

# 子宮腺筋症の浸潤メカニズムの解明

---

2014

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

大原 玲奈

筑波大学  
博士（医学）学位論文

# 子宮腺筋症の浸潤メカニズムの解明

---

2014

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

大原 玲奈

# 略語一覽

HE	Hematoxilin Eosin
LMD	Laser Micro Dissection
LC-MS/MS	Liquid chromatography/tandem mass spectrometry
cDNA	complementary DNA
siRNA	small interfering RNA
ROCK	Rho associated kinase
p38MAPK	p38 Mitogen-activated Protein Kinase
PKC	protein kinase C
PBS	Phosphate Buffered Saline
PVDF	Poly vinylidene difluoride
EMT	Epithelial- mesenchymal transformation
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha

# 目次

略語一覧

研究課題：子宮腺筋症の浸潤メカニズムの解明

はじめに

図：子宮腺筋症の病理組織所見

第1章 プロテオーム解析を用いた子宮腺筋症の“浸潤”に関する分子の網羅的解析

## 1. 背景

## 2. 対象と方法

### 2-1. 症例背景

### 2-2. LMD を用いた組織からのタンパク質抽出と処理方法

### 2-3. LC-MS/MS 解析法

### 2-4. 結果

## 3. 候補タンパク質の選定と免疫染色

### 3-1. 候補タンパク質の選定

### 3-2. 免疫染色に用いた症例背景

### 3-3. 免疫染色

### 3-4. 評価方法

### 3-5. 結果

## 4. moesin の発現解析

4-1. 発現解析に使用した症例背景

4-2. Total RNA の抽出および cDNA 合成

4-3. Real time RT-PCR 法による moesin の mRNA 発現解析と結果

4-4. タンパク抽出および濃縮

4-5. Western blotting 法による moesin の発現解析と結果

5. 考察

図 1-1 : LMD を用いた組織からのタンパク質抽出

図 1-2 : moesin の免疫染色像

図 1-3 : Lumican、TPI の免疫染色像

図 1-4 : 正常内膜と子宮腺筋症病変部における Moesin 染色性に関する統計解析

図 1-5 : 子宮腺筋症の病変深度と Moesin 染色性に関する解析

図 1-6 : 定量 PCR を用いた moesin mRNA の発現解析

図 1-7 : western blotting 法を用いた moesin の発現解析

表 1-1 : MS 解析で子宮腺筋症での発現が多かったタンパク質

表 1-2 : MS 解析結果

表 1-3 : 免疫染色で使用した抗体一覧

表 1-4 : 定量 PCR に用いた moesin および  $\beta$ -actin プライマー配列

表 1-5 : western blotting で使用した抗体一覧

表 1-6 : 免疫染色に使用した手術検体の臨床情報および上皮細胞における Moesin 発現に関する統計解析結果

表 1-7：免疫染色に使用した手術検体の臨床情報および上皮細胞における Moesin 発現に関する統計解析結果

## 第 2 章 候補タンパク質の *in vitro* での機能解析

1. 背景
2. 使用した細胞株
3. 方法
  - 3-1. siRNA 導入方法
  - 3-2. siRNA の効果持続時間の検討
  - 3-3. Invasion assay に用いた細胞の蛍光免疫染色法
  - 3-4. Invasion assay の方法
4. RNA 干渉法を用いた細胞形態変化と浸潤能解析の結果
5. 考察

図 2-1：子宮内膜間質肉腫症例の moesin 免疫染色像

図 2-2：OMC-9 細胞における moesin 発現解析

図 2-3：siRNA 効果持続時間の検討

図 2-4：invasion assay の方法

図 2-5：moesin siRNA 導入による細胞形態変化

図 2-6：免疫蛍光染色法を用いた moesin siRNA 導入細胞の形態学的評価

図 2-7：invasion assay の結果

表 2-1：免疫蛍光染色に用いた抗体一覧

### 第3章 候補タンパク質の活性化と浸潤のメカニズムとの関係における検討

1. 背景
2. 子宮腺筋症における moesin のリン酸化について
3. 方法
4. 結果
5. Moesin のリン酸化経路についての考察
6. 今後の課題

図 3-1 : これまで報告されている moesin のリン酸化経路図

図 3-2 : 子宮腺筋症の臨床検体におけるリン酸化 moesin の発現解析

図 3-3 : OMC-9 細胞における Rho-ROCK 経路の検討

図 3-4 : OMC-9 細胞における p38MAPK、PKC 経路の検討

図 3-5 : 免疫蛍光染色による PKC 阻害剤 (GF109203X) 添加細胞の形態学的評価

図 3-6 : PKC 阻害剤の細胞浸潤能に与える影響の検討

表 3-1 : western blotting で使用した抗体一覧

(腺筋症におけるリン酸化 moesin の検討)

表 3-2 : western blotting で使用した抗体一覧 (リン酸化経路の検討)

表 3-3 : 免疫蛍光染色に用いた抗体一覧

### 第4章 本研究の総括

謝辞

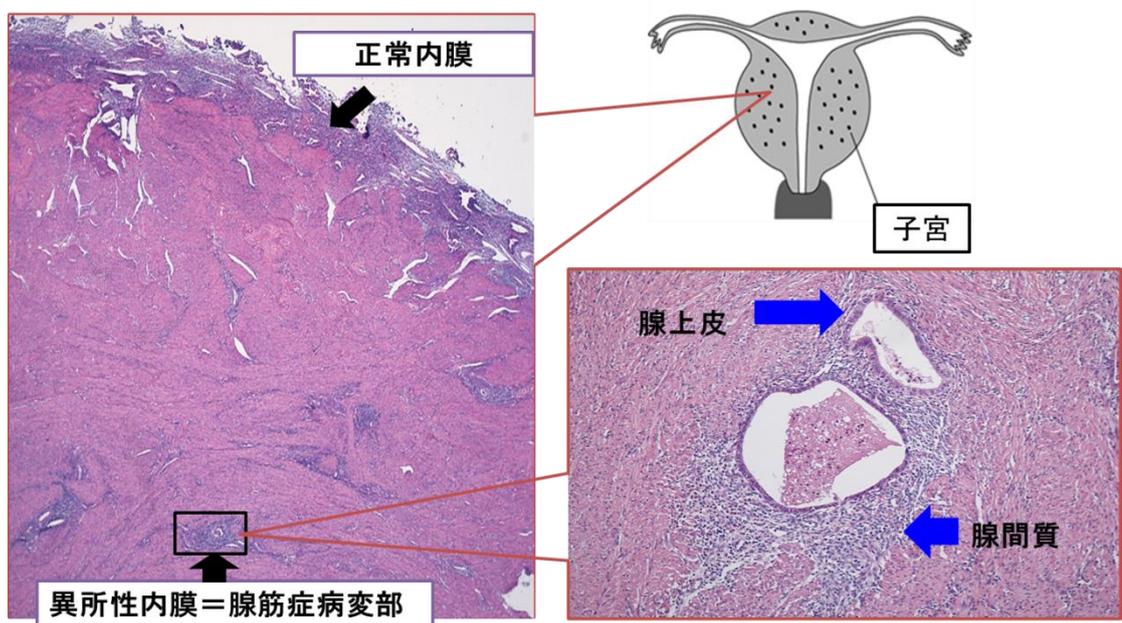
参考文献

# はじめに

子宮腺筋症は進行性のホルモン依存性婦人科良性疾患である。病理組織学的にみると正常の内膜組織に類似した構造が、子宮筋層内に非連続的に侵入した病態をとっている。子宮腺筋症はもともと子宮内膜症と類似疾患として扱われていたが、ホルモン治療感受性の違いなどから現在では別の異なる病態として認識されている。子宮腺筋症は過多月経や月経困難症を引き起こすだけでなく、着床障害による不妊症や流・早産の原因にもなりうる。もともと30代後半から40代の出産を終えた年代での罹患が多かったため、根治手術として子宮摘出を行うことが多かった。しかし我が国では近年女性の晩婚化や出産年齢の上昇に伴い、子宮温存を希望する未産婦・未婚女性での罹患率が上昇している。そのため子宮摘出以外の治療法が望まれているが、挙児希望のある患者に対する治療法の選択肢は限られている<sup>1,2</sup>。

子宮腺筋症の発症機序は、1908年にCullenらが提唱した子宮内膜の直接進展説がもっとも有力視されているが、ほかにもミューラー管遺残説、脈管進展説も存在している。しかし、いずれの説についてもそのメカニズムを十分には解明できていない。一方子宮腺筋症の非連続的な侵入は悪性腫瘍の特徴の一つである“浸潤”とよく類似している。悪性腫瘍は増殖維持能、アポトーシスからの回避能力、血管新生の促進能、浸潤・転移促進能、不死化など多くの特徴（異常）を併せ持つことでその悪性度を高めている<sup>3</sup>。いくつかの特徴を併せ持っていることが逆に個々の事象のメカニズムの解明を困難にしていると考えられる。しかし、前癌

病変や初期病変、さらには子宮腺筋症のような良性であるにも関わらず“浸潤”という悪性疾患の特徴を有するような病態では“浸潤”という現象を解明するのがよりシンプルに行える可能性が秘められていると考えられる。私は子宮腺筋症において正常子宮内膜様の構造物が悪性腫瘍と同様に子宮筋層内へ“浸潤”していくという興味ある現象に着目しこの現象の分子メカニズムを解明し子宮腺筋症の発症予防や治療に応用すること、また悪性腫瘍における“浸潤”という特徴の本質を明らかにしたいと考えて本研究を行った。



図：子宮腺筋症の病理組織所見

子宮筋層内に正常内膜に類似した異所性内膜が不連続に侵入した像を示す。多くは腺管構造と間質細胞からなるが、間質細胞のみから構成される子宮腺筋症も認める。

# 第1章

プロテオーム解析を用いた子宮腺筋症の  
“浸潤”に関する分子の網羅的解析

# 1. 背景

2003年に全ゲノムシーケンスが終了し以降ポストゲノムあるいはポストゲノムシーケンス時代に入り、まずDNAマイクロアレイなどによるmRNAの網羅的発現解析が盛んに行われるようになった。しかし細胞内でのmRNA発現量とタンパクの存在量とは必ずしも比例しないこと、タンパク質の活性は細胞内での局在やプロセッシング、翻訳後修飾などmRNAとは別のレベルで制御されていることなどから、疾患の表現型としてのプロテオームへの関心が高まっている。さらによく保存されたmRNAを抽出するのに必須な新鮮凍結標本では形態学的に詳細な観察が困難なことが多く、cDNAマイクロアレイは部位選択的な解析に向かない。またプロテオーム解析の場合cDNAマイクロアレイ解析のように新鮮組織は必ずしも必須ではなく、形態学的な保存に優れたホルマリン固定材料でも精度は落ちるが解析が可能である。近年プロテオーム解析法の急速な進歩とヒトゲノム計画の成果によるデータベース化が進み、ヒト遺伝子により発現タンパク質の同定が容易になってきており、疾患診断の補助や分子メカニズムの解明の一助となることが期待されている<sup>4</sup>。

子宮腺筋症におけるプロテオーム解析も近年文献報告が散見されるようになってきているが、ターゲットとしている分子は報告毎に様々でありプロテオーム解析の網羅性を考えると報告に無いほかの分子にも重要な機能が隠されている可能性もあり、まだ検討の余地があると考えられる。

## 2. 対象と方法

### 2-1 症例背景

症例は筑波大学附属病院にて子宮腺筋症の診断で子宮摘出を行った 2 例を用いてプロテオーム解析を行った。それぞれ月経周期による影響を考慮して周期の増殖期および分泌期の症例を 1 例ずつ選択した。いずれの症例も書面による同意書が得られており、連結可能匿名化されている。

### 2-2 LMD を用いた組織からのタンパク質抽出と処理方法

正常内膜および子宮腺筋症病変部それぞれから LMD 法を用いてサンプルを採取するため、各症例のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片内に正常内膜部と子宮腺筋症病変部を含む切片を選択し、スライス厚は 10  $\mu\text{m}$  とした。使用したスライドガラスは LMD システム Leica CTR6000<sup>®</sup> に対応した Laser Micro dissection Slides (DIRECTOR<sup>®</sup>)を用いた。

LMD の前処置として組織切片の脱パラフィン処理を行い、ヘマトキシリン単染色のみ施行し自然乾燥させた。前もって作成しておいた同一標本の連続切片の HE 染色病理像で位置を確認しながら LMD 法を用いて正常内膜および子宮腺筋症部分から個別に組織片を採取した (図 1-1)。採取した組織量の目安としては合計で 2x4 mm 幅 (約 8000000  $\mu\text{m}^2$ ) をとるようにした。組織片の採取は 50 $\mu\text{l}$  PCR チューブのふたに 20  $\mu\text{l}$  の milliQ 水を入れ、その中へ落下させた。採取後はふたを慎重に締め、数秒間遠心しサンプルをチューブ側へスピンドウンした。

サンプルのトリプシン処理はホルマリン固定パラフィン包埋検体の処理も可能である Tissue® MS protein Prep kit (Expression Pathology 社) を用いて行い、解析まで-20℃で保存した。

### 2-3 LC-MS/MS 解析法

正常内膜および子宮腺筋症病変部のタンパク発現解析を LC-MS/MS 解析法にて行った。LC-MS/MS 解析は独立行政法人物質材料研究機構 中核研究部門 ナノテクノロジー融合部門にある ZAPLOUS LC/MS systems (AMR 社) にて行った。データベースによる解析は Matrix science 社の MASCOT®解析ソフトを用い、データベースは IPI human を選択した。

### 2-4 結果

LC-MS/MS 解析の結果、総検出タンパク数は 260 個であり、検出されたタンパク質の分子量は 11 kDa~3806 kDa の範囲内であった。その内訳は表 1-2 に示す。図 1-2 の 3 に示すように同定されるタンパク質は細胞内器官あるいは細胞質内タンパクが主体で膜タンパクや核内タンパクの数は限られていた。スペクトラムカウント法を用いると、正常内膜部に比較して腺筋症病変部において発現が亢進していたタンパクは表 1-1 に示す 73 個であった。

## 3. 候補タンパク質の選定と免疫染色

### 3-1. 候補タンパク質の選定

LC-MS/MS 解析の結果 (表 1-1) をもとに、普遍的に存在するアルブミンや

ケラチンなどのタンパク質を除外して文献的考察を加えたうえでこれまで浸潤との関与の報告があるタンパク質を候補タンパク質として選定した。最終的に選定された候補タンパク質は Lumican、Triosphosphate isomerase (TPI)、Moesin の3つである。Lumican は文献報告では腫瘍間質の繊維芽様細胞で発現が亢進し、浸潤細胞に近接して発現していることから浸潤との関与を示唆されている<sup>5-7</sup>。TPI は胎盤から分離されたタンパクで、糖代謝に関与する酵素であり低酸素下で発現が亢進するという報告がある一方、膀胱癌や肺腺癌また悪性黒色腫においてその発現量が亢進しているとの報告などプロテオーム解析から腫瘍との関連を示唆する報告が散見されている<sup>8,9</sup>。また、近年悪性腫瘍に罹患している患者血清中に TPI に対する自己抗体が存在するという報告も認められ癌の診断マーカーとしての役割を期待されている<sup>10</sup>。子宮腺筋症は妊娠・出産経験のある女性や中絶手術などの子宮内操作を受けた既往のある人に多いとの疫学調査もあり、これまで TPI と子宮腺筋症の関連を示唆する文献報告は認められないが、胎盤に発現の多い TPI は子宮腺筋症の浸潤と関連がある可能性があると考えた<sup>11</sup>。Moesin は細胞骨格タンパク質であり、アクチンと結合しリモデリングを起こすことで細胞形態を変化させ細胞に浸潤・遊走能を付与するとの報告がなされており、浸潤への関与が示唆される分子であり候補とした<sup>12-17</sup>。

### 3-2 免疫染色に用いた症例背景

候補タンパク質についてプロテオーム解析の結果の検証と、腺筋症病変部

でより特異的に発現が亢進しているタンパク質をスクリーニングするため免疫染色を行った。対象とした症例は、筑波大学附属病院にて 1998 年から 2010 年までに子宮腺筋症の診断で子宮摘出を行った症例 19 例とした。Moesin については、さらに 2012 年までに良性疾患にて子宮摘出を行い最終的に子宮腺筋症の診断がついた 16 例を追加し、免疫染色を行った。全症例は包括的同意書を得られていることを確認した。症例は 35 歳から 67 歳で、治療歴のある症例が 9 例、無い症例が 26 例であった。月経周期は病理学的所見から判断し増殖期 22 例、分泌期 11 例、閉経後 2 例であった。妊娠既往のある症例は 30 例、無い症例は 5 例であった。また、子宮手術の既往がある症例は 17 例であった (表 1-6 および 1-7)。

### 3-3. 免疫染色

正常内膜と子宮腺筋症病変部における発現比較をするため、同一スライド内に正常内膜組織と子宮腺筋症が共存する組織片を選択した。免疫染色は当診断病理研究室で確立された手法を用いて行った。MAS コートスライドガラスに 3 $\mu$ m スライス厚の組織片を乗せ免疫染色用のスライドを作成した。免疫染色の前処理としてキシレン溶剤にて脱パラフィン処理を行い、エタノール水和を行った。内因性ペルオキシダーゼの除去のため 3%過酸化水素水に 30 分間浸しながら軽く振とうした。流水水洗のち抗原の賦活化のため pH6.0 のクエン酸バッファーに浸して 121°C10 分オートクレーブ処理を行った。冷却後に PBS で洗浄し 1 次抗体反応を行った。各 1 次抗体濃度は表 1-3 の通りと

し、室温 1 時間反応させた。PBS で洗浄したのち 2 次抗体反応を施行した。室温 30 分反応させたのち PBS 洗浄、DAB (WAKO)にて発色を行った。ヘマトキシリン染色を行い、脱水—透徹の過程を経てカバーガラスにて封入を行った。

### 3-4. 評価方法

免疫染色の半定量的評価は正常内膜の上皮細胞および間質細胞、腺筋症病変部の上皮細胞および間質細胞に分けてスコアリングを行った。スコアリングの方法は、染色強度（1；陰性～線状に陽性、2；弱陽性、3；中等度陽性、4；強陽性）の 4 段階に分け、さらに陽性細胞の割合を加味してスコアリングした（100-400）。

### 3-5. 結果

免疫染色の結果、3つの候補タンパク質のうち腺筋症病変部で発現が特異的に亢進していたタンパク質は moesin のみであった（図 1-2）。Lumican、TPI に関しては染色性に有意差を認めなかった（図 1-3）。

特に Moesin の免疫染色結果は、35 例について上皮細胞および間質細胞での Moesin 染色性について別個に検討を行い、腺筋症の病変深度を含めて統計学的検討を行った。上皮細胞の Moesin 染色性に関する検討では、腺筋症病変部での染色性が正常内膜における染色性より優位であった症例は 23 例、正常内膜で優位であった症例は 12 例であった（表 1-6）。間質細胞の Moesin 染色性に関する検討では、腺筋症病変部での染色性が正常内膜と比較して優位であ

った症例は26例、正常内膜での染色性が優位であった症例は9例であった(表1-7)。症例毎に施行した Moesin 染色性に関するスコアリング結果をもとに、Wilcoxon 検定を用いて統計学的検討を施行したところ上皮細胞の Moesin 染色性は正常内膜と腺筋症病変部との間に有意差を認めなかった(図1-4 上段  $p = 0.098$ ) が、間質細胞の Moesin 染色性は腺筋症病変部において有意に高いことが明らかとなった(図1-4 下段  $p < 0.001$ )。子宮腺筋症の病変深度と Moesin の染色性との関連性については、上皮細胞および間質細胞いずれに関しても病変が浅いほど染色性が高くなるという逆相関の関係が認められた(図1-5)。

各症例に関して収集した月経周期、子宮手術歴、経妊産歴などの臨床情報と染色性との関連について  $\chi^2$  検定にて統計学的検討を行ったところ、間質細胞の Moesin 染色性と臨床情報との間に関連性は見出すことはできなかった(表1-6) が、上皮細胞の Moesin 染色性と子宮手術歴およびホルモン治療歴との関連性が認められた。(表1-7)。

## 4. Moesin の発現解析

### 4-1. 発現解析に使用した症例背景

発現解析に使用した症例は、独立行政法人国立病院機構 霞ヶ浦医療センター病院の西田正人院長のご協力を得て新鮮凍結検体の収集を行った。検体収集は筑波大学倫理委員会および霞ヶ浦医療センター病院倫理委員会の承認を得たうえで行った。西田院長に情報管理者となつていただき、研究者と対象症例

間は連結可能匿名化の状態とした。対象症例の同意書は西田院長に手術の説明の際に一緒にとっていただき、検体採取時に同意書がなされていることを書面上で確認した。

症例は子宮腺筋症の診断にて子宮摘出もしくは子宮腺筋症核出術を施行した症例で、正常内膜および子宮腺筋症病変部をそれぞれ個別に検体として採取した。採取した検体は氷冷したうえで研究室に持参し、Tissue-Tec® O.C.T compound (Sakura)を用いて包埋のうえアセトンドライを用いて-80℃凍結処理を行った。

#### 4-2. Total RNA の抽出および cDNA 合成

Total RNA の抽出は当診断病理研究室において確立された手法を用いて行った。正常内膜及び子宮腺筋症病変部からそれぞれ個別に RNA を抽出するため LMD 法を使用した。LMD system に対応した前述のスライド上にクライオスタットを用いて作成した 20 μm 厚の凍結組織片をのせ、氷冷下で 5%(v/v)酢酸エタノールを用いて 3 分間固定のち DPEC 水（氷冷）で 1 分間水洗、1 分間の 0.05 %トルイジンブルー染色を行い、再度 DPEC 水（氷冷）で 2 回水洗したのち 30 秒間風乾した。totalRNA 抽出はスライド作成後ただちに行った（保存が必要な場合は氷冷または-80℃保存とした）。total RNA の抽出には RNeasy Plus Mini Kit® (QIAGEN)を用いた。サンプルを回収する際の buffer として kit 内の buffer RLT plus/βメルカプトエタノールの混合溶液を用いた。プロトコールに従い total RNA を抽出し、nano Vue (GE)で濃度を測定した。抽出した RNA

は使用するまで-80℃保存とした。

続いて High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Applied and Bio systems)を用いて 200 ng の total RNA から cDNA 合成を行い解析に使用するまで-20℃保存とした。

#### 4-3. Real time RT-PCR 法による moesin の mRNA 発現解析と結果

計 14 例の凍結検体を用いて解析を行った。内因性コントロールとして  $\beta$ -actin の mRNA 発現量を同時に測定した。Real time RT-PCR は SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara)と 7300Real-Time PCR systems を用いて行った。Moesin のプライマー及び  $\beta$ -actin のプライマーは別表 1-4 の通りである。測定結果は正常内膜および子宮腺筋症病変部のそれぞれにおける moesin mRNA 発現量を  $\beta$ -actin mRNA 発現量で除した数値間で比較し、グラフは正常内膜での moesin mRNA 発現量を 1 とした場合の子宮腺筋症病変部における moesin mRNA 発現量を相対値として表した。14 例中 9 例 (64 %) の症例において正常内膜に比較して子宮腺筋症病変部における moesin mRNA の発現が亢進しており、Wilcoxon 検定による統計学的検討においても子宮腺筋症病変部において moesin mRNA の発現が有意に亢進しているとの結果となった (図 1-5、 $p < 0.05$ )。

#### 4-4. タンパク抽出および濃縮

real time RT-PCR を施行した 14 例を対象とした。-80 °C凍結保存しておいた正常内膜および子宮腺筋症病変部の組織片をそれぞれクライオスタットにて

10 µm 厚、各 20 枚作成した。各組織を T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent (PIERCE) 500 µl の入った 1.5 ml チューブに入れ、5 µl の Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo scientific)を加えたうえで 4°C、2 時間ホモジェナイズを行ったのち氷冷下で超音波破碎を行った。サンプルを 15000 rpm、10 分間遠心し上清を回収した。得られた上清をさらに濃縮するため Amicon Ultra-0.5 3K (Millipore)を使用した。採取したサンプルは解析に用いるまで-80°C 保存とした。

#### 4 - 5. Western blotting 法による moesin の発現解析と結果

Western blotting は 20 µg のタンパクを用いて行った。Total 20 µl となるようにサンプルを調整し、95°C5 分間の熱変性を加えたうえで 12%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。iBlot™ gel transfer system (Invitrogen)を用いて PVDF 膜にタンパクを転写し、ブロッキングを施行したのち抗体反応を行った。バンド検出は Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo)を使用した。用いた 1 次抗体および 2 次抗体は表 1-5 に示す通りである。結果は 14 例全例において正常内膜に比較して子宮腺筋症の moesin 発現が亢進していることが明らかとなった (図 1-6)。また、検出されたバンドを image J 解析ソフトを用いて解析・定量化し得られたデータを student の t 検定にかけて統計学的検討を行った。結果統計学的にも有意に腺筋症病変部での moesin 発現亢進が確認された ( $p=0.0006$ )。

