

## [研究紹介] 生殖機能病態学

生水 真紀夫 碓井 宏和 木原 真紀 石川 博士  
三橋 暁 楯 真一 加藤 一喜 尾本 暁子  
田中 宏一 長田 久夫

千葉大学大学院医学研究院生殖機能病態学（旧産婦人科学）では、関谷宗英教授の後任として生水真紀夫が就任して3年が経過した。現在の教室における主要な研究テーマと進捗状況の概要を紹介する。

当教室が長年にわたって取り組み、国内外の学会をリードしてきたテーマである絨毛性疾患と悪性腫瘍に関する研究を継承している。これに、分子生物学的手法を導入し、トランスレーショナル研究の視点から診断や治療への介入を視野に入れた研究を行っている。

周産期分野では、絨毛機能の異常にともなって生じる疾患（妊娠高血圧症や癒着胎盤など）の病態解析等に力を入れている。これまでの絨毛細胞研究で培ってきた知識と経験を活かすことができるといふ教室の強みがある。

この10年あまりで生殖補助技術は長足の進歩を遂げ不妊治療は大きく様変わりした。開発・応用が進んだ技術のなかには裏付けとなる基礎的検証が充分でないまま臨床応用がなされていると思われるものもある。これらについて科学的な検証を行うとともに、着床前診断や妊孕性の長期温存など新たな技術の開発をめざす研究を開始している。

紹介する研究の多くは取り組みを初めて間もないため、実質的な成果はこれからである。しかし、20年度は科学研究費補助金の対象に教室から新たに7件が採用されており、発展性が期待されているものと考えている。

### I. 絨毛性疾患

絨毛性疾患研究は、当教室が長年にわたり精力的に取り組んできたテーマである。これまでに、難治性絨毛癌の化学療法の開発・hCG測定による胎状奇胎の一次管理基準の策定や絨毛性疾患関連細胞株の樹立などで成果をあげ、世界的にも高く評価されてきた。現在は、分子生物学的手法を積極的に導入して、診断法の開発・胎状奇胎発生機序の解析などに幅広く取り組んでいる。

#### 胎状奇胎の遺伝子診断法の開発と応用 p57<sup>KIP2</sup>免疫診断

胎状奇胎の診断は、「絨毛性疾患取り扱い規約」によって肉眼診断で行うとされている。この規約は、わが国において経膈超音波診断が臨床応用されるより前の時代に制定されたものであり、胎状奇胎の多くが妊娠4ヶ月以降に診断されていた時代のものである。経膈超音波が広く普及した現在では、胎状奇胎の多くが妊娠早期に、「異常妊娠」の診断の下で奇胎陰去術が行われている。このような早期中絶例では、全胎状奇胎であっても嚢胞径が小さく量も少ないため特徴的な肉眼的所見（嚢胞）を示さない。したがって、肉眼所見では胎状奇胎と認識できず、適切な管理が行われていない可能性がある。

そこで、われわれはこれまで肉眼診断に代わる精度の高い診断法の開発に取り組んできた。

その結果, p57<sup>kip2</sup>免疫診断, VNTR (Variable number of tandem repeat) を用いた遺伝子診断法が有用なことを明らかにしている。とくに, p57<sup>kip2</sup>免疫診断法は, 診断材料が容易に入手できる上に, 手技も容易であることから極めて有用な補助診断法となる。現在, 「取り扱い規約」の改訂に向けて, 千葉県内の症例を対象に前方視的に有用性を検証する段階に入っている。

### 胞状奇胎における続発症発生予測

胞状奇胎では続発症(転移性増殖)の早期発見のために, 1年にわたる避妊と経過観察が必要とされている。続発症発症率は, 胞状奇胎の種類によって異なり, 全胞状奇胎では20%と高いが, 部分奇胎では1%と低い。さらに, 全胞状奇胎のなかにも続発症発症率の高いハイリスクグループが存在する可能性がある。そこで, このハイリスクグループを見つけ出すことができれば, 多くの患者を長期間の管理から解放することができる。

そこで, われわれはまず前述のp57<sup>kip2</sup>免疫染色・VNTR分析により部分奇胎と全奇胎を確実に鑑別して続発症発生リスクを検討した。その結果, DNA診断により正しく診断した場合, 部分奇胎からの続発症発症率は従来の報告(1%)よりさらに低いことがほぼ明らかになった。したがって, DNA診断を臨床診断に応用することで, ローリスクの患者を長期管理から解放できる可能性が示された。

