

氏名（本籍） 大原 玲奈（福岡県）
 学位の種類 博士（医学）
 学位記番号 博甲第 7090 号
 学位授与年月 平成 26 年 5 月 31 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
 審査研究科 人間総合科学研究科
 学位論文題目 子宮腺筋症の浸潤メカニズムの解明

主	査	筑波大学教授	博士（医学）	佐藤 幸夫
副	査	筑波大学教授	医学博士	長田 道夫
副	査	筑波大学准教授	医学博士	内田 和彦
副	査	筑波大学助教	博士（医学）	水野 智亮

論文の内容の要旨

（目的）

子宮腺筋症の成因を明らかにするために、浸潤という病態に着目し、その浸潤メカニズムの解明を行った。そのことで、婦人科悪性疾患の浸潤のメカニズムの解明や治療につながり得る可能性を検索する。

（対象と方法）

1. 子宮腺筋症における浸潤に関わる分子の網羅的検索と発現解析。
 - a. 子宮腺筋症と診断された手術症例のパラフィン包埋検体を用いたプロテオーム解析。
 - b. 子宮腺筋症と診断された手術症例の免疫染色、western blotting 法によるタンパク発現解析および real time RT-PCR 法による mRNA 発現解析。
2. In vitro における候補分子の機能解析
 - a. 子宮内膜間質肉腫細胞株 OMC-9 を用いて、候補分子をターゲットとする siRNA を用いた抑制群とコントロール群の invasion assay。
 - b. 候補分子抑制群とコントロール群における細胞形態変化の免疫蛍光染色。
3. 候補分子活性化のためのリン酸化経路の解析
 - a. OMC-9 細胞におけるリン酸化経路の検討。各種リン酸化阻害剤添加時における候補分子リン酸化抑制の western blotting 法による検討。
 - b. 候補分子のリン酸化が抑制された細胞の免疫蛍光染色による形態評価。

- c. 候補分子のリン酸化が抑制された細胞の invasion assay。
- d. 子宮腺筋症における候補分子リン酸化の western blotting 法による解析。

(結果)

- 1-a. LC-MS/MS 解析を行い、総検出タンパク数は 260 個。うち 73 個が子宮腺筋症病変部で発現が亢進していた。これらのうち文献的考察を加え候補タンパクを 3 種に絞り更なる発現解析を行った。
- 1-b. 候補タンパク 3 種についてスクリーニングのため免疫染色を行い、うち moesin の発現が腺筋症の主に間質の細胞において有意に亢進していることが明らかとなった。さらに症例を追加して検討した結果、腺筋症病変の浸潤の深さと moesin の発現は逆相関するという結果を得た ($p < 0.05$)。real time RT-PCR 法においても moesin の mRNA の発現は腺筋症部分で亢進しており ($p < 0.05$)、western blotting 法においても腺筋症での moesin の発現が亢進していることが明らかとなった ($p < 0.05$)。
- 2-a. moesin が腺筋症の間質細胞で有意に発現が亢進していることから内膜間質肉腫細胞株を用いて invasion assay を行った。moesin をターゲットとする siRNA を導入した細胞群においてその浸潤能は有意に低下した ($p < 0.05$)。
- 2-b. moesin siRNA を導入した細胞は細胞突起が消失し、重合型アクチン線維の配列が不規則となり形態学的変化が認められた。
- 3-a. Rho-ROCK を介する経路、p38MAPK を介する経路および PKC を介する経路について報告があり各阻害剤を添加し検討した。OMC-9 細胞においては PKC を阻害した場合にのみ moesin のリン酸化が抑制された。
- 3-b. PKC 阻害剤を添加した OMC-9 細胞の形態学的評価では、阻害剤添加細胞の細胞突起の消失、重合型アクチン線維の細小・減少が認められ形態学的な変化が認められた。
- 3-c. PKC 阻害剤を用いた invasion assay による浸潤能の解析では、統計学的な有意差は認めないが阻害剤を添加した細胞群における浸潤能が低下する傾向が認められた ($p = 0.16$)。
- 3-d. 子宮腺筋症におけるリン酸化 moesin の発現は正常内膜に比較して亢進していることが明らかとなった。

(考察)

プロテオーム解析から得られた候補分子のうち腺筋症での moesin 高発現が明らかとなった。moesin は活性化によりアクチンと結合し細胞のリモデリングを起こすことで浸潤や遊走に関与する。実際に siRNA を用いてその発現を抑制もしくは阻害剤により moesin のリン酸化を抑制し活性化を抑制することが、細胞リモデリングを抑制し細胞の浸潤能を低下させることから、moesin が浸潤に多大な影響を持っていることが示された。また臨床検体における免疫染色結果の検討から、浸潤の深さと moesin の発現が逆相関するという結果が得られ、腺筋症発症初期において moesin の発現が特に高値となる可能性が示唆された。

(結論)

子宮腺筋症では moesin 蛋白発現が亢進しており、moesin 蛋白の機能制御が腺筋症の新たな治療戦略となることが示された。さらに、OMC-9 細胞を用いた実験系で浸潤抑制を検討できることから、子宮内膜間質肉腫などの悪性腫瘍の治療戦略の新たな可能性を示唆した。

審査の結果の要旨

(批評)

大原氏の研究により、moesin の発現もしくはリン酸化による moesin 活性化をコントロールすることが、子宮腺筋症病変進展の抑制につながると考えられた。

臨床病理検体そして in vitro の結果ともに臨床応用に発展する可能性を示唆する結果が示されており、研究の計画・遂行・結果の評価が、科学的・論理的に的確に行われている。臨床応用を目指し、リン酸化カスケードの解明等、今後の研究を続けて頂きたい。

平成 26 年 4 月 7 日、博士（医学）学位論文審査委員会において審査委員全員出席のもとに最終試験を行い、論文について説明をもとめ、関連事項について質疑応答を行った結果、審査委員全員によって合格とされた。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。