

【総説】

第11回 高安賞優秀論文賞受賞

論文 「Creation of immortalised epithelial cells from ovarian endometrioma」  
 Br J Cancer  
 Vol. 106, Page 1205-1213 2012年2月掲載  
 Bono Y, Kyo S, Takakura M, Maida Y, Mizumoto Y,  
 Nakamura M, Nomura K, Kiyono T, Inoue M.

子宮内膜症性卵巣嚢胞から分離した子宮内膜症上皮不死化細胞株の樹立

保野由紀子 (ほの ゆきこ)

【目的】 子宮内膜症は内膜組織が卵巣や骨盤腹膜、子宮筋層などに異所性に発育する疾患である。近年増加傾向にあり、月経困難症や不妊症などを引き起こし、性成熟期の女性のQOLに深刻な影響を与える疾患として社会問題化している。子宮内膜症の病巣は正所性内膜と同様に上皮と間質から構成されるが、その上皮細胞の培養が困難なことから、子宮内膜症研究においては多くが間質細胞を用いた系で実験が行われてきた。また卵巣子宮内膜症の上皮細胞の癌化が昨今問題となってきたがその分子機構は不明である。子宮内膜症研究の進展、特に内膜症からの癌化のメカニズムを明らかにするためには上皮細胞の安定培養系が必須である。そこで我々は当研究室が開発してきた細胞不死化技術を駆使し、内膜症上皮細胞のin vitro培養系を初めて確立したので報告する。

【方法】 手術により摘出した子宮内膜症性卵巣嚢胞より、文書による同意が得られた2症例の腫瘍壁を細切し、コラゲナーゼ処理、フィルター濾過後、上皮細胞成分を濃縮した。これらを培養液に展開し、顕微鏡下に上皮細胞塊を約100個直接採取して初代培養した。上皮細胞の不死化に必須のステップであるRb機能の不活化とテロメラーゼ活性化のため、cyclinD1, CDK4, または

Human papillomavirus type 16 E6/E7のウイルス発現ベクターを導入し、さらにhTERTのウイルス発現ベクターを各々組み合わせて導入し、継代を試みた。不死化高率を高める目的で、さらにDominant negative p53 (DN-p53)の導入も試みた。

【結果】 上記の遺伝子導入の組み合わせにより永続的に培養可能な不死化細胞を樹立し得た。不死化に成功した遺伝子の組み合わせは、(1) cyclinD1, CDK4, DN-p53, hTERT, (2) E6/E7, hTERT, (3) cyclinD1, CDK4, hTERTの3パターンであった。以上より、hTERTと、Rbを不活化す

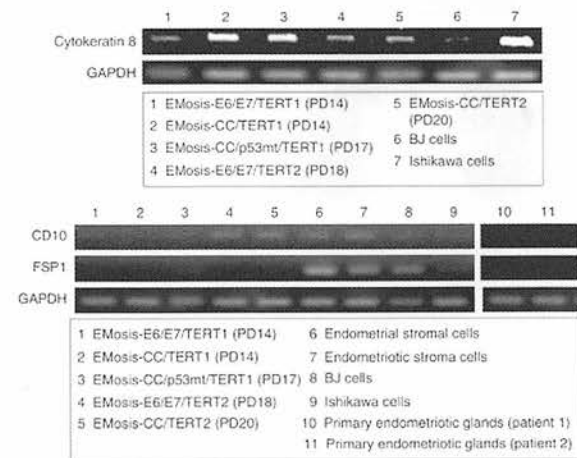


図2. EMosis-CC/TERT1はRT-PCRで上皮マーカーであるサイトケラチン陽性、間質マーカーであるCD10, FSP1は陰性だった。

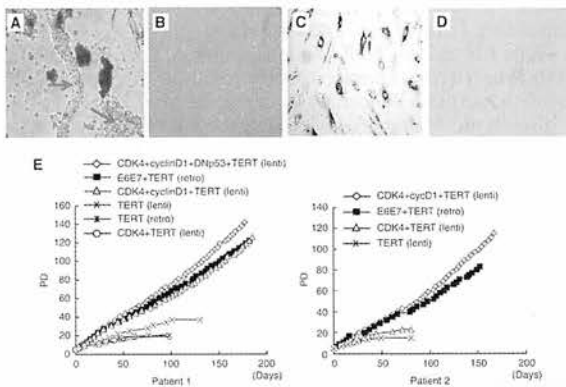


図1. (A) 子宮内膜症性卵巣嚢胞をminceし分離した上皮集塊。(B) 不死化細胞は培養上で腺管様構造を認める。(C) (D) hTERT導入のみの非不死化細胞はPD 20にてsenescence associated  $\beta$ -gal染色陽性であり、senescenceが誘導されていることを確認した(C)。一方、不死化細胞はPD100においても $\beta$ -gal染色陰性である(D)。(E) 遺伝子導入した細胞株の増殖曲線。上皮の不死化にはhTERTと、Rbを不活化するcyclinD1/CDK4あるいはE6E7の組み合わせが必要十分な因子であることが明らかになった。