さらに, 全胞状奇胎のなかでも, ホモ奇胎に比べ, ヘテロ奇胎のほうが続発症発症率が極めて高いとの中間解析結果を得ている。現在, 症例数を追加して確認作業を行うとともに, 高密度DNAチップを用いた遺伝子多型マーカー解析による詳細な検討を進めている。

### 難治性絨毛癌の寛解マーカーの開発と集学的治療

絨毛性疾患の早期診断・管理・治療(化学療法)の進歩により, 侵入奇胎で100%, 絨毛癌でも90%で寛解が得られるようになってきている。

しかし, 標準的な化学療法で寛解に至らないこともある。当科には, このような難治性絨毛癌の患者が全国より紹介されており, もっとも適切な治療方法の検討を行っている。現在, 呼吸器外

科・放射線科・脳神経外科などの関連科とともに集学的な治療を行っている。

一般に, 絨毛性疾患ではhCG値が良好な診断・治療マーカーとなる。ところが, このような難治例のなかにはhCG値の推移と臨床経過が一致しない症例が存在する。このような症例では, hCG以外の新たな寛解判定のマーカーが必要となる。そこで, 現在患者血漿中のcell free RNAに着目して, 新規マーカーの候補を検索している。

## II. 悪性腫瘍

婦人科腫瘍としては, 子宮体癌と卵巣癌が近年増加している。当科での研究も, 子宮頸癌から子宮体癌や卵巣癌にシフトしつつある。

### 子宮体癌

子宮体癌のなかでも, 類内膜腺癌(I型)が増加している。このI型はエストロゲンと関連しており, 多嚢胞性卵巣症候群(PCOS), 肥満, インスリン抵抗性などホルモン異常を背景に持つことが多い。

若年の癌患者では, 妊孕性の温存が必要となる。この目的で従来から酢酸メドロキシプロゲステロン(MPA)大量療法が行われてきた。MPA療法の奏成功率は高いが, 投与中止後の再発率が高い。とくに, 温存治療を行った後に妊娠に向けて待機している間に再発する例などでは患者の悲嘆も大きい。

メトホルミンは2型糖尿病治療薬であるが, 服用中の糖尿病患者に癌の発生が少ないことが報告された。メトホルミンは, PCOS症例の排卵誘発にも有効である。このように, メトホルミンは子宮体癌に合併するさまざまな内分泌学的異常を改善し, エストロゲン依存性の発癌や癌の進展にも抑制的に働く可能性がある。

そこで, メトホルミンの子宮体癌細胞株に対する増殖抑制効果を確認した。現在, この増殖抑制機序の解析をin vitroで進めている。

さらに, 承認を得てインスリン抵抗性や肥満のある若年性子宮体癌患者を対象とするメトホルミン併用MPA療法の治験を開始した。内膜癌治療の奏成功率, 再発抑制効果を評価する予定である。

また、MPA投与終了後にもメトホルミン投与を継続することで、最終的に妊娠率向上につながるかについても検討する予定である。

### 子宮頸癌

様々な癌腫で放射線併用化学療法（CCRT）の治療効果が手術と同等であることが明らかにされ、子宮頸癌の治療法に患者の意思が反映されるようになった。当科では、Cis-DDP (C-S-diammine dichloro platinum) を分割投与（daily）することでコンプライアンスの改善を図っている。

さらに、この分割投与によるCCRTを術後補助療法にも導入している。これまでに、放射線単独療法に比し有意に予後を改善することが明らかとなっている。

### 卵巣癌の化学療法

卵巣癌治療ガイドラインでは、TC療法・CAP療法やエトポシドやイリノテカン単独療法を推奨している。再発卵巣癌のなかには、治療中にこれらの薬剤に抵抗性を獲得するものがありthird lineでのレジメンが必要とされる。われわれは、このような難治再発性癌を対象として、ゲムシタピン+イリノテカン療法の有用性を検討している。

### Tumor dormancy therapyによる再発卵巣癌third line 化学療法

再発難治性癌の治療では、寛解導入をめざす強力な化学療法だけではなく、患者のQOLを重視したtumor dormancy therapyという概念も大切である。Tumor dormancy therapyは、最大耐用量の投与を行って腫瘍の縮小や消失をめざすのではなく、個別化薬剤量（individualized toxicity grade 1 or 2 inducing dose）を投与して延命をはかる治療戦略である。腫瘍消失は期待できないが、抗がん剤の投与量が少なくQOLを良好に保つことができるというメリットがある。すでに大量の抗がん剤投与を受けた再発難治性卵巣癌の患者に対しても、比較的安全に施行することができる。

