

氏名（本籍）	竹中基記	（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第1065号	
学位授与日付	平成30年3月25日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Iron regulatory protein 2 in ovarian endometrial cysts.	
審査委員	（主査）教授 柴田 敏之	
	（副査）教授 長岡 仁	教授 永田 知里

## 論文内容の要旨

### 【目的・諸言】

子宮内膜症は、子宮内膜が子宮以外の部位に発生・増殖する疾患である。子宮内膜症の大部分は骨盤内に発生し、その病変は正常子宮内膜と同様に月経周期に合わせて増殖と剥離（出血）を繰り返す。卵巣で増殖すると、卵巣に血液が貯留し嚢胞を形成し、卵巣子宮内膜症性嚢胞と呼ばれる。

卵巣子宮内膜症性嚢胞は卵巣癌の発生母地とされ、加齢・サイズ増大するにつれそのリスクは増加する。癌化の原因として様々な要因が示唆されているが、嚢胞液中の血液に由来する二価鉄から、三価鉄と活性酸素が生成される Fenton 反応による細胞障害との関連が近年脚光を浴びている。

一方、細胞はトランスフェリン受容体 (TfR) による鉄取り込み、フェリチン (Ft) による鉄貯蔵を行っている。これら鉄調節因子は、mRNA 上に存在する鉄応答配列 iron responsive element (IRE) に iron regulatory protein (IRP) 1, 2 というタンパクが結合することで発現が調節され、細胞内鉄濃度は一定に保たれる。

すなわち、鉄欠乏時には IRP1, 2 は安定化し、鉄調節因子の発現を調節し細胞内鉄濃度を上昇させる。鉄過剰時には IRP1 は鉄-硫黄クラスターを形成しその活性は失われ、IRP2 はヘムとの結合および酸化を契機に分解される。この IRP 分解機構により、過剰な鉄による Fenton 反応が抑制されている。

本研究では、卵巣子宮内膜症性嚢胞の癌化機構との関連から、嚢胞組織および嚢胞上皮細胞における鉄動態および酸素濃度に着目し検討した。

### 【対象と方法】

手術にて摘出したヒト卵巣子宮内膜症性嚢胞組織を用い各種免疫組織染色を行った。二価鉄の同定には岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室にて新規開発された二価鉄選択的蛍光低分子プローブ RhoNox-1 を用いた。また、鉄染色である Perl's Prussian blue 染色、低酸素により誘導される CA9 (Carbonic anhydrase 9) 染色、そして鉄調節タンパクである IRP2 の免疫組織染色を行った。

一方、ヒト卵巣子宮内膜症性嚢胞液を採取し、メタロアッセイ LS にて鉄濃度、ABL 700 series system にて酸素濃度を測定した（全9症例）。

卵巣子宮内膜症性嚢胞モデルとしては Ishikawa 細胞を用いた。Ishikawa 細胞はヒト子宮内膜癌細胞株であるが、高分化型であり内膜症細胞と類似する点が多いためこれを用いた。

まず Ishikawa 細胞を常酸素環境下で培養し、二価鉄である ammonium iron(II) sulfate (FAS)、鉄キレート剤である deferoxamine (DFO) を各々負荷し、IRP2 の発現変化を Western blotting にて調べた。続いて低酸素環境下で培養し、鉄負荷による IRP2 の発現変化を調べた。低酸素環境下細胞培養は、INVIVO2 200 Physiological Cell Culture Workstation にて GAS MIXER Q を用いて行った。

## 【結果】

卵巣子宮内膜症性嚢胞組織では RhoNox-1 染色, Perl's Prussian blue 染色で強い集積を認めた。また、この局在部位に一致して CA9 染色, IRP2 染色でも高発現を示し, Tfr 染色では発現低下を認めなかった。また、卵巣子宮内膜症性嚢胞液中の鉄濃度は  $8.06 \pm 2.9\text{mg/L}$ 、酸素濃度は  $22.4 \pm 5.2\text{mmHg}$  であった。

常酸素環境下に培養した Ishikawa 細胞では, FAS 負荷により IRP2 の発現は低下し, 鉄キレート剤である DFO 負荷では IRP2 の発現は増加したが, 低酸素環境下に培養すると時間依存性に IRP2 の発現亢進が認められ, 鉄負荷による IRP2 発現低下は認めなかった。

## 【考察】

卵巣子宮内膜症性嚢胞組織には鉄, 特に Fenton 反応を引き起こす二価鉄が過剰に存在していることが示唆された。通常, 細胞内鉄濃度が過剰な状態では, IRP2 は分解され, 細胞内への鉄取り込みが抑制されるが, 卵巣子宮内膜症性嚢胞組織には IRP2 も過剰に存在していた。その理由として, IRP2 はヘムとの結合および酸化を契機に分解されるが, 嚢胞内の酸素濃度は換算すると約  $3\%O_2$  であり, 低酸素環境により IRP2 の分解障害が生じているのではないかと推察した。

卵巣子宮内膜症性嚢胞モデルの実験結果から, 常酸素環境下では鉄欠乏時には IRP2 は安定化し, 鉄過剰時には分解され正常な制御機構が働くが, 低酸素環境下では鉄負荷による IRP2 の分解は阻害され制御機構が破綻すること示された。

低酸素による IRP2 の分解障害により, Tfr の発現が低下せず, 細胞内への鉄取り込みが促進されていることが考えられ, 細胞内の過剰な二価鉄により Fenton 反応が亢進され, 細胞障害や癌化が促進される可能性が示唆された。

## 【結論】

卵巣子宮内膜症性嚢胞では, 低酸素環境により IRP2 の分解障害が生じ, 細胞内に過剰な二価鉄が確認された。この過剰な二価鉄により, Fenton 反応の亢進が起き, 細胞障害や癌化を促進する可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 竹中 基記 は, 卵巣子宮内膜症性嚢胞における鉄動態および低酸素環境に着目し, 患者から得た検体において免疫組織学的手法および鉄・酸素濃度測定を行い, Fenton 反応を引き起こす二価鉄の過剰な存在および低酸素環境を見出した。また, 低酸素環境のため IRP2 の分解障害を生じていることを発見し, 癌化促進の一因を解明した。以上の結果は, 今後の婦人科腫瘍学の発展に少なからず寄与するものと認める。

---

[主論文公表誌]

Takenaka M, Suzuki N, Mori M, Hirayama T, Nagasawa H, Morishige KI.

Iron regulatory protein 2 in ovarian endometrial cysts.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Jun 10;487(4):789-794. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.115.

Epub 2017 Apr 25.