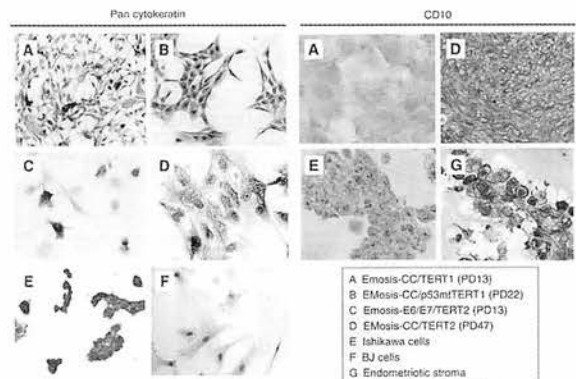


図3. EMosis-CC/TERT1は細胞免疫染色で上皮マーカーであるサイトケラチン陽性、間質マーカーであるCD10は陰性だった。

るcyclinD1/CDK4あるいはE6E7の組み合わせが不死化に必要な十分な因子であることが明らかになった(図1).

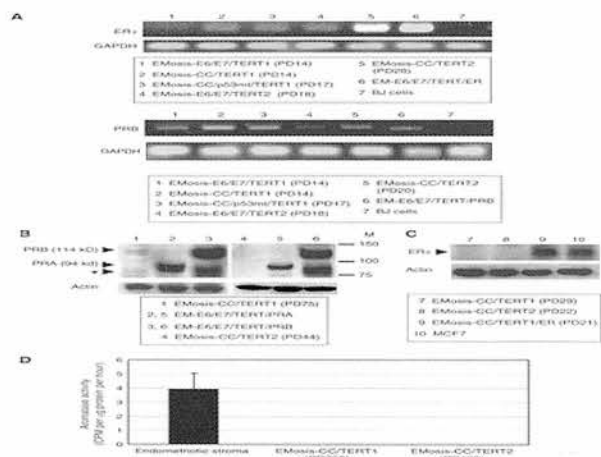


図4. EMosis-CC/TERT1はER $\alpha$ , PRBの発現をRT-PCRで認めた(A). ウェスタンではPRBの発現を認めたが、PRAの発現は認めなかった(B). また、ウェスタンでは、ER $\alpha$ の発現も認めなかった(C). (D)Water assay法にてアロマターゼ活性は認めなかった.

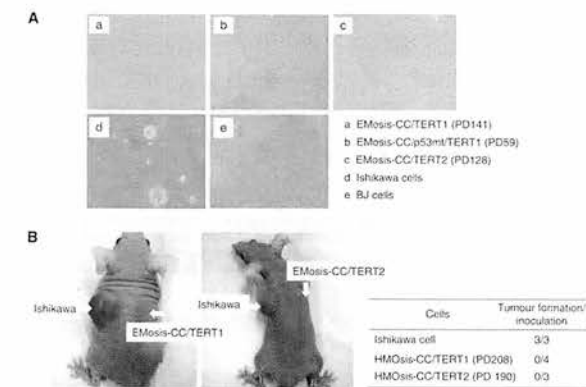


図5. (A) 軟寒天培地上で不死化細胞はコロニーを形成せず、足場非依存性の増殖を認めなかった。(B) ノードマウスの皮下に不死化細胞を接種するも腫瘍は形成されず、不死化細胞の悪性形質転換は認めなかった.