## 5. 考察

プロテオーム解析により子宮腺筋症の浸潤に関与する分子を網羅的に探索し、免疫染色、real time RT-PCR 法および western blotting 法にて moesin の発現が子宮腺筋症にて有意に亢進していることが判明した。症例によって moesin の mRNA の発現と western blotting 法によるタンパク発現の結果に乖離が認められたが、タンパクの半減期の問題や mRNA 発現とのタイムラグなどが原因と考えられた。

Moesin の発現が亢進している意義として子宮腺筋症病変深度、月経周期、子宮手術歴、経妊産歴などの臨床情報との関連を検討した。上皮細胞における Moesin 発現亢進と子宮手術歴およびホルモン治療歴との間に関連が示された。文献報告では子宮腺筋症と子宮手術既往との関連を報告するものもあり子宮手術後の修復過程において Moesin が高発現するとも考えうる。また病変の深度との関連では上皮細胞・間質細胞いずれにおいても Moesin の発現量との逆相関の関係であり、病変形成初期においてより Moesin の発現が亢進しやすいという可能性が考えられた。一方文献報告にて EMT と moesin の発現亢進との関連を示唆するものが近年認められ、*In vitro* の実験系ではあるが、EMT を誘導すると moesin の発現が亢進しそのことにより EMT の効率が良くなると報告されている<sup>18-20</sup>。正常内膜の上皮細胞が EMT を起こして間質細胞様となり子宮筋層内へ浸潤し浸潤した先で MET 現象により上皮腺管構造を構築するという可能性はあり、この可能性についても検討する必要があると考えられた<sup>21</sup>。本研究では、腺筋症の間質の細胞で moesin の発現が亢進していることを明らかにした。子宮内膜間質細

胞はもともと内膜上皮細胞の分化誘導能や再生能を備えており、組織幹細胞の存在を示唆する文献報告も多く存在する<sup>22-27</sup>。また腺筋症患者由来の間質細胞と子宮筋細胞の共培養実験系に関する論文報告があり、間質細胞が筋細胞と共同して腺筋症の浸潤病変の形成に関与しているとの報告も存在している<sup>28</sup>。そのような内膜間質細胞が *moesin* の発現亢進に伴い浸潤能を獲得し子宮筋層内へ移動・上皮腺管成分へ形質転換した可能性があると考えられた<sup>3</sup>。

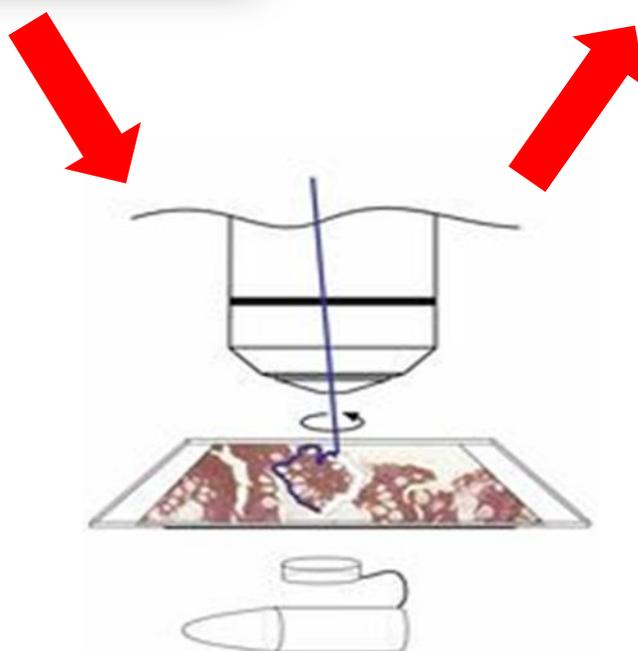
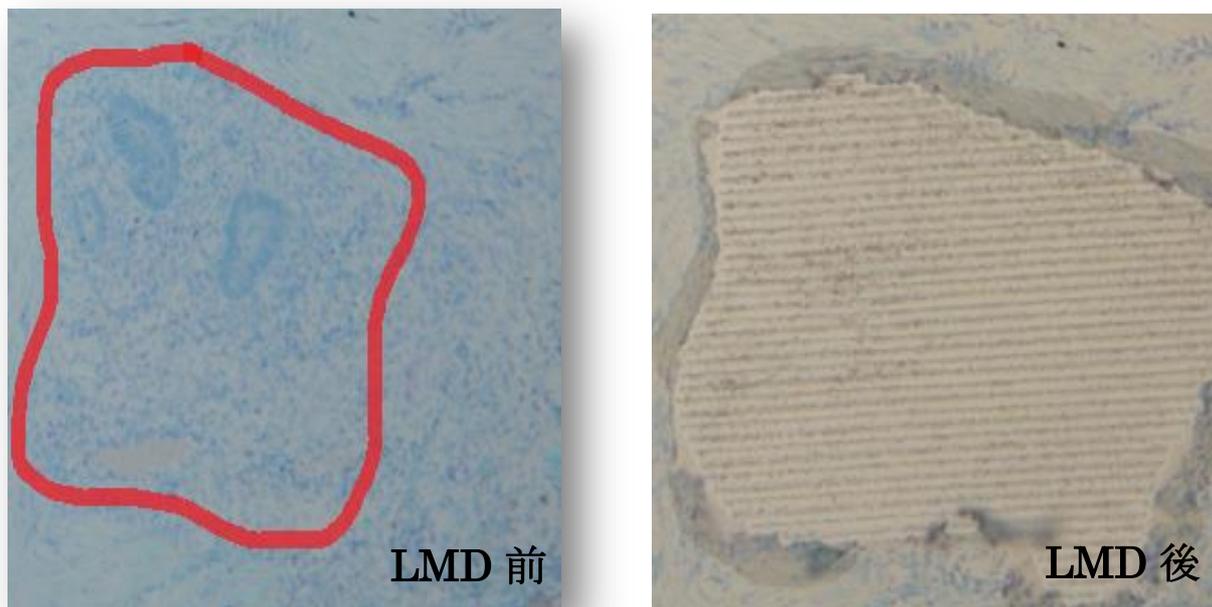


図 1-1 LMD を用いた組織からのタンパク抽出

ヘマトキシリン染色のみ施行し、LMD システム (LeicaCTR6000®) で切除する範囲を指定し、レーザーにて削り採取した。切除組織片はチューブのふたに回収される。

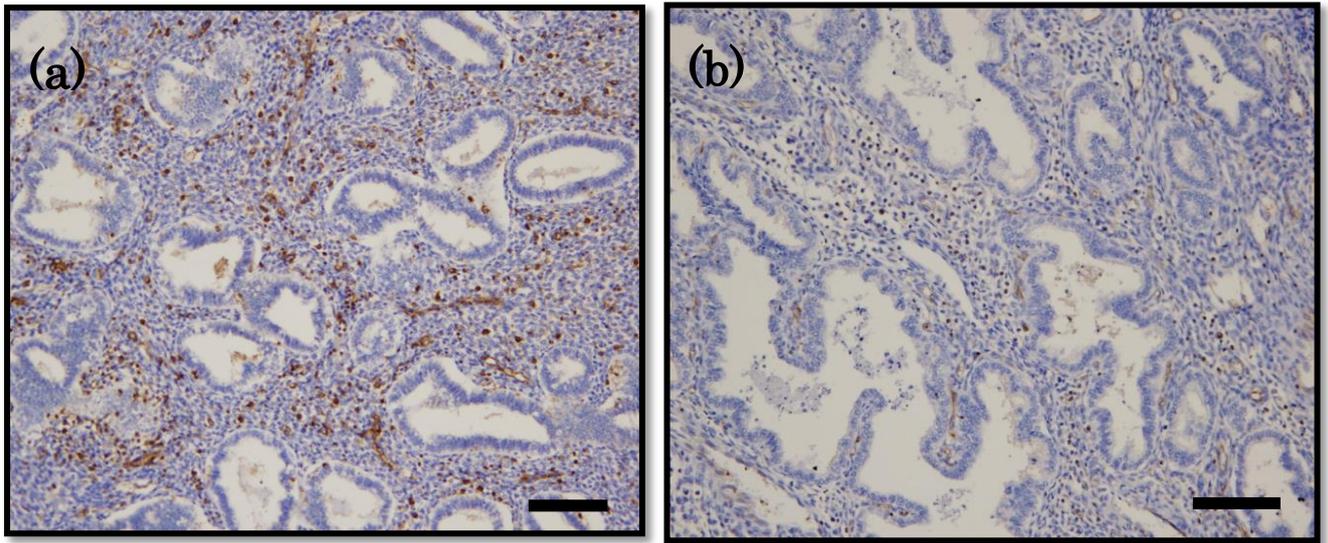


図 1-2 moesin の免疫染色像 (x200)

(a) 子宮腺筋症病変部

Moesin は腺筋症の主に間質の細胞にて陽性となった。

(b) 正常内膜部

正常内膜においてはほとんど染色されなかった。

Positive control: 甲状腺癌 Scale bar 50µm

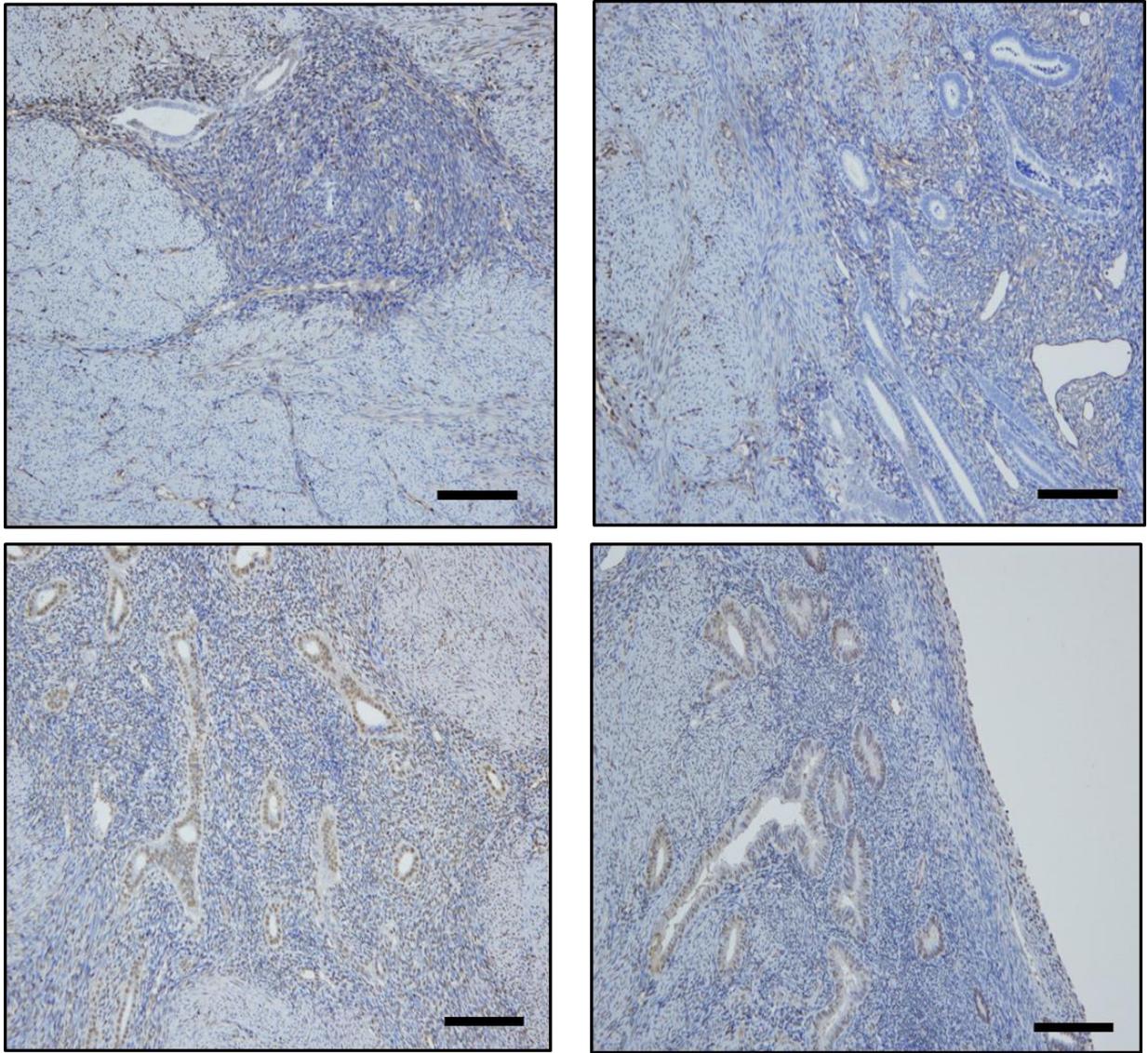


図 1-3 Lumican、TPI の免疫染色像 (x200)

Lumican および TPI の免疫染色では正常内膜、腺筋症病変部の染色性に有意差を認めなかった。

Lumican の Positive control : 類内膜腺癌

TPI の positive control : 胎盤組織

Scale bar : 50  $\mu$ m

腺筋症病変部 Lumican x200	正常内膜 Lumican x200
腺筋症病変部 TPI x200	正常内膜 TPI x200

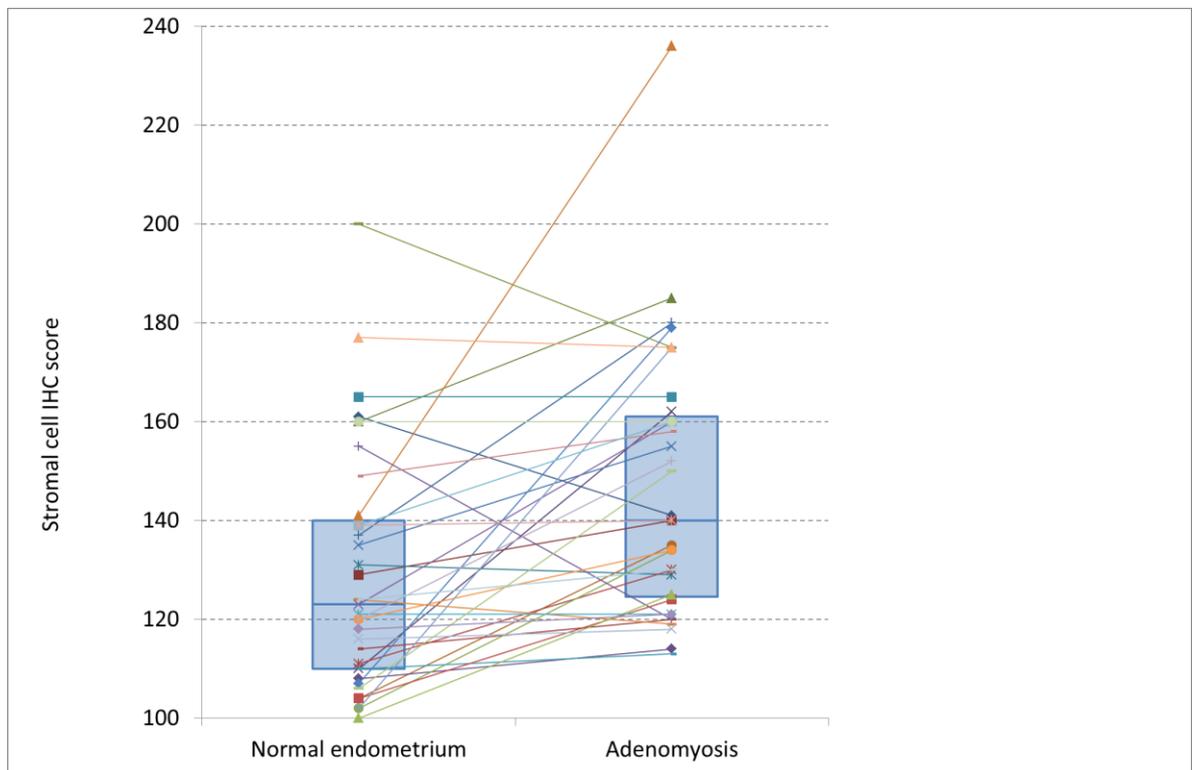
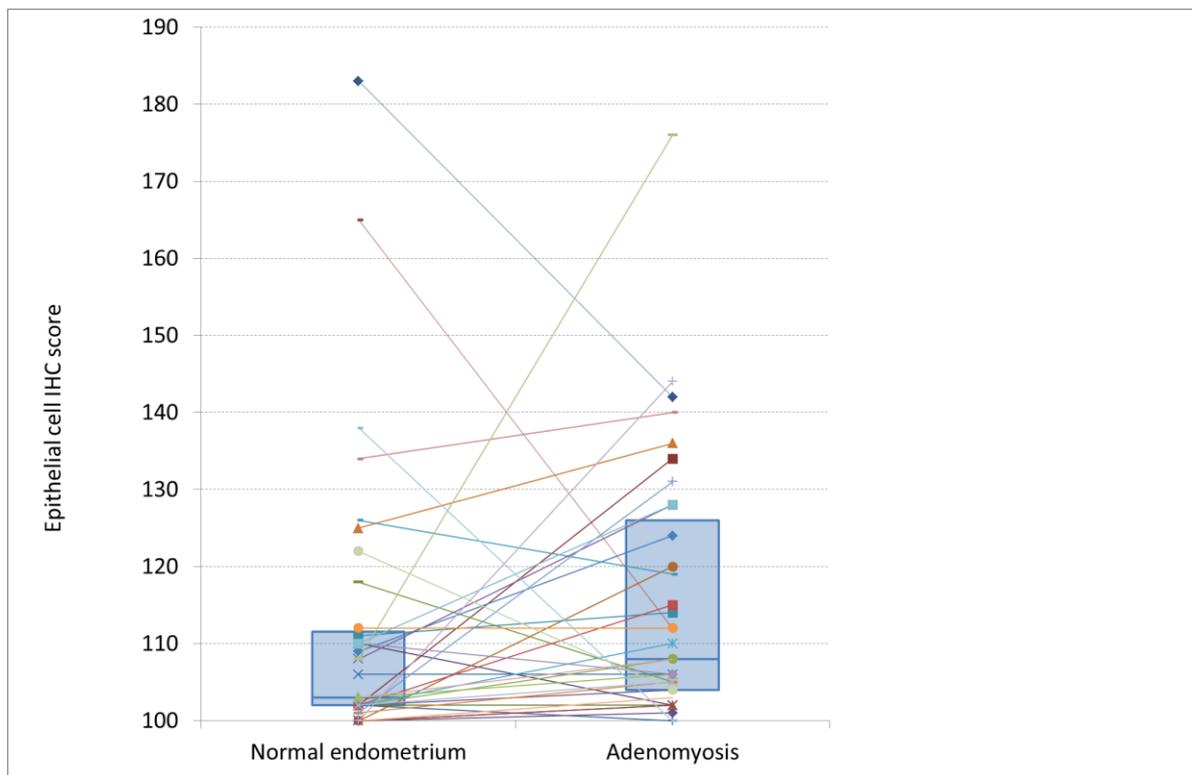


図 1-4 正常内膜と子宮腺筋症病変部における Moesin 染色に関する統計解析  
 上皮細胞においては腺筋症病変部と正常内膜における Moesin 染色性に有意差を認めなかった（上段  $p=0.098$  , *Wilcoxon* 検定）が、間質細胞に関しては腺筋症病変部における Moesin 染色性が有意に高かった（下段  $p<0.001$  , *Wilcoxon* 検定）。

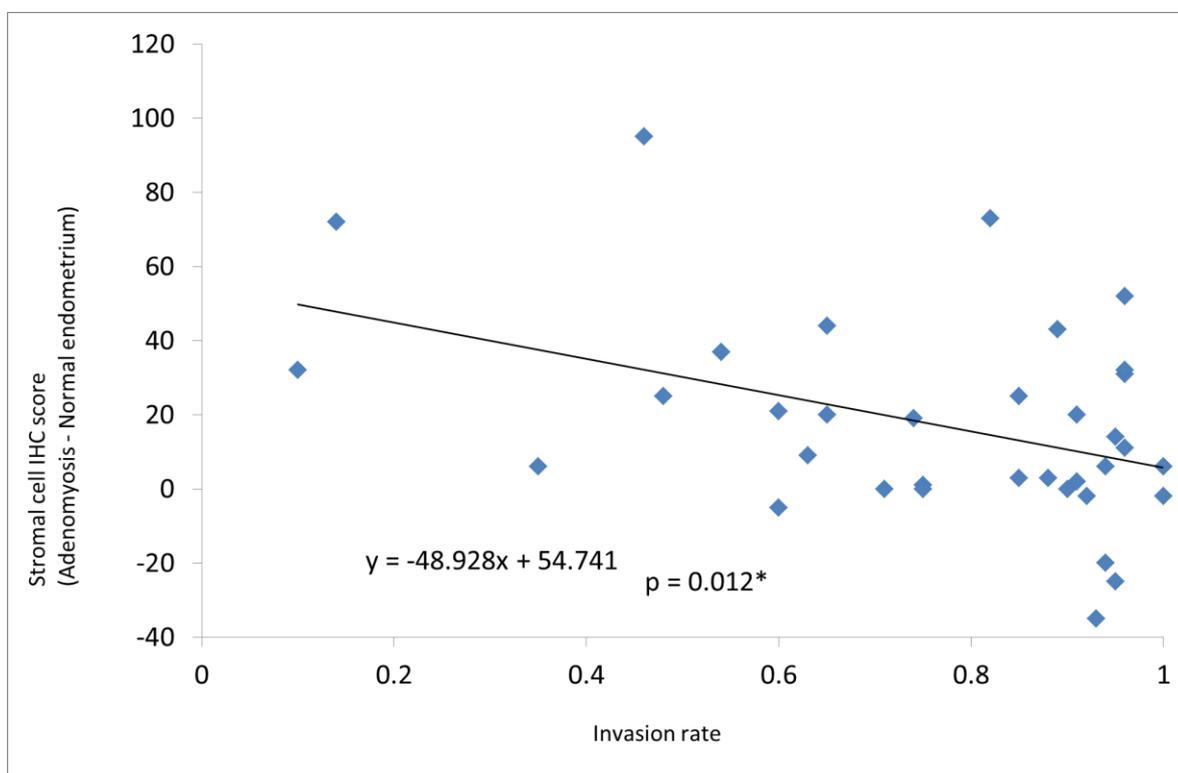
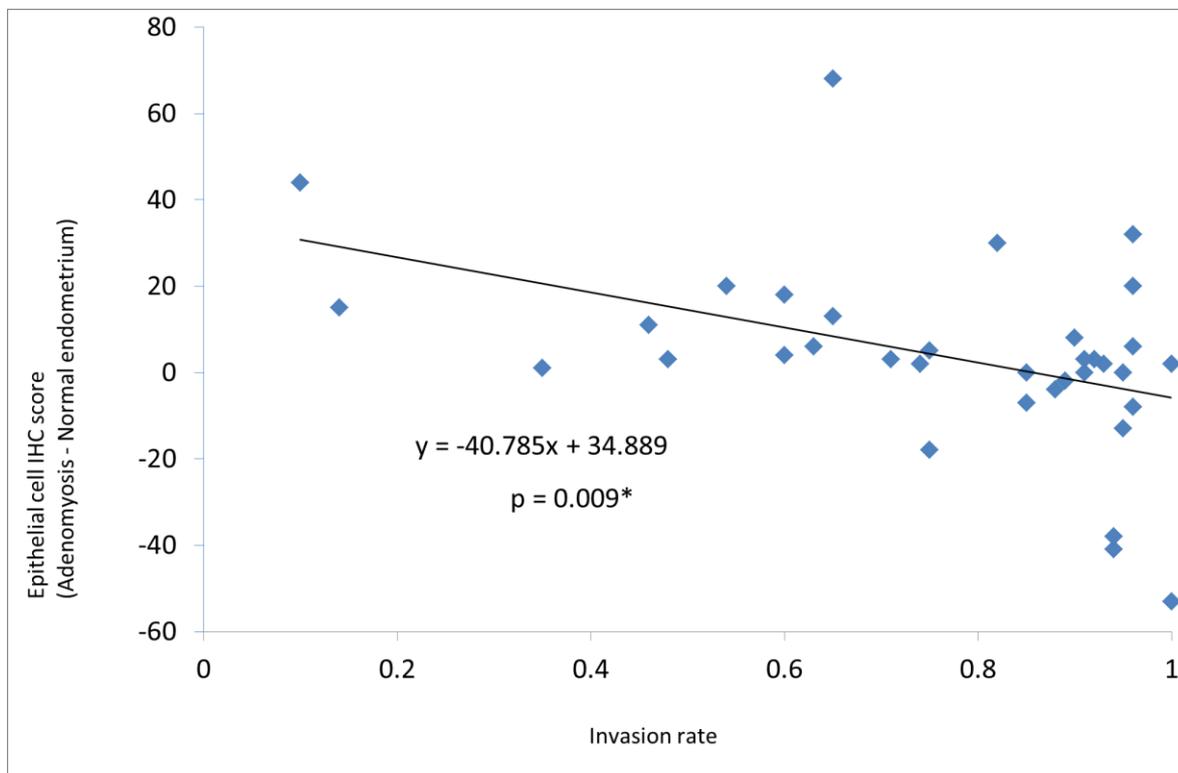