そこで、われわれはこのtumor dormancy therapy理論に基づいたゲムシタピン併用化学療法

法を再発難治性卵巣癌患者を対象として施行し、その効果を検証している。ゲムシタピンは、単剤投与でも難治再発性卵巣癌の60%で進行を阻止することが示されており、イリノテカン（単剤での奏効率が23.6%）との併用での効果が期待される。

### 外来化学療法時の悪心・嘔吐管理法

従来の化学療法は主として入院管理で行っていたので、嘔気嘔吐に対して注射剤により随時対応することが可能であった。しかし、最近ではそのほとんどが外来で施行されており、嘔気嘔吐に対する管理も外来ベースで可能なものに変更する必要がある。プラチナ製剤による悪心嘔吐は遅発性であることから、われわれは5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬（塩酸ラモセトロン）の口腔内崩壊錠による外来管理を行い、その有用性の検証を開始した。

### 腹水細胞診による卵巣癌の手術（IDS: Interval debulking surgery）介入時期の判定

卵巣癌では、化学療法と手術（IDS: Interval debulking surgery）を組み合わせる治療を行う。進行癌では化学療法後に手術を行うが、どのタイミングで手術に踏み切るか明確な基準はない。

われわれは、これまでの検討で手術介入時の腹水細胞診が陰性であれば治療予後が良いことを明らかにしてきた。これは、化学療法により細胞診陰性となった症例でIDSを施行すると完全切除となる可能性が高いことと関連している。

そこで、化学療法中に腹水細胞診をモニタリングし、細胞診陰性となった時点で手術介入に踏み切る方針とした。患者の同意を得て、初回手術時に腹腔内リザーバーによる情報ドレーンを設置し、術後に腹腔内洗浄細胞診によるモニタリングを行って手術介入（IDS）時期を決めている。これにより、完全切除率を80%にまで高めることができた。現在、この管理方法の変更が実際に予後を改善するかどうか確認している。

### 婦人科腫瘍アドバンスコース

卵巣癌は婦人科癌のなかでももっとも治療成績に施設間格差のあるがんの一つである。治療ガイドラインが制定され、多くの施設で標準化された治療が行われているが、いまだに施設間の成績に

はかなりの開きがある。

卵巣癌の半数以上が腹腔内播種をきたした進行癌で発見され、その治療は手術と化学療法とで行われる。このうち、化学療法はガイドラインで規定された標準的なレジメンにしたがって行われ、施設間の差異はほとんどない。手術では、播種を含めた完全切除を目指す、完全切除ができない場合は可能な限りの腫瘍減量術を行う。この際に、残存腫瘍径1 cm未満にすること (optimal surgery) で、その後の化学療法の奏功率を上げることができると知られているが、逆に稚拙な技術によって不十分な手術が行われたり、手術合併症を増加させるような場合には予後は悪くなる。

われわれは、この腫瘍減量手術の差異が、施設間の治療成績の差異に反映されているのではないかと考えている。欧米での成績もこれを支持する結果となっており、熟練した婦人科腫瘍専門医による手術を受けた患者の予後が最も良い。そこで、われわれの教室では最大限の腫瘍減量術を安全に行うために、①婦人科腫瘍外科専門医による手術チームを立ち上げ、②完全切除のためのあらたな術式を開発して、③optimal surgery率をあげて実際に予後の改善が得られるかどうか検証を開始した。

卵巣癌の多くが消化管・膀胱や尿管・横隔膜・腹膜などへの進展をきたす。Optimal surgeryを目指す手術では、これらの播種・転移病巣の合併切除が必須である。そこで、進行卵巣癌に対しては消化器・泌尿器の合併切除を標準術式として採用し、現在では進行卵巣癌 (Ⅲ期・Ⅳ期) の初回手術でもoptimal surgery率が80%以上となっている。他施設のほとんどが10-40%のoptimal surgery率を報告しているのに比べ極めて高率である。

このような高いoptimal surgery率をめざした手術がほんとうに卵巣癌患者の予後改善に寄与するかどうか、安全性はどうかなど今後数年程度をかけて検証していく。

