

〔ワークショップ1 / 子宮内膜症の成因に関する基礎的研究〕

## 子宮腺筋症において腺細胞が子宮筋層へ侵入するメカニズムに関する検討

- 1) 長崎大学医学部産婦人科
- 2) 長崎済生会病院産婦人科
- 3) 佐世保中央病院

カーン カレク<sup>1)</sup>, 北島 道夫<sup>1)</sup>, 平木 宏一<sup>1)</sup>, 井上 統夫<sup>1)</sup>  
藤下 晃<sup>2)</sup>, 石丸 忠之<sup>3)</sup>, 増崎 英明<sup>1)</sup>

はじめに

子宮腺筋症は、子宮内膜基底層より侵入した子宮内膜腺上皮および間質組織が子宮筋層内に存在し、周囲筋層の肥大・過形成を伴い限局性あるいはびまん性の子宮腫大を呈する疾患と定義される [1, 2]。本疾患は、35歳から50歳にかけての経産女性に好発する。子宮内膜症と子宮腺筋症とは、その由来する内膜組織（機能層か基底層か）および病巣の解剖学的所在（子宮内か子宮外か）により相違する [2]。子宮腺筋症の発症機序および病態生理は、未だ明らかでない。これまでに、子宮腺筋症の病態に関して子宮筋層内のミューラー管遺残組織の化生説、血管やリンパ管など脈管を通した浸潤説、あるいは子宮内膜・筋層境界のストレス反応説など異なる発症機序が報告されている [1, 3-5]。そのなかで、子宮内膜基底層組織が直接子宮筋層内へ向けて陥入し増殖することで腺筋症病巣が形成されるという説が広く受け入れられている [1]。しかしながら、内膜組織が筋層内へ陥入する機序に関しては必ずしも明らかでない。

カドヘリン（E-カドヘリンおよびN-カドヘリン）は、膜貫通型糖タンパクで、通常細胞間接着の「ジッパー」として働く。すなわち、これらは上皮細胞（E-カドヘリン）あるいは平滑筋細胞（N-カドヘリン）において、細胞間あるいは細胞-周囲結合織間との接着に関与している蛋白である [6]。子宮内膜症組織の腺上皮細胞は浸潤能が高く、これらではE-カドヘリン

の発現が欠損していることが報告されている [7]。また、乳癌、膀胱癌あるいは肝細胞癌での検討では、これらの細胞における hepatocyte growth factor (HGF) の過剰発現がカドヘリンを介した細胞間接着を抑制し、間葉系組織への細胞遊走および浸潤に関わっていることが示されている [8]。これらより、子宮腺筋症での筋層内への子宮内膜組織の侵入にHGFとカドヘリンが関わっている可能性が推察される。

本研究では、子宮腺筋症の子宮内膜機能層および基底層の月経周期による生物学的相違を検討し、また、子宮内膜・筋層境界域におけるHGFとカドヘリンの発現を子宮腺筋症の有無により比較検討した。

対象および方法

子宮摘出を受けた10例の子宮腺筋症女性（33～51歳）および6例の非子宮腺筋症コントロール女性（38～52歳）を対象とし、摘出した子宮から子宮内膜より子宮筋層に至る全層組織を生検した。これら対象の子宮摘出時の月経周期の分布は、腺筋症群では、増殖期2例、分泌期5例、月経期1例、および無月経2例で、コントロール群では、分泌期4例、無月経2例であった。子宮内膜基底層は、過去に報告されたその組織形態学的特徴や定義を参照にして識別した [9, 10]。すなわち、(1)基底層は月経周期による形態的变化を伴わず、(2)基底層における腺組織は増殖性が弱く、(3)基底層細胞は分泌変化を伴

わず間質は紡錘形で脱落膜変化を呈せず，(4)月経周期の時期によらず子宮内膜・筋層移行部から厚さ1mmの層，とした。すべての生検組織はヘルシンキ宣言および施設倫理委員会の承認の下に採取され，すべての対象女性からインフォームド・コンセントを得たうえで行った。

