



多嚢胞性卵巣症候群患者子宮内膜と子宮内膜培養細胞におけるアンドロゲン受容体発現にメトホルミンが与える影響についての検討

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2019-06-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大原, 美希 メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000269

学 位 論 文

表題

多嚢胞性卵巣症候群患者子宮内膜と子宮内膜
培養細胞におけるアンドロゲン受容体発現に
メトホルミンが与える影響についての検討

福島県立医科大学大学院医学研究科

産科婦人科学分野

学籍番号 145007

大原 美希

論文内容要旨 (和文)

学位論文題名	多嚢胞性卵巣症候群患者子宮内膜と子宮内膜培養細胞におけるアンドロゲン受容体発現にメトホルミンが与える影響についての検討
<p>(目的) 多嚢胞性卵巣症候群(Polycystic ovary syndrome; 以下 PCOS) は性成熟期女性の 5～10%相当が罹患する比較的頻度の高い内分泌疾患であり、月経異常や排卵障害、不妊症が問題となる。また流産率も高いことが知られ、子宮内膜の異常、特にアンドロゲン受容体(androgen receptor 以下 AR)の過剰発現が原因として指摘されている。当講座の先行研究は、PCOS 患者へのメトホルミン投与が子宮内膜における AR 発現を内服後に低下させたことを明らかにした。本研究では第 1 に、テストステロンによって制御される HOXA10 という分子に着目し、HOXA10 発現と AR 発現の関連を解析することを目的とした。第 2 にメトホルミンが子宮内膜 AR 発現に与える影響を解析するため、子宮内膜培養細胞を用い、テストステロンとメトホルミンを添加することにより、AR 蛋白量と局在がどのように変化するかを検討した。(方法) はじめに PCOS 患者子宮内膜組織を用いた実験として、先行研究の残余検体が確認できた 3 症例について AR と HOXA10 の免疫組織染色を行い、メトホルミン加療前後の発現様式変化を検討した。つぎに培養細胞を用いた実験として、メトホルミンが子宮内膜上皮細胞と間質細胞それぞれの AR 発現に与える影響を検討するため、上皮細胞のモデルとして子宮内膜腺癌細胞株(以下 Ishikawa cells)を、間質細胞のモデルとして子宮内膜間質細胞株 (以下 HESCs) を使用した。培養液中にテストステロンとメトホルミンを添加し、ウエスタンブロット法を用いて AR 発現量の変化を検討し、蛍光細胞免疫染色法により AR 局在の変化を評価した。(結果) PCOS 患者子宮内膜組織を用いた実験では、今回検討を行った 3 症例に共通して、メトホルミン</p>	

内服後に AR 発現は腺上皮細胞、間質細胞ともに抑制され、間質細胞における HOXA10 発現は上昇していた。次に培養細胞を用いた実験において、Ishikawa cells と HESCs は、テストステロンにより AR 発現が誘導され、テストステロンとメトホルミンの添加により Ishikawa cells では AR 発現が低下傾向を示し、HESCs では変化を認めなかった。AR 発現の局在は Ishikawa cells、HESCs ともにテストステロンを添加すると核に誘導され、テストステロンとメトホルミンを添加すると Ishikawa cells において発光強度が低下したが、HESCs ではメトホルミンを添加しても変化を認めなかった。(結論) 本研究では、PCOS 患者へのメトホルミン投与によって子宮内膜における AR 発現が抑制され、HOXA10 発現は上昇した。また、Ishikawa cells を用いた実験において AR 発現はメトホルミンの添加により、抑制される傾向があることを明らかにした。一方、HESCs において AR 発現の変化を認めなかった。本研究の結果から、PCOS 患者子宮内膜の腺上皮細胞における AR 発現の低下は一部メトホルミンの直接的作用によるものである可能性が考えられた。今後、さらにメトホルミンが PCOS 患者子宮内膜に与える影響についての知見を蓄積することにより、着床や流産率の改善、また子宮体癌予防などに貢献することが期待される。

(1177/1200 文字)

(2019 年公開予定)

【緒言】

多嚢胞性卵巣症候群（ Polycystic ovary syndrome; 以下 PCOS とする ）は 1935 年に Stein と Leventhal によって月経異常、多毛、肥満、卵巣腫大などの特徴的な症状を有した症例としてはじめて報告された¹⁾。現在、本邦においては 2007 年に日本産科婦人科学会生殖・内分泌委員会で定められた診断基準が用いられている。これは、①月経異常 ②多嚢胞性卵巣 ③血中男性ホルモン高値、または LH 基礎値高値かつ FSH 基礎値正常の全てをみたすものを PCOS として定義している²⁾。性成熟期女性の 5～10%相当が罹患すると考えられており、比較的頻度の高い疾患といえる。

PCOS の病態としては、卵巣におけるステロイド産生や卵胞発育の先天的な異常を背景として視床下部の GnRH のパルス分泌が増加し、下垂体での LH 分泌亢進が引き起こされると考えられている。高 LH 血症によって卵巣莢膜細胞でのアンドロゲン分泌が増加するため、高アンドロゲン血症が生じ、アンドロゲンの過剰及び排卵障害に伴うプロゲステロンの低下は、視床下部でのさらなるパルス異常につながると考えられている。このように、PCOS では視床下部－下垂体－卵巣系のいずれかに異常をきたすことで悪循環が引き起こされている³⁾。また、高アンドロゲン血症下の卵巣では、小卵胞の発育が促進され発育卵胞数は増加するが、前胞状卵胞から胞状卵胞の段階で卵胞発育の停止や閉鎖化が促進されるため、卵巣の多嚢胞性変化や排卵障害が起こるとされている⁴⁾。近年ではゲノム解析により性腺刺激ホルモン受容体、FSH β サブユニット、インスリン受容体などが PCOS の発症に関連している可能性も示唆されているが未だ不明な点も多い³⁾。

PCOS の合併症として様々な疾患との関連が示唆されており、閉経前女性における心血管イベント⁵⁾や、妊娠糖尿病や妊娠高血圧症候群といった妊娠合併症⁶⁾、睡眠時無呼吸症候群⁷⁾、うつや不安などのリスクが増加する⁸⁾と報告されている。代謝異常に関しては、特に糖代謝と密接に関連している。PCOS 患者の 20~40% にインスリン抵抗性 (insulin resistance, IR) が認められ、PCOS に引き続いて 30~35% の症例で耐糖能異常を、8~10% の症例で 2 型糖尿病を発症するといわれている³⁾。

さらに PCOS では初期の流産率が 30~50% と高率である⁹⁾ことが報告されている。子宮内膜増殖症や子宮内膜癌の発症も多く、子宮内膜癌の罹患リスクは 2.7 倍に増加し、生涯罹患率は 9% という報告もある³⁾¹⁰⁾。これらの背景には、PCOS 患者における子宮内膜異常の存在が推察される。原因として慢性的な高エストロゲン状態¹⁰⁾や、高アンドロゲン血症、高インスリン血症などの存在¹¹⁾が明らかになった。また、PCOS 患者子宮内膜においては、核内受容体であるアンドロゲン受容体 (androgen receptor , AR) が過剰発現し、着床障害が生じている可能性が指摘されている¹²⁾¹³⁾。

一方、PCOS はインスリン抵抗性と関連し、インスリン抵抗性改善薬であるメトホルミンは PCOS 患者の排卵率を改善するという報告が多くみられる¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。現在本邦では PCOS 患者の排卵誘発にクロミフェン療法が第一選択として推奨されており、肥満、耐糖能異常、インスリン抵抗性のいずれかを認め、かつクロミフェン単独で卵胞発育を認めなければメトホルミンの併用が推奨されている¹⁸⁾。メトホルミンが排卵率を改善するメカニズムは高イ

ンスリン血症の改善により、卵巣でのアンドロゲン産生が低下するためと考えられている¹⁹⁾。

近年、メトホルミン内服による子宮血流増加や²⁰⁾²¹⁾、流産率低下²²⁾などの報告から、子宮に対する作用が示唆されている。メトホルミンが子宮内膜におけるAR発現に与える影響について検討した報告は、現段階で当講座の先行研究を含めて2報のみである。当講座における先行研究²³⁾では、PCOS患者5症例にメトホルミン750mg/日を投与し、内服の前後で子宮内膜採取と糖・内分泌パラメーターの測定を行ったところ、5症例のうち4症例において子宮内膜におけるAR発現が低下したことを明らかにした。また、AR発現が低下していた4症例の糖代謝・内分泌パラメーターのうち、HOMA-IR (homeostatic model assessment insulin resistance) は各症例に共通して低下していたが、血中LH、FSH、遊離テストステロン、DHEA-S (dehydroepiandrosterone sulfate)、エストラジオール値のなかで各症例に共通して改善を認めたパラメーターは確認できなかったことを報告した。もう一方の研究では子宮内膜増殖症を有するPCOS患者子宮内膜の初代培養細胞実験において、メトホルミン添加によりAR発現が阻害されたことを報告している²⁴⁾。