図 1-5 子宮腺筋症の病変深度と Moesin 染色性に関する解析

上皮細胞および間質細胞のどちらに関しても、病変形成が浅いほど Moesin の染色性が強いという、染色性と病変深度は逆相関の関係にあった。

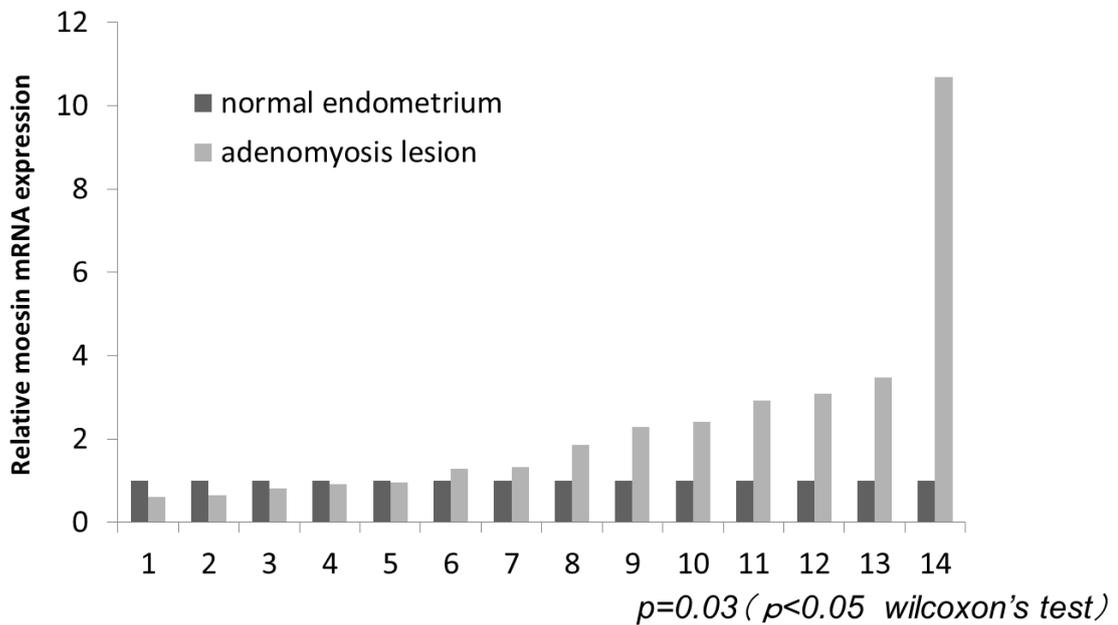


図 1-6 定量 PCR を用いた moesin mRNA の発現解析

臨床検体 14 例の正常内膜と子宮腺筋症病変部における moesin mRNA の発現の比較検討をした。14 例中 9 例 (64%) の症例において正常内膜より腺筋症での moesin の発現が亢進していた。グラフは正常内膜での moesin mRNA 発現量を 1 とした場合の腺筋症での moesin mRNA 発現量を相対値で表したものである。

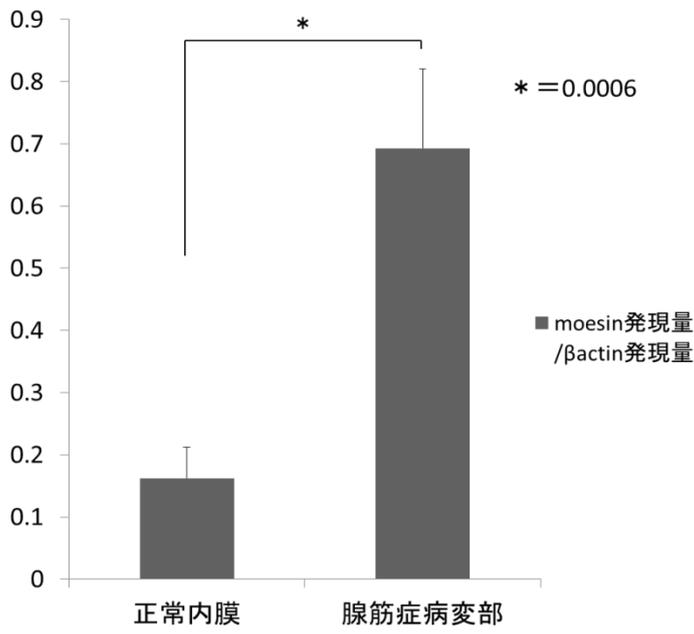
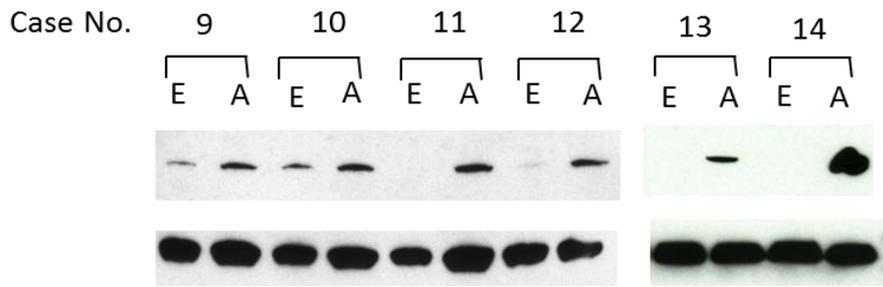
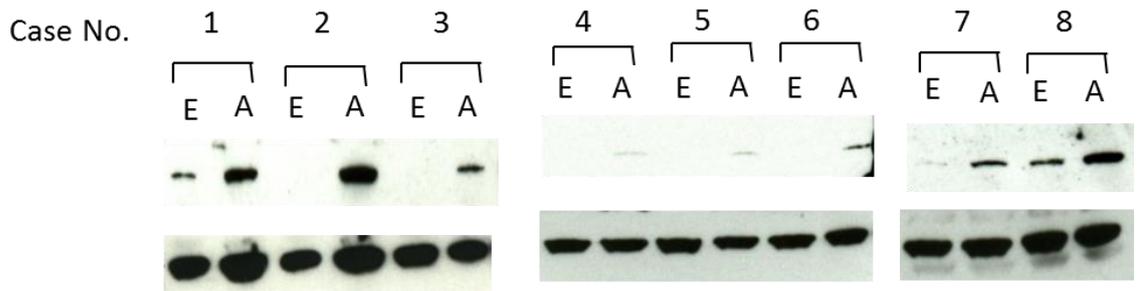


図 1-7 western blotting 法を用いた moesin の発現解析

定量 PCR を行った 14 例の正常内膜および子宮腺筋症における moesin タンパクの発現の比較検討を行った。発現量に程度の差はあるものの正常内膜に比較して子宮腺筋症での moesin タンパクの発現が亢進していることが明らかとなった。全 14 例に関して western blot で検出されたバンドを image J®ソフトウェアを用いて解析・定量化し、student の t 検定を用いて検討した。

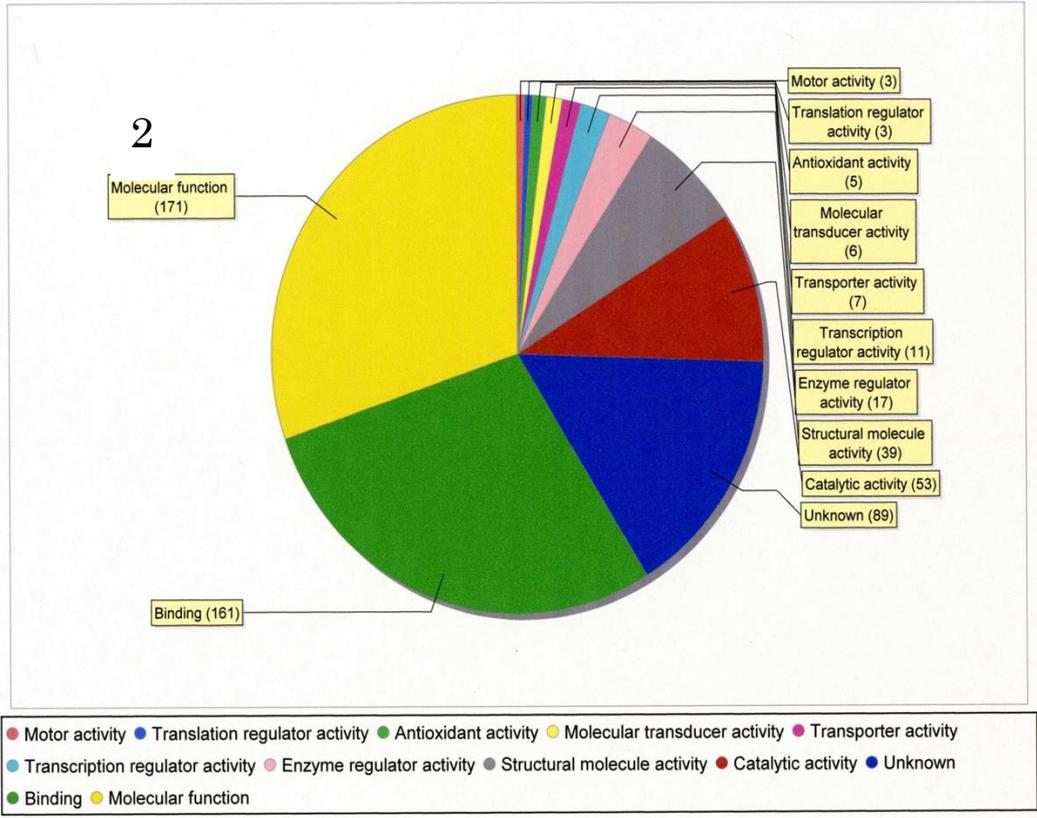
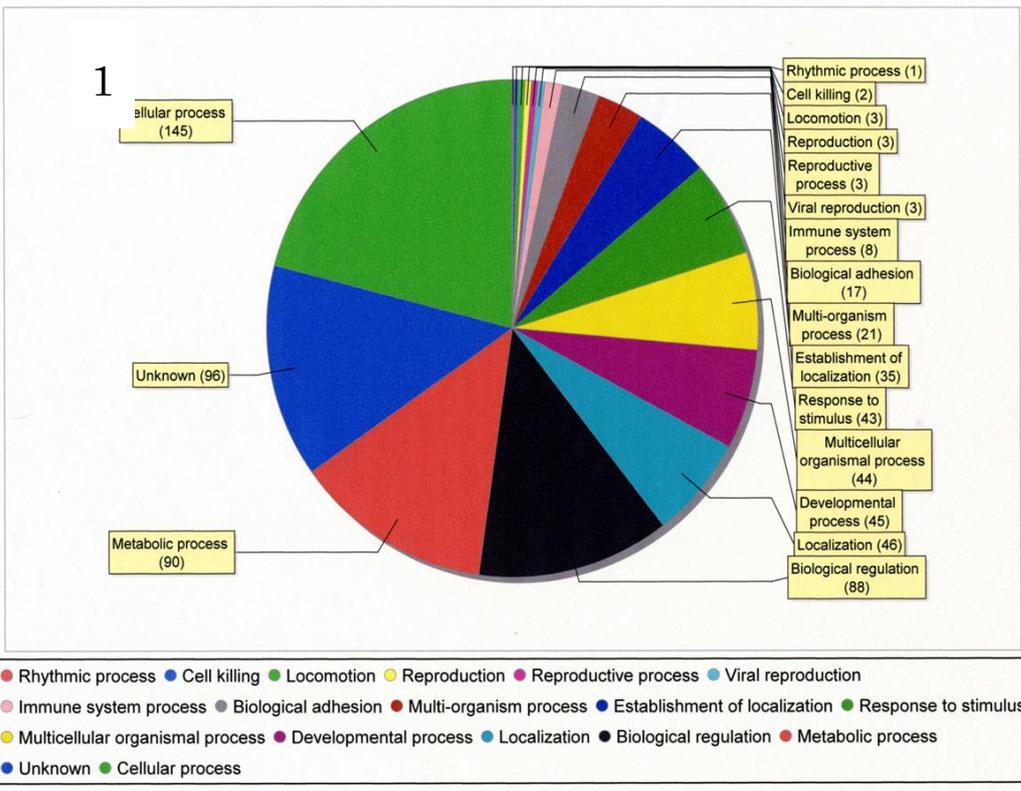
Identified proteins	Accession	molecular	proliferative	secretary
	Number	weight	phase #A/E	phase #A/E
Isoform 1 of Serum albumin	IPI00745872	69 kDa	1.9	1.4
Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42 kDa	1.8	1.3
Vimentin	IPI00418471	54 kDa	1.7	1.3
Isoform 2 of Filamin-A	IPI00302592	280 kDa	2.9	2.3
Isoform 1 of Collagen alpha-3(VI) chain	IPI00022200	344 kDa	2.1	2.0
Collagen alpha-1(I) chain	IPI00297646	139 kDa	1.1	4.0
Histone H2B type 2-E	IPI00003935	14 kDa	2.4	2.4
Tubulin beta chain	IPI00011654	50 kDa	5.5	2.8
Myosin-11	IPI00020501	227 kDa	7.0	7.0
Isoform 1 of Collagen alpha-1(XIV) chain	IPI00176193	194 kDa	1.1	3.3
Actin, alpha cardiac muscle 1	IPI00023006	42 kDa	5.0	3.0
Collagen alpha-2(I) chain	IPI00304962	129 kDa	1.1	3.3
Keratin, type I cytoskeletal 19	IPI00479145	44 kDa	5.0	3.0
Isoform 1 of Triosephosphate isomerase	IPI00465028	31 kDa	2.2	1.4
Keratin, type II cytoskeletal 8	IPI00554648	54 kDa	4.0	1.8
Desmin	IPI00465084	54 kDa	7.5	2.3
Collagen alpha-1(VI) chain	IPI00291136	109 kDa	3.3	5.0
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	IPI00303476	57 kDa	4.7	5.0
Alpha-actinin-1	IPI00013508	103 kDa	3.3	1.3
Isoform 1 of Heat shock cognate 71 kDa protein	IPI00003865	71 kDa	4.5	1.7
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	IPI00219018	36 kDa	1.9	3.0
14-3-3 protein zeta/delta	IPI00021263	28 kDa	2.3	9.0
Annexin A5	IPI00329801	36 kDa	1.3	2.7
Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	IPI00216049	51 kDa	3.7	2.0
IGKV1-5 protein	IPI00419424	26 kDa	2.0	1.3
Talin-1	IPI00298994	270 kDa	5.5	3.0
Glutathione S-transferase P	IPI00219757	23 kDa	4.0	3.5
heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1 isoform 1	IPI00382470	98 kDa	3.0	2.5
Lumican	IPI00020986	38 kDa	1.2	3.0
Isoform 2C2 of Collagen alpha-2(VI) chain	IPI00304840	109 kDa	2.0	6.0
Lamin-B2	IPI00009771	70 kDa	9.0	2.0
cDNA FLJ53368, highly similar to Pyruvate kinase isozymes M1/M2	IPI00847989	50 kDa	4.0	6.0
Heat shock protein beta-1	IPI00025512	23 kDa	1.3	1.3
Isoform B1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	IPI00396378	37 kDa	3.5	2.5
Elongation factor 1-alpha	IPI00025447	48 kDa	6.0	1.7
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	IPI00645078	118 kDa	7.0	3.0
Calponin-1	IPI00021264	33 kDa	2.0	3.0
Endoplasmic	IPI00027230	92 kDa	2.0	1.3

Hemoglobin subunit alpha	IPI00410714	15 kDa	2.0	5.0
Isoform 2 of Tropomyosin beta chain	IPI00220709	33 kDa	7.0	3.0
Isoform 4 of Collagen alpha-1(XII) chain	IPI00302944	325 kDa	2.0	3.3
cDNA FLJ44920 fis, clone BRAMY3011501, highly similar to	IPI00640106	83 kDa	1.5	3.0
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U				
EMILIN-1	IPI00013079	107 kDa	6.0	4.0
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	IPI00024284	469 kDa	5.0	4.0
Keratin, type I cytoskeletal 18	IPI00554788	48 kDa	1.5	2.5
ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1	IPI00644712	70 kDa	2.5	2.0
H2A histone family, member Y isoform 2	IPI00059366	39 kDa	3.0	2.0
cDNA FLJ54957, highly similar to Transketolase	IPI00643920	69 kDa	1.3	2.0
Isoform XB of Tenascin-X	IPI00025276	464 kDa	3.0	2.0
Isoform 1 of Alpha-1-antitrypsin	IPI00553177	47 kDa	6.0	2.0
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	IPI00440493	60 kDa	2.5	2.0
Isoform 1 of Nucleophosmin	IPI00549248	33 kDa	3.0	3.0
Fibrillin-1	IPI00328113	312 kDa	2.0	3.0
Isoform Long of 14-3-3 protein beta/alpha	IPI00216318	28 kDa	1.5	1.3
Isoform Non-muscle of Myosin light polypeptide 6	IPI00335168	17 kDa	2.0	2.0
Profilin-1	IPI00216691	15 kDa	2.5	3.0
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	IPI00419585	18 kDa	2.0	4.0
Malate dehydrogenase, mitochondrial	IPI00291006	36 kDa	2.0	3.0
Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	IPI00018219	75 kDa	1.5	2.0
L-lactate dehydrogenase B chain	IPI00219217	37 kDa	2.0	1.2
Isoform 1 of Gelsolin	IPI00026314	86 kDa	2.0	3.0
Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	IPI00013877	37 kDa	2.3	2.0
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	IPI00022774	89 kDa	2.0	1.5
Peroxiredoxin-1	IPI00000874	22 kDa	2.0	2.0
Moesin	IPI00219365	68 kDa	2.0	1.3
Non-POU domain-containing octamer-binding protein	IPI00304596	54 kDa	2.0	2.0
Stress-70 protein, mitochondrial	IPI00007765	74 kDa	2.0	2.0
Isoform 1 of Fibronectin	IPI00022418	263 kDa	2.0	1.5
DEAD box polypeptide 17 isoform 1	IPI00023785	80 kDa	1.3	2.0
Laminin subunit gamma-1	IPI00298281	178 kDa	2.0	3.0
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	IPI00031522	83 kDa	2.0	1.5
Collagen alpha-1(XV) chain	IPI00295414	142 kDa	2.0	2.0
Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha	IPI00216230	75 kDa	3.0	1.5

表 1-1 MS 解析で子宮腺筋症での発現が多かったタンパク質

スペクトラムカウント法にて計 260 タンパクのうち 73 個のタンパクが増殖期および分泌期腺筋症病変部で発現が亢進していた。

#A/E : Number of spectrum count for Adenomyosis/Endometrium



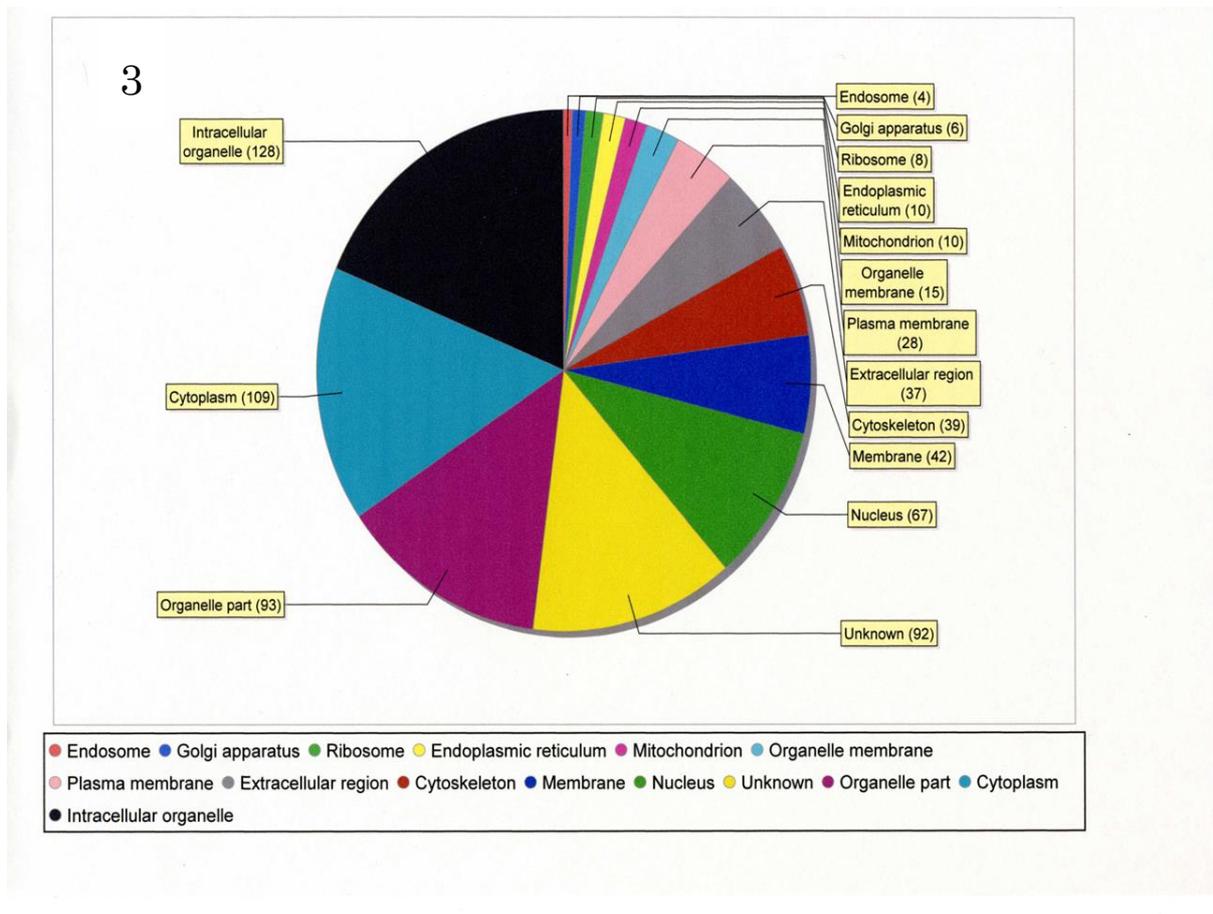


表 1-2 MS 解析結果 (Gene Ontology)

1 : biological process

2 : molecular function

3 : cellular component

1 次抗体	濃度
Anti human Lumican antibody (R&D systems)	x100
Triosephosphate isomerase antibody (Novus biological)	x200
Anti moesin antibody (SIGMA- ALDRICH)	x100

表 1-3 免疫染色で使用した抗体一覧

forward primer	reverse primer
Moesin	
5'-AGCCTGTGCCCTGATCCAAG-3'	5'-GGGACAGAACAGCTGGTGTCAA-3'
β-actin	
5'- TGGCACCCAGCACAATGAA-3'	5'- CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'

表 1-4 定量 PCR に用いた moesin および β-actin プライマー配列

1 次抗体	濃度	2 次抗体
Anti moesin antibody (SIGMA-ALDRICH)	x50	anti Rabbit IgG antibody
Anti βactin antibody (SIGMA-ALDRICH)	x1000	anti mouse IgG antibody

表 1-5 western blotting で使用した抗体一覧

	Immunohisto-chemistry expression (Epithelial cell)			p value	Student t test
	ADM > Normal	ADM ≤ Normal			
	endometrium	endometrium			
	Case = 23	Case = 12			
Age(year)			0.535		
Median (Range)	47 (37 - 67)	45.5 (35 - 55)			
Pregnancy			0.467	$\chi$ .467	
None	4 ( 17% )	1 ( 8% )			
More than 1 time	19 ( 83% )	11 ( 92% )			
Parity			0.467	$\chi$ .467	
None	4 ( 17% )	1 ( 8% )			
More than 1 time	19 ( 83% )	11 ( 92% )			
Menarche age			0.482	$\chi$ .482	
< 12	2 ( 9% )	2 ( 17% )			
≥ 12	21 ( 91% )	10 ( 83% )			
History of uterine surgery			0.006*	$\chi$ .006r	
None	8 ( 35% )	10 ( 83% )			
More than 1 time	15 ( 65% )	2 ( 17% )			
Menstrual cycle			0.520	$\chi$ .520	
proliferative phase	16 ( 70% )	6 ( 50% )			
secretory phase	6 ( 26% )	5 ( 42% )			
postmenopause	1 ( 4% )	1 ( 8% )			
History of hormone therapy			0.012*	$\chi$ .012r	
None	14 ( 61% )	12 ( 100% )			
Done	9 ( 39% )	0 ( 0% )			