子宮内膜機能層および基底層の生物学的相違は，免疫組織化学的手法により，エストロゲン受容体 (ER, ER1D5, Dako, 1:50)，プロゲステロン受容体 (PR, NCL-PGR, Novocastra, 1:40)，Ki-67 (MIB-1, Immunotech, 1:100)，TUNEL法 (Wako) および activated caspase-3 (R&D, 1:50) の発現を比較することで検討した。また，HGF (H-145, Santa Cruz, 1:50)，E-カドヘリン (NCH-38, Dako, 1:100) および N-カドヘリン (6G11, Dako, 1:100) の発現を免疫組織化学的手法で検討した。これらの手法の詳細は既報を参照にされたい [11]。ER, PR および activated caspase-3 の発現動態は，quantitative-histogram score (Q-H score) を用いて半定量的に評価した [11]。細胞増殖性は Ki-67染色により，4つの200倍視野における全細胞中の核染色陽性率を Ki-67インデックスとして算出した。アポトーシスインデックスは，10mm<sup>2</sup>あたりの TUNEL 陽性細胞数で算出した。生検組織から抽出培養した上皮細胞および平滑筋細胞における HGF およびカドヘリン遺伝子の発現を RT-PCR 法により検討した。上皮細胞および平滑筋細胞の分離抽出，培養および培養細胞の純度の評価はこれまで報告されている方法で行った [12, 13]。

### 結 果

ER および PR の発現は，子宮内膜機能層および基底層の腺上皮細胞および間質細胞に認められた。増殖期での ER および PR の発現に内膜の部位による相違は認められなかったが，分泌期では，腺筋症およびコントロール女性ともに基底層での ER と PR の発現が減弱していることが認められた。Ki-67は増殖期の機能層において強発現を認めたが，基底層における Ki-67の発現率は各月経周期を通して低いことが認

められた。TUNEL 陽性細胞は機能層において増殖期でもっとも少なく，分泌期中程度で月経期においてもっとも増加することが認められたが，基底層では TUNEL 陽性細胞が少ないことが認められた。機能層あるいは基底層における Activated caspase-3 の発現・局在も TUNEL 法と同様の傾向が認められた。子宮腺筋症女性における子宮内膜部位別のこれらの発現動態の相違を，表1にまとめた。

サイトケラチン陽性上皮細胞および smooth muscle actin (SMA) 陽性平滑筋細胞において，HGF の濃度依存的な細胞分離作用が認められた。コンフルエントに達した培養上皮細胞あるいは平滑筋細胞に対して HGF を50あるいは100ng/mL 添加したところ，非添加群に比較して培養細胞の分離・散乱が亢進した (図1A)。子宮内膜腺上皮細胞における E-カドヘリン遺伝子の発現は，時間依存的に増加し，24~48時間後にもっとも高かった (図1B)。図1Aに示したような HGF の濃度依存的な細胞分離作用は，腺上皮細胞および平滑筋細胞における E-カドヘリンおよび N-カドヘリン遺伝子の発現低下と一致していた (図1C)。子宮腺筋症女性由来の子宮内膜機能層あるいは基底層の腺上皮細胞において，HGF の強発現と E-カドヘリンあるいは N-カドヘリンの発現低下が認められたが (図2)，これらは非腺筋症コントロール女性においては認められなかった (図3)。

### 考 察

今回の検討で，子宮腺筋症および非腺筋症コントロール女性において，子宮内膜機能層と基底層との間に生物学的相違が存在することが確認された。子宮内膜機能層は，エストロゲンおよびプロゲステロンへ反応して月経周期に沿った変化が認められるのに対して，基底層では ER および PR の発現が弱くまた細胞増殖を示すインデックスも低いことから，月経周期に沿った変化が少ないことが示唆された。アポトーシスあるいは壊死変化が基底層よりも機能層で強いことは，月経期に剥脱する機能層内膜に対して，基底層では月経期においても機能・形態

表1 Differences between functional and basal endometrium in women with adenomyosis based on menstrual cycle

	Proliferative phase		Secretory phase	
	Functionalis	Basalis	Functionalis	Basalis
ER expression (Q-H score)	↑↑	↑↑	↑↑	↑
PR expression (Q-H score)	↑↑	↑↑	↑↑	↑
Ki-67 index	↑↑	↑	↑	↑
Apoptotic index	↑	↓	↑↑	↓
activated caspase-3 expression (Q-H score)	↑	↓	↑↑	↓

The immunoreactivity of ER, PR and activated caspase-3 in biopsy specimens was measured by modified method of quantitative histogram score (Q-H score) as described recently (Ref. 11). The cell proliferation index (Ki-67 index) in each tissue section was calculated by measuring the mean percentage of Ki-67-positive nuclei among total cells in four different microscopic fields (200). The apoptotic index was defined as the number of TUNEL positive apoptotic cells per 10mm<sup>2</sup> unit area.