そこで今回、我々はテストステロンによって制御されるHOXA10という分子に着目した。HOXA10は分泌期中期において胚の着床のために子宮内膜を分化させ、妊娠成立時には脱落膜において強発現するなど、胚の受容に不可欠とされる転写因子である。テストステロンによりその発現が抑制され、PCOS患者内膜においても発現が抑制されていると報告されている²⁵⁾。当講

座の先行研究により PCOS 患者へのメトホルミン投与によって子宮内膜における AR 発現が低下したことを踏まえ、本研究では第 1 に子宮内膜における HOXA10 発現様式を解析し、HOXA10 発現と AR 発現の関連を解析することを目的とした。

また当講座の先行研究では、AR 発現の低下を認めた症例に共通して改善していた糖代謝・内分泌パラメーターは HOMA-IR 以外に確認できなかった。特に遊離テストステロン値が内服後に低下していなかった症例においても子宮内膜における AR 発現の低下を認めた。そこで第 2 にメトホルミンが子宮内膜の AR 発現に直接影響するかどうか明らかにすることを目的とし、培養細胞を用いてテストステロンとメトホルミンを培養液中に添加した場合の、AR 蛋白量とその局在の変化について検討を行った。

【方法】

1. PCOS 患者子宮内膜組織を用いた実験

対象症例と検体採取

PCOS 患者子宮内膜組織の採取について、代謝疾患や内分泌異常を有さない新規の PCOS 患者数が少ないため、本研究では当講座の山口ら²³⁾により行われた先行研究の検体を用いた。

山口らの研究における検体採取について簡単に述べる。福島県立医科大学附属病院 産婦人科または糖尿病・内分泌・代謝内科で PCOS の診断を受けた患者で、臨床研究参加の同意が得られた症例を対象とした。内分泌パラメーターとして、血中 LH、FSH、遊離テストステロン、DHEA-S (dehydroepiandrosterone sulfate)、エストラジオール値を、また糖代謝パラメーターとして、HOMA-IR (homeostasis model assessment-insulin resistance index) につき測定を行った。肥満 (BMI \geq 25) またはインスリン抵抗性を有する患者に対し、メトホルミン 750mg/日内服を開始し、3 ヶ月間内服を継続した。内服前後で採血及び子宮内膜採取を行った。先行研究において加療の前後で子宮内膜組織を採取できたのは 5 症例であった。

本研究では、残余検体が確認できた 3 症例で検討を行った。今回検討した 3 症例では、メトホルミン加療前の平均年齢は 29 ± 3.79 歳、全例で希発月経の状態、内膜は増殖期の像を示していた。メトホルミン加療後は、症例 1 は無排卵のままであったが、症例 2、3 では排卵が確認され、子宮内膜は症例 1 と症例 3 が増殖期、症例 2 のみが分泌期の像を呈していた。また、良性

疾患にて子宮を摘出し、病理診断で子宮内膜の異常が確認されなかった非 PCOS 患者 5 症例の内膜組織を解析した。このうち増殖期症例が 2 症例、分泌期症例が 3 症例であり、全症例は正常な月経周期を有していた。

免疫組織化学染色法

パラフィン包埋されていた残余検体を新たにマイクロトームで 5 μ m に薄切後、組織標本を作成し、AR と HOXA10 の発現様式を解析した。

まず、組織切片はキシレンにて脱パラフィンした後、濃度勾配エタノールにて親水化した。10mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) 内で Microwave 処理し、加熱による抗原の賦活化を行った。内因性ペルオキシダーゼの除去は 3% 過酸化水素加エタノールで室温 5 分間の処理を行った。ブロッッキング (AR: goat normal serum, HOXA10: rabbit normal serum) を 60 分間施行後、4°C で一次抗体を一晩反応させた。一次抗体の種類、濃度は AR (rabbit polyclonal antibody, #Sc-815, 1:250, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), HOXA10 (goat polyclonal antibody, #Sc-17159, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) とした。その後 Tween 添加リン酸緩衝生理食塩水 (0.1% Tween) (以下 PBS-T とする) で 5 分間の洗浄を 3 回施行し、さらに PBS で 5 分間の洗浄を 1 回施行した。ビオチン化された二次抗体 (AR: anti-rabbit antibody, HOXA10: anti-goat antibody) を室温で 60 分間反応させた。PBS-T と PBS で洗浄を行い、ABC (avidin-biotinylated peroxidase complex) を室温で 20 分間反応させた。3, 3'-diaminobenzidine (DAB; #D5905, Sigma-Aldrich, MO, USA) 溶液にて発色反

応を室温下で2分間行った後、ヘマトキシリンを用い核染色した。濃度勾配エタノールによる脱水後、キシレン処理を行い、マリノールにて封入した。

ARは前立腺癌組織を陽性対照とし、HOXA10は正常子宮内膜における発現が報告されているため²⁶⁾、良性疾患を有し、子宮内膜の病理診断で異常が確認されなかった非PCOS患者子宮の内膜組織検体を陽性対照としても用いた。前立腺癌と子宮内膜の組織検体は共に手術で摘出され、その一部を研究利用することに同意が得られたものである。陰性対照については、一次抗体を使用せず、その他の処理は同様に行った。

組織標本の観察と評価方法

子宮内膜組織標本は、Olympus BX51 光学顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて観察した。子宮内膜期別分類は Noyes の criteria²⁷⁾を用いて行った。染色強度は HSCORE による評価を行い²³⁾²⁸⁾、半定量化した。具体的には、400倍に拡大して得られた任意の視野で、以下のように染色濃度を5段階に分けた(0、1+、2+、3+、4+; 0は染色されていない状態、1+は軽度、2+は中等度、3+は高度、4+は極めて高度に染色された状態)。それぞれの陽性細胞の分布割合を%で表し(P0、P1、P2、P3、P4)、 $HSCORE = \sum_{i=0}^4 P_i(i+1)$, $i = 0, 1, 2, 3, 4$ (P_i ; 0-100%)の公式を用い算出した。測定は独立した2名で行った。[intraobserver (AR: $r=0.96$, HOXA10: $r=0.88$), interobserver (AR: $r=0.94$, HOXA10: $r=0.92$)] 測定値は症例数が少ないため統計学的解析は行わず、加療前後における発現様式変化の傾向について検討した。

2. 培養細胞を用いた実験

細胞培養法とテストステロン及びメトホルミン添加濃度

本研究ではメトホルミンが子宮内膜上皮細胞と間質細胞それぞれの AR 発現に与える影響について検討するため、子宮内膜上皮細胞のモデルとして Ishikawa cells (子宮内膜腺癌細胞株) を、子宮内膜間質細胞のモデルとして HESCs (子宮内膜間質細胞株、Human Endometrial Stromal Cells 以下 HESCs とする) の 2 種類の細胞株を使用した。培養液として、Ishikawa cells は Dulbecco's Modified Eagle's Medium – low glucose (without phenol red, #D5921, Sigma-Aldrich, MO, USA) を、HESCs は Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Nutrient Mixture F-12 Ham (without phenol red, #D2906, Sigma-Aldrich, MO, USA) を使用し、共に培養液へ 10% Fetal bovine serum (#10099-141, Gibco, CA, USA) を添加した。さらに、Ishikawa cells には 2% L-Glutamine (#G7513, Sigma-Aldrich, MO, USA) と 1% Penicillin-streptomycin mixture (#168-23191, Wako, Osaka, Japan)、HESCs には 0.15% 炭酸水素ナトリウム (#S5761, Sigma-Aldrich, MO, USA)、1% ITS+Premix (c#354352, Corning, NY, USA)、0.005% Puromycin (#P9620, Sigma-Aldrich, MO, USA) を添加した。細胞は共に 37°C、5% CO₂ の条件で培養を行った。

まず、Ishikawa cells、HESCs とともに、 2×10^4 cells/cm² の濃度で細胞を播種し、継代後 24 時間培養した。ウシ胎児血清(Fetal bovine serum, 以下 FBS とする) を含まない培地に交換してさらに 24 時間培養 (血清飢餓) を行った²⁹⁾。培養細胞は後述の如く 3 群に分け、培養液中にテストステロン(#T1500, Sigma-Aldrich, MO, USA) とメトホルミン(#1115-70-4, Wako, Osaka, Japan) を