表 1-6 免疫染色に使用した手術検体の臨床情報および上皮細胞における moesin 発現に関する統計解析結果

	Immunohisto-chemistry expression (Stromal cell)		p value	
	ADM > Normal endometrium Case = 26	ADM ≤ Normal endometrium Case = 9		
Age(year)			0.335	Student t test
Median (Range)	47 (35 - 67)	45 (37 - 55)		
Pregnancy			0.430	χ 2test
None	3 ( 12% )	2 ( 22% )		
More than 1 time	23 ( 88% )	7 ( 78% )		
Parity			0.430	χ 2test
None	3 ( 12% )	2 ( 22% )		
More than 1 time	23 ( 88% )	7 ( 78% )		
Menarche age			0.972	χ 2test
< 12	3 ( 12% )	1 ( 11% )		
≥ 12	23 ( 88% )	8 ( 89% )		
History of uterine surgery			0.774	χ 2test
None	13 ( 50% )	5 ( 56% )		
More than 1 time	13 ( 50% )	4 ( 44% )		
Menstrual cycle			0.166	χ 2test
proliferative phase	18 ( 69% )	4 ( 44% )		
secretory phase	6 ( 23% )	5 ( 56% )		
postmenopause	2 ( 8% )	0 ( 0% )		
History of hormone therapy			0.781	χ 2test
None	19 ( 73% )	7 ( 78% )		
Done	7 ( 27% )	2 ( 22% )		

表 1-7 免疫染色に使用した手術検体の臨床情報および間質細胞における moesin 発現に関する統計解析結果

## 第 2 章

### *in vitro* での Moesin の機能解析

# 1. 背景

Moesin は文献報告上アクチンと結合し細胞のリモデリングを生じることで細胞に様々な機能を付与するとされている。そこで、*in vitro* の実験系を用いて moesin の分子機能を検討する実験を行った。Moesin の細胞形態変化への影響および浸潤能への関与を検討項目とするため、RNA 干渉を用いた invasion assay および免疫蛍光染色による実験を行った。

# 2. 使用した細胞株

Moesin の機能解析を行った。moesin は子宮腺筋症の間質の細胞で多く発現していたが子宮腺筋症の間質の細胞株は存在しないので総合的に判断して子宮内膜間質肉腫細胞株である OMC-9 細胞を使用した。購入する前の予備実験として子宮内膜間質肉腫での moesin の発現状態は筑波大学附属病院で手術後、子宮内膜間質肉腫の診断に至った 4 症例を用いて免疫染色を行った (図 2-1)。その結果すべての症例で moesin の高発現が確認された。OMC-9 細胞株は RIKEN の cell bank より購入した。樹立論文も参考にして F-12 培地を用いて、37°C・5%CO<sub>2</sub> にて培養した<sup>29</sup>。OMC-9 細胞における moesin の発現は PCR 法を用いて増幅のち 2%アガロースゲル上で泳動しバンドの検出を行い確認した (図 2-2)。

## 3. 方法

### 3-1. siRNA 導入方法

siRNA 導入は lipofectamin® (Invitrogen) を用いて reverse transfection 法にて行った。5nM siRNA と  $10 \times 10^4$  cell/ml 濃度に調節した OMC-9 細胞を抗生剤無添加の F-12 培地 (10%FBS 含有) 下で 4 時間以上 incubation した。導入効率は moesin mRNA 発現を real time RT-PCR 法にて確認を行った。

### 3-2. siRNA の効果持続時間の検討

Invasion assay のための予備実験として、使用した moesin siRNA の効果持続時間とタンパク発現抑制までの時間についての検討を行った。siRNA 導入後 24 時間、48 時間、72 時間、96 時間で mRNA 発現およびタンパク発現についてそれぞれ real time RT-PCR 法および western blotting 法を用いて確認を行った。

結果 mRNA の発現は 24 時間で十分抑制されていたが (図 2-3 上段)、タンパク発現については 48 時間以降で十分に抑制されることが明らかとなった (図 2-3 下段)。

また、siRNA を導入することによる細胞活性の低下が起こっていないことを確認するため WST-1 assay を行った。結果 moesin の siRNA を導入した細胞群の活性はコントロール細胞に比較し 9 割であるという結果であった (data not shown)。この結果から moesin の siRNA を導入し invasion assay を行うことで、moesin が浸潤に関与するかどうかを純粹に検討できると判断した。

### 3-3. Invasion assay に用いた細胞の蛍光免疫染色法

さらに詳細に形態学的な評価をするために免疫蛍光染色による評価を行った。

ターゲットは moesin と重合型アクチン(F-actin)とした。OMC-9 細胞を Moesin siRNA 導入および negative control siRNA 導入し、chamber slide 上に播種した。24 時間経過した時点で 4%ホルムアルデヒド固定をし、0.5%Triton-X/ PBS 処理を行った上で 1 次抗体を 4°C cover night で反応させた。PBS 洗浄のち 2 次抗体反応を経て VECTASHIELD®で封入・核染し蛍光顕微鏡にて観察した。使用した抗体は表 2-1 に記載の通りである。

### 3-4. Invasion assay の方法

moesin の siRNA を用いた発現抑制細胞群と negative control siRNA 導入細胞群における浸潤能の差を比較することで moesin が浸潤に関与しうるか invasion assay を用いて検討した。Invasion assay は boyden chamber を基本とした assay kit (QCM™ 24-well Collagen-based Cell invasion Assay kit, CHEMICON, 8µm pore size, colorimetric)を用いて行った。予備実験の結果から、invasion assay は siRNA を導入後 48 時間から開始することとした。siRNA 導入後 48 時間の細胞を無血清培地下で 18 時間処理をしたうえで invasion assay のインサート内に細胞を添加した。細胞濃度は  $5 \times 10^5$  cell/ml とし無血清下で添加した。Insert は血清培地を入れた chamber 内に浸るように設置し 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下でさらに 48 時間培養した。

48 時間後、浸潤し insert の膜下に生着した細胞のみを染色した後脱色、染色液の濃度を 560 nm 吸光度測定し比較した (図 2-4)。

## 4. RNA 干渉法を用いた細胞形態変化と浸潤能解析の結果

通常の位相差顕微鏡学的に観察をすると、Moesin の siRNA を導入した細胞は negative control siRNA 導入細胞に比較して形態学的な変化が生じていた (図 2-5)。免疫蛍光染色法による moesin siRNA 導入細胞と negative control siRNA 導入細胞の形態学的評価では、negative control siRNA 導入では細胞突起が明らかで、F-actin 繊維の配列が規則正しいのに比較して、moesin siRNA 導入した細胞では細胞突起の消失および F-actin 繊維の配列の不規則化が認められ形態学的にも変化が確認された (図 2-6)。

Invasion assay では moesin siRNA 導入細胞群における浸潤能が有意に低下していることが明らかとなった (図 2-7)。

## 5. 考察

Moesin の機能解析のため moesin の発現を抑制する siRNA を用いた RNA 干渉実験系で OMC-9 の形態変化解析および invasion assay を行った。OMC-9 細胞において moesin の発現を抑制することで、OMC-9 細胞の形態が変化したことが明らかとなった。F-actin 繊維が不規則な配列となっていたことから moesin を抑制すると浸潤に必要な actin のリモデリングが起こらず、その浸潤能が低下したと考えられた。一方 OMC-9 の浸潤能が低減したことから moesin の分子機能のひとつとして浸潤に関与することが示された。子宮腺筋症において moesin が高発現している

ことはその浸潤能との関与を示唆するものであると考えられた。

つまり浸潤するには細胞のリモデリングが必要であり、その役割を **moesin** が果たしていると考えられた。子宮腺筋症の浸潤部で高発現している **moesin** を抑制することはその浸潤を抑制しうることが推察された。

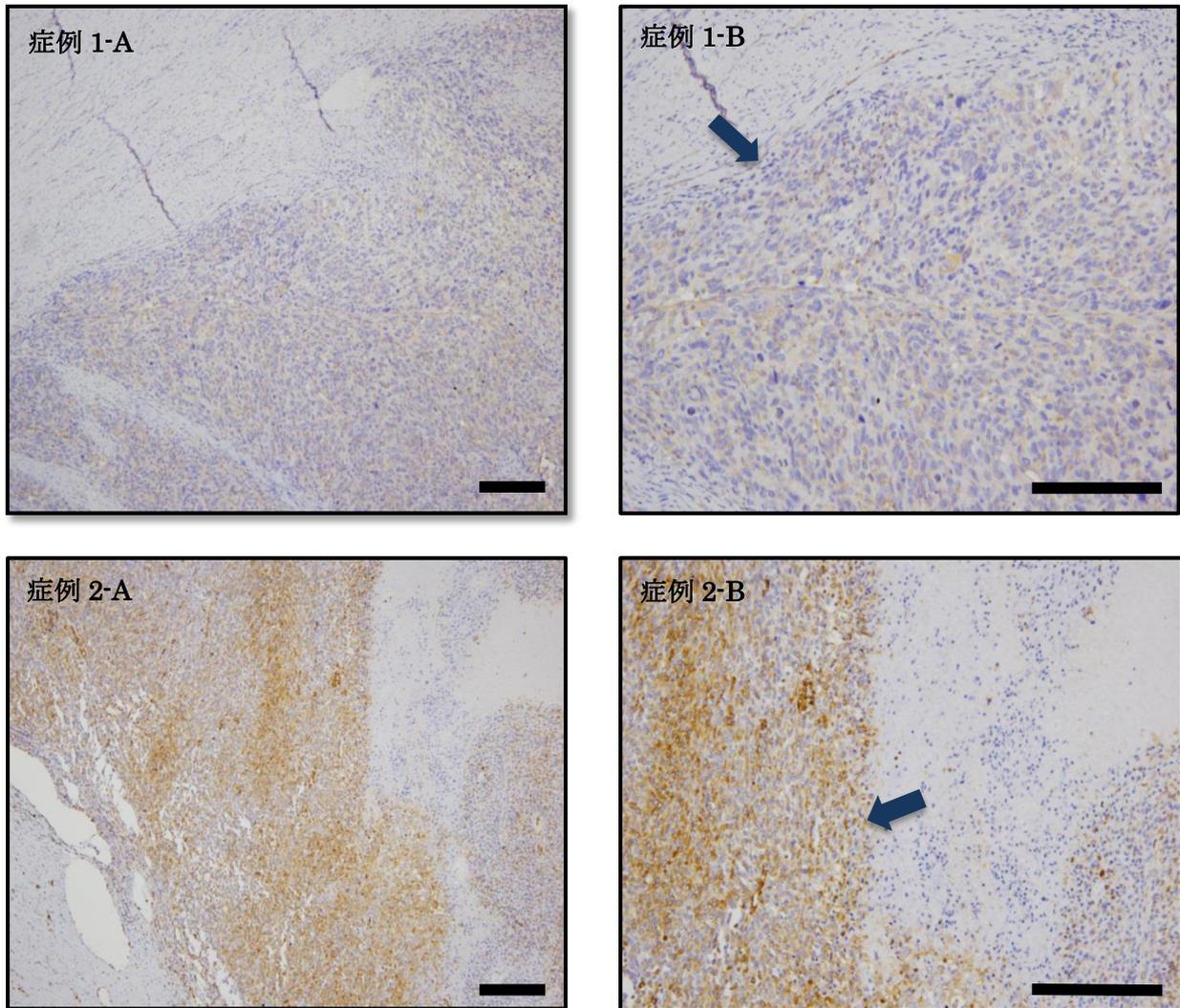


図 2-1 子宮内膜間質肉腫症例の moesin 免疫染色像 scale bar 50  $\mu$ m

子宮内膜間質肉腫症例における moesin タンパクの発現を検討するため、筑波大学附属病院手術症例を用いて免疫染色を行った。Moesin は腫瘍部 (→) において高発現であることが確認された。症例 1-A : x100 1-B : x200、 症例 2-A : x100 2-B : x200

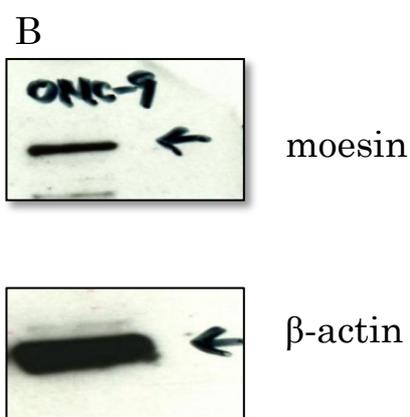
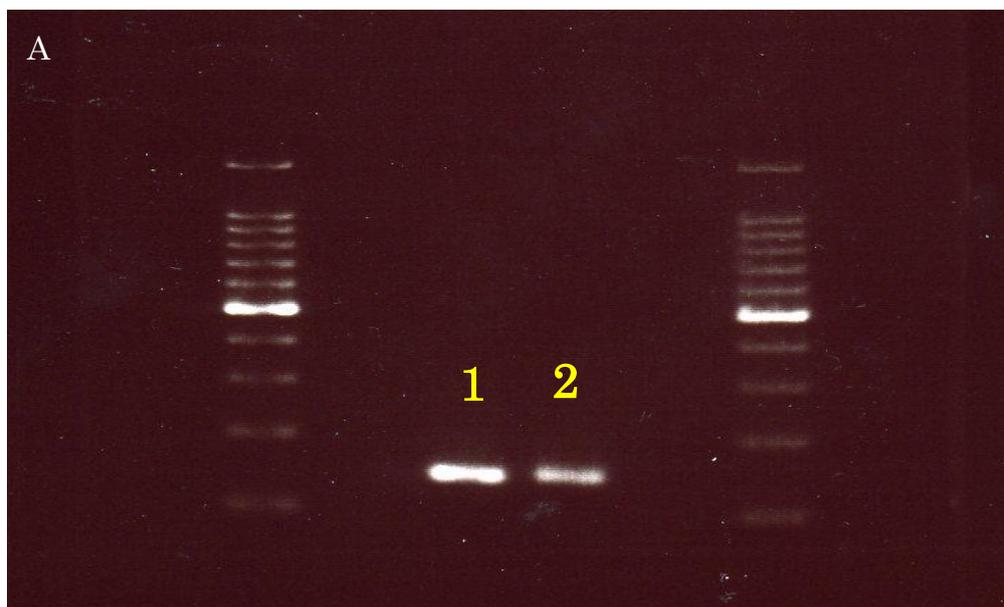


図 2-2 OMC-9 細胞における moesin 発現解析

A: Invasion assay に使用する OMC-9 細胞における moesin の発現の有無について PCR を行い、2%アガロースゲルで泳動し検出した。1 は OMC-9 細胞の cell lysate、2 は臨床検体の子宮腺筋症から抽出した tRNA を鋳型とし cDNA を合成し PCR で増幅を行った。

Moesin : 143bp

B : OMC-9 細胞における moesin タンパク発現を western blotting 法にて検出した。

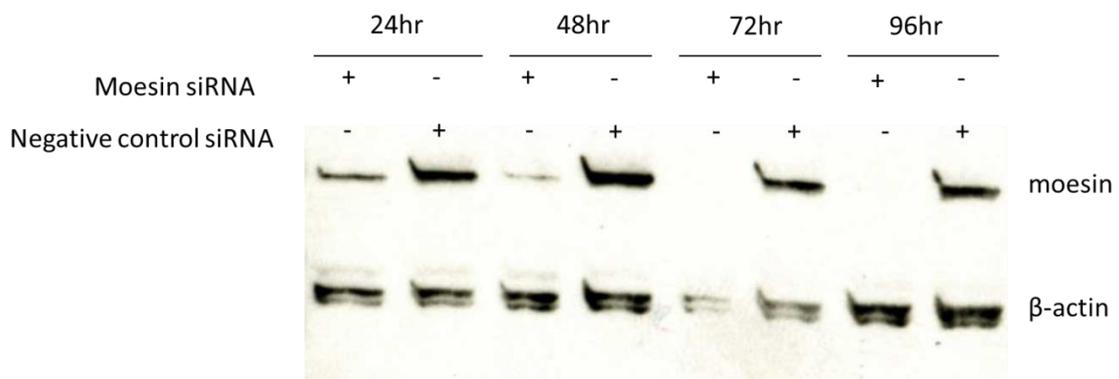
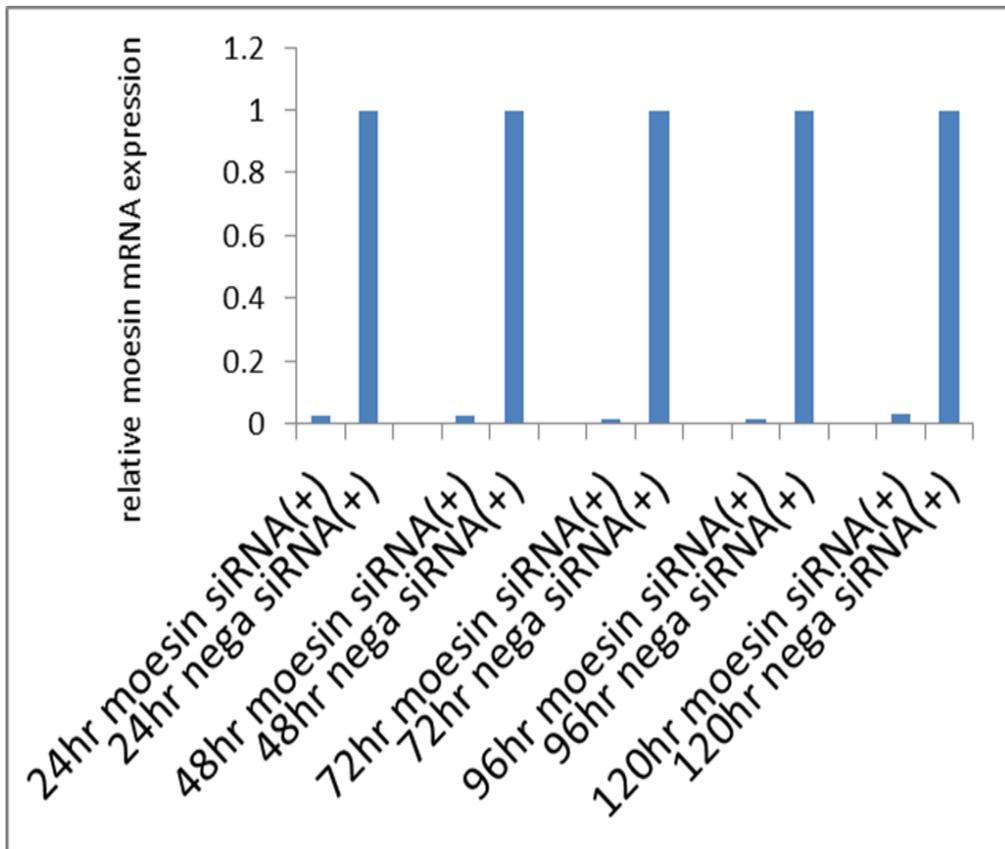


図 2-3 siRNA 効果持続時間の検討

OMC-9 における moesin targeted siRNA の効果の確認および効果持続時間を real time RT-PCR (上段) および western blotting 法 (下段) にて検討した。

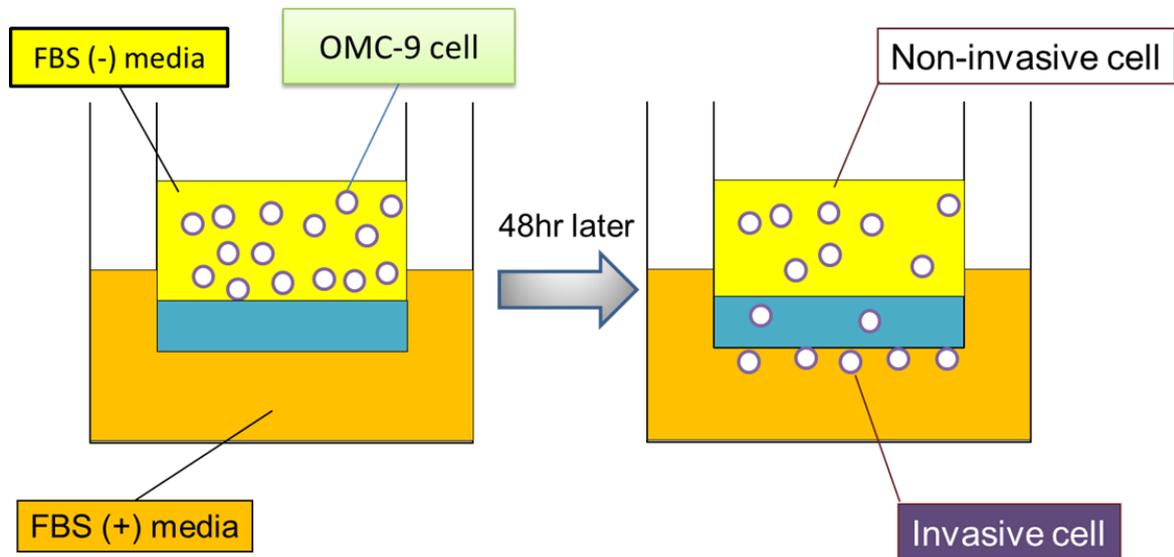


図 2-4 Invasion assay の方法

siRNA にて 48 時間前処理した各細胞群を chamber の insert 内に無血清培地とともに播種し、さらに 48 時間 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。48 時間の培養のち浸潤せず insert 内に残存した細胞は除去し、浸潤し insert 外の膜に生着した細胞のみを染色したのち脱色、染色液の 560 nm 吸光度測定を行って比較した。

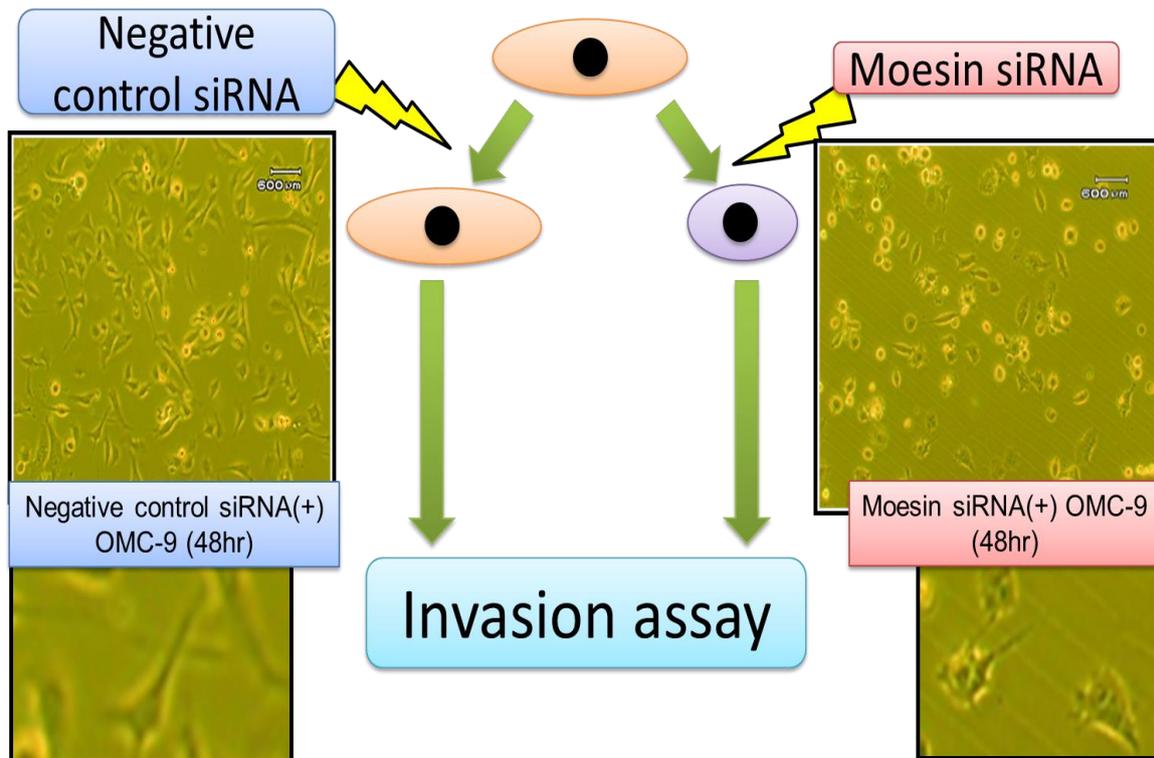


図 2-5 moesin siRNA 導入による細胞形態変化

Invasion assay は siRNA を導入後 48 時間経過した細胞を使用した。Negative control siRNA 細胞群と moesin targeted siRNA 導入細胞群における浸潤能を比較検討した。