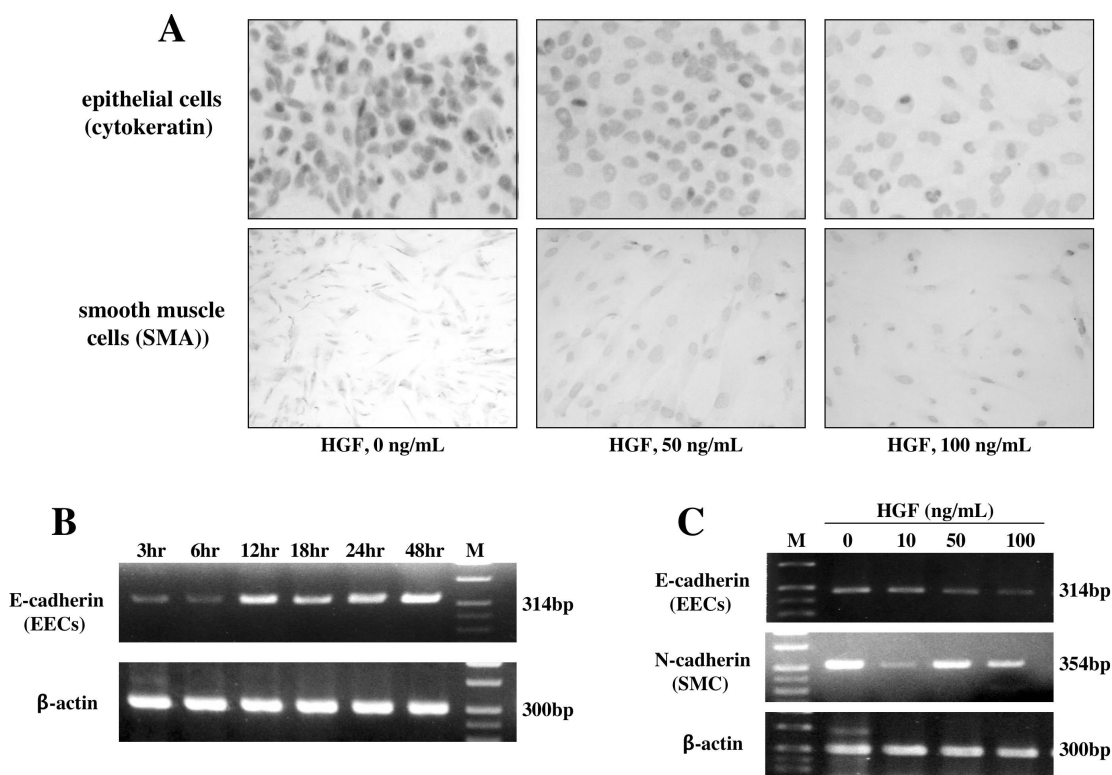


図1 子宮内膜上皮細胞 (EEC) および平滑筋細胞 (SMC) に対する HGF の細胞分離作用 (A), EEC における経時的な E-カドヘリン mRNA 発現の変化 (B), および EEC と SMC における E-カドヘリンおよび N-カドヘリン遺伝子の発現に対する HGF の作用 (C) を示す。HGF (50 および 100 ng/mL) 添加により EEC および SMC の細胞分離が亢進した (A)。EEC における E-カドヘリン mRNA の発現はコンフルエント到達後時間依存的に亢進した (B)。HGF の培養細胞に対する分離作用 (A) と同様に、コンフルエントになった培養細胞に種々の濃度の HGF (10, 50, 100 ng/mL) を添加すると、EEC での E-カドヘリンおよび SMC での N-カドヘリン遺伝子の発現が低下した (C)。