添加して 48 時間培養を行った³⁰⁾³¹⁾。それぞれ、T 群 (テストステロンのみを添加)、T+M 群 (テストステロンとメトホルミンを添加)、C 群 (テストステロンとメトホルミンの溶媒のみを添加) とした。テストステロンは無水エタノールで飽和溶解液を作成し、PBS(-)で希釈した。添加するテストステロンの濃度は 10^{-5}M に²⁵⁾設定した。メトホルミンはPBS(-)で溶解液を作成し、添加するメトホルミンの濃度はウエスタンブロット法では 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5}M に²⁹⁾³²⁾、蛍光免疫細胞染色法では 10^{-2}M に³⁰⁾³¹⁾³³⁾設定した。これらの条件で培養した細胞をウエスタンブロット法と蛍光免疫細胞染色法にそれぞれ用いた。また、テストステロンは生理的血中濃度が 10^{-9}M から 10^{-8}M に相当するため、生体内と比較すると高い濃度で添加しているが、先行研究²⁵⁾では 10^{-5}M の濃度を用いていたことから、本研究においても 10^{-5}M のテストステロンを添加して AR 発現を誘導した。メトホルミンに関しても、添加した濃度はヒトにおける有効血中濃度よりも高濃度であるが、先行研究²⁹⁾³⁰⁾³¹⁾³²⁾³³⁾にならぬ、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5}M の濃度のメトホルミンを添加した。

ウエスタンブロット法

Ishikawa cells、HESCs を 60mm ディッシュにそれぞれ継代し、先述の条件で培養後、テストステロンとメトホルミンの投与を行った。培養終了後、タンパク抽出を行った。はじめに培地を除去して PBS(-)で 3 回洗浄し、タンパク抽出液を加えた。タンパク抽出液は T-PER (#78510, Thermo Scientific, IL, USA) にタンパク質分解酵素阻害剤カクテルタブレット (cOmplete, Mini, EDTA-free #11836170001, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を加えて作

成した。セルスクレーパーを用いて抽出液中で細胞を培養皿から剥がし、氷上で 15 分間静置した。サンプルをマイクロチューブに集め、数秒ホモジナイズを行った。予冷しておいた高速遠心機にて細胞成分を沈殿させ (15000rpm、10 分、4°C)、上清を回収してタンパク抽出液を得た。これらのサンプルは 2×SDS sample buffer [10mM Tris-HCL(pH6.8), 4% SDS, 20% Glycerol, 0.1% Bromophenol Blue, 0.25M DTT, 2.5mM Sodium acetate (pH:5.0)] 液と等量ずつ混和し、90 °Cで 5 分加熱処理して SDS 化し、ウエスタンブロット用のサンプルとした。タンパク質濃度は Bradford 法を用いて測定した。

ウエスタンブロットは、SDS 化したサンプルを Mini-PROTEAN TGX precast gels (4-15% #4561083, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) の各レーンにアプライし、SDS-PAGE (100V、60 分) を行った。Trans-Blot Turbo Transfer Pack (#1704156, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用いて 0.2 μ m の PVDF 膜に転写した (25V、10 分)。転写後のメンブレンは Tween 添加トリス緩衝生理食塩水 (0.1%Tween) (以下 TBS-T とする) で 10 分間洗浄した後、ブロッキングを行った。ブロッキング液は 5%スキムミルク/TBS-T を用い、室温で 60 分間処理をした。一次抗体 AR (rabbit monoclonal antibody, #ab133273, Abcam, Cambridge, UK) はブロッキング液にて 1:1000 に希釈し、4°Cで一晩反応させた。洗浄後、二次抗体[Goat anti-rabbit IgG H&L(HRP) preadsorbed (#ab97080, Abcam, Cambridge, UK)]をブロッキング液で 1:5000 に希釈して室温で 1 時間反応させた後、洗浄を行った。洗浄は全て TBS-T で行い、ECL Prime Western Blotting Detection reagent (#RPN2232, GE Healthcare, NJ, USA) によって化学発光させ、Amersham Imager (GE Healthcare, NJ, USA) を用いて撮像した。陽性対照にはマウス精巣ライセートを用いた。陰性対照については、一次抗

体のみを使用せず、その他の処理は同様に行った。内在性コントロールを評価するため、Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer (#46430, Thermo Scientific, IL, USA)で 30 分処理して抗体を除去した後、先述と同じ条件で GAPDH (rabbit polyclonal antibody, #ab9485, 1:1000, Abcam, Cambridge, UK) を検出した。これらのバンド強度を数値化し、AR/GAPDH Intensity 値を算出して定量的評価を行った。同様の検討を 3 回繰り返し、T 群における AR/GAPDH Intensity 値を 1 としたときの各群の Intensity 値を求め、Mean ± SEM を算出した。統計学的有意差については、一元配置分散分析(one-way analysis of variance; one-way ANOVA)を行った³⁰⁾³¹⁾。

蛍光免疫細胞染色法

Ishikawa cells、HESCs をそれぞれ 8well チャンバースライドに継代後、先述の条件で培養し、テストステロンとメトホルミンを添加した。培養終了後は培地を除去後、PBS(-)により洗浄し、蛍光免疫染色を行った。具体的には、4%パラホルムアルデヒド/ PBS (#163-20145, Wako, Osaka, Japan) を 15 分間室温で反応させて固定し、0.5% Triton-X (T-8532, Sigma-Aldrich, MO, USA) in PBS(-) を同様に 15 分間室温で反応させて透過処理とした。抗体の希釈には 3% BSA/PBS(-) を用い、一次抗体 (AR, rabbit monoclonal antibody, #ab133273, 1:100, Abcam, Cambridge, UK) は 4°C で一晩反応させた。二次抗体 (Donkey Anti-Rabbit IgG H&L(Alexa Fluor 488) Donkey polyclonal Secondary Antibody, #ab150073, 1:1000, Abcam, Cambridge, UK) は室温下で 60 分間反応させ、二次抗体以降の処理は遮光下で行った。抗体反応後はそれぞれ PBS(-)で 5 分間

の洗浄を4回行い、DAPI添加封入剤 Pro Long Gold Antifade Mountant with DAPI (#P36941, Thermo Scientific, IL, USA) により封入した。Ishikawa cells において AR が発現していることはすでに確認されているため³⁴⁾、これを陽性対照とした。陰性対照については、一次抗体を使用せず、その他の処理は同様に行った。撮像には共焦点レーザー顕微鏡システム OLYMPUS FV1000 (Olympus, Tokyo, Japan) を使用した。

【結果】

1. PCOS 患者子宮内膜組織を用いた実験

非 PCOS 患者の子宮内膜における AR 及び HOXA10 発現様式

PCOS 患者子宮内膜の検討を行うにあたり、まず染色方法とその結果が適正であるかを評価するために陽性、陰性対照検体の染色を行った（図 1）。AR の陽性対照では前立腺癌組織において上皮細胞の核と間質細胞の一部の核が染色された。HOXA10 の陽性対照では子宮内膜間質細胞の核が染色された。一方、陰性対照では AR、HOXA10 ともに全く染色されなかった。これらの結果から、染色方法とその結果は適正であると判断した。

これまでに非 PCOS 患者の子宮内膜において AR と HOXA10 発現の関連を調べた研究はないため、まず、非 PCOS 患者について検討を行った。非 PCOS 患者 5 症例の子宮内膜を用いて AR と HOXA10 の免疫染色を行い、HSCORE 値を算出した。5 症例に共通して、AR は腺上皮細胞の核と間質細胞の核で発現を認めた。HOXA10 は間質細胞の核でのみ発現を認めた。以後、AR に関しては腺上皮細胞と間質細胞とに分け、それぞれの核における発現について、HOXA10 に関しては間質細胞の核における発現について評価を行い、HSCORE 値を算出した（図 1、表 1）。

AR の腺上皮細胞における HSCORE 値は、最も高値であったのは非 PCOS 症例 1 で 279 ± 19.5 、最も低値であったのは非 PCOS 症例 5 で 229 ± 10.2 であった。間質細胞の HSCORE 値については、最も高値であったのは非 PCOS 症例 1 で 273 ± 16.7 、最も低値であったのは非 PCOS 症例 5 で 230 ± 7.8 であ