写真は細胞の位相差顕微鏡像で、moesin targeted siRNA 導入細胞群の細胞突起は短縮し形態学的な変化が伺えた。

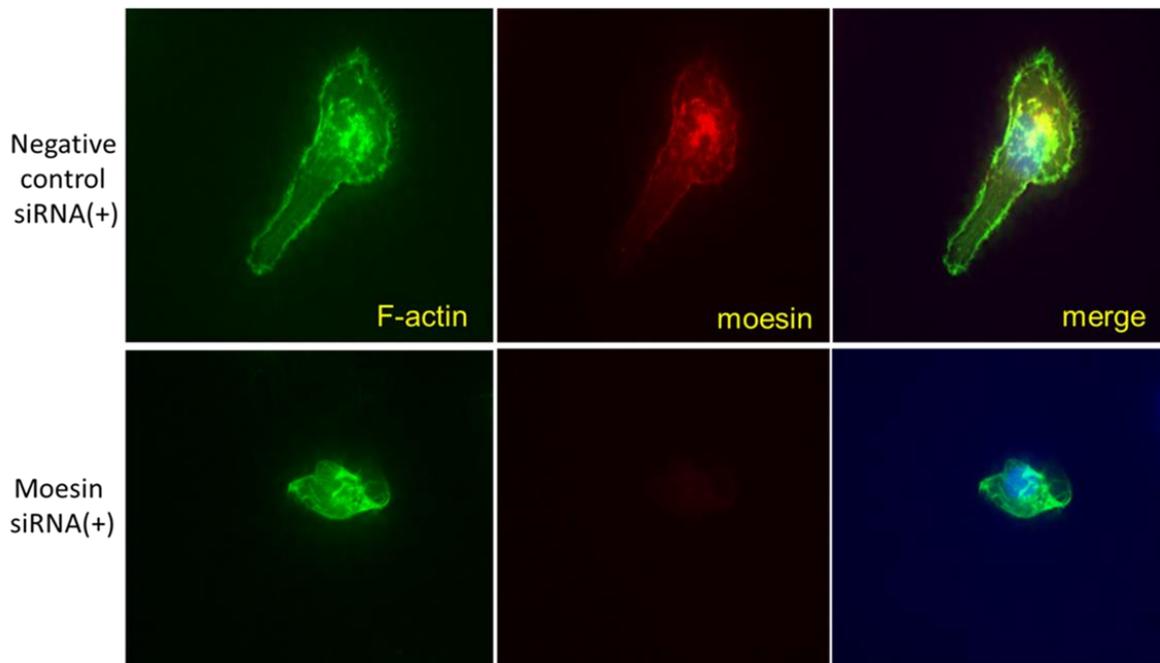


図 2-6 免疫蛍光染色法を用いた moesin siRNA 導入細胞の形態学的評価

Negative control siRNA 導入細胞群と moesin targeted siRNA 導入細胞群における形態学的な比較を行った。重合型 actin、moesin の 2 重蛍光免疫染色を行った。Control 細胞に比較して moesin の発現を抑制した細胞は、重合型 actin の構造が不規則となり、細胞突起が消失し形態学的に変化が表れていることが確認された。

重合型 actin : green、moesin : red、細胞核 : blue

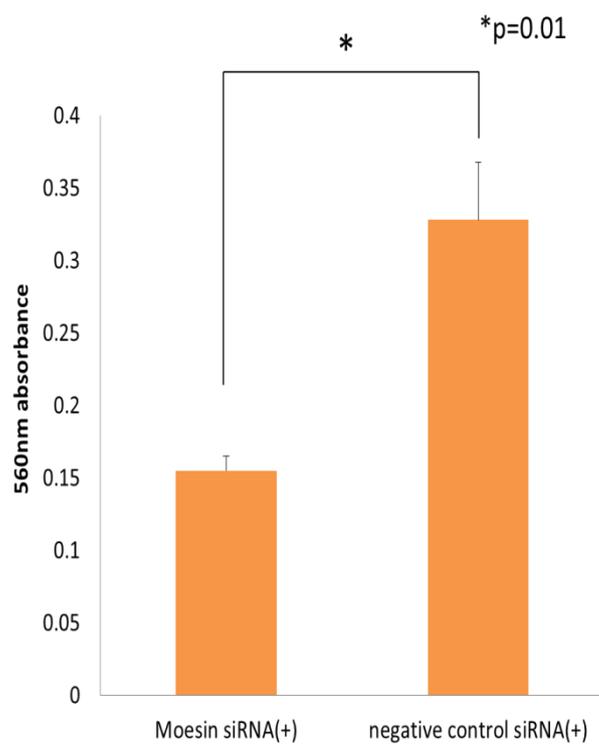
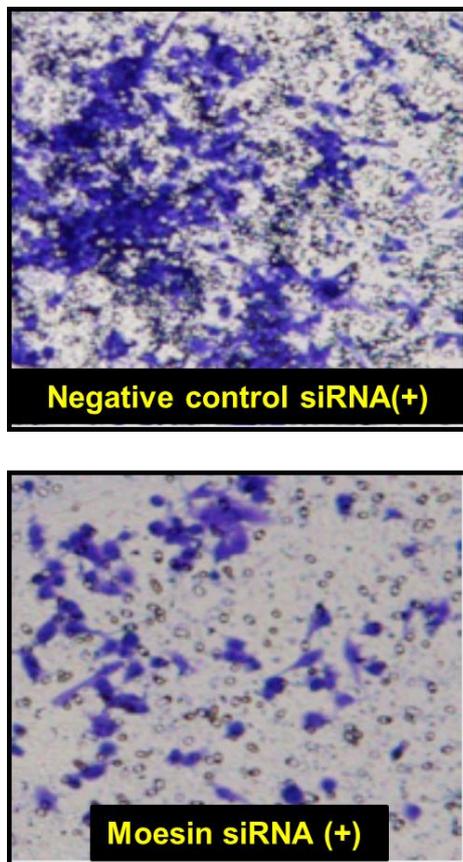


図 2-7 invasion assay の結果

Moesin siRNA 導入細胞群での浸潤細胞数は減少し、統計学的にも浸潤能が低下していることが明らかとなった。

1 次抗体	濃度	2 次抗体
Anti moesin antibody	x60	anti Rabbit IgG Rhodamine antibody
(SIGMA-ALDRICH)		
*Acti-stain <sup>TM</sup> 488 Fluorescent Phalloidin	x1000	
(Cytoskeleton)		

表 2-1 免疫蛍光染色に用いた抗体一覧

\*は蛍光色素が付随した抗体のため 2 次抗体を添加するとき同時に添加した。

## 第3章

### **Moesin** の活性化と浸潤のメカニズムと の関係における検討

## 1. 背景

Moesin は通常不活化型の場合は重合した状態で存在し、リン酸化を受けると活性化・重合が解除され C 末端ドメインがアクチン繊維と結合してアクチンのリモデリングを起こし細胞骨格を変化させ、細胞に浸潤・遊走能を付与するとされる。浸潤能を発揮するには moesin のリン酸化による活性化が必要であり、その経路の解明は新たな治療法の解明につながる可能性がある。Moesin のリン酸化経路はいくつか報告があり、細胞種ごとに異なっている可能性がある。代表的な経路としては図 3-1 にまとめたが、Rho-ROCK 経路、p38MAPK 経路、PKC を介する経路の報告がある<sup>30</sup>。特に Rho は低分子量 G タンパク質のひとつで、ROCK を介してターゲット分子のセリン・スレオニンをリン酸化する。ターゲットの一つとして moesin は文献報告されている<sup>15,31</sup>。本章では腺筋症病変部における moesin のリン酸化の程度について検討するとともに、OMC-9 細胞におけるリン酸化経路を検討した。

## 2. 子宮腺筋症における moesin のリン酸化について

第 1 章の moesin の発現解析で用いた新鮮凍結組織 2 例から抽出したタンパクを用いて western blotting 法にて解析を行い、腺筋症でのリン酸化 moesin の存在を明らかとした (図 3-2)。

### 3. 方法

Rho-ROCK 経路の検討のため Rho inhibitor I および ROCK 阻害剤(Y27632) を用いた。Rho を阻害する Rho inhibitor I (Cytoskeleton 社) は Rho 阻害剤として知られる C3 transferase の細胞膜透過性を改善し、培養細胞に無血清下で添加し培養するだけでその働きを阻害するとされる。70-80%コンフルの OMC-9 細胞に Rho inhibitor I を 0.5  $\mu\text{g/ml}$ 、1.0  $\mu\text{g/ml}$  濃度で各 2 時間、4 時間添加しタンパクを回収・濃縮した。また、Rho の下流である ROCK 阻害剤は 10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$ 、40  $\mu\text{M}$ 、80  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$  で各 24 時間、48 時間添加しタンパクを回収・濃縮を行った。p38MAPK 経路の検討のため p38MAPK 阻害剤である SB203580 を使用した。70-80%コンフルの OMC-9 細胞に無血清下で 10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$  濃度で 24 時間添加しタンパクを回収・濃縮した。PKC 経路の検討のため PKC 阻害剤である GF109203X を使用した。同様に 70-80%コンフルの OMC-9 細胞に無血清下で 1.0  $\mu\text{M}$ 、2.5  $\mu\text{M}$  濃度で 3 時間添加しタンパクを回収・濃縮した。moesin のリン酸化への影響を western blotting 法を用いて検討した。タンパクの抽出は第 1 章 4-4 のとおりとし、濃縮を行った。

結果の検証のため第 2 章で用いた免疫蛍光染色法による形態学的評価および invasion assay 系を用いた。

## 4. 結果

Western blotting による解析の結果、Rho および ROCK 阻害剤ではいずれの条件においても moesin のリン酸化は抑制されず、OMC-9 細胞における Rho-ROCK 経路の重要性は低いと考えられた (図 3-3)。

p38MAPK 経路および PKC 経路に関しては、濃度依存性ではあるが GF109203X を 2.5  $\mu$ M 添加した OMC-9 細胞にて moesin のリン酸化が抑制されていることが明らかとなった (図 3-4)。このことから OMC-9 細胞における moesin のリン酸化には PKC の経路が重要であることが明らかとなった。

前述の結果から OMC-9 細胞における moesin のリン酸化経路には PKC が重要であることが明らかとなった。Moesin のリン酸化が起こることで細胞のリモデリングが生じ、形態変化が起こっていると考えられるため、逆に moesin のリン酸化が抑制されることがもともとの細胞形態を変化させうるとの仮定のもとに、PKC 阻害剤である GF109203X を添加することで実際に細胞形態に影響があるかについて免疫蛍光染色法を用いて検討した。あらかじめチャンバースライド上で培養した OMC-9 細胞に Moesin のリン酸化が抑制された 2.5  $\mu$ M 濃度で GF109203X を添加し、3 時間経過したところで細胞を固定、染色した。結果、阻害剤を添加した OMC-9 細胞において細胞突起の消失および F-actin の減少・細小化が認められ形態学的な変化

が示唆された (図 3-5)。

さらに GF109203X を添加した OMC-9 細胞の浸潤能が変化するのかについて再度 invasion assay を行い検討した。Invasion assay は前述と同じ kit を用いて行った。18 時間の無血清処理を行ったうえで 2.5  $\mu$ M 濃度の GF109203X とともに細胞を insert 内に添加した。Control として阻害剤を添加しない細胞の invasion assay も同時に行った。37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で 48 時間培養し、浸潤細胞を染色・染色液の濃度を 560 nm 吸光度測定して比較した。結果、統計学的な有意差は認めなかったが阻害剤を添加した細胞群における浸潤能は低下する傾向にあることが明らかとなった (図 3-6)。

## 5. Moesin のリン酸化経路についての考察

Moesin は生物種間および細胞種間に関わらず広く保存された分子で、細胞骨格タンパクとして様々な機能の報告が認められている。Moesin のリン酸化はその細胞機能の活性化と密接な関連があり、様々な細胞機能を微妙に調節するためにリン酸化経路もさまざまに存在していることが推察される。OMC-9 細胞においては PKC を介した moesin のリン酸化がその活性化に重要であり、moesin のリン酸化が細胞形態に変化を与え浸潤能に関与していることが実験から示唆された。実際に OMC-9 細胞を PKC 阻害剤で moesin のリン酸化を抑制し invasion assay を行ったところ有意差はないもののその浸潤能が低減することから、OMC-9 細胞においては moesin のリ

ン酸化によって付与される分子機能は浸潤能であることが示された。

**Moesin** は生物種を問わず広く保存された分子であるが、その発現は組織特異的に微妙に調節されており組織機能の調節に関与していると考えられている。つまり **moesin** そのものの発現を抑制することは生体機能に重大な影響を及ぼす可能性もある。リン酸化経路がさまざまに報告されているのは、発現の微調整とともにリン酸化の経路を変えることにより機能の微調整を行っているとも考えられる。よってリン酸化経路を解明することで、よりピンポイントに必要な機能の抑制のみを選択性を持って行うことができると考えられた。

## 6. 今後の課題

阻害剤を使用した **invasion assay** において統計学的な有意差が認められなかった原因の考察としては、阻害剤の作用時間や性質によるところの可能性があるのでないかと推察した。**GF109203X** は競合阻害剤であること、また作用時間についての報告がないことから **invasion assay** を行っている 48 時間の間、阻害剤が作用し続けているかどうかについては不明であるという問題がある。実際に **OMC-9** 細胞に **GF109203X** を添加し 24 時間、48 時間経過した細胞のタンパクを抽出し **moesin** のリン酸化を **western blotting** 法にて確認したところどちらも **moesin** のリン酸化が検出される結果となったことから、**invasion assay** の解析の際には阻害剤の効果が低下あるいはなくなっていた可能性が示唆される。つまり本実験で

得られた結果は阻害剤が効果を発揮していた期間の影響による阻害剤添加群での浸潤能が低下するという結果であった可能性が考えられた。

また、PKCのさらに上流の因子について検討を深めることも重要である。PKCそのものは、多彩な細胞機能を調節する重要因子でありそのものの完全な抑制は生体に重大な影響を与える可能性をはらんでいる。よってさらに上流の因子の探索をすることで、より疾患特異性の高い活性化経路を抑制できると考えられる。候補としてあげられるのは TNF $\alpha$  である。TNF $\alpha$  は子宮腺筋症の類似疾患である子宮内膜症患者の腹水中に多数存在しており、また TNF $\alpha$ /PKC/moesin のリン酸化経路の報告が存在する<sup>20, 30</sup>。近年 TNF $\alpha$  は腫瘍促進作用の報告があり、これまで報告されてきた腫瘍壊死因子としての作用と逆の作用の報告も認められていることから検討の余地があると考えられた。

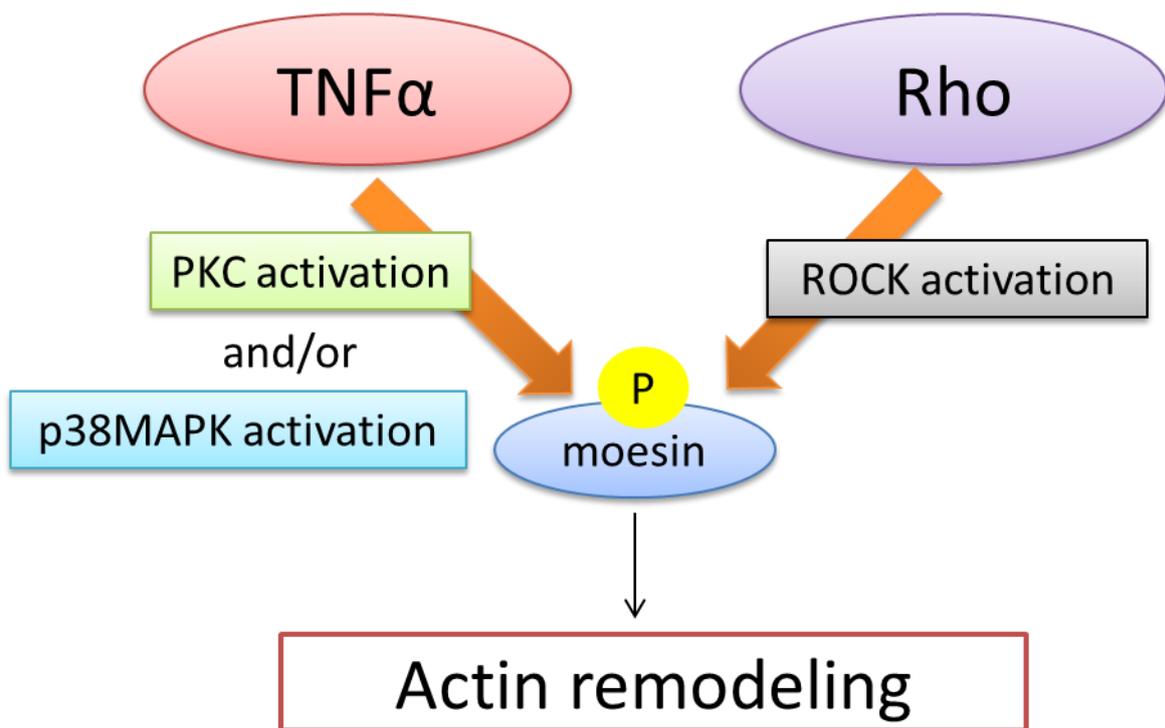


図 3-1 これまで報告されている moesin のリン酸化経路図

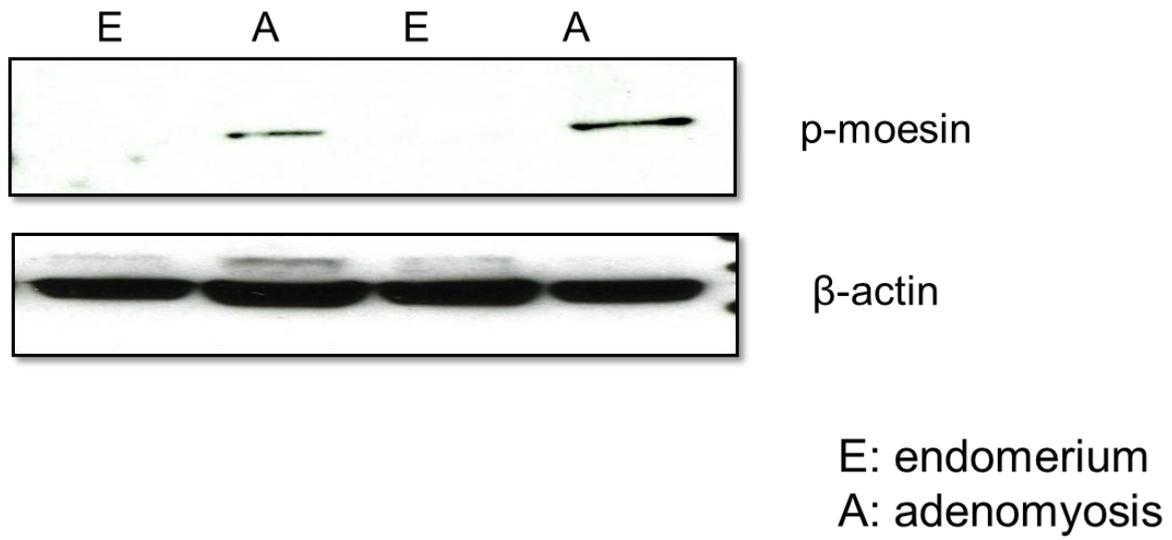


図 3-2 子宮腺筋症の臨床検体におけるリン酸化 moesin の発現解析

Western blotting 法により腺筋症病変部でのリン酸化 moesin の存在が明らかとなった。

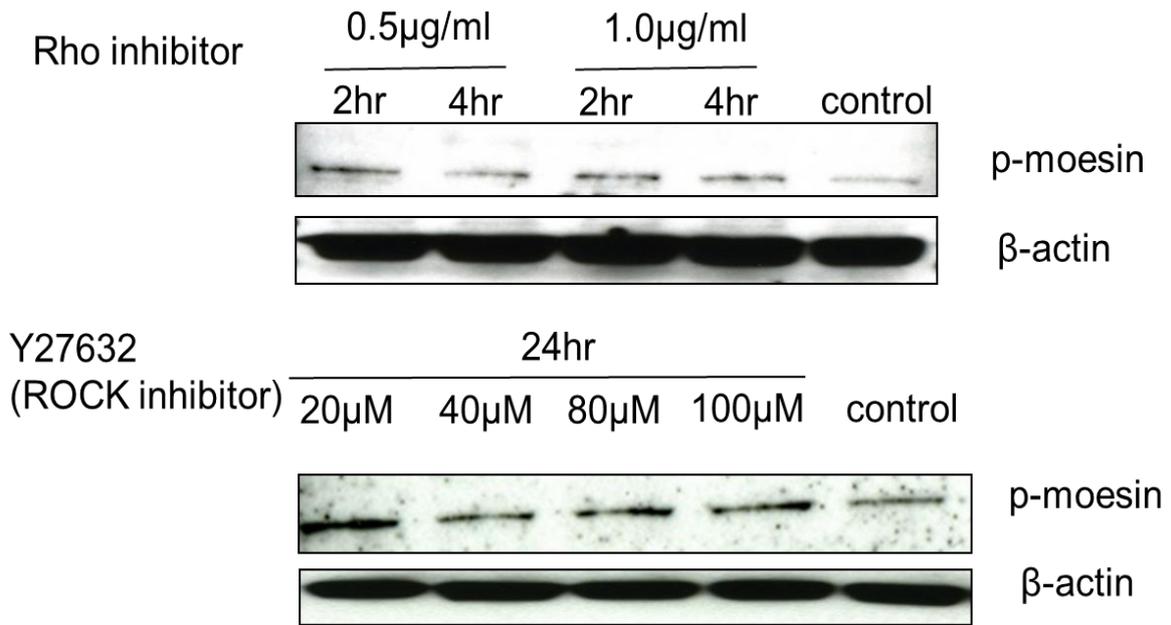


図 3-3 OMC-9 細胞における Rho-ROCK 経路の検討

Rho inhibitor および ROCK inhibitor を各濃度・各時間添加した後の p-moesin の変化を western blotting 法を用いて検討した。いずれの条件でも抑制されず、OMC-9 細胞における Rho-ROCK 経路の重要性は低いと考えられた。

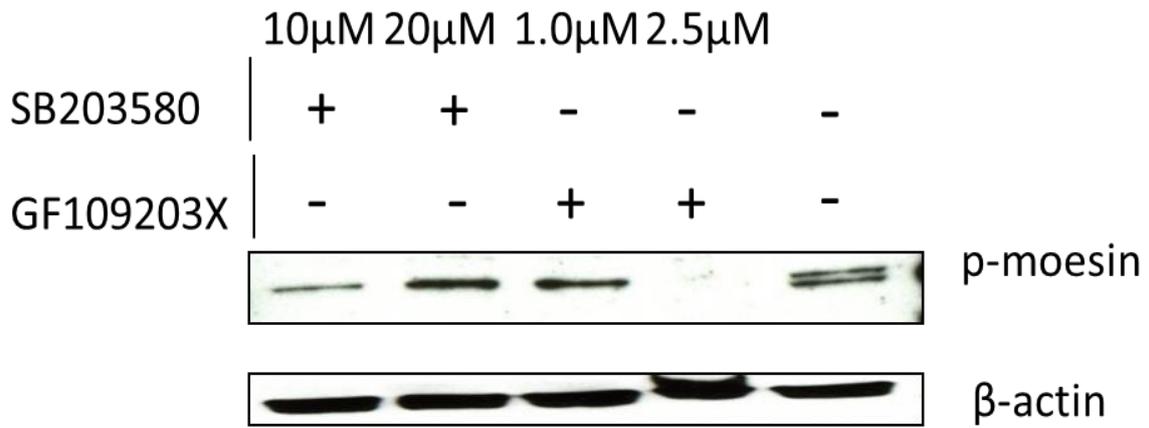
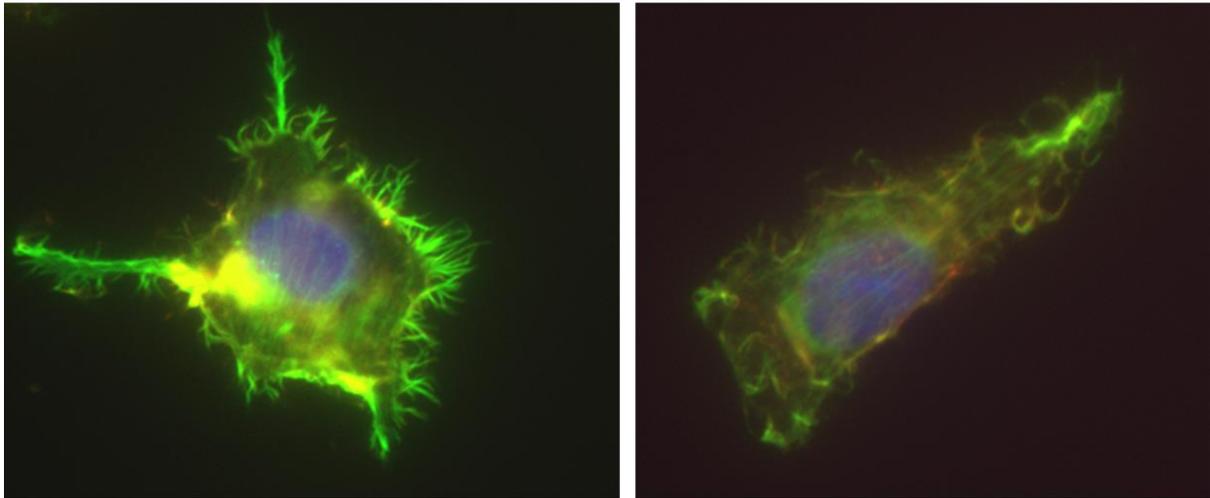


図 3-4 OMC-9 細胞における p38MAPK 経路および PKC 経路の検討

p38MAPK 阻害剤 (SB203580) および PKC 阻害剤 (GF109203X) を各濃度添加し p-moesin の変化を western blotting 法にて検討した。GF109203X を添加した場合にのみ p-moesin が抑制され、OMC-9 細胞においては PKC 経路が moesin のリン酸化に重要であると考えられた。