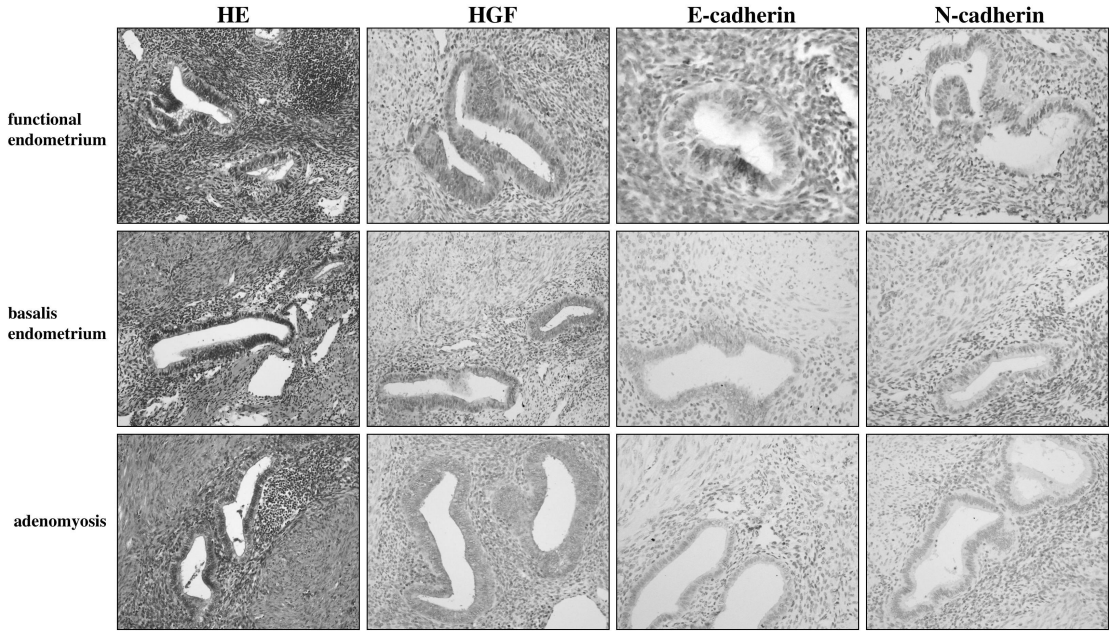


図2 子宮腺筋症女性から採取した子宮内膜機能層（上段），基底層（中段）および腺筋症病変（下段）組織のヘマトキシリンエオジン（HE）染色，HGF，E-カドヘリンおよびN-カドヘリンの免疫染色組織像を示す．これらの組織では，HGFの強発現とE-およびN-カドヘリンの発現低下が認められた．

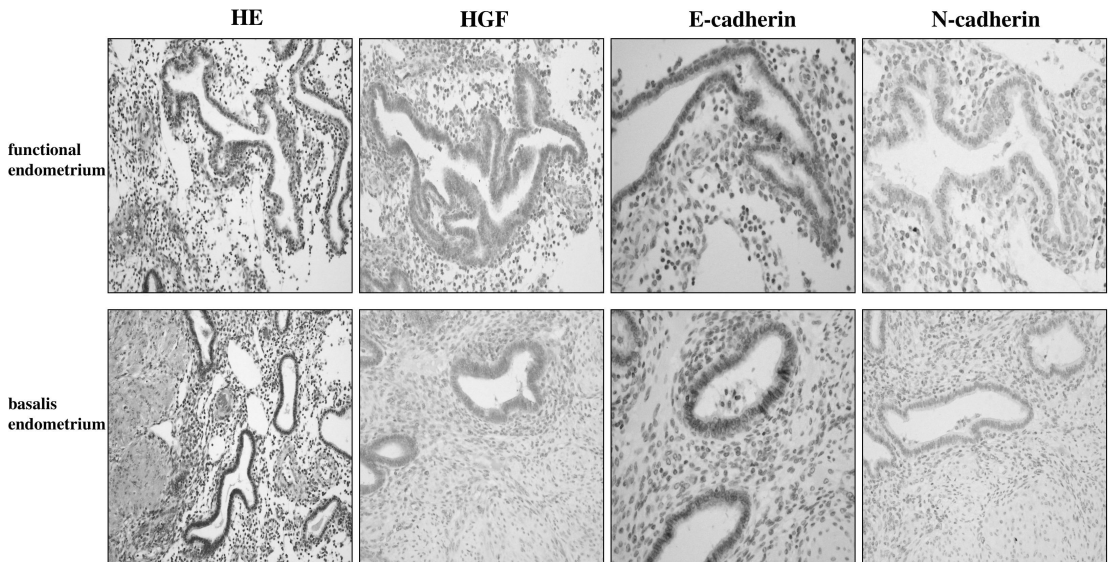


図3 非子宮腺筋症コントロール女性から採取した子宮内膜機能層（上段）および基底層（下段）組織でのヘマトキシリンエオジン（HE）染色，HGF，E-カドヘリンおよびN-カドヘリンの免疫染色組織像を示す．子宮腺筋症と異なり，コントロール女性の子宮内膜機能層あるいは基底層では，HGFとE-カドヘリンの発現に逆相関は認められなかった．