った。HSCORE の平均はそれぞれ増殖期の腺上皮細胞で 265 ± 16.5 、間質細胞で 269 ± 26.4 、分泌期の腺上皮細胞で 239 ± 20.5 、間質細胞で 240 ± 14.3 であった。非 PCOS 患者内膜における AR の発現は腺上皮細胞、間質細胞ともに分泌期でわずかに低下していた。

HOXA10 発現の HSCORE 値は非 PCOS 症例 3 で 366 ± 16.5 と最も高く、最も低値であったのは非 PCOS 症例 2 で 259 ± 17.5 であった。HSCORE 値の平均は増殖期で 293 ± 10.2 、分泌期で 350 ± 17.2 であった。非 PCOS 患者内膜における HOXA10 の発現は増殖期と比較して分泌期で上昇していた。

メトホルミン内服が PCOS 患者の子宮内膜における AR および HOXA10 発現様式に与える影響

次に、メトホルミン内服前後における PCOS 患者内膜について、AR と HOXA10 の発現様式を解析した (図 2)。PCOS 患者内膜において、AR は腺上皮細胞の核と間質細胞の核に認め、HOXA10 は間質細胞の核に局在を認めた。AR 発現については腺上皮細胞と間質細胞にわけ、それぞれの核における発現を、HOXA10 発現は間質細胞の核における発現を評価して HSCORE 値を算出し、内服前後で比較した (図 3、表 2)。

症例 1 の AR 発現は、腺上皮細胞では内服前と比較して内服後で発現が低下し、HSCORE 値は 460 ± 24.6 から 311 ± 22.2 へ減少していた。間質細胞においても AR 発現は低下しており、HSCORE 値は内服前 319 ± 2.0 から内服後 290 ± 12.9 へと僅かではあるが低下を認めた。HOXA10 発現については内

服前に比較して内服後で発現が上昇しており、HSCORE 値は 250 ± 19.6 から 298 ± 1.0 へ増加していた。

症例 2 では AR の発現は腺上皮細胞、間質細胞ともに内服後で低下していた。HSCORE 値では腺上皮細胞で 455 ± 41.2 から 271 ± 22.4 へ減少、間質細胞で 375 ± 19.8 から 259 ± 40.2 へと減少していた。HOXA10 発現についても内服後で発現が上昇しており、HSCORE 値は 271 ± 4.4 から 377 ± 4.9 へ増加していた。

症例 3 においても AR 発現は腺上皮細胞、間質細胞ともにメトホルミン内服後で低下していた。AR の HSCORE 値は腺上皮細胞で 346 ± 2.9 から 217 ± 7.4 に、間質細胞で 342 ± 3.8 から 234 ± 13.0 に低下していた。HOXA10 発現については、内服後に発現上昇を認め、HSCORE 値はそれぞれ 273 ± 2.8 から 308 ± 12.6 と増加していた。

上記の結果から、PCOS 症例 1~3 に共通して、メトホルミン内服後の子宮内膜における AR 発現は腺上皮細胞、間質細胞とともに抑制され、間質細胞における HOXA10 発現は上昇していた。また、症例ごとの AR 発現低下の傾向は当講座における先行研究の結果と同様であったことを確認した。

2. 培養細胞株を用いた実験

メトホルミン添加が培養細胞の AR 発現様式に与える影響

①ウエスタンブロット法による解析

PCOS 患者子宮内膜検体を用いた検討から、メトホルミンが AR 発現を抑制し、HOXA10 発現を上昇させた可能性が考えられた。子宮内膜組織を用いた実験は、検体採取に限界があるため、子宮内膜 AR 発現に対してメトホルミンが与える影響について培養細胞を用いて実験をすすめることにした。本研究では、まず子宮内膜腺癌細胞株である Ishikawa cells と子宮内膜間質細胞株である HESCs の 2 種類の細胞株を用いて、AR の発現量を解析するためウエスタンブロット法を施行した。

はじめに、検討方法の妥当性を確認するためマウス精巣ライセートを陽性対照として用いた。AR の分子量である 110kDa にバンドを検出し、陰性対照ではバンドの検出を認めなかったことから、ウエスタンブロット法は妥当であると判断した。

次に、Ishikawa cells における AR 発現に関して (図 4-(1))、C 群で発現を認め、T 群では C 群と比較してさらに発現が亢進していた。このことからテストステロンにより AR 発現が誘導されたと判断した。さらに T+M 群では T 群と比較して低下傾向を認めた。

Ishikawa cells における AR/GAPDH Intensity 比は濃度依存性に低下していた。T+M3 における AR/GAPDH Intensity 比は 0.70 ± 0.09 と最も発現が抑制され、T 群と T+M3 群の間に統計学的有意差を認めた。(図 4-(2))。

HESCs においても AR 発現の変化について Ishikawa cells と同様の検討を行った(図 5-(1))。C 群ではわずかに AR 発現を認めたが、T 群では C 群と比較して発現が亢進していた。T+M 群では T 群と比較して変化を認めなかった。AR/GAPDH Intensity 比についても、HESCs では T 群と T+M 群でほとんど差を認めなかった(図 5-(2))。

これらの結果から、Ishikawa cells と HESCs において、テストステロンにより AR 発現が誘導され、テストステロンとメトホルミンの添加により Ishikawa cells では AR 発現が低下傾向を示し、HESCs では変化を認めないことが分かった。

②蛍光細胞免疫染色法による解析

前項の結果から、Ishikawa cells と HESCs に対するテストステロンとメトホルミン添加による AR 発現量の差違が明らかになった。そこで、さらに細胞内における AR 発現の局在変化を明らかにするため、蛍光細胞免疫染色法を施行した。代表的な画像を図 6、7 に示す。

Ishikawa cells における AR 発現について、C 群では核に局在を認めたが、発現の程度は軽微であった。T 群でも核に局在を認め、C 群と比較してその

発現は亢進していた。T+M2 群でも核に局在があり、T 群と比較すると T+M2 群において発光強度が低下しており、AR 発現が抑制されていた。

HESCs における AR 発現について、C 群では発現量が少なく局在は不明瞭であったが、核を中心に細胞全体で発現していた。T 群では核に局在を認め、細胞質に発現は確認できなかった。T+M2 群においても核に局在を認めたが、T 群との違いは明らかではなく、Ishikawa cells において観察されたような発光強度の変化は認められなかった。

これらの結果から、Ishikawa cells における AR 発現はテストステロンの添加によって核に誘導され、メトホルミン添加によって発光強度が減少した。一方の HESCs における AR 発現は、テストステロンによって核に発現が誘導されるが、メトホルミンを添加しても明らかな変化は確認できなかった。

【考察】

本研究では、PCOS 患者の子宮内膜検体と培養細胞株を用いて、*in vivo*、*in vitro* の両方の系からメトホルミンが子宮内膜の AR 発現に与える影響について検討を行った。

まず、非 PCOS 患者内膜組織を用いた検討において、AR 発現は増殖期と比較して分泌期でやや抑制され、HOXA10 発現は増殖期と比較して分泌期で上昇する傾向にあった。AR と HOXA10 の月経周期による発現様式の違いについては、分泌期において AR 発現は抑制され³⁵⁾、HOXA10 は上昇する³⁶⁾ことがそれぞれ報告されている。しかし、同一実験系を用いて、AR と HOXA10 の発現様式について解析した報告はこれまでになく、本研究では先行研究と一致した結果を得た。

次に、PCOS 患者子宮内膜組織を用いた検討において、メトホルミン内服前の子宮内膜における AR 発現は非 PCOS 患者と比較して亢進していた。メトホルミン内服後は内服前と比較して AR 発現が低下しており、当講座における先行研究と同様の結果を得た。HOXA10 発現については、PCOS 症例 1～3 全例で内服前と比較して内服後で発現が上昇していた。HOXA10 の制御機構については Ishikawa cells を用いた研究において、テストステロンの添加により HOXA10 の発現が抑制され、AR 受容体拮抗薬であるフルタミドを添加することによってその発現が回復したと報告されており²⁵⁾、HOXA10 はテストステロンにより制御されている分子であることが知られている。今回の検討において HOXA10 発現が上昇した原因としては、AR 発現が低下し、

子宮内膜における AR を介したシグナル経路が抑制された可能性があると考ええる。

ただし、PCOS 患者症例 2 に関しては、メトホルミン内服後の子宮内膜は分泌期を呈していた。正常月経周期をもつ女性の分泌期内膜においては増期と比較してその発現が抑制されることが報告されている¹²⁾³⁵⁾一方、PCOS 患者内膜においては分泌期内膜においても AR 発現は抑制されないという報告がある¹³⁾。従って、分泌期における HSCORE 値の低下がメトホルミン内服によるものか月経周期自体による変化か、については更なる症例の検討が必要と考える。