GF109203X (-)

GF109203X (2.5 $\mu$ M added)



Green: F actin  
Red: moesin

図 3-5 免疫蛍光染色による PKC 阻害剤 (GF109203X) 添加細胞の形態学的評価

リン酸化 moesin が抑制された 2.5  $\mu$ M 濃度で GF109203X を添加し、免疫蛍光染色法にて細胞形態の評価を行った。阻害剤を添加した細胞の細胞突起が消失し、重合型アクチン繊維は数が減少・細小化した。

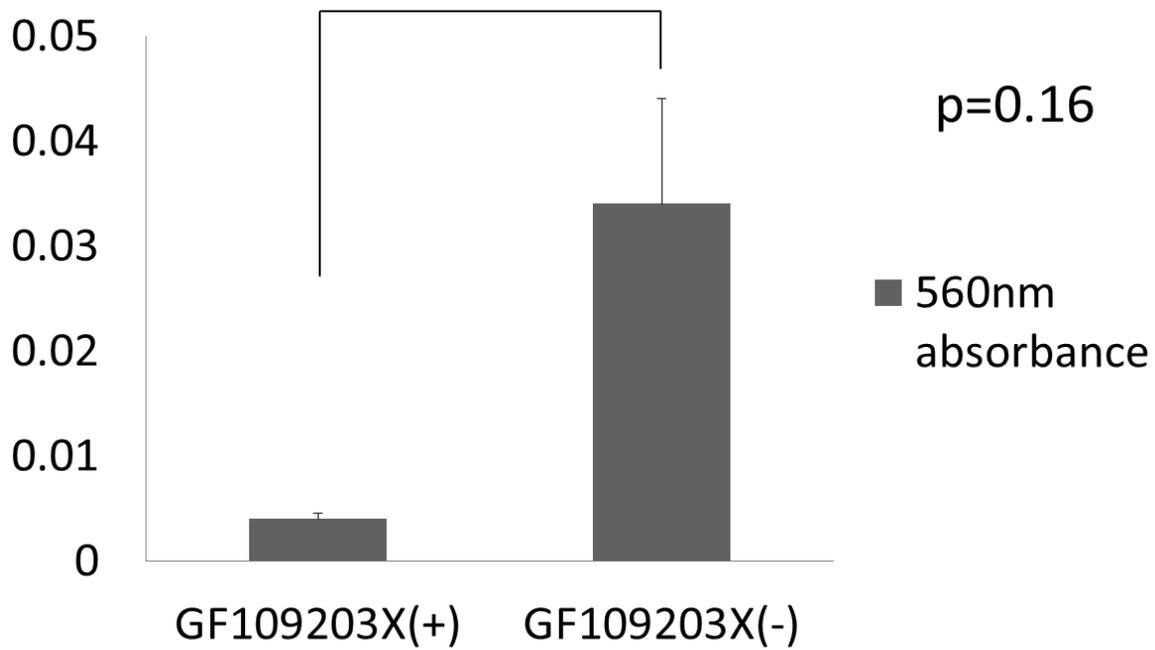


図 3-6 PKC 阻害剤の細胞浸潤能に与える影響の検討

2.5  $\mu\text{M}$  濃度の GF109203X 存在下で OMC-9 細胞の invasion assay を前述の chamber を用いて行った。統計学的な有意差は認めなかったが、阻害剤を添加した細胞における浸潤能が低下する傾向にあることが明らかとなった。

1 次抗体	濃度	2 次抗体
Anti p-moesin antibody (SANTA CRUZ)	x30	anti Rabbit IgG antibody
Anti $\beta$ actin antibody (SIGMA-ALDRICH)	x1000	anti mouse IgG antibody

表 3-1 western blotting で使用した抗体一覧(腺筋症におけるリン酸化 moesin の検討)

1 次抗体	濃度	2 次抗体
Anti p-moesin antibody (SANTA CRUZ)	x60	anti Rabbit IgG antibody
Anti $\beta$ actin antibody (SIGMA-ALDRICH)	x1000	anti mouse IgG antibody

表 3-2 western blotting で使用した抗体一覧 (リン酸化経路の検討)

1 次抗体	濃度	2 次抗体
Anti moesin antibody (SIGMA-ALDRICH)	x60	anti Rabbit IgG Rhodamine antibody
*Acti-stain <sup>TM</sup> 488 Fluorescent Phalloidin (Cytoskeleton)	x1000	

表 3-3 免疫蛍光染色に用いた抗体一覧

\*は蛍光色素が付随した抗体のため 2 次抗体を添加するとき同時に添加した。

# 第4章

## 本研究の総括

本研究は子宮腺筋症の病理学的な特徴である非連続的子宫筋層内侵入に着目し、悪性腫瘍の浸潤のメカニズムの解明につなげることを目的として行ってきた。

本研究では LMD システムを用いて病理学的に特徴的な病変を個別に採取し LC-MS/MS 解析にかけることでより精度の高いプロテオーム解析を行うことができたと考えた。また、ホルマリン固定パラフィン包埋検体を用いたプロテオームは新鮮材料の採取が困難で検体が限られる場合であっても応用が可能であり、特に採取する部位が限定される場合 LMD システムと連結すると応用範囲は広がる。その方法論のさらなる確立は今後の研究においても重要であると推察される。

本研究のターゲット分子である *moesin* の機能としては細胞骨格の再構築への関与および浸潤・遊走能の付与など細胞骨格を変化させることで細胞を動的に変化させる機能の報告が多い。また悪性腫瘍と *moesin* との関連についてであるが、*moesin* の発現亢進は直腸がんや乳癌または膵癌の浸潤部との関連を報告する文献が認められ、*in vitro* の実験系においても *moesin* の発現抑制が浸潤能の低下を示したとする報告が多い<sup>12, 32-34</sup>。悪性腫瘍の浸潤との関連を示唆する研究が多く、*moesin* が子宮腺筋症において高発現していることは *moesin* が子宮腺筋症においてもその浸潤に関与していることを示唆している。実際 OMC-9 細胞を用いた *in vitro* の実験系における *moesin* の分子機能の検討では発現を抑制することでその浸潤能が低下することが明らかとなった。子宮腺筋症間質細胞の継

代可能な細胞株がないため OMC-9 細胞を用いたが、この結果を実際の腺筋症で検証するには *in vivo* または *in vitro* の実験系で確かめる必要がある。今後の検討課題として子宮腺筋症間質細胞の初代培養細胞を用いて OMC-9 細胞において判明した事象について検討を行うことや、*moesin* を強制発現した正常内膜間質細胞を用いてマウスに子宮腺筋症を誘導する実験の可能性について検討する必要があると考えられた。

一方浸潤とひとことでいっても病理学的にみてその浸潤形態は様々である。他を圧排・破壊するように浸潤するものや、間質内をすり抜けるように浸潤していくものなどがある。子宮腺筋症はもともと良性疾患であることもあり、浸潤はするものの他を圧排・破壊せず間質内をアメーバのように浸潤していく形態をとっている。*Moesin* はそのような浸潤形態をとる疾患に特徴的な分子である可能性があり、同様の形態をとる浸潤性の疾患に関しても *moesin* の発現に関して検討の余地があると考えられた。

*moesin* の分子機能の調節は、細胞株を用いた *in vitro* の実験系の文献報告によると C 末端ドメインのスレオニン (T 558) のリン酸化により制御されるとの報告が多い。リン酸化部位の報告はおおむね T 558 で一致しているが、そのリン酸化経路は Rho-ROCK 経路を介するもの、p38MAPK 経路を介するもの、PKC を介するものと報告がさまざまである。そこで今回の研究で使用した OMC-9 細胞におけるリン酸化経路の検討を行ったところ、PKC を介する経路が重要であると判明した。確かに子宮腺筋症においてもリン酸化 *moesin* の存在を認め、

moesin の活性化はその浸潤に関係があると推察される。さらなる上流の因子の検討は新たな治療戦略の構築のためにも必要であると考えられる。上流因子の候補の検討方法として、子宮腺筋症における moesin のリン酸化を制御している PKC の種類を知ることもターゲットを絞り込むための重要な戦略のひとつになり得ると考えられる。どのサブタイプの PKC に依存しているかについて、たとえば siRNA 抑制系を用いて検証可能であると推察される。現時点で Moesin の活性化を促す分子の候補として TNF $\alpha$  を考えている。理由としては、類似疾患の子宮内膜症患者の腹水中の TNF $\alpha$  が高値を示すこと、また文献報告上 TNF $\alpha$ -PKC-moesin のリン酸化の経路が存在することなどがあげられる。定量 PCR を用いて検討した結果、子宮腺筋症における TNF $\alpha$  受容体の発現は正常内膜に比較して亢進している傾向にあり、HE 染色像との相関を検証すると腺筋症の程度と相関することを確認しており、子宮腺筋症においても、TNF $\alpha$ -PKC-moesin のリン酸化の経路の可能性があるのでないかと考えている (data not shown)。結果の検証を急ぎたい。

リン酸化経路の報告が細胞種・組織型により異なっていることのひとつの理由としては、moesin が非常によく保存された分子であることがあげられるのではないかと考えられた。多くの組織で発現が確認されている分子であるからこそ細部にわたって調節する必要がある、つまりはその機能調節のメカニズムは多岐にわたっているべきでありそれにより moesin の分子機能を効率よく調節できるのではないかと考えられた。

今後の検討課題の一つとして **moesin** の発現亢進の原因が **moesin** 自身にないかを検討する必要がある。文献報告を見る限りでは **moesin** の発現亢進に **point mutation** や **gene instability** などの遺伝子変異の報告は認められない。一方興味深い報告として近年 **moesin** の発現亢進が **EMT** と関連していることを示唆する報告が相次いでいることである。上皮系細胞(乳腺細胞、網膜細胞など)を **TGF- $\beta$**  により **EMT** を誘導すると **moesin** の発現が亢進しそのことが **EMT** の効率をよくしているという報告や **EMT** 関連の転写因子である **snail** を強制発現させると **moesin** の発現が上昇するという報告などである<sup>18-20</sup>。上皮系悪性腫瘍の浸潤と **EMT** 現象についてはその理論が確立されつつある<sup>35</sup>。しかし間質系悪性腫瘍でも **EMT** 関連因子の発現が亢進していることも多くその意義については検討の必要があるとされている。**Moesin** を **EMT** 関連因子とするなら子宮腺筋症でも正常内膜の上皮系細胞が **EMT** を起こして筋層内に浸潤したという仮説が成り立ち、上皮から間質細胞に既に知られている **moesin** を誘導する因子の発現があることなどを確認できれば、腺筋症は内膜の分化を過剰に模倣した間質細胞と上皮細胞の相互作用による、上皮の病的な形態変化と解釈できる可能性も示唆された。その証明には子宮腺筋症の起源となる細胞の同定が必要であり、フローサイトメトリーや初代培養などの手法を用いて **moesin** を高発現している細胞の解析を行うことで子宮腺筋症の起源の細胞を同定できる可能性があると考えられた。今回の我々の検討結果から **EMT** の関与を推察することは不可能であり、むしろ子宮は間葉系発生であることや内膜間質細胞の再生・分化誘導能といっ

た性質を考慮すると、間質細胞において **moesin** が発現亢進し浸潤能を獲得したと考える方が自然ではないかと思われた。さらに子宮腺筋症の起源の細胞を同定することができれば今後間葉系悪性腫瘍における EMT 関連因子の高発現の意義の解明にもつなげられる可能性があると考えられた。

**moesin** は子宮腺筋症の浸潤および悪性腫瘍の浸潤に関しても共通する因子であり、本研究の子宮腺筋症の浸潤メカニズムの解明を悪性腫瘍の浸潤メカニズムの解明および治療につなげるという目的にかなう分子であったと考えている。少なくとも今回の検討により婦人科悪性腫瘍のひとつである子宮内膜間質肉腫の浸潤メカニズムの解明につながり、今後の治療戦略の構築に役立てる可能性があると考えられた。

# 謝辞

本研究を遂行するにあたり一貫してご指導・ご鞭撻くださいました筑波大学医学医療系診断病理学教授 野口雅之先生、筑波大学医学医療系産婦人科学教授 吉川裕之先生、筑波大学医学医療系生命医科学域講師 加野准子先生に深謝いたします。また、プロテオーム解析においてサンプル調整・解析に関し一貫してご指導くださいました筑波大学医学医療系講師 坂下信吾先生および助教 里見介石先生に感謝いたします。

質量分析を行う際にシステムの使用を許可して下さった独立行政法人物質材料研究機構 中核研究部門 ナノテクノロジー融合部門の箕輪貴司博士に感謝の意を表します。

また、子宮腺筋症の検体提供にご尽力くださいました独立行政法人国立病院機構 霞ヶ浦医療センター病院院長、西田正人先生に感謝いたします。

最後に公私にわたり支えてくださいました診断病理研究室の先生方、スタッフの皆様、大学院生の皆様はこの場をお借りして感謝いたします。

# 参考文献

- [1] Maheshwari A, Gurunath S, Fatima F, Bhattacharya S. Adenomyosis and subfertility: a systematic review of prevalence, diagnosis, treatment and fertility outcomes. *Hum Reprod Update*.
- [2] 北出真理. さまざまな腺筋症. 関東連合産科婦人科学会誌 12011 年 vol.48 No.4: 471-475.
- [3] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 12011;144: 646-74.
- [4] 野村文夫ほか. 臨床検査からみた疾患プロテオミクス. 12010 年: 112-119.
- [5] Matsuda Y, Yamamoto T, Kudo M, Kawahara K, Kawamoto M, Nakajima Y, Koizumi K, Nakazawa N, Ishiwata T, Naito Z. Expression and roles of lumican in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 12008;33: 1177-85.
- [6] Ishiwata T, Cho K, Kawahara K, Yamamoto T, Fujiwara Y, Uchida E, Tajiri T, Naito Z. Role of lumican in cancer cells and adjacent stromal tissues in human pancreatic cancer. *Oncol Rep* 12007;18: 537-43.
- [7] Naito Z. Role of the small leucine-rich proteoglycan (SLRP) family in pathological lesions and cancer cell growth. *J Nippon Med Sch* 12005;72: 137-45.
- [8] Mikuriya K, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, Fujimoto M, Mori S, Oka M, Hamano K, Okita K, Sakaida I, Nakamura K. Expression of glycolytic enzymes is increased in pancreatic cancerous tissues as evidenced by proteomic profiling by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *Int J Oncol* 12007;30: 849-55.
- [9] Robert J, Van Rymenant M, Lagae F. Enzymes in cancer. III. Triosephosphate isomerase activity of human blood serum in normal individuals and in individuals with various pathological conditions. *Cancer* 11961;14: 1166-74.
- [10] Tamesa MS, Kuramitsu Y, Fujimoto M, Maeda N, Nagashima Y, Tanaka T, Yamamoto S, Oka M, Nakamura K. Detection of autoantibodies against cyclophilin A and triosephosphate isomerase in sera from breast cancer patients by proteomic analysis. *Electrophoresis* 12009;30: 2168-81.
- [11] Yuan PM, Dewan RN, Zaun M, Thompson RE, Gracy RW. Isolation and characterization of triosephosphate isomerase isozymes from human placenta. *Arch Biochem Biophys* 11979;198: 42-52.
- [12] Abiatari I, Esposito I, Oliveira TD, Felix K, Xin H, Penzel R, Giese T, Friess H, Kleeff J. Moesin-dependent cytoskeleton remodelling is associated with an anaplastic phenotype of pancreatic cancer. *J Cell Mol Med* 14: 1166-79.
- [13] Estecha A, Sanchez-Martin L, Puig-Kroger A, Bartolome RA, Teixido J, Samaniego R, Sanchez-Mateos P. Moesin orchestrates cortical polarity of melanoma tumour cells to initiate 3D invasion. *J Cell Sci* 12009;122: 3492-501.
- [14] Louvet-Vallee S. ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biol Cell* 12000;92: 305-16.

- [15] Giretti MS, Fu XD, De Rosa G, Sarotto I, Baldacci C, Garibaldi S, Mannella P, Biglia N, Sismondi P, Genazzani AR, Simoncini T. Extra-nuclear signalling of estrogen receptor to breast cancer cytoskeletal remodelling, migration and invasion. *PLoS One* 2008;3: e2238.
- [16] Fu XD, Flamini M, Sanchez AM, Goglia L, Giretti MS, Genazzani AR, Simoncini T. Progestogens regulate endothelial actin cytoskeleton and cell movement via the actin-binding protein moesin. *Mol Hum Reprod* 2008;14: 225-34.
- [17] Luo Y, Zheng C, Zhang J, Lu D, Zhuang J, Xing S, Feng J, Yang D, Yan X. Recognition of CD146 as an ERM-binding protein offers novel mechanisms for melanoma cell migration. *Oncogene*.
- [18] Haynes J, Srivastava J, Madson N, Wittmann T, Barber DL. Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Mol Biol Cell* 2011;22: 4750-64.
- [19] Wang CC, Liao JY, Lu YS, Chen JW, Yao YT, Lien HC. Differential expression of moesin in breast cancers and its implication in epithelial-mesenchymal transition. *Histopathology*.
- [20] Takahashi E, Nagano O, Ishimoto T, Yae T, Suzuki Y, Shinoda T, Nakamura S, Niwa S, Ikeda S, Koga H, Tanihara H, Saya H. Tumor necrosis factor- $\alpha$  regulates transforming growth factor- $\beta$ -dependent epithelial-mesenchymal transition by promoting hyaluronan-CD44-moesin interaction. *J Biol Chem* 2010;285: 4060-73.
- [21] Santisteban M, Reiman JM, Asiedu MK, Behrens MD, Nassar A, Kalli KR, Haluska P, Ingle JN, Hartmann LC, Manjili MH, Radisky DC, Ferrone S, Knutson KL. Immune-induced epithelial to mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells. *Cancer Res* 2009;69: 2887-95.
- [22] Dimitrov R, Timeva T, Kyurkchiev D, Stamenova M, Shterev A, Kostova P, Zlatkov V, Kehayov I, Kyurkchiev S. Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium. *Reproduction* 2008;135: 551-8.
- [23] Kurita T, Cooke PS, Cunha GR. Epithelial-stromal tissue interaction in paramesonephric (Mullerian) epithelial differentiation. *Dev Biol* 2001;240: 194-211.
- [24] Arnold JT, Kaufman DG, Seppala M, Lessey BA. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. *Hum Reprod* 2001;16: 836-45.
- [25] Cunha GR. Stromal induction and specification of morphogenesis and cytodifferentiation of the epithelia of the Mullerian ducts and urogenital sinus during development of the uterus and vagina in mice. *J Exp Zool* 1976;196: 361-70.
- [26] Gargett CE. Uterine stem cells: what is the evidence? *Hum Reprod Update* 2007;13: 87-101.
- [27] Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HP, Wu D. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod* 2009;80: 1136-45.
- [28] Mehaseb MK, Taylor AH, Pringle JH, Bell SC, Habiba M. Enhanced invasion of stromal cells from adenomyosis in a three-dimensional coculture model is augmented by the presence of myocytes from affected uteri. *Fertil Steril* 2010;94: 2547-51.

- [29] Kakuno Y, Yamada T, Mori H, Narabayashi I. Establishment and characterization of a cell line (OMC-9) originating from a human endometrial stromal sarcoma. *Hum Cell* 12008;21: 46-55.
- [30] Koss M, Pfeiffer GR, 2nd, Wang Y, Thomas ST, Yerukhimovich M, Gaarde WA, Doerschuk CM, Wang Q. Ezrin/radixin/moesin proteins are phosphorylated by TNF-alpha and modulate permeability increases in human pulmonary microvascular endothelial cells. *J Immunol* 12006;176: 1218-27.
- [31] Simoncini T, Scorticati C, Mannella P, Fadiel A, Giretti MS, Fu XD, Baldacci C, Garibaldi S, Caruso A, Fornari L, Naftolin F, Genazzani AR. Estrogen receptor alpha interacts with Galpha13 to drive actin remodeling and endothelial cell migration via the RhoA/Rho kinase/moesin pathway. *Mol Endocrinol* 12006;20: 1756-71.
- [32] Kim CY, Jung WY, Lee HJ, Kim HK, Kim A, Shin BK. Proteomic analysis reveals overexpression of moesin and cytokeratin 17 proteins in colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 12011;27: 608-20.
- [33] Carmeci C, Thompson DA, Kuang WW, Lightdale N, Furthmayr H, Weigel RJ. Moesin expression is associated with the estrogen receptor-negative breast cancer phenotype. *Surgery* 11998;124: 211-7.
- [34] Ou-Yang M, Liu HR, Zhang Y, Zhu X, Yang Q. ERM stable knockdown by siRNA reduced in vitro migration and invasion of human SGC-7901 cells. *Biochimie* 12011;93: 954-61.
- [35] 佐々秀行. 上皮間葉転換と癌浸潤転移. *実験医学* 12011年 vol.29 No.2: 249-254.

# 参考論文

## **Moesin overexpression is a unique biomarker of adenomyosis**

\*Rena Ohara<sup>1,2</sup>, \*Hiroo Michikami<sup>1,2</sup>, Yuko Nakamura<sup>1,2</sup>, Akiko Sakata<sup>1</sup>, Shingo Sakashita<sup>1</sup>, Kaishi Satomi<sup>1</sup>, Aya Shiba-Ishii<sup>1</sup>, Junko Kano<sup>1</sup>, Hiroyuki Yoshikawa<sup>2</sup>, and Masayuki Noguchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japan

<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japan

\* Authors RO and HM contributed equally to this paper.

Running Head: Moesin overexpression in adenomyosis

All correspondence to Masayuki Noguchi, M.D., Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8575, Japan

Tel: +81-29-853-3750, Fax: +81-29-853-3150

Email: nmasayuk@md.tsukuba.ac.jp

## Abstract

Adenomyosis is characterized by extension of endometrial glands and stromal cells into the myometrium. Here we proved that “moesin” is a unique biomarker of adenomyosis. We selected two cases of adenomyosis that had been surgically resected and fixed with formalin. Proteins were extracted from the infiltrating adenomyosis lesions and normal endometrium by tissue microdissection. The extracted proteins were examined using a LC-MS/MS system and the expression profiles of each region were compared. Two hundred and sixty proteins were detected, among which 73 were expressed more in adenomyosis than in normal endometrium. Among these proteins, we focused on overexpression of moesin in adenomyosis. Expression of moesin estimated semiquantitatively using an immunohistochemistry score was higher in adenomyosis than in normal endometrium. In particular, moesin was significantly overexpressed in stromal cells of adenomyosis than in those of normal endometrium. Relative to normal endometrium, moesin was also overexpressed at the RNA level in 9 of 14 cases of adenomyosis and at the protein level in all 14 cases. We also detected activated (phosphorylated) moesin in adenomyosis lesions. The present findings suggest that moesin is characteristically overexpressed and activated in adenomyosis, and that moesin activation may be related to extension of adenomyosis in the myometrium.

**Key words:** adenomyosis, moesin, LC-MS/MS analysis, invasion

## Introduction

Adenomyosis is an estrogen-dependent disease that affects 8-62% of women of reproductive age, being defined as the presence of ectopic endometrial glands and stromal cells within the myometrium<sup>1 2</sup>. Although adenomyosis is a benign gynecological disease, it shows characteristic “amoeba-like” invasive growth of both the endometrial columnar epithelium and stromal cells; sometimes only stromal cells may be pathologically evident. However, the molecular mechanism responsible for its pathogenesis has not yet been determined. Three main theories to explain the development of adenomyosis have been proposed: the direct invasion theory, the mullerian residual theory, and the transplantation theory. The most well known of these theories contends that adenomyosis is the result of downward extension of the endometrium from the uterine cavity due to collapse of the endometrial basal layer, and that increased invasiveness of the endometrial cells may be responsible for the development of adenomyosis<sup>3</sup>. Recently, some articles have indicated that the epithelial-mesenchymal transition (EMT) is the critical mechanism responsible for development of adenomyosis<sup>4</sup>. However, the mechanisms of invasion during adenomyosis development remain elusive. Although the invading endometrial tissue has no malignant potential, its pattern of invasive growth bears many of the hallmarks of malignancy.

In the present study, we performed proteomics analysis using a LC-MS/MS

system, and searched for molecules overexpressed in adenomyosis. For this purpose, we used formalin-fixed surgical specimens of adenomyosis. Proteins were extracted from both normal endometrium and invasive lesions of adenomyosis that had been separated using a laser-capture microdissection system, and their expression profiles were compared. Molecules that showed significantly higher expression in adenomyosis than in normal endometrium were selected. This approach led to the recognition of moesin as a unique biomarker of adenomyosis.

## Materials and methods

### *Patients*

We selected 37 women with adenomyosis who underwent transabdominal hysterectomy at Tsukuba University Hospital (Ibaraki, Japan) between 1998 and 2012. The patients included those who had been diagnosed as having adenomyosis both before and after surgery. All of the surgical specimens were formalin-fixed and paraffin-embedded. Among these cases, two were used for LC-MS/MS analysis and the other 35 were used for immunohistochemistry. In addition, 14 fresh specimens surgically resected at Kasumigaura Medical Center (Ibaraki, Japan) in 2011 were used for real-time RT-PCR and western blotting. Furthermore, two sets of adenomyosis specimens were also examined for moesin phosphorylation using a phosphorylated specific anti-moesin antibody. The ethics committees of the two

hospitals approved this study, and informed consent for specimen collection was obtained from all of the patients concerned.