広範囲の切除を安全に遂行するためには、各専門他科との連携だけでなく、婦人科医師も広く外科的手技に精通しておく必要がある。そこで、婦人科腫瘍専門医資格を取得予定の医師を対象に他

臓器合併切除にも対応できるようにするためのトレーニングコース「婦人科腫瘍外科 アドバンスドコース」を立ち上げ、全国からの応募者を受け入れている (千葉大学産婦人科ホームページ参照)。

### Ⅲ. 周産期領域

#### 癒着胎盤の保存的療法

癒着胎盤は分娩に大量出血をきたす疾患で、産婦人科医逮捕事件で社会的にも広くその重要性が認知された疾患である。従来、自然剥離しない胎盤に対しては、早期に用手剥離を試み、剥離に成功しない場合に癒着胎盤と診断するのが一般的であった。癒着胎盤に剥離を試みると、大量の出血をきたし緊急の子宮摘出や輸血が必要となることがある。人手の少ない夜間帯や中小の病院では、このような緊急事態の発生に対応するのは困難である。

そこで、われわれは癒着胎盤が推定された症例に対してはMRIや超音波診断で確認した後、出来る限り保存的に治療する管理方針を作成した。全身状態が進行性に悪化する恐れが強い場合を除き、放射線科の協力をえて子宮動脈塞栓術などで出血に対応し経過を観察する。自然剥離徴候がみとめられた時点で、子宮摘出術の準備を整え、用手剥離を試みる。これまでのところ、帝王切開直後に自然剥離が進行して大量出血をきたした一例を除き、全例で子宮の温存に成功している。また、以前の管理方針での対応していた時期の出血量に比べ、現在では明らかに出血量および輸血量が少ない。

#### 頸管妊娠に対する一期的搔爬術

頸管妊娠は、搔爬時に大量出血をきたす疾患である。子宮を温存する場合には、抗がん剤 (methotrexate, MTX) を投与する。しかし、MTXには副作用がある上に、治療に長い期間を要する。

われわれは、血管収縮剤であるピトレスシン (バゾプレッシン) を子宮および頸管に局注して血流を一過性に減少させた後に、一期的に吸引搔爬する治療を行っている。血流の減少は、胎児心



拍の停止により確認できる。最近では、比較的妊娠早期に診断される症例が多く、これまでのところ本法を試みた全例で、この一期的治療により大出血を招くことなく短期間で治癒させることに成功している。

#### 絨毛外絨毛細胞の機能とその制御

絨毛外絨毛細胞は、絨毛から離れて母体の脱落膜・筋層に浸潤し、らせん動脈壁の再構築に関わる重要な細胞である。その機能異常が、妊娠高血圧症候群や子宮内胎児発育制限などと関連していると考えられる。

絨毛膜外絨毛細胞の浸潤を評価するために、GFPマウスを用いて、妊娠母体に浸潤する胎児由来絨毛細胞を容易に追跡できる実験系を作成した。現在、COMT (Catechol-O-methyltransferase) 阻害剤などさまざまな薬剤を用いて妊娠初期の絨毛外絨毛細胞の浸潤を抑制し妊娠高血圧症候群の実験モデルの作成を試みている。

また、これまでにIGF2Rなどの胎盤におけるインプリンティング遺伝子の発現パターンなどの解析などから、絨毛膜外絨毛細胞の機能制御にゲノムインプリンティングが関わっているとの成績を得ている。そこで、これらの遺伝子のエピジェネティックな変化と絨毛細胞機能の関連について検討を行っている。

#### 羊水におけるメタゲノム分析

メタゲノム分析は、細菌の共通DNA配列を用いてPCR法によりDNA増幅を行って細菌数や種類を分析する手法である。培養が困難な細菌でも同定が可能な手法であるが、real-time PCRを採用することで菌数の正確な推定が可能となる。

現在、切迫早産における細菌感染の診断の目的で、羊水穿刺が行われている。採取された羊水は培養検査により細菌感染の同定が行われている。しかし、臨床的に細菌感染が強く疑われるにもかかわらず、細菌培養では陰性となる症例が多い。また、培養検査では菌数の推定が困難である。そこで、われわれはメタゲノム分析を応用することで、菌数の同定や培養困難な細菌の同定を試みている。