次に、培養細胞を用いたウエスタンブロット法と蛍光細胞免疫染色法の検討から、メトホルミンは Ishikawa cells において AR 発現を抑制する傾向があることが明らかになった。

Li ら²⁴⁾は、グルコース輸送体である GLUT4 が正常子宮内膜細胞（主に腺上皮細胞）に発現し、高アンドロゲン状態にある PCOS 患者や PCOS ラットモデルにおいては、GLUT 4 が down-regulation されていることを明らかにした。また、子宮内膜増殖症を有する PCOS 患者の子宮内膜初代培養細胞を用いた実験において、メトホルミンは cation transporter isoforms を制御していること、GLUT4 の発現を誘導し AR 発現を抑制すること、insulin receptor / PI3K / Akt / mTOR シグナル経路を阻止していることを報告した²⁴⁾。この結果から、著者らは PCOS 患者子宮内膜においても GLUT4 発現はアンドロゲン-AR 経路および insulin receptor / PI3K / Akt / mTOR 経路の両者を制御している可能性を示唆している。本研究では、子宮内膜増殖症を有する PCOS 患者の

子宮内膜ではなく PCOS 患者子宮内膜検体と子宮内膜培養細胞を用いて検討した。GLUT4 の解析を行っていないが、GLUT4 を介した機序で Ishikawa cells の AR 発現が低下した可能性はあると考える。

また、HESCs ではテストステロンにより誘導された AR 発現はメトホルミンの添加により変化せず、Ishikawa cells の結果とは異なっていた。近年、マウスモデルを用いてアンドロゲンが子宮内膜上皮細胞の増殖と腺形成に果たす役割が解析され、デヒドロテストステロンの投与により、子宮重量や子宮内膜腺数が増加したと報告されている³⁷⁾。さらに子宮内膜間質細胞と上皮細胞は異なる機能を有することが指摘³⁷⁾されており、上皮細胞と間質細胞はそれぞれ細胞特異性を有する可能性を考える。また、PCOS 患者子宮内膜における AR 発現はメトホルミン内服後に上皮細胞だけでなく間質細胞においても抑制されていたが、生体内においては子宮内膜の腺上皮細胞と間質細胞の間で相互作用している可能性があるとして報告³⁷⁾³⁸⁾³⁹⁾されており、*in vivo* においては、*in vitro* とは異なった結果が得られたと考える。

本研究では、メトホルミン投与によって PCOS 患者子宮内膜の AR 発現が抑制され、HOXA10 発現は上昇した。また、Ishikawa cells を用いた実験においても AR 発現はメトホルミン添加により抑制される傾向があることを明らかにした。メトホルミンはすでにインスリン抵抗性改善薬として広く用いられている安全性の高い薬である。メトホルミンが子宮内膜に与える影響についての知見を蓄積することにより、着床や流産率の改善、また子宮体癌予防などに貢献することが期待される。

【参考文献】

- 1) Stein IF, Leventhal ML: Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 29: 181-191, 1935
- 2) 日本産科婦人科学会生殖内分泌委員会報告: 本邦における多嚢胞性卵巣症候群の新しい診断基準の設定に関する小委員会 (平成 17 年度～平成 18 年度) 検討結果報告. *日産婦誌* 59: 868-886, 2007
- 3) McCartney CR, Marshall JC: CLINICAL PRACTICE. Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med* 375: 54-64, 2016
- 4) 水沼英樹: 多嚢胞性卵巣症候群の病態生理. *日産婦誌* 58: 1603-1608, 2006
- 5) Wild RA, Carmina E, Diamanti-Kandarakis E, Dokras A, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Lobo R, Norman RJ, Talbott E, Dumesic DA: Assessment of cardiovascular risk and prevention of cardiovascular disease in women with the polycystic ovary syndrome: a consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome (AE-PCOS) Society. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 2038-49, 2010
- 6) Boomsma CM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Visser GH, Fauser BC, Macklon NS: A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 12: 673-83, 2006
- 7) Tasali E, Van Cauter E, Ehrmann DA: Polycystic Ovary Syndrome and Obstructive Sleep Apnea. *Sleep Med Clin* 3: 37-46, 2008

- 8) Veltman-Verhulst SM, Boivin J, Eijkemans MJ, Fauser BJ: Emotional distress is a common risk in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of 28 studies. *Hum Reprod Update* 18: 638-51, 2012
- 9) Jakubowicz DJ, Iuorno MJ, Jakubowicz S, Roberts KA, Nestler JE: Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 524-529, 2002
- 10) Dumesic DA, Lobo RA: Cancer risk and PCOS. *Steroids* 78: 782-5, 2013
- 11) Giudice LC: Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20: 235-244, 2006
- 12) Apparao KB, Lovely LP, Gui Y, Lininger RA, Lessey BA: Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome. *Biol Reprod* 66: 297-304, 2002
- 13) Li X, Pishdari B, Cui P, Hu M, Yang HP, Guo YR, Jiang HY, Feng Y, Billig H, Shao R: Regulation of Androgen Receptor Expression Alters AMPK Phosphorylation in the Endometrium: In Vivo and In Vitro Studies in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Int J Biol Sci* 11: 1376-89, 2015
- 14) Nestler JE, Jakubowicz DJ, Evans WS, Pasquali R: Effect of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 338: 1876-1880, 1998

- 15) Moghetti P, Castello R, Negri C, Tosi F, Perrone F, Caputo M, Zanolin E, Muggeo M: Metformin effects on clinical features, endocrine and metabolic profiles, and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled 6-month trial, followed by open, long-term clinical evaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 139-146, 2000
- 16) Lord JM, Flight HK, Norman RJ: Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 327: 951-953, 2003
- 17) 苛原稔: PCOS の臨床. *日産婦誌* 58: 1597-1602, 2006
- 18) 日本産科婦人科学会・日本産婦人科医会編 産婦人科診療ガイドライン 婦人科外来編: 131-134, 2014
- 19) Vincenzo De Leo, Antoniola Marca, Antonino Ditto, Giuseppe Morgante, Antonio Cianci: Effects of metformin on gonadotropin-induced ovulation in women with polycystic ovary syndrome. *Ferti Steril* 72: 282-285, 1999
- 20) Jakubowicz DJ, Seppala M, Jakubowicz S, Roriguez-Armas O, Rivas-Santiago A, Koistinen H, Koistinen R, Nestler JE: Insulin reduction with metformin increases luteal phase serum glycodelin and insulin-growth factor binding protein 1 concentrations and enhances uterine vascularity and blood flow in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1126-1133, 2001
- 21) Palomba S, Russo T, Orio F Jr, Falbo A, Manguso F, Cascella T, Tolino A, Carmina E, Colao A, Zullo F: Uterine effects of metformin administration in anovulatory women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 21: 457-465, 2006

- 22) Gleuck CJ, Phillips H, Cameron D, Sieve-Smith L, Wang P: Continuing metformin throughout pregnancy in women with polycystic ovary syndrome appears to safely reduce first-trimester spontaneous abortion: a pilot study. *Fertil Steril* 75: 46-52, 2001
- 23) Ito-Yamaguchi A, Suganuma R, Kumagami A, Hashimoto S, Yoshida-Komiya H, Fujimori K: Effects of metformin on endocrine, metabolic milieu and endometrial expression of androgen receptor in patients with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 31: 44-47, 2015
- 24) Li X, Cui P, Jiang HY, Guo YR, Pishdari B, Hu M, Feng Y, Billig H, Shao R: Reversing the reduced level of endometrial GLUT4 expression in polycystic ovary syndrome: a mechanistic study of metformin action. *Am J Transl Res* 7: 574-86, 2015
- 25) Cermik D, Selam B, Taylor HS: Regulation of HOXA10 expression by testosterone in vitro and in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 238-243, 2003
- 26) Gui Y, Zhang J, Yuan L, Lessey BA: Regulation of HOXA-10 and its expression in normal and abnormal endometrium: *Mol Hum Reprod* 5: 866-73, 1999
- 27) Noyes RW, Hertig AT, Rock J: Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1: 3-25, 1950
- 28) McCarty KS Jr, Miller LS, Cox EB, Konrath J, McCarty KS Sr.: Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal anti-receptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 109: 716-21, 1985