#### *Laser microdissection and LC-MS/MS analysis*

We performed laser microdissection using a Leica CTR6000<sup>®</sup> and collected protein from adenomyosis lesions and normal endometrial tissue individually. The collected proteins were trypsinized using a Liquid Tissue<sup>®</sup> MS Protein Prep kit (Expression Pathology). Peptide samples were separated by liquid chromatography and analysis of peptide masses was performed using mass spectrometry (ZAPLOUS LC/MS Systems, AMR). A database search was performed using the MASCOT<sup>®</sup> search engine (Matrix Science) in the IPI human database.

#### *Antibodies and reagents*

A rabbit anti-moesin antibody and a mouse anti- $\beta$ -actin antibody (Sigma) were also used for Western blot analysis. Anti-lumican antibody raised in goat (R&D Systems), anti-moesin antibody raised in rabbit (Sigma), and anti-triosephosphate isomerase antibody raised in rabbit (Novus Biological) were used for immunohistochemistry. A Histofine simple stain MAX-PO goat (Nichirei) and an Envision kit HRP<sup>®</sup> (Dako) were used as the secondary antibody. An anti-p-moesin antibody raised in rabbit (T558 phosphorylation, Santa Cruz) was obtained for phosphorylation analysis and used for Western blotting.

### *Immunohistochemistry*

After deparaffinization, the samples were placed in blocking solution to suppress non-specific staining for 30 min. Then, epitope retrieval was performed using citrate buffer (pH 6.0) in an autoclave at 121°C for 10 min. Tissue slices were incubated with the antibody in accordance with our laboratory manual. For each case, a semi-quantitative moesin expression score was calculated based on the percentage of positive epithelial and stromal cells and their immunostaining intensity in adenomyosis and normal endometrium. The immunostaining intensity was scored as: 1, negative or trace; 2, weak; 3, moderate; or 4, intense. The total score was calculated by multiplying the intensity score and the fraction score, to give a score range of 100-400.

### *Collection of total RNAs and real-time RT-PCR*

Nine 20-µm sections of fresh frozen tissue were placed on laser microdissection slides (DIRECTOR<sup>®</sup>), then fixed with 5% (v/v) acetic acid/ethanol and stained with 0.05% toluidine blue prepared in our laboratory. Using a laser microdissection system, samples were collected from adenomyosis lesions and normal endometrial tissue individually. Total RNAs were extracted using an RNeasy Plus Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen). Reverse transcription was performed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit<sup>®</sup> (Applied Biosystems).

Real-time RT-PCR was performed using SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa) and 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystems) systems. The template was 1.5 ng of cDNA in 80 µl of PCR mixture containing 6.4 µl of 5 µM moesin forward primer and 5 µM moesin reverse primer, and dispensed in 25-µl aliquots. The same amount of β-actin was used as an internal control. The sequences of the moesin primers were '5-AGCCTGTGCCCTGATCCAAG-3' (forward) and 5'-GGGACAGAACAGCTGGTGTCAA-3' (reverse).

#### *Western blot analysis*

Twenty 10-µm cryostat sections of adenomyosis and endometrium were prepared from each frozen specimen. The sections were collected with 500 µl of T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent (Pierce) and 5 µl of Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific). Amicon Ultra-0.5 3K (Millipore) was used to concentrate the extracted protein in accordance with the manufacturer's instructions. Twenty micrograms of extracted protein was prepared for samples, subjected to electrophoresis on 12% polyacrylamide gel (SDS-PAGE), and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes using an iBlot™ gel transfer system (Invitrogen). The membranes were blocked with 0.1% blocking reagent and then incubated with the primary antibody. Protein bands were visualized using Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific).

### *Statistical analysis*

Data was analyzed using JMP 9 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Statistical significance of differences was evaluated by Pearson's chi-squared test, Student's *t* test, Wilcoxon matched pairs signed rank test or linear regression analysis. Differences at  $p < 0.05$  were considered significant.

### Results

We extracted the proteins from both normal endometrium and invasive areas of two adenomyosis cases using a tissue microdissection system and performed a proteomics study using LC-MS/MS. We screened proteins that showed higher expression in adenomyosis than in normal endometrium in both cases. Totally, 260 proteins were detected, of which 73 showed higher expression in adenomyosis than in normal endometrium on the basis of spectrum counts (Supplementary Table 1). These 73 proteins included binding proteins, structural proteins, and signal transcription factors. Among them, we focused on lumican, triosephosphate isomerase (TPI), and moesin, whose expression is known to be correlated with the invasive growth of malignant tumors<sup>5-11</sup>.

The expressions of these three genes were examined by immunohistochemistry using 35 surgically resected specimens of adenomyosis. For epithelial cells, twenty-three (65.7%) of the 35 cases, and for stromal cells, 26 cases

(72.3%) showed higher moesin expression in adenomyosis than in normal endometrium (Figs. 1 and 2). Interestingly, moesin expression was detected mainly in stromal cells relative to epithelial cells (Fig. 1d). Although the immunohistochemistry (IHC) score for moesin in adenomyosis (both epithelial cells and stromal cells) was higher than that in normal endometrium (Table 1), overexpression of moesin was significantly stronger in stromal cells of adenomyosis than in those of normal endometrium (Table 1,  $p < 0.001$ ) (Fig. 2). The other two proteins (lumican and TPI) showed no significant difference of staining score between adenomyosis and normal endometrium (data not shown). The high expression of moesin in stromal cells showed no significant relationship with any stage of the menstrual cycle, or with other clinical parameters in the individual patients (Supplementary Table 2-1), but in epithelial cells, high expression of moesin was significantly associated with a history of uterine surgery and hormone therapy (Supplementary Table 2-2). We then examined the relationship between depth of invasion and IHC score in both epithelial cells and stromal cells (Fig. 3a and b). IHC scores for both epithelial cells and stromal cells were inversely correlated with invasion depth.

To confirm the overexpression of moesin in adenomyosis, we performed real-time RT-PCR for moesin using 14 fresh specimens of surgically resected adenomyosis. All of the samples employed were extracted using laser microdissection.

Nine (64%) of the 14 cases examined showed higher expression of moesin in adenomyosis than in normal endometrium (Fig. 4).

High expression of moesin was also confirmed by Western blotting using the 14 fresh specimens that had been employed for real-time RT-PCR. In this experiment, we did not subject the tissue samples to microdissection, and the proteins extracted from adenomyosis lesions included those from myometrial tissue. However, unlike the results of real-time RT-PCR, all 14 cases showed higher expression of moesin in adenomyosis than in normal endometrium (Fig. 5). The expression of moesin was evaluated using the Image J software package, and shown to be statistically significant ( $p=0.0006$ ).

Several articles have reported that activation of moesin requires phosphorylation of T558 in the moesin molecule. Therefore, we examined moesin activation (phosphorylation) in two specimens of adenomyosis. As shown in Fig. 6, adenomyosis expressed phosphorylated moesin, whereas normal endometrial tissue showed no signal.

## Discussion

In this study using LC-MS/MS analysis, we focused on possible biomarkers of adenomyosis by screening proteins that showed higher expression in

adenomyosis than in normal counterpart endometrial tissue, and then using immunohistochemistry found that 72.3% (26/35) of adenomyosis cases showed higher expression of moesin than normal endometrium. These results were confirmed at both the RNA (RT-PCR) and protein (western blotting) levels. Therefore, although the histology of adenomyosis mimics normal endometrial tissue, moesin overexpression is a unique characteristic of adenomyosis.

Moesin overexpression is reportedly related to carcinogenesis in various carcinomas, such as pancreatic cancer<sup>12</sup> or colorectal carcinoma<sup>13</sup>, and also to the invasiveness of melanoma cells<sup>10</sup>. Kobayashi et al. have demonstrated that the expression pattern of moesin is an independent prognostic factor in oral squamous cell carcinoma<sup>14</sup>. On the other hand, Ou-Yang et al. have shown that transfection with an ERM-targeted siRNA expression vector reduced the invasive growth of a gastric cancer cell line, SGC-7901<sup>15</sup>. Carmeci et al. have also reported that high expression of moesin contributes to the invasiveness of hormone-unresponsive breast cancers<sup>16</sup>. Our data showed that moesin expression was not related to any stage of the menstrual cycle, indicating that high expression of moesin is not associated with any hormone-dependent mechanism of invasiveness in adenomyosis.

Moesin is a well conserved gene in many species and is present in many tissues, exerting various molecular actions, such as regulation of the actin cytoskeleton and

control of cell shape, cell adhesion or motility<sup>17</sup>. Phosphorylation is required for activation of moesin, and different activation signals regulate the functions of moesin by modulating these intra-molecular interactions. Phosphorylation of moesin acts as a switch to trigger cell motility. In this study we demonstrated the presence of phosphorylated moesin in surgically resected specimens of adenomyosis, but not in normal endometrial tissue (Fig. 6). The present results suggest that overexpression of activated moesin is not only one of the phenotypic characteristics of adenomyosis, but also that cells expressing phosphorylated (activated) moesin in adenomyosis have some functional role in its extension into the myometrium. Interestingly, moesin IHC scores for both epithelial cells and stromal cells were inversely correlated with the depth of adenomyosis invasion (Fig. 3a and b). Therefore, we speculate that activated moesin is critical for early downward extension of adenomyosis. However, the relationship between moesin over-expression and tumor cell invasion is still debatable. In melanoma, it is reported that immunohistochemical expression of moesin decreases according to the extent of invasion. On the other hand, in gastric adenocarcinoma, moesin expression increases according to the extent of invasion. Further details of the relationship of moesin to invasiveness await further studies using a specific antibody against phosphorylated moesin. In order to clarify the molecular mechanism responsible for the infiltrative activity of adenomyosis and to screen potentially useful therapeutic drugs, there is a need to examine in detail the

mechanism of moesin phosphorylation in adenomyosis.

It was noteworthy that IHC for adenomyosis using an anti-moesin antibody demonstrated greater overexpression of moesin in stromal cells than in epithelial cells (Table 1, Fig 1 and 2). Recently, moesin has been reported to be an EMT marker or EMT-related gene<sup>18-20</sup>. For example, Hynes et al. demonstrated that increased moesin expression was related to actin remodeling during EMT. Also, Takahashi et al. have reported a relationship between moesin and CD44, which is a cancer stem cell marker. Gargett et al. reported that stromal clones isolated from endometrium expressed CD44, a mesenchymal stem cell marker<sup>21, 22</sup>. In our present study, we were unable to clarify any association between moesin overexpression in stromal cells of adenomyosis and the EMT, but stromal cells showing high expression of the moesin gene might be associated with the pathogenesis of adenomyosis (mixed proliferation of the epithelial and stromal components).

## Disclosure Statement

None of the authors have any competing interests to disclose.

## References

- 1 Yang JH, Wu MY, Chen CD, Chen MJ, Yang YS, Ho HN. Altered apoptosis and proliferation in endometrial stromal cells of women with adenomyosis. *Hum Reprod.* 2007; **22**: 945-52.
- 2 Parrott E, Butterworth M, Green A, White IN, Greaves P. Adenomyosis--a result of disordered stromal differentiation. *Am J Pathol.* 2001; **159**: 623-30.
- 3 Yang JH, Wu MY, Chen MJ, Chen SU, Yang YS, Ho HN. Increased matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 secretion but unaffected invasiveness of endometrial stromal cells in adenomyosis. *Fertil Steril.* 2009; **91**: 2193-8.
- 4 Chen YJ, Li HY, Huang CH, *et al.* Oestrogen-induced epithelial-mesenchymal transition of endometrial epithelial cells contributes to the development of adenomyosis. *J Pathol.* 2010; **222**: 261-70.
- 5 Nikitovic D, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN. Lumican, a small leucine-rich proteoglycan. *IUBMB Life.* 2008; **60**: 818-23.
- 6 Naito Z. Role of the small leucine-rich proteoglycan (SLRP) family in pathological lesions and cancer cell growth. *J Nippon Med Sch.* 2005; **72**: 137-45.
- 7 Tamesa MS, Kuramitsu Y, Fujimoto M, *et al.* Detection of autoantibodies against cyclophilin A and triosephosphate isomerase in sera from breast cancer patients by proteomic analysis. *Electrophoresis.* 2009; **30**: 2168-81.
- 8 Robert J, Van Ryment M, Lagae F. Enzymes in cancer. III. Triosephosphate isomerase activity of human blood serum in normal individuals and in individuals with various pathological conditions. *Cancer.* 1961; **14**: 1166-74.
- 9 Mikuriya K, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, *et al.* Expression of glycolytic enzymes is increased in pancreatic cancerous tissues as evidenced by proteomic profiling by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *Int J Oncol.* 2007; **30**: 849-55.
- 10 Estecha A, Sanchez-Martin L, Puig-Kroger A, *et al.* Moesin orchestrates cortical polarity of melanoma tumour cells to initiate 3D invasion. *J Cell Sci.* 2009; **122**: 3492-501.
- 11 Giretti MS, Fu XD, De Rosa G, *et al.* Extra-nuclear signalling of estrogen receptor to breast cancer cytoskeletal remodelling, migration and invasion. *PLoS One.* 2008; **3**: e2238.
- 12 Abiatari I, Esposito I, Oliveira TD, *et al.* Moesin-dependent cytoskeleton remodelling is associated with an anaplastic phenotype of pancreatic cancer. *J Cell Mol Med.* **14**: 1166-79.
- 13 Kim CY, Jung WY, Lee HJ, Kim HK, Kim A, Shin BK. Proteomic analysis reveals overexpression of moesin and cytokeratin 17 proteins in colorectal carcinoma. *Oncol Rep.* 2011; **27**: 608-20.
- 14 Kobayashi H, Sagara J, Kurita H, *et al.* Clinical significance of cellular

distribution of moesin in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004; **10**: 572-80.

15 Ou-Yang M, Liu HR, Zhang Y, Zhu X, Yang Q. ERM stable knockdown by siRNA reduced in vitro migration and invasion of human SGC-7901 cells. *Biochimie.* 2011; **93**: 954-61.

16 Carmeci C, Thompson DA, Kuang WW, Lightdale N, Furthmayr H, Weigel RJ. Moesin expression is associated with the estrogen receptor-negative breast cancer phenotype. *Surgery.* 1998; **124**: 211-7.

17 Louvet-Vallee S. ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biol Cell.* 2000; **92**: 305-16.

18 Takahashi E, Nagano O, Ishimoto T, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha regulates transforming growth factor-beta-dependent epithelial-mesenchymal transition by promoting hyaluronan-CD44-moesin interaction. *J Biol Chem.* 2010; **285**: 4060-73.

19 Wang CC, Liao JY, Lu YS, Chen JW, Yao YT, Lien HC. Differential expression of moesin in breast cancers and its implication in epithelial-mesenchymal transition. *Histopathology.* **61**: 78-87.

20 Haynes J, Srivastava J, Madson N, Wittmann T, Barber DL. Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Mol Biol Cell.* 2011; **22**: 4750-64.

21 Gargett CE. Uterine stem cells: what is the evidence? *Hum Reprod Update.* 2007; **13**: 87-101.

22 Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HP, Wu D. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod.* 2009; **80**: 1136-45.

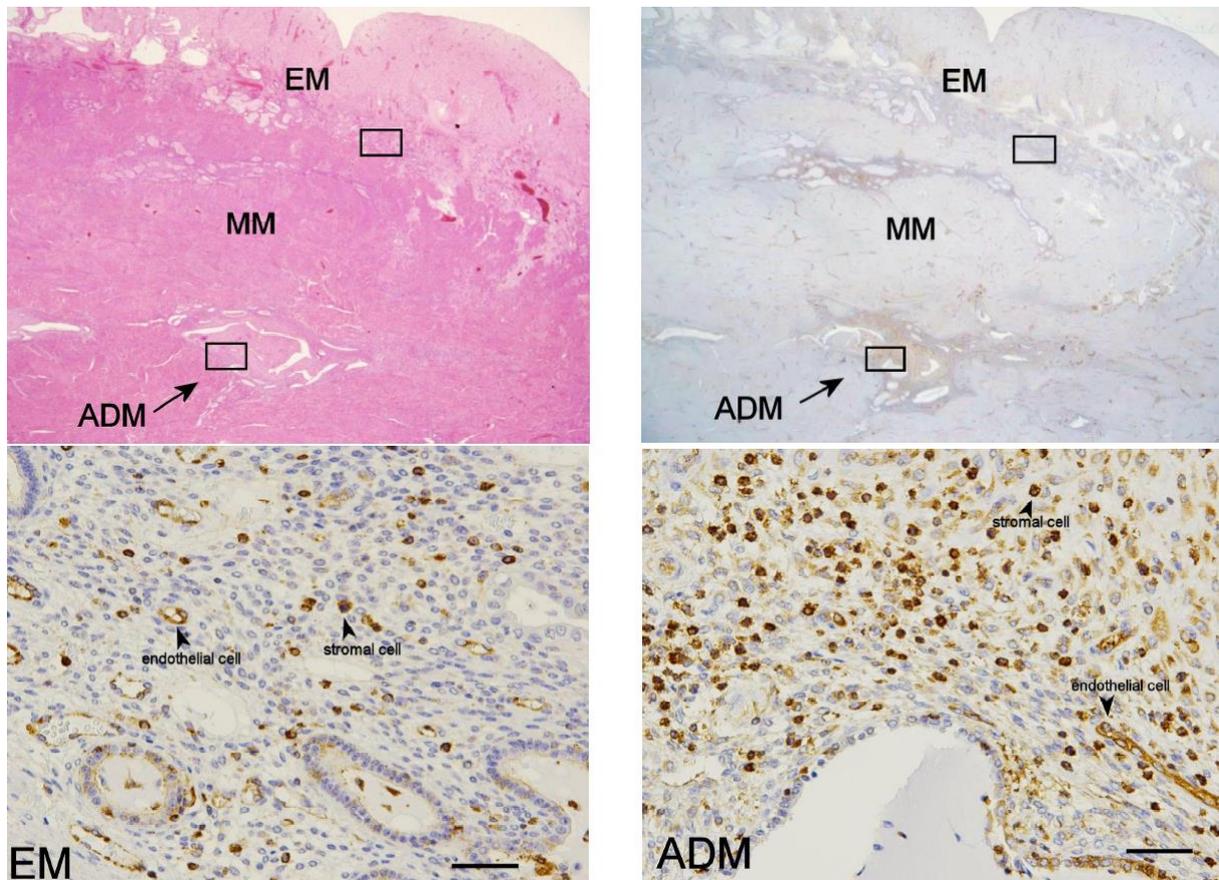


Figure 1: Immunohistochemical analysis of moesin in surgical sections of adenomyosis.

(a) Macroscopic features evident in a H&E section. The surgical specimen was mainly composed of three histological structures: an adenomyosis area (ADM), a myometrium area (MM), and an endometrium area (EM).

(b) Immunohistochemistry for moesin (magnification, x40).

(c) 1 (Endometrium) Scattered expression of moesin was observed in endometrial tissue (both epithelial cells and stromal cells) (magnification, x400).

Scale bar, 50  $\mu$ m

(d) 2 (Adenomyosis) Moesin was overexpressed in the adenomyosis area. Both epithelial cells and stromal cells expressed moesin, but stromal cells showed a

higher level of expression than epithelial cells (magnification, x400).

Scale bar, 50  $\mu\text{m}$

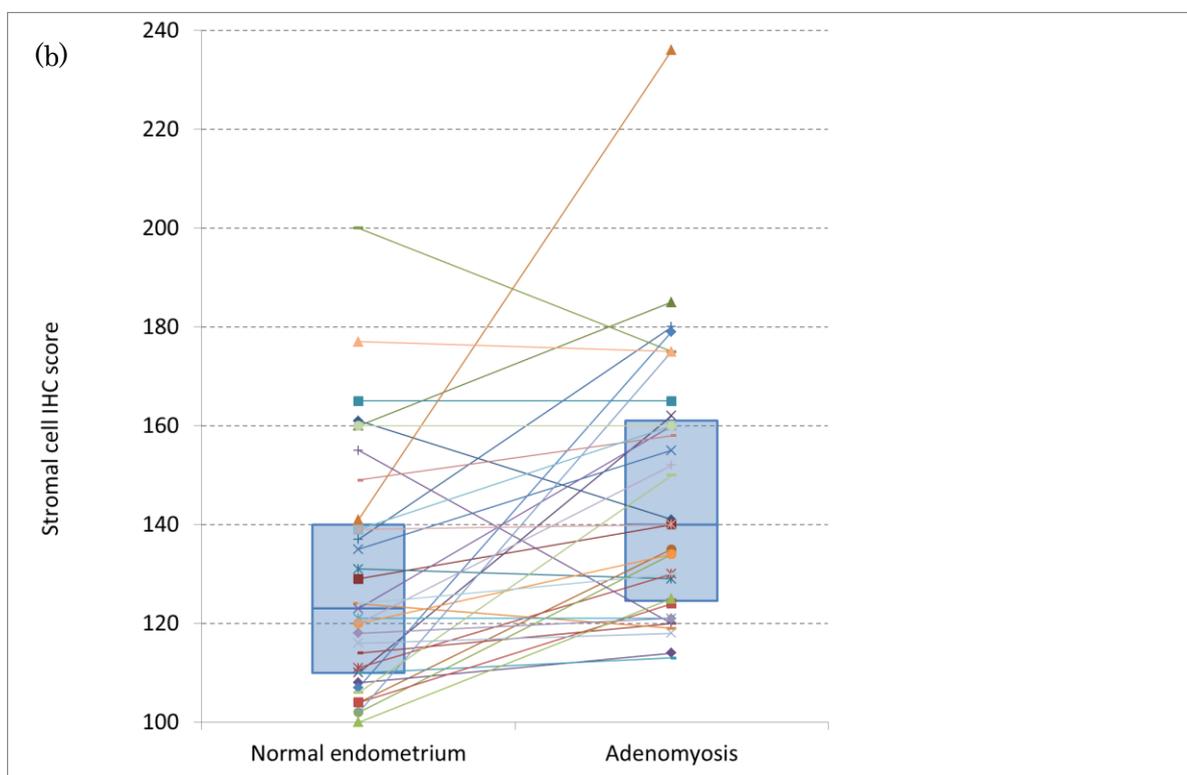
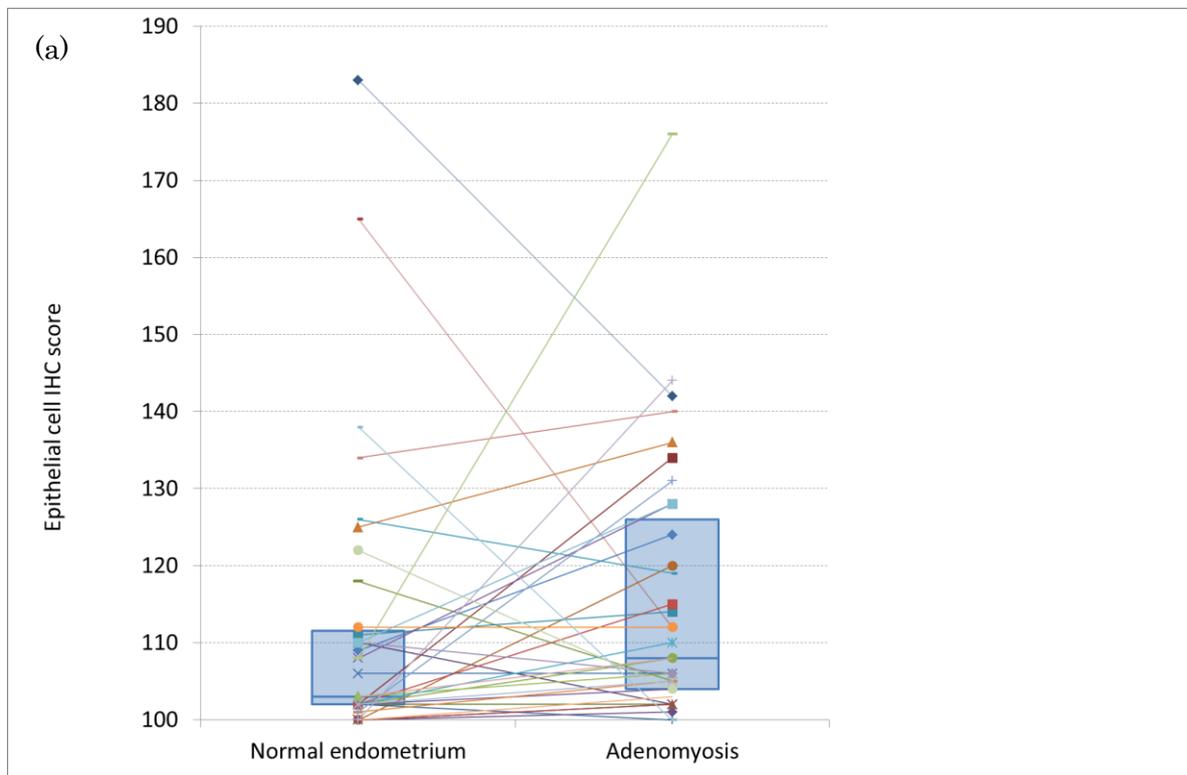


Figure 2: Comparison of the moesin immunohistochemical expression scores between normal endometrium and adenomyosis. (a) epithelial cells, (b) stromal cells. (\* $p < 0.05$ : Wilcoxon matched pairs signed rank test.)

