化 日本臨床 67 増刊号(5)「子宮疾患・子宮内膜症の臨床」;471-473 2009.08
 6. 小林 浩. 【婦人科がん検診-卵巣がん検診】卵巣がんスクリーニングの限界 臨床婦人科産科 63(9);1212-1215 2009.09
 7. 小林 浩. 特集 子宮内膜症合併不妊の治療法 [総論]内膜症治療と卵巣機能 4. チョコレート嚢胞と癌化 産科と婦人科 77(7)765-769 2010.7
 8. 小林 浩. 特集 いま改めて卵巣癌を考える 子宮内膜症の癌化とその取り扱い方 産婦人科治療 101(3)257-263 2010
 9. 小林 浩. 研修コーナー第5回画像

- 診断 日本産科婦人科学会雑誌
62(10)300-311 2010
10. 小林 浩. 特集 卵巣がんに関する最新トピックス 卵巣がん検診は有効か? 産婦人科の実際 59(10)1443-1449 2010. 10
 11. 小林 浩. 特集 婦人科がんの Molecular Biology 10. 血管新生 産科と婦人科78(1)88-94 2011
 12. 小林 浩. 子宮内膜症の癌化とその取り扱い方 産婦人科治療 102(3);244-248 2011. 3
3. 学会発表
 1. Tanase Y, Komeda S, Oonogi A, Kanayama S, Yoshida S, Furukawa N, Yamada Y, Oi H, Kobayashi H. A Rare Case of Huge Ovarian Teratoma Mimicking Omental Cyst Treated with Laparoscopic Surgery. AAGL 38th Global Congress of Minimally Invasive Gynecology. Orlando, FL. November 15-19, 2009 (Poster)
 2. 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. The First Asian Conference on Endometriosis Shanghai China October15-17 2010 (Poster)
 3. Yoshida S, Shigetomi H, Tanase Y, Haruta S, Nagai A, Kawaguchi R, Furukawa N, Sado T, Yamada Y, Oi H, Kobayashi H. Decidualized ovarian endometriosis during pregnancy: Mimicking a malignant ovarian tumor The First Asian Conference on Endometriosis Shanghai China October15-17 2010 (Poster)
 4. Furukawa N, Shigetomi H, Tanase Y, Kawaguchi S, Yoshida S, Yamada Y, Oi H, Kobayashi H. CA125 as a predictive marker for optimal interval debulking surgery. IGCS 13th Biennial Meeting Prague, Czech Republic October23-26 2010 (Poster)
 5. Furukawa N, Shigetomi H, Yoshida S, Kawaguchi R, Komeda S, Tanase Y, Yamada Y, Kobayashi H. CA125 as a predictive marker for optimal interval debulking surgery in advanced ovarian cancer. (The publication-only abstracts) 2011 American Society of Clinical Oncology(ASOC) annual meeting Chicago Illinois USA June3-7 2011
 6. Sakon M, Maehara Y, Kobayashi T, Seo N, Kobayashi H, Shimazui T, Ozeki Y. EVALUATION OF THE RISK FACTORS OF VENOUS THROMBOEMBOLISM IN JAPANESE SURGICAL AND NON-SURGICAL PATIENTS USING ELECTRONIC PATIENT DATABASE. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 57th Annual SSC Meeting(ISTH) Kyoto July 23-28 2011 (Poster)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
 1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

表 1

Functions	Official Symbol	Name	ref.
Hormone receptors	ESR1	estrogen receptor 1	70
	PGR rs1042838	progesterone receptor	74
Cell cycle regulators	CCND1	cyclin D1	75
	CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	75
	CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	75
	CDK6	cyclin-dependent kinase 6	75
	MDM2	Mdm2 p53 binding protein homolog	75
	XRCC2	X-ray repair complementing defective repair	75
	BABAM1	BRISC and BRCA1 A complex member 1	76
Cytokines	IL-1RA	Interleukin-1 receptor antagonist	77
	IL-18 rs1834481	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)	77
Transcription factors	NFKB1	Nuclear factor-kappaB1	78
Angiogenesis	VEGF	Vascular endothelial growth factor	79
Others	LSP1	lymphocyte-specific protein 1	70
	PMS1 and PMS2	postmeiotic segregation increased 1/2	80
	RUVBL1	RuvB-like 1	47
	CASP5	caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase	47
	NXPH2	neurexophilin 2	81
	TERT	telomerase reverse transcriptase	71
	MSL1	male-specific lethal-1 homolog	72
	PRPF31	PRP31 pre-mRNA processing factor 31 homolog	72

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

本研究では、ミトコンドリア遺伝子と卵老化との関係が示唆され、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 mtDNA の量的・質的分析を介して、加齢との関係を解明することを目的とした。未受精卵・未分割胚は、40 歳以上群は、40 歳未満群と比較し有意な減少 ($p=0.012$) を認めた。顆粒膜細胞も有意差は認めないものの 40 歳以上の群において copy 数減少傾向を示した。また、T8993G 点変異は、全ての検体において検出されなかった。加齢女性（40 歳以上）由来の卵子細胞質体積は若年女性由来と比較し、有意に増大していた ($p<0.01$) が、mtDNA 量は有意に減少していたことから加齢胚発生効率の低下に関与する因子として微小変異の蓄積による可能性は少なく、mtDNA の細胞質内の低密度化に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

ミトコンドリアは生命活動に必要なエネルギーである ATP を産生する細胞内小器官であり、その内部には独自の遺伝情報であるミトコンドリア DNA (mtDNA) が存在している。mtDNA は 1 万 6 千塩基対の環状二本鎖の形態をとっており、1 細胞中に数 1000copy から数万 copy 存在するといわれている。mtDNA の一部に変異を生じた場合、正常型の mtDNA と変異型の mtDNA が共存する heteroplasmy が存在し、変異比率の上昇により疾患が発症する。

加齢とともに細胞質変化をおこすが、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あたえる。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、変化を起す。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しているといわれている。ミトコンドリア機能が低下すれば酸化的リン酸化機能低下から ATP 産生が低下し妊孕性

の低下生じる可能性が示唆される。

mtDNA は 12 S, 16 S の 2 つのリボソーム RNA 遺伝子、22 種類の転移 RNA、電子伝達系のサブユニットのうち 13 種類のタンパク質をコードしている。核 DNA と異なり、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 は容易に変異を生じ、核 DNA に比較して変異の生じる速度が 10 倍ほど速いことが知られている。そのため突然変異や欠失が蓄積しやすいことが知られている。

近年、パーキンソン病、特発性心筋症、アテローム動脈硬化症などに mtDNA 変異が証明され、mtDNA 変異が退行性疾患と密接に関連することが明らかとなった。さらに mtDNA 変異と老化との関連が解析され、心筋において年齢が進むにつれて欠失 mtDNA の割合が増加することが認められた。

mtDNA の代表的な変異として、point mutation では ATPase6 領域 8993 位の T