

氏 名 山中 章義

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 博士甲第763号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項

学位授与年月日 平成29年 3月10日

学位論文題目 Progesterone and synthetic progestin, dienogest, induce apoptosis of human primary cultures of adenomyotic stromal cells

(培養子宮腺筋症間質細胞に対するジエノゲストによるアポトーシス誘導作用の検討)

審査委員 主査 教授 河内 明宏

副査 教授 宇田川 潤

副査 教授 醍醐 弥太郎

論文内容要旨

※整理番号	770	(ふりがな) 氏名	やまなか あきよし 山中 章義
学位論文題目	Progesterone and synthetic progestin, dienogest, induce apoptosis of human primary cultures of adenomyotic stromal cells. (培養子宮腺筋症間質細胞に対するジェノゲストによるアポトーシス誘導作用の検討)		
【研究の目的】 子宮腺筋症とは、本来子宮内腔に存在するはずの子宮内膜組織が子宮筋層内に存在する疾患である。周囲の子宮平滑筋が過形成により肥大し、月経困難症や過多月経の原因となる。根治療法は子宮全摘術であるが、妊娠希望のある女性では病変のみ切除を行う。病変切除を行えば症状は緩和するものの、子宮腺筋症組織のみを切除することは不可能であり子宮筋も同時に切除しなければならない。そのため妊娠中の子宮破裂のリスクは高くなる。また本術式は手術を行っても再発率が高い。子宮腺筋症に対する薬物療法に GnRH アナログを用いた偽閉経療法があるが、低エストロゲンによる更年期症状を認めることが多く長期間の使用はできない。 ジェノゲストは子宮内膜症に対して使用されるプロゲステロン製剤であり、鎮痛作用が強く、in vitro にて子宮内膜症間質細胞の増殖抑制やアポトーシス誘導作用を有することが分かっている。臨床診療では子宮内膜症類似疾患である子宮腺筋症に対しても使用され、その鎮痛作用が有効であることは知られているが、基礎実験によるデータはこれまで報告されていなかった。 本研究では、ジェノゲストによる子宮腺筋症細胞に対するアポトーシス誘導作用を検討することを目的とする。			
【方法】 滋賀医科大学附属病院および高の原中央病院にて子宮腺筋症と診断され手術を施行し、病理組織検査にて子宮腺筋症が確認された 24 名の患者の子宮腺筋症組織を検討に使用した。子宮腺筋症間質細胞の単離は既報に従った。培養した細胞は免疫染色にて Vimentin 陽性、Cytokeratin 陰性、 α -smooth muscle actin 陰性、von Willebrand factor 陰性であり、間質細胞であることを確認した。 細胞増殖抑制作用の検討は以下のように行った。 ①培養した子宮腺筋症間質細胞を 24 時間飢餓状態とした後、チミジンアナログである 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を添加した培養液を加える。培養液はコントロールおよびプロゲステロンもしくはジェノゲストを各濃度に振り分けて添加した。 ②2 時間後にフローサイトメトリーにて BrdU が取り込まれている細胞数をカウントし、細胞周期毎の細胞数の割合を算出した。			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2 千字程度でタイプ等を用いて印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

アポトーシス誘導作用の検討は以下に行った。

①フローサイトメトリーを用いたアポトーシス細胞数のカウント

- 1) 培養した子宮腺筋症間質細胞にコントロールおよびプロゲステロンもしくはジェノゲストを各濃度に振り分けた培養液を添加し48時間培養した。
- 2) 細胞数を 10^6 個に揃えた後、Annexin-Vおよび7-amino-actinomycin D (7-AAD)を添加し、15分後にフローサイトメトリーを用いて取り込み細胞数をカウントした。

②カスパーゼ3/7活性を用いたアポトーシスの検討

- 1) 10^4 個に揃えた子宮腺筋症間質細胞へコントロールおよびプロゲステロンもしくはジェノゲストを各濃度に振り分けた培養液を添加し4時間培養した。
- 2) ルシフェラーゼアッセイを用いてカスパーゼ3/7活性細胞を発光させ、マイクロプレートリーダーを用いて発光量を測定した。

【結果】

細胞増殖抑制作用

ジェノゲストはプロゲステロンと同様、S期細胞の割合がコントロール群と比較し有意に低下しており、細胞増殖が抑制されていた。増殖抑制作用は、プロゲステロンおよびジェノゲストともに濃度依存性であった。

アポトーシス誘導作用

Annexin-Vを用いたアポトーシス細胞数およびカスパーゼ3/7活性において、いずれもジェノゲストはプロゲステロンと同様、コントロール群と比較しアポトーシス誘導作用の増強を有意に認めた。

【考察】

プロゲステロンは子宮内膜の癌細胞株のアポトーシスを誘導することが報告されており、ジェノゲストも子宮内膜症細胞に対し細胞増殖抑制作用やアポトーシス誘導作用を有することが分かっている。しかしながら、これまで子宮腺筋症組織の間質細胞に対して、プロゲステロン製剤による細胞増殖抑制作用やアポトーシス誘導作用を検討した報告は認められなかった。

ジェノゲストはプロゲステロン受容体を選択的に活性化し、プロゲステロン作用を有する。ジェノゲストは主席卵胞に作用し、その発育を抑制し血中エストラジオールの産生を抑制すると考えられている。子宮腺筋症はエストロゲン依存性疾患であり、血中エストロゲン濃度の上昇を抑制することにより細胞増殖を抑制すると考えられていた。今回の検討により、ジェノゲストが子宮腺筋症間質細胞への直接作用により、細胞増殖抑制とアポトーシス誘導作用を有すると考えられる。

【結論】

ジェノゲストは子宮腺筋症間質細胞の細胞増殖抑制作用およびアポトーシス誘導作用を有する。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	770	氏名	山中 章義
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) ※明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと</p> <p>子宮腺筋症は子宮内膜が子宮筋層内に侵入し、子宮筋層の肥大、過多月経、月経困難症を引き起こす疾患である。同じく子宮内膜が骨盤内の腹膜に異所性に増殖する疾患に子宮内膜症があり、これらは類似疾患として扱われることが多い。ジェノゲストは子宮内膜症に対する増殖抑制効果と鎮痛効果を有し、子宮内膜症に対して広く使用されている。類似疾患である子宮腺筋症に対しても使用されてきたが、子宮腺筋症に対するジェノゲストの効果を検討した基礎的研究の報告はこれまでにない。</p> <p>本論文ではジェノゲストが子宮腺筋症に対して、子宮内膜症と同様に細胞増殖抑制作用を有しているか、またこれまで検討されていなかったアポトーシス誘導作用も有しているかについて検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none">1) ジェノゲストは子宮腺筋症間質細胞における G0/G1 期から S 期への移行を抑制することにより、細胞増殖を抑制する。2) ジェノゲストは子宮腺筋症間質細胞においてカスパーゼ 3/7 活性を増強させる。3) ジェノゲストは子宮腺筋症間質細胞においてアポトーシス細胞を増加させる。 <p>本論文は、子宮腺筋症間質細胞に対しジェノゲストによる細胞増殖抑制作用およびアポトーシス誘導作用について新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 581 字) (平成 29 年 1 月 23 日)</p>			