- 29) Xie Y, Wang YL, Yu L, Hu Q, Ji L, Zhang Y, Liao QP: Metformin promotes progesterone receptor expression via inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) in endometrial cancer cells. *J of Steroid Biochemi & Mol Biol* 126: 113-120, 2011
- 30) Zhang Q, Schmandt R, Celestino J, McCampbell A, Yates MS, Urbauer DL, Broaddus RR, Loose DS, Shipley GL, Lu KH: CGRRF1 as a novel biomarker of tissue response to metformin in the context of obesity. *Gynecol Oncol* 133: 83-9, 2014
- 31) Malaguarnera R1, Sacco A, Morcavallo A, Squatrito S, Migliaccio A, Morrione A, Maggiolini M, Belfiore A: Metformin inhibits androgen-induced IGF-IR up-regulation in prostate cancer cells by disrupting membrane-initiated androgen signaling. *Endocrinology* 155: 1207-21, 2014
- 32) Freis A, Renke T, Kämmerer U, Jauckus J, Strowitzki T, Germeyer A: Effects of a hyperandrogenaemic state on the proliferation and decidualization potential in human endometrial stromal cells. *Arch Gynecol Obstet* 295: 1005-1013, 2017
- 33) Liu Z, Qi S, Zhao X, Li M, Ding S, Lu J, Zhang H: Metformin inhibits 17 β -estradiol-induced epithelial-to-mesenchymal transition via β Klotho-related ERK1/2 signaling and AMPK α signaling in endometrial adenocarcinoma cells. *Oncotarget* 7: 21315-31, 2016
- 34) Lovely LP, Appa Rao KB, Gui Y, Lessey BA: Characterization of androgen receptors in a well-differentiated endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa). *J Steroid Biochem Mol Biol* 74: 235-41, 2000

- 35) Simitsidellis I, Saunders PTK, Gibson DA: Androgens and endometrium: New insights and new targets. *Mol Cell Endocrinol* 465: 48-60, 2018
- 36) Daftary GS, Taylor HS: Endocrine regulation of HOX genes. *Endocr Rev* 27: 331-55, 2006
- 37) Simitsidellis I, Gibson DA, Cousins FL, Esnal-Zufiaurre A, Saunders PT: A Role for Androgens in Epithelial Proliferation and Formation of Glands in the Mouse Uterus. *Endocrinology* 157: 2116-28, 2016
- 38) Wang H, Bocca S, Anderson S, Yu L, Rhavi BS, Horcajadas J, Oehninger S: Sex steroids regulate epithelial-stromal cell cross talk and trophoblast attachment invasion in a three-dimensional human endometrial culture system. *Tissue Eng Part C Methods* 19: 676-87, 2013
- 39) Cronin JG, Kanamarlapudi V, Thornton CA, Sheldon IM: Signal transducer and activator of transcription-3 licenses Toll-like receptor 4-dependent interleukin (IL)-6 and IL-8 production via IL-6 receptor-positive feedback in endometrial cells. *Mucosal Immunol* 9: 1125-36, 2016

【図説明】

図1 免疫組織化学染色法による非PCOS患者症例(1~5)子宮内膜におけるARとHOXA10の発現様式

(a): ARの陽性対照 (前立腺癌組織)、 (g): ARの陰性対照 (前立腺癌組織)

(b)~(f): 非PCOS症例1、2(増殖期)、 3、4、5(分泌期)におけるARの局在

(h)~(l): 非PCOS症例1~5におけるARの陰性対照

(m): HOXA10の陽性対照 (子宮内膜組織)、 (s): HOXA10の陰性対照 (子宮内膜組織)

(n)~(r): 非PCOS症例1~5におけるHOXA10の局在

(t)~(x): 非PCOS症例1~5におけるHOXA10の陰性対照

G: 腺上皮 (Glandular epithelium)、 S: 間質 (Stroma)

図2 免疫組織化学染色法によるPCOS患者子宮内膜AR及びHOXA10発現にメトホルミン加療が与える変化

(a)~(c): メトホルミン加療前PCOS症例1~3(いずれも増殖期)におけるAR発現

(d)~(f): メトホルミン加療後PCOS症例1~3(症例2のみ分泌期)におけるAR発現

(g)~(i): メトホルミン加療前PCOS症例1~3におけるHOXA10発現

(j)~(l): メトホルミン加療後PCOS症例1~3におけるHOXA10発現

図3 PCOS患者子宮内膜AR及びHOXA10発現のメトホルミン加療前後におけるHSCORE値の変化

- (a): メトホルミン加療前後における子宮内膜上皮細胞AR発現変化
- (b): メトホルミン加療前後における子宮内膜間質細胞AR発現変化
- (c): メトホルミン加療前後における子宮内膜間質細胞HOXA10発現変化

図4 ウェスタンブロット法によるテストステロン存在下メトホルミン添加がIshikawa cellsのAR発現に与える影響

図4-(1): Ishikawa cellsにおけるAR発現

図4-(2): Ishikawa cellsにおけるAR/GAPDH Intensity値の変化

Positive control: 陽性対照 (マウス精巣ライセート)

Control: 対照群

T : 10^{-5} M テストステロン添加群

T+M5: 10^{-5} M テストステロン + 10^{-5} M メトホルミン添加群

T+M4: 10^{-5} M テストステロン + 10^{-4} M メトホルミン添加群

T+M3: 10^{-5} M テストステロン + 10^{-3} M メトホルミン添加群

*: 統計学的有意差あり ($P<0.05$)

図5 ウェスタンブロット法によるテストステロン存在下メトホルミン添加が HESCs の AR 発現に与える影響

図 5-(1): HESCs における AR 発現

図 5-(2): HESCs における AR/GAPDH Intensity 値の変化

Positive control: 陽性対照 (マウス精巣ライセート)