が保たれていることが推察される。

今回の結果は、月経周期を通じた変化の少ない内膜基底層の腺上皮あるいは間質細胞が子宮筋層へ侵入し腺筋症病巣を形成することを示唆している。これら組織における HGF とカドヘリンの遺伝子およびタンパク発現の逆相関は、カドヘリンの発現低下による細胞間接着の減弱が基底層細胞が筋層へ陥入・浸潤する機序の1つであることを示している。また、基底層内膜腺上皮で HGF の発現が高くアポトーシスが低下しており、これらは浸潤した細胞が局所で生着することと関連しているかもしれない。子宮内膜症では、HGF が病変の増殖・進展と関連していることが認められている [14, 15]。

今回の検討では、培養子宮内膜上皮細胞あるいは平滑筋細胞を HGF で処理することにより、これらの細胞分離が亢進し、また E-カドヘリンおよび N-カドヘリンの遺伝子発現が低下することが認められた。コンフルエントな上皮細胞では時間依存的に E-カドヘリン mRNA の発現が亢進したが、これらの発現が HGF の添加により低下することが認められた。一方、HGF と E-カドヘリンの逆相関は非腺筋症コントロール女性の内膜では認められなかった。子宮内膜・筋層接合部において、細胞間接着タンパクである E-および N-カドヘリンの発現が低下することにより、細胞間の「ジッパー」が開かれ、基底層内膜細胞が筋層内へ侵入する素地となることが示唆される。これらは、子宮内膜症組織の腺上皮で E-カドヘリンの発現が低下しているとする報告 [7] や、浸潤癌組織における HGF とカドヘリン発現の逆相関に関する報告 [8] と合致している。

### 結 語

子宮腺筋症で認められる内膜腺細胞の子宮筋層への浸潤には、子宮内膜筋層接合部における HGF の発現の亢進とカドヘリンの発現の低下が関与している可能性があり、今後さらなる検討を加える必要があると考えられた。

### 文 献

- [1] Bergeron C et al. Pathology and pathophysiology of adenomyosis. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology* 2006; 20 : 511 - 521
- [2] Ota H et al. Is adenomyosis an immune disease? *Hum Reprod Update* 1998; 4 : 360 - 367
- [3] Ferenczy A : Pathophysiology of adenomyosis. *Hum Reprod Update* 1998; 4 : 312 - 322
- [4] Ridley JH : The histogenesis of endometriosis, A review of facts and fancies. *Obstet Gynecol Surv* 1968; 23 : 1 - 35
- [5] Nishida M et al. Development of adenomyosis. *Sanfujinka no Sekai* 1994; 46 : 9 - 15 (Japanese)
- [6] Shapiro L et al. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 1995; 374 : 327 - 337
- [7] Gaetje R et al. Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lacks the tumor suppressor molecule E-cadherin. *Am J Pathol* 1997; 150 : 461 - 467
- [8] Hiscox S et al. HGF/SF regulates the phosphorylation of  $\beta$ -catenin and cell-cell adhesion in cancer cells. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1998; 39 : 500 - 501
- [9] Hendrickson MR et al. Normal histology of the uterus and Fallopian tubes. In Sternberg SS, MD ed. *Histology for pathologists (2<sup>nd</sup> Ed)*, Philadelphia PA : Lippincott-Raven, 1997; 894 - 897
- [10] Setoguchi T : *Histology of endometrium. Practical Histology (1<sup>st</sup> Ed)*, 1979; 228 - 229 (Japanese)
- [11] Khan KN et al. Changes in tissue inflammation, angiogenesis and apoptosis in endometriosis, adenomyosis and uterine myoma after GnRH $\alpha$  therapy. *Hum Reprod* 2010; 25 : 642 - 653
- [12] Koga K et al. Demonstration of human angiogenin in human endometrium and its enhanced expression in endometrial tissues in the secretory phase and the decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86 : 5609 - 5614
- [13] Rossi MJ et al. Presence of epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and their receptors in human myometrial tissues and smooth muscle cells : their action in smooth muscle cells in vitro. *Endocrinology* 1992; 130 : 1716 - 1727
- [14] Khan KN et al. Immunopathogenesis of pelvic endometriosis : role of hepatocyte growth factor, macrophages and ovarian steroids. *Am J Reprod Immunol (review)*, 2008; 60 : 383 - 404
- [15] Khan KN et al. Multifunctional role of hepatocyte growth factor in the development of pelvic endometriosis. *WES e-journal (review)*, 2008; 13 - 20