## IV. 生殖不妊領域

### 卵巣凍結保存

悪性腫瘍患者では、放射線治療や化学療法後に生殖細胞が死滅して不妊症となることがある。このような状況に陥ると、せっかく悪性腫瘍の治療に成功しても、その後の患者のQOLが大きく低下する。現在、白血病患者などで治療前に卵巣穿刺を行って成熟卵子を採取し、凍結保存する臨床研究が始まっている。この方法では、時間をかけて下垂体ホルモンの大量注射を行い卵巣を過剰に刺激した後に、経腔的に針穿刺を行って卵子を回収する。この場合、採取までに2週間あるいはそれ以上の時間がかかること、採取できる卵子が最大でも20個程度に限られること、経腔採卵のため幼児などでは施行できないことなど多くの問題がある。

そこで、われわれは卵巣組織を採取し、凍結保存する方法を検討している。この方法では、多数の卵子が保存できること、解凍後の卵巣組織を自家移植することで自然妊娠も期待できること、幼児に対しても施行が可能であることなどメリットが大きい。これまでの検討では、改良ガラス化凍結法によるヒト卵巣組織の凍結融解により良好な卵子が保存できることを確認している。臨床応用を目指しさらなる改良法を開発している。

### RCA法を用いた着床前診断 (PGD) 技術の開発とその応用

わが国では、体外受精時に得られたヒト胚を用いた着床前診断が筋ジストロフィーや習慣性流産などに応用されつつある。筋ジストロフィーなどの遺伝子病などではPCR法により遺伝子増幅が行われた後、解析に供される。これまで、単一細胞からのゲノムはsingle strand primer extensionなどの方法で増幅したのちに、遺伝子病診断のためのPCRに供されるのが一般的であった。われわれは、より確実で簡易な方法として、RCA法を応用した1Nゲノム増幅法を開発し、現在その臨床応用を目指して改良を進めている。

### 3 前核の由来解析

体外受精では、受精後に2つの前核 (卵子由来

と精子由来)が観察される。ところが、数%に3つの前核が形成されることが知られている。顕微授精によって1精子のみの受精が行われたことが確実な卵子においても3前核が出現することから、3前核の原因が多精子受精によるものではない可能性がある。3前核の発生機序は不明で、臨床の現場では3前核由来胚は廃棄することになっている。3前核胚を培養すると、一部が形態学的に正常な胚盤胞にまで成長する。しかし、その後正常胎児に発生するのかどうかは分かっていない。

そこで、われわれは3前核受精卵から、マイクロマニピュレーターを用いて前核を単離し、これをrolling cycle amplification (RCA)法でゲノムDNAを増幅した後にVNTR遺伝子多型解析を行って、前核の由来が卵子か精子かを判別する方法の開発に取り組んでいる。現在、1つの前核ゲノムから5 locus程度の多型分析が可能となっている。

さらに、3前核受精卵を培養して得られた胚盤胞から内・外細胞塊を分離し、個々の細胞に分離して、同様に遺伝子解析およびFISH法による染色体分析を試みている。これらの検討により、3前核由来胚盤胞が正常核型を有していることが確認できれば、3前核受精卵を廃棄せずに利用することが可能である。

### エストロゲン合成酵素遺伝子の転写及び活性制御機構

エストロゲン合成酵素(アロマターゼ)には少

なくとも8つのプロモーターがある。臓器・細胞特異的に特定のプロモーターが選択的に使用されて転写が始まる。われわれは、これまでにエクソン6と7を発見しその機能解析を行ってきた。

最近あらたに、2つめのイントロン内プロモーターを発見し、その機能解析・発現解析を行っている。さらに、新たなエンハンサー領域をイントロン内に同定している。このエンハンサーは、臓器特異的なプロモータースイッチングにも関与している可能性があり、解析を進めている。

アロマターゼの活性調節は、主として転写レベルで行われていると考えられてきた。われわれの一連の研究から、アロマターゼの活性調節が分解過程の調節によっても行われており、極めて短時間で活性を上昇させることができることを確認した。現在この調節機序の詳細を明かにするための研究を行っている。

### 子宮筋腫の病態解明

子宮筋腫は婦人科疾患の中で最も頻度の高い疾患であるが、その原因は未だに不明である。これには子宮筋腫の適切な実験モデルがないことが関与している。

そこで、我々はマウス腎被膜下へのヒト子宮筋腫組織及び細胞の移植を試みている。これまでの検討でエストロゲン・プロゲステロンの併用投与ヒト子宮筋腫に類似した腫瘍が形成されることを確認した。現在このモデルの有用性を確認するとともに、病態および原因解明のための研究を開始している。