Control: 対照群

T : 10^{-5} M テストステロン添加群

T+M5: 10^{-5} M テストステロン + 10^{-5} M メトホルミン添加群

T+M4: 10^{-5} M テストステロン + 10^{-4} M メトホルミン添加群

T+M3: 10^{-5} M テストステロン + 10^{-3} M メトホルミン添加群

図6 蛍光細胞免疫染色法によるテストステロン存在下メトホルミン添加が Ishikawa cells における AR 発現様式に与える影響

(a): C 群における AR 発現、(b): C 群における DAPI による核染色像、(c): (a)と(b)の合成画像

(d): T 群における AR の陰性対照、(e): 陰性対照の DAPI による核染色像、(f): (d)と(e)の合成画像

(g): T 群における AR 発現、(h): T 群における DAPI による核染色像、(i): (g)と(h)の合成画像

(j): T+M2 群における AR 発現、(k): T+M2 群における DAPI による核染色像、(l): (j)と(k)の合成画像

図7 蛍光細胞免疫染色法によるテストステロン存在下メトホルミン添加が HESCs における AR 発現様式に与える影響

(a): C 群における AR 発現、(b): C 群における DAPI による核染色像、(c): (a)と(b)の合成画像

(d): T 群における AR の陰性対照、(e): 陰性対照の DAPI による核染色像、(f): (d)と(e)の合成画像

(g): T 群における AR 発現、(h): T 群における DAPI による核染色像、(i): (g)と(h)の合成画像

(j): T+M2 群における AR 発現、(k): T+M2 群における DAPI による核染色像、(l): (j)と(k)の合成画像

表題

表 1 メトホルミン内服前後における PCOS 患者の糖代謝・内分泌パラメーター（当講座における先行研究²³⁾より引用）

表 2 非 PCOS 患者子宮内膜における AR および HOXA10 発現の HSCORE 値

表 3 PCOS 患者子宮内膜におけるメトホルミン加療前後の AR および HOXA10 発現の HSCORE 値

图 1

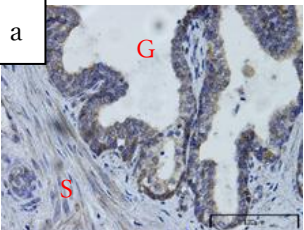
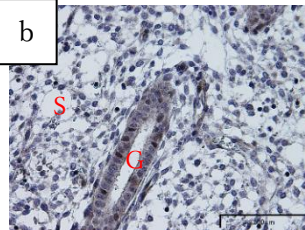
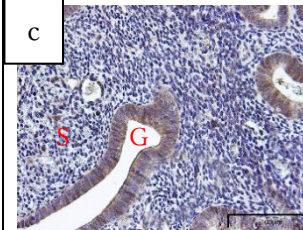
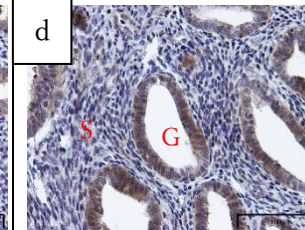
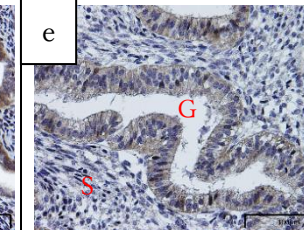
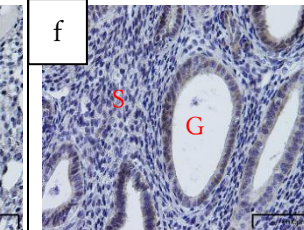
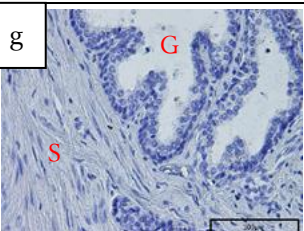
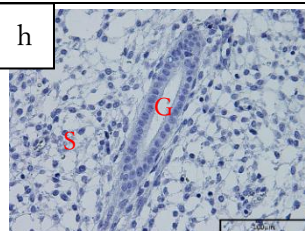
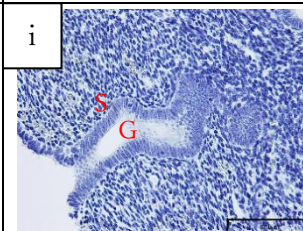
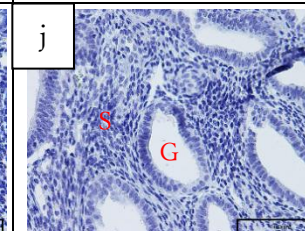
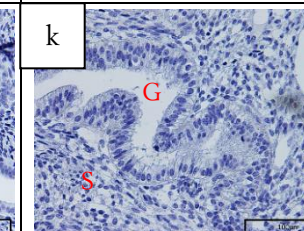
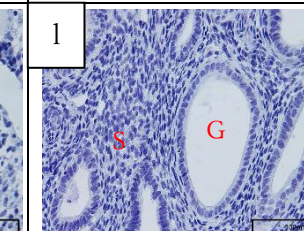
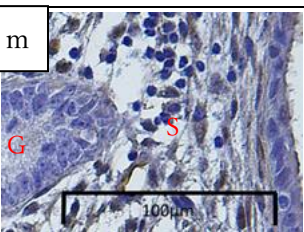
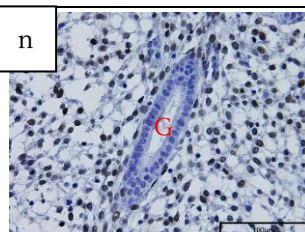
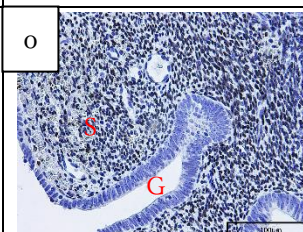
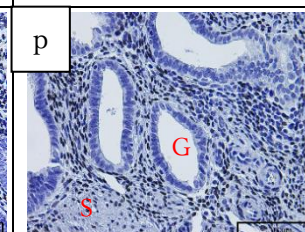
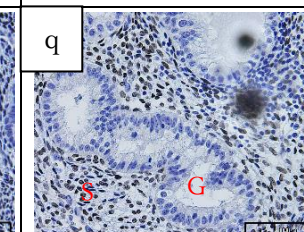
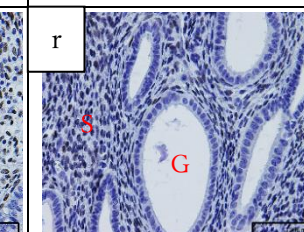
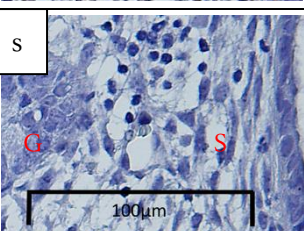
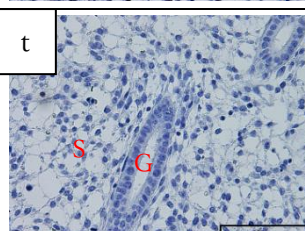
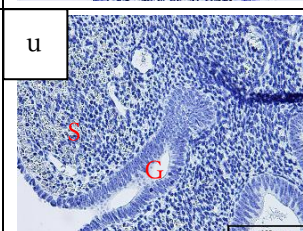
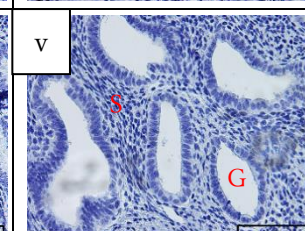
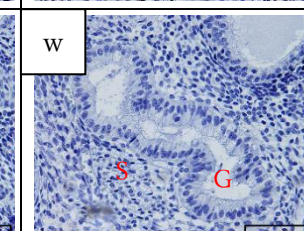
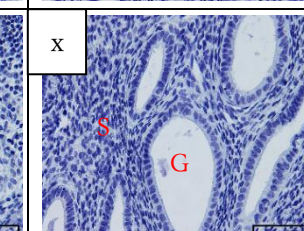
	陽性・陰性对照	非 PCOS 症例 1	非 PCOS 症例 2	非 PCOS 症例 3	非 PCOS 症例 4	非 PCOS 症例 5
周期		增殖	增殖	分泌	分泌	分泌
AR						
AR 陰性对照						
HOXA10						
HOXA10 陰性对照						