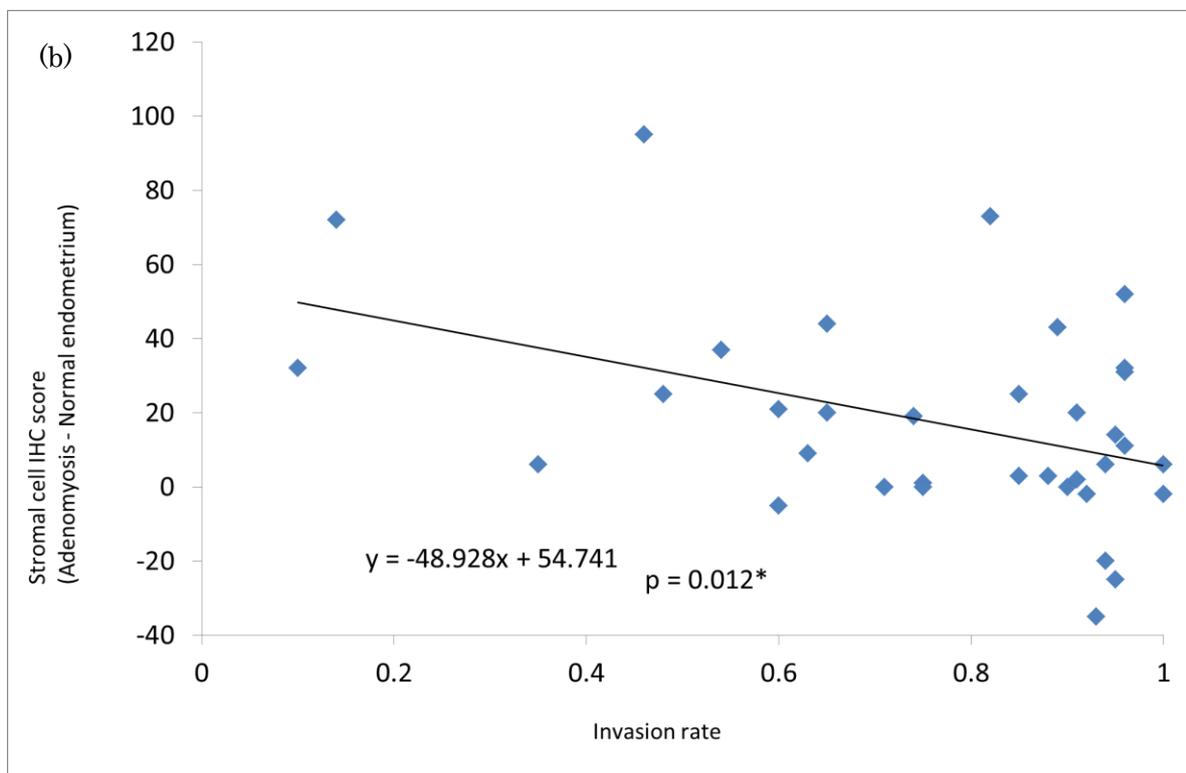
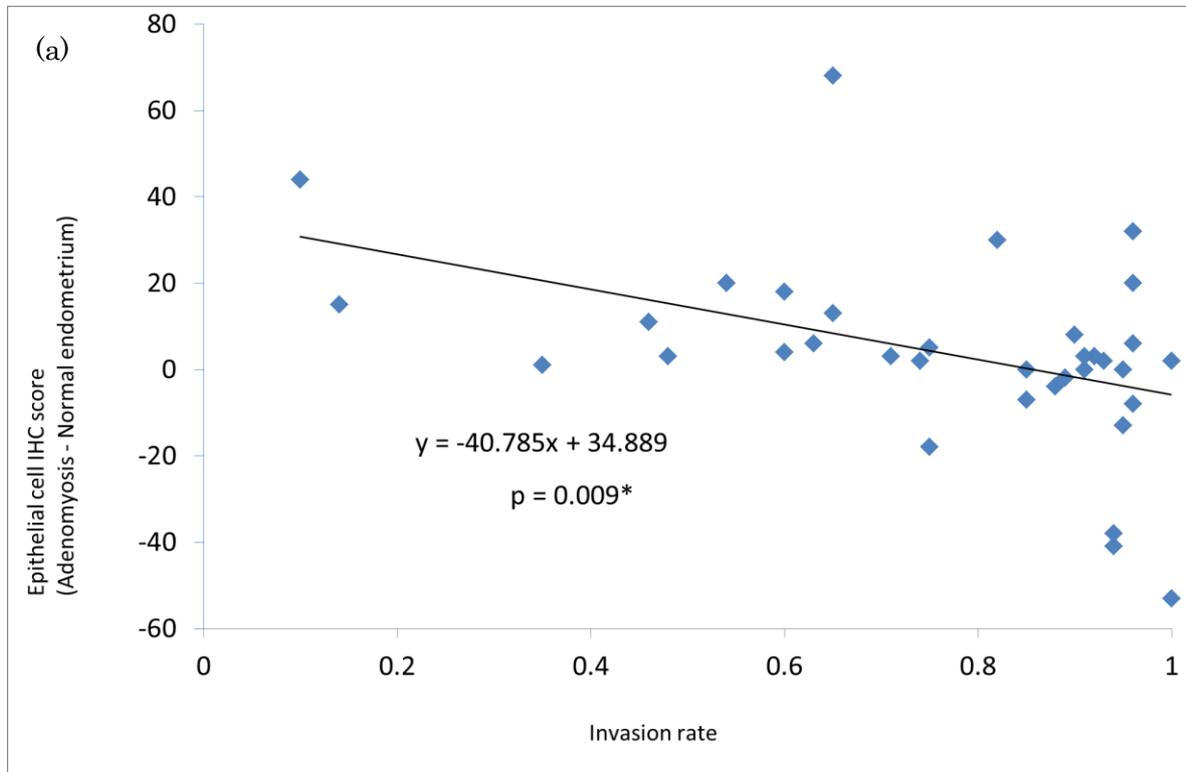


Figure 3: Correlation between immunohistochemical (IHC) score and degree of invasion (0 to 1). Both (a) the epithelial cell IHC score and (b) the stromal cell IHC score were inversely correlated with the degree of invasion (\* $p < 0.05$ : linear regression analysis).

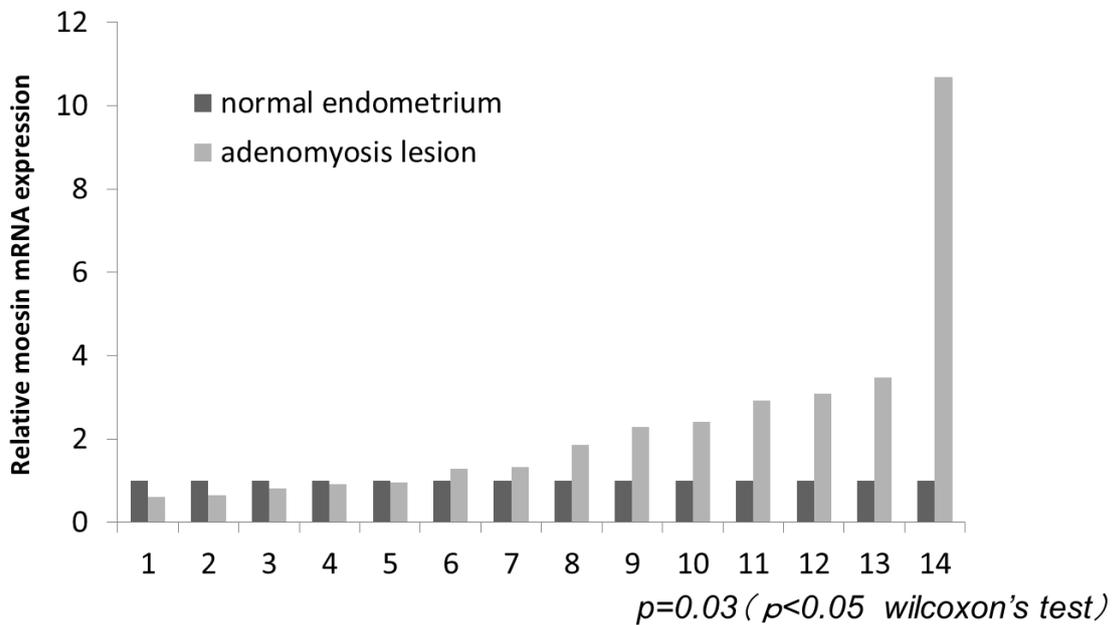


Figure 4: Real-time RT-PCR analysis of moesin mRNA expression in adenomyosis lesions and normal endometrium.

Using 14 cases of adenomyosis, the relative expression of moesin was examined by real-time RT-PCR. Relative expression of moesin mRNA in adenomyosis was compared with that in normal endometrium.

■; normal endometrium, ■; adenomyosis lesion

(\* $p<0.05$ : Wilcoxon matched pairs signed rank test.)

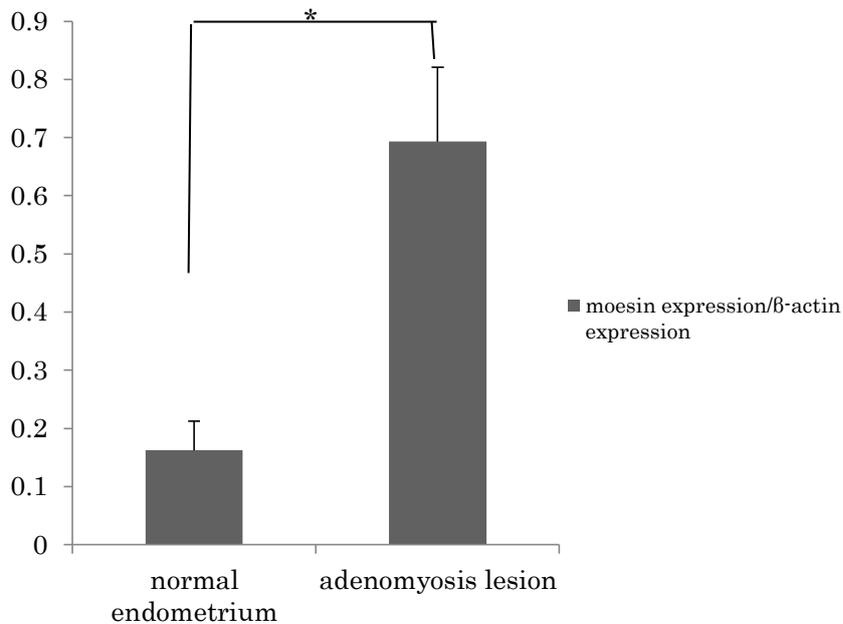
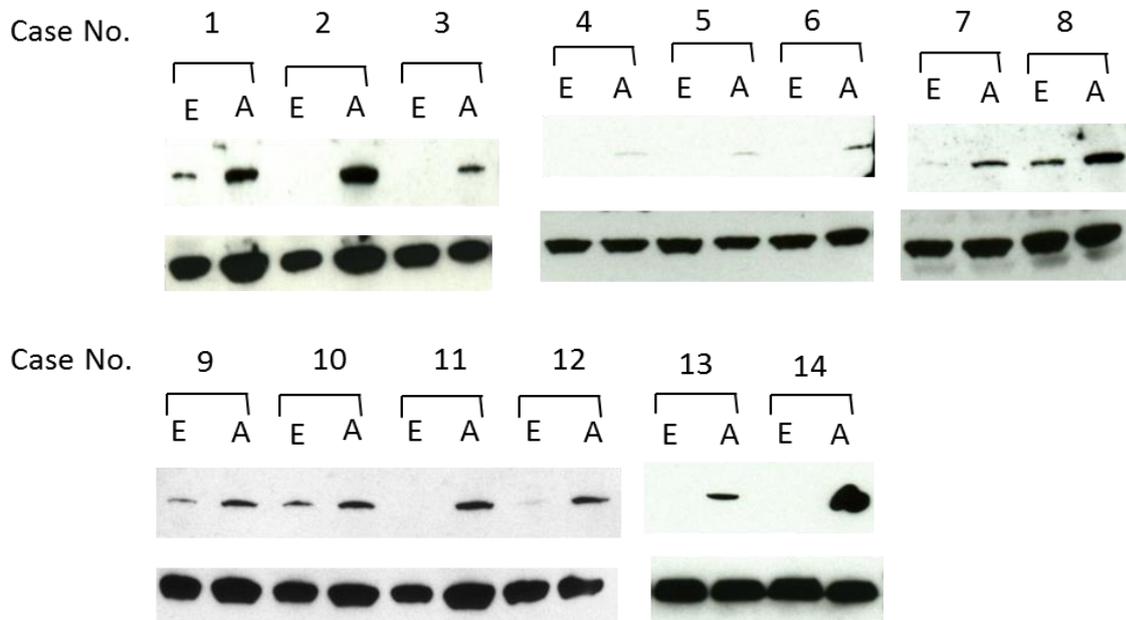


Figure 5: Western blot analysis of moesin expression in surgically resected cases of adenomyosis.

Using 14 cases of adenomyosis, the relative expression of moesin was examined by Western blotting (\*  $p < 0.05$ : Student's *t* test).

"E"; normal endometrium, "A"; adenomyosis in each case. Internal control was  $\beta$ -actin.

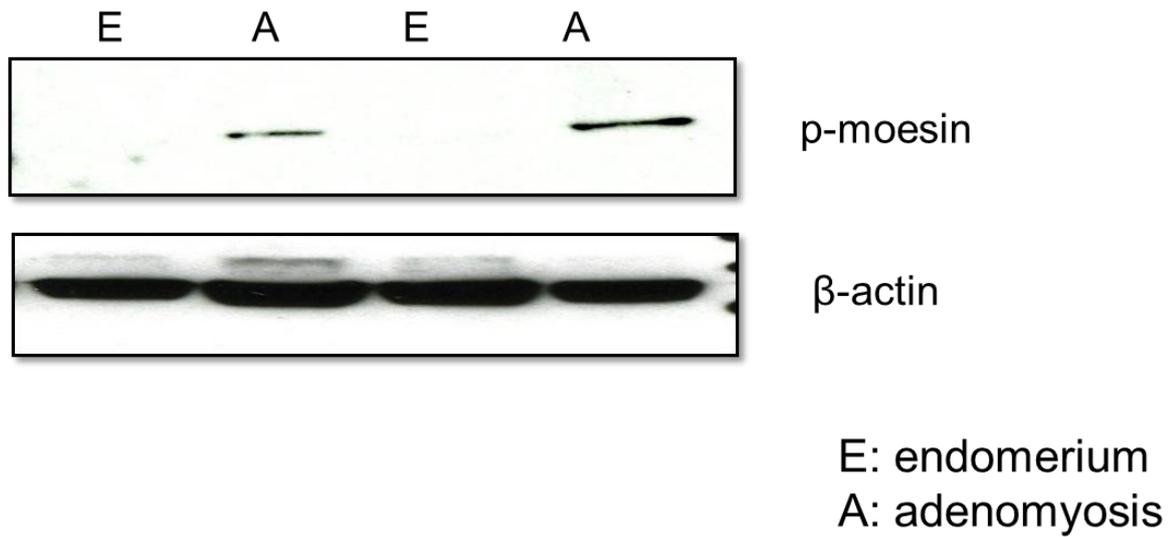


Figure 6: Western blotting of phosphorylated moesin in surgically resected cases of adenomyosis.

Phosphorylated moesin was detected in adenomyosis lesions but not in normal endometrium. E; endometrium, A; adenomyosis.

## Supplementary Table 1

### Seventy-three proteins found to show higher expression in adenomyosis lesions in

#### LC-MS/MS analysis

Identified proteins	Accession	molecular	proliferative	secretary
	Number	weight	phase #A/E	phase #A/E
Isoform 1 of Serum albumin	IPI00745872	69 kDa	1.9	1.4
Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42 kDa	1.8	1.3
Vimentin	IPI00418471	54 kDa	1.7	1.3
Isoform 2 of Filamin-A	IPI00302592	280 kDa	2.9	2.3
Isoform 1 of Collagen alpha-3(VI) chain	IPI00022200	344 kDa	2.1	2.0
Collagen alpha-1(I) chain	IPI00297646	139 kDa	1.1	4.0
Histone H2B type 2-E	IPI00003935	14 kDa	2.4	2.4
Tubulin beta chain	IPI00011654	50 kDa	5.5	2.8
Myosin-11	IPI00020501	227 kDa	7.0	7.0
Isoform 1 of Collagen alpha-1(XIV) chain	IPI00176193	194 kDa	1.1	3.3
Actin, alpha cardiac muscle 1	IPI00023006	42 kDa	5.0	3.0
Collagen alpha-2(I) chain	IPI00304962	129 kDa	1.1	3.3
Keratin, type I cytoskeletal 19	IPI00479145	44 kDa	5.0	3.0
Isoform 1 of Triosephosphate isomerase	IPI00465028	31 kDa	2.2	1.4
Keratin, type II cytoskeletal 8	IPI00554648	54 kDa	4.0	1.8
Desmin	IPI00465084	54 kDa	7.5	2.3
Collagen alpha-1(VI) chain	IPI00291136	109 kDa	3.3	5.0
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	IPI00303476	57 kDa	4.7	5.0
Alpha-actinin-1	IPI00013508	103 kDa	3.3	1.3
Isoform 1 of Heat shock cognate 71 kDa protein	IPI00003865	71 kDa	4.5	1.7
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	IPI00219018	36 kDa	1.9	3.0
14-3-3 protein zeta/delta	IPI00021263	28 kDa	2.3	9.0
Annexin A5	IPI00329801	36 kDa	1.3	2.7
Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	IPI00216049	51 kDa	3.7	2.0
IGKV1-5 protein	IPI00419424	26 kDa	2.0	1.3
Talin-1	IPI00298994	270 kDa	5.5	3.0
Glutathione S-transferase P	IPI00219757	23 kDa	4.0	3.5
heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1 isoform 1	IPI00382470	98 kDa	3.0	2.5
Lumican	IPI00020986	38 kDa	1.2	3.0
Isoform 2C2 of Collagen alpha-2(VI) chain	IPI00304840	109 kDa	2.0	6.0
Lamin-B2	IPI00009771	70 kDa	9.0	2.0
cDNA FLJ53368, highly similar to Pyruvate kinase isozymes M1/M2	IPI00847989	50 kDa	4.0	6.0

Heat shock protein beta-1	IPI00025512	23 kDa	1.3	1.3
Isoform B1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	IPI00396378	37 kDa	3.5	2.5
Elongation factor 1-alpha	IPI00025447	48 kDa	6.0	1.7
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	IPI00645078	118 kDa	7.0	3.0
Calponin-1	IPI00021264	33 kDa	2.0	3.0
Endoplasmin	IPI00027230	92 kDa	2.0	1.3
Hemoglobin subunit alpha	IPI00410714	15 kDa	2.0	5.0
Isoform 2 of Tropomyosin beta chain	IPI00220709	33 kDa	7.0	3.0
Isoform 4 of Collagen alpha-1(XII) chain	IPI00302944	325 kDa	2.0	3.3
cDNA FLJ44920 fis, clone BRAMY3011501, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	IPI00640106	83 kDa	1.5	3.0
EMILIN-1	IPI00013079	107 kDa	6.0	4.0
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	IPI00024284	469 kDa	5.0	4.0
Keratin, type I cytoskeletal 18	IPI00554788	48 kDa	1.5	2.5
ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1	IPI00644712	70 kDa	2.5	2.0
H2A histone family, member Y isoform 2	IPI00059366	39 kDa	3.0	2.0
cDNA FLJ54957, highly similar to Transketolase	IPI00643920	69 kDa	1.3	2.0
Isoform XB of Tenascin-X	IPI00025276	464 kDa	3.0	2.0
Isoform 1 of Alpha-1-antitrypsin	IPI00553177	47 kDa	6.0	2.0
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	IPI00440493	60 kDa	2.5	2.0
Isoform 1 of Nucleophosmin	IPI00549248	33 kDa	3.0	3.0
Fibrillin-1	IPI00328113	312 kDa	2.0	3.0
Isoform Long of 14-3-3 protein beta/alpha	IPI00216318	28 kDa	1.5	1.3
Isoform Non-muscle of Myosin light polypeptide 6	IPI00335168	17 kDa	2.0	2.0
Profilin-1	IPI00216691	15 kDa	2.5	3.0
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	IPI00419585	18 kDa	2.0	4.0
Malate dehydrogenase, mitochondrial	IPI00291006	36 kDa	2.0	3.0
Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	IPI00018219	75 kDa	1.5	2.0
L-lactate dehydrogenase B chain	IPI00219217	37 kDa	2.0	1.2
Isoform 1 of Gelsolin	IPI00026314	86 kDa	2.0	3.0
Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	IPI00013877	37 kDa	2.3	2.0
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	IPI00022774	89 kDa	2.0	1.5
Peroxiredoxin-1	IPI00000874	22 kDa	2.0	2.0
Moesin	IPI00219365	68 kDa	2.0	1.3
Non-POU domain-containing octamer-binding protein	IPI00304596	54 kDa	2.0	2.0
Stress-70 protein, mitochondrial	IPI00007765	74 kDa	2.0	2.0
Isoform 1 of Fibronectin	IPI00022418	263 kDa	2.0	1.5
DEAD box polypeptide 17 isoform 1	IPI00023785	80 kDa	1.3	2.0
Laminin subunit gamma-1	IPI00298281	178 kDa	2.0	3.0
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	IPI00031522	83 kDa	2.0	1.5

Collagen alpha-1(XV) chain	IPI00295414	142 kDa	2.0	2.0
Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha	IPI00216230	75 kDa	3.0	1.5

## Supplementary Table 2

Patients and clinical characteristics of adenomyosis cases used in this study.

Statistical analysis of the relationships between moesin expression and clinical data was performed ( $p < 0.05$ ).

	Immunohisto-chemistry expression (Epithelial cell)		p value	
	ADM > Normal endometrium Case = 23	ADM $\leq$ Normal endometrium Case = 12		
Age(year)			0.535	Student t test
Median (Range)	47 (37 - 67)	45.5 (35 - 55)		
Pregnancy			0.467	$\chi^2$ .467
None	4 ( 17% )	1 ( 8% )		
More than 1 time	19 ( 83% )	11 ( 92% )		
Parity			0.467	$\chi^2$ .467
None	4 ( 17% )	1 ( 8% )		
More than 1 time	19 ( 83% )	11 ( 92% )		
Menarche age			0.482	$\chi^2$ .482
< 12	2 ( 9% )	2 ( 17% )		
$\geq$ 12	21 ( 91% )	10 ( 83% )		
History of uterine surgery			0.006*	$\chi^2$ .006r
None	8 ( 35% )	10 ( 83% )		
More than 1 time	15 ( 65% )	2 ( 17% )		
Menstrual cycle			0.520	$\chi^2$ .520
proliferative phase	16 ( 70% )	6 ( 50% )		
secretory phase	6 ( 26% )	5 ( 42% )		
postmenopause	1 ( 4% )	1 ( 8% )		
History of hormone therapy			0.012*	$\chi^2$ .012r
None	14 ( 61% )	12 ( 100% )		
Done	9 ( 39% )	0 ( 0% )		

	Immunohisto-chemistry expression (Stromal cell)		p value	
	ADM > Normal endometrium Case = 26	ADM ≤ Normal endometrium Case = 9		
Age(year)			0.335	Student t test
Median (Range)	47 (35 - 67)	45 (37 - 55)		
Pregnancy			0.430	χ 2test
None	3 ( 12% )	2 ( 22% )		
More than 1 time	23 ( 88% )	7 ( 78% )		
Parity			0.430	χ 2test
None	3 ( 12% )	2 ( 22% )		
More than 1 time	23 ( 88% )	7 ( 78% )		
Menarche age			0.972	χ 2test
< 12	3 ( 12% )	1 ( 11% )		
≥ 12	23 ( 88% )	8 ( 89% )		
History of uterine surgery			0.774	χ 2test
None	13 ( 50% )	5 ( 56% )		
More than 1 time	13 ( 50% )	4 ( 44% )		
Menstrual cycle			0.166	χ 2test
proliferative phase	18 ( 69% )	4 ( 44% )		
secretory phase	6 ( 23% )	5 ( 56% )		
postmenopause	2 ( 8% )	0 ( 0% )		
History of hormone therapy			0.781	χ 2test
None	19 ( 73% )	7 ( 78% )		
Done	7 ( 27% )	2 ( 22% )		