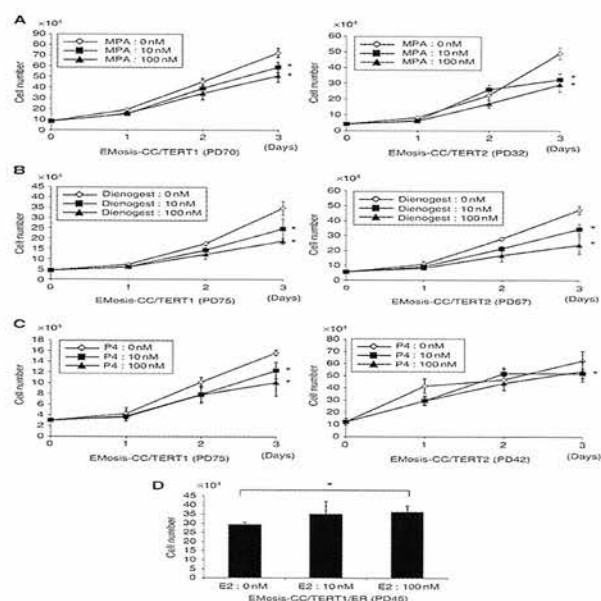


図6. プロゲステリン製剤 (A : MPA, B : Dienogest, C : P4) による増殖抑制効果とエストロゲン(D) に対する増殖促進効果を認めた.

今回我々はヒト由来の遺伝子導入で不死化したcyclinD1/CDK4/TERT導入細胞 (EMosis-CC/TERT1) を実験に用いた. 上皮細胞マーカーとしてサイトケラチンを, 間質細胞マーカーとしてCD10をRT-PCRおよび免疫細胞染色にて確認したところ, 不死化細胞が上皮由来であることを確認した(図2, 図3). 次に子宮内膜症の進展発育に大きな影響を与える性ステロイドホルモンの受容体を解析した. RT-PCRおよびWestern blotによる解析ではEMosis-CC/TERT1はEstrogen receptor (ER) $\alpha$ , Progesterone receptor (PR)B陽性であったが, PRAの発現は認められなかった(図4). EMosis-CC/TERT1に様々なプロゲステリン製剤 (MPA, プロゲステロン, dienogest) を投与し, 細胞増殖を確認したところ, 内膜症組織に特有の有為な細胞増殖抑制効果を確認した(図6). 最後に不死化細胞の悪性形質を評価検討した. これらの細胞ではsoft agarによる足場非依存性の増殖やノードマウスでの造腫瘍能を認めなかった(図5).

【結論および考察】性ステロイドホルモン感受性を保持した子宮内膜症上皮不死化細胞株を初めて樹立し得た. 不死化のステップとしては, Rbの不活化とテロメレーズの活性化の2ステップで十分であり, これまでの上皮細胞不死化のセオリーに準ずるものであった. 子宮内膜症は性ステロイドによる影響を受け進展, あるいは消退する疾患であり, ホルモン感受性のある本細胞株は子宮内膜症の治療モデルとして特に有用であると考えられる. また本細胞株は不死化しているものの癌化形質は獲得していない. 本細胞でRb不活化に用いたCDK4およびcyclinD1はいずれもhuman factorであり, 従来好んで用いられたHPV E6/E7などのウイルス癌遺伝子を含んでいない. E6/E7にはRb, p53不活化以外にも様々な癌化促進経路に作用し, 発癌実験においては癌化経路の解明が複雑になる欠点があったが, 本細胞は純然たるRb不活化因子を用いている点で発癌実験には適している. 今後これらの細胞に癌遺伝子の導入あるいは癌抑制遺伝子のノックダウンを試みることで癌化に必須のステップを明らかにし, 子宮内膜症性卵巣嚢胞の癌化メカニズムの解明に貢献したい.

文 献

- 1) Anglesio MS, Carey MS, Köbel M, Mackay H, Huntsman DG, Vancouver Ovarian Clear Cell Symposium Speakers (2010) Clear cell carcinoma of the ovary: A report from the first Ovarian Clear Cell Symposium. *Gynecol Oncol* 121: 407-415
- 2) Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE (2000) Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2897-2902
- 3) Bulun SE, Mahendroo MS, Simpson ER (1993) Polymerase chain reaction amplification fails to detect aromatase cytochrome P450 transcripts in normal human endometrium or decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 1458-1463
- 4) Bulun SE, Yang S, Fang Z, Gurates B, Tamura M, Zhou J, Sebastian S (2001) Role of aromatase in endometrial disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79: 19-25
- 5) Bulun SE, Cheng YH, Yin P, Imir G, Utsunomiya H, Attar E, Innes J, Julie, Kim J (2006) Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 248: 94-103



Profile

2003年3月: 金沢大学医学部医学科卒業  
 2012年12月: 金沢大学大学院医学系研究科  
 分子移植学博士課程修了