图 2

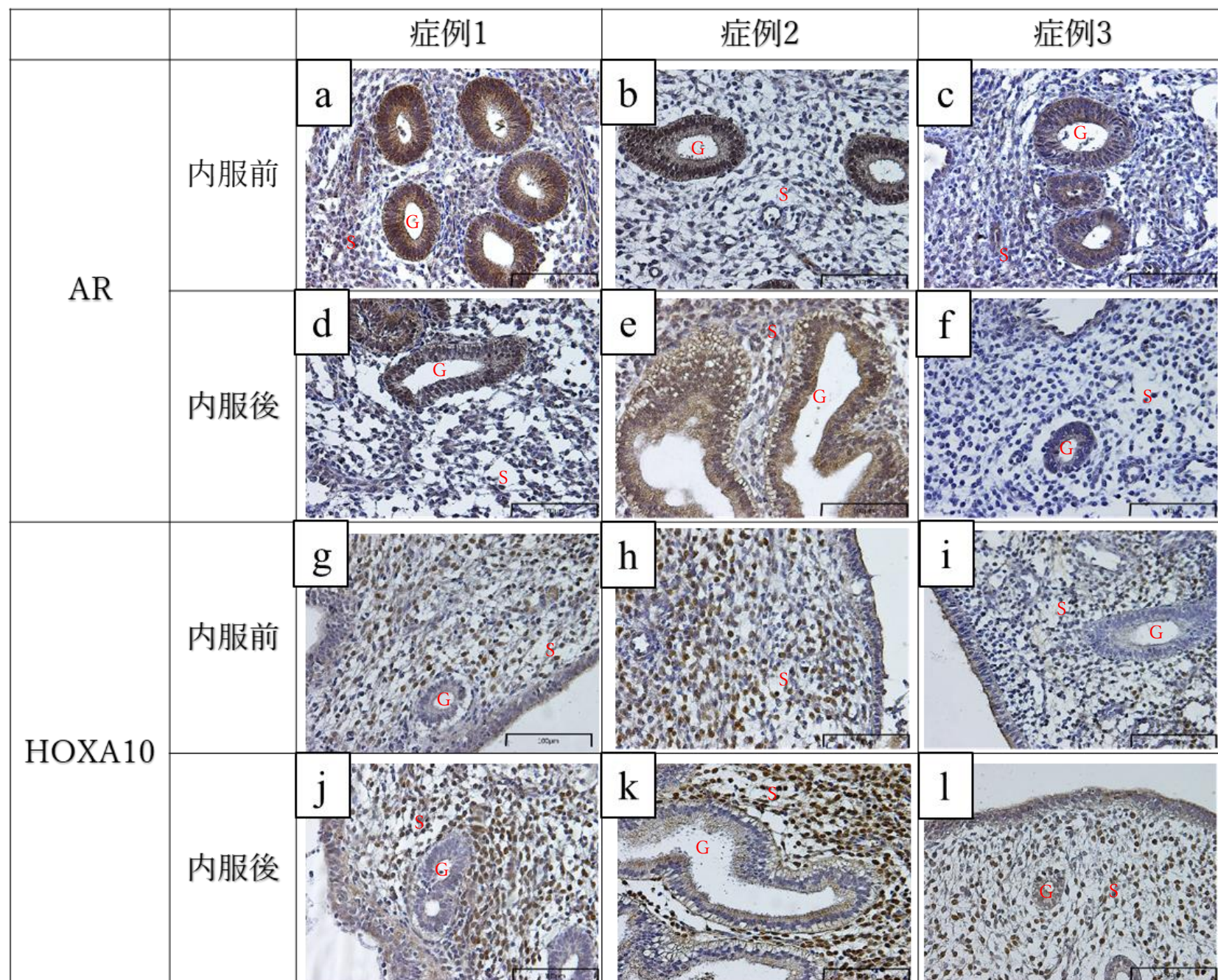


図 3

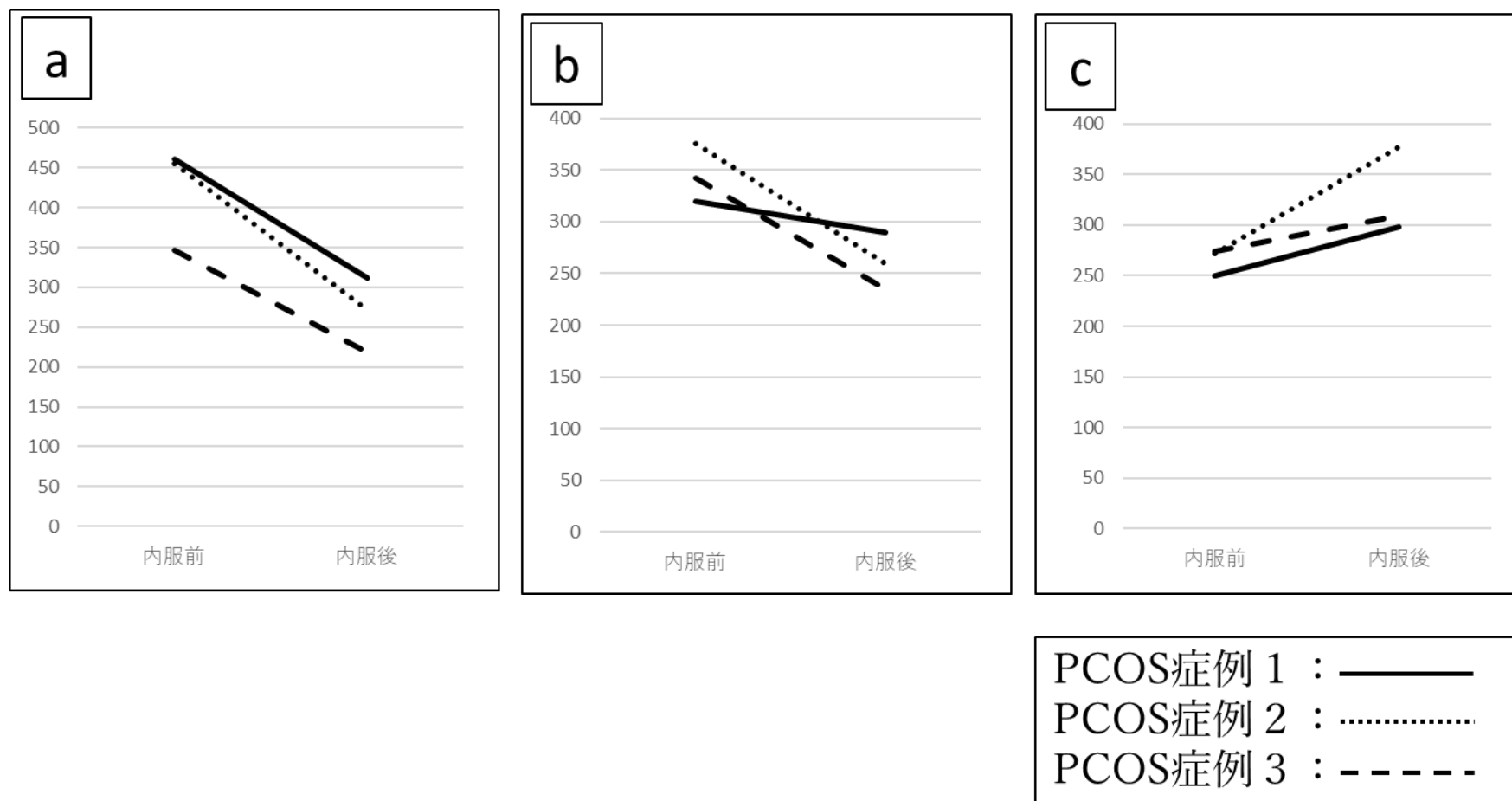


图 4-(1)

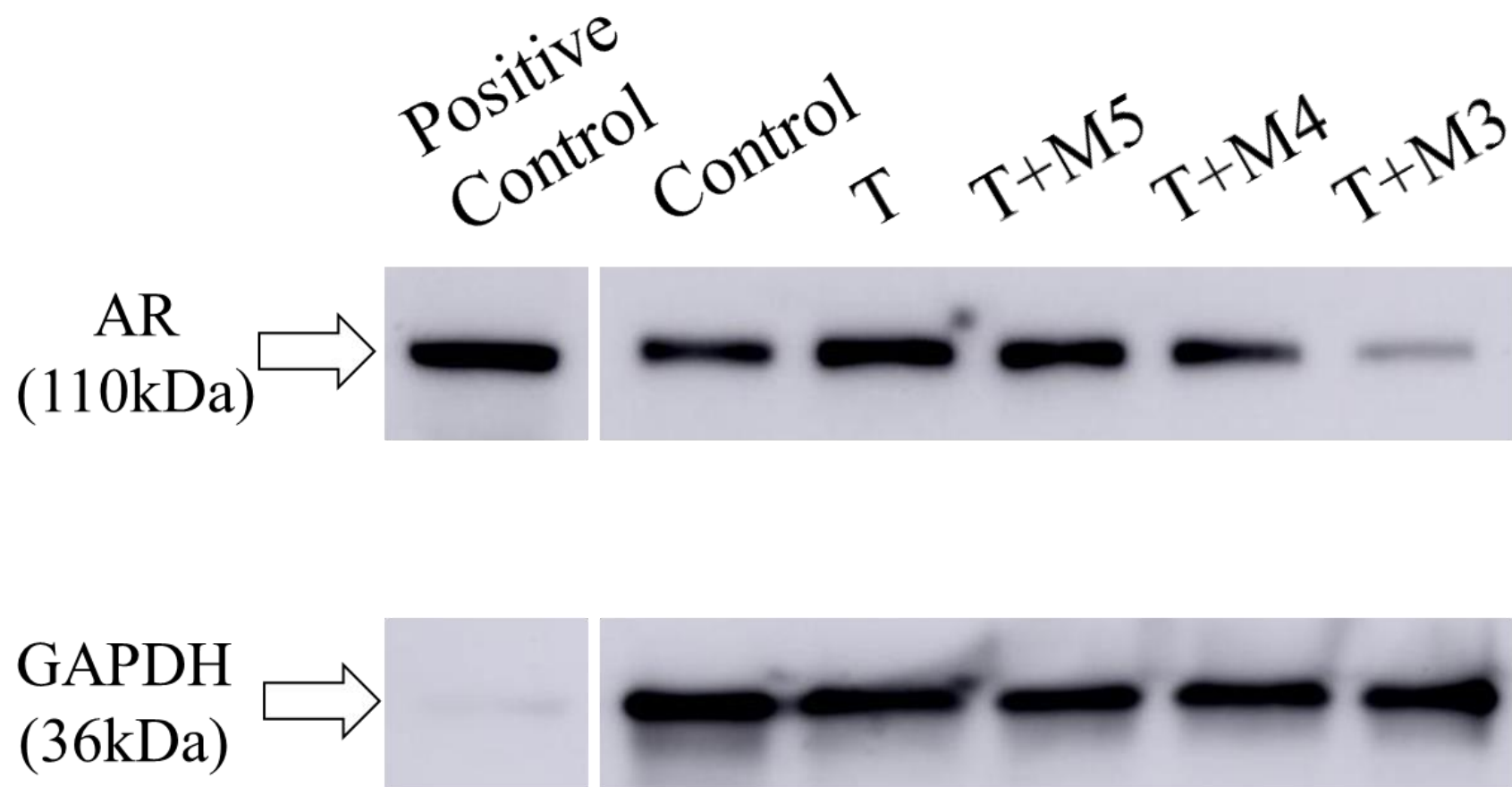


图 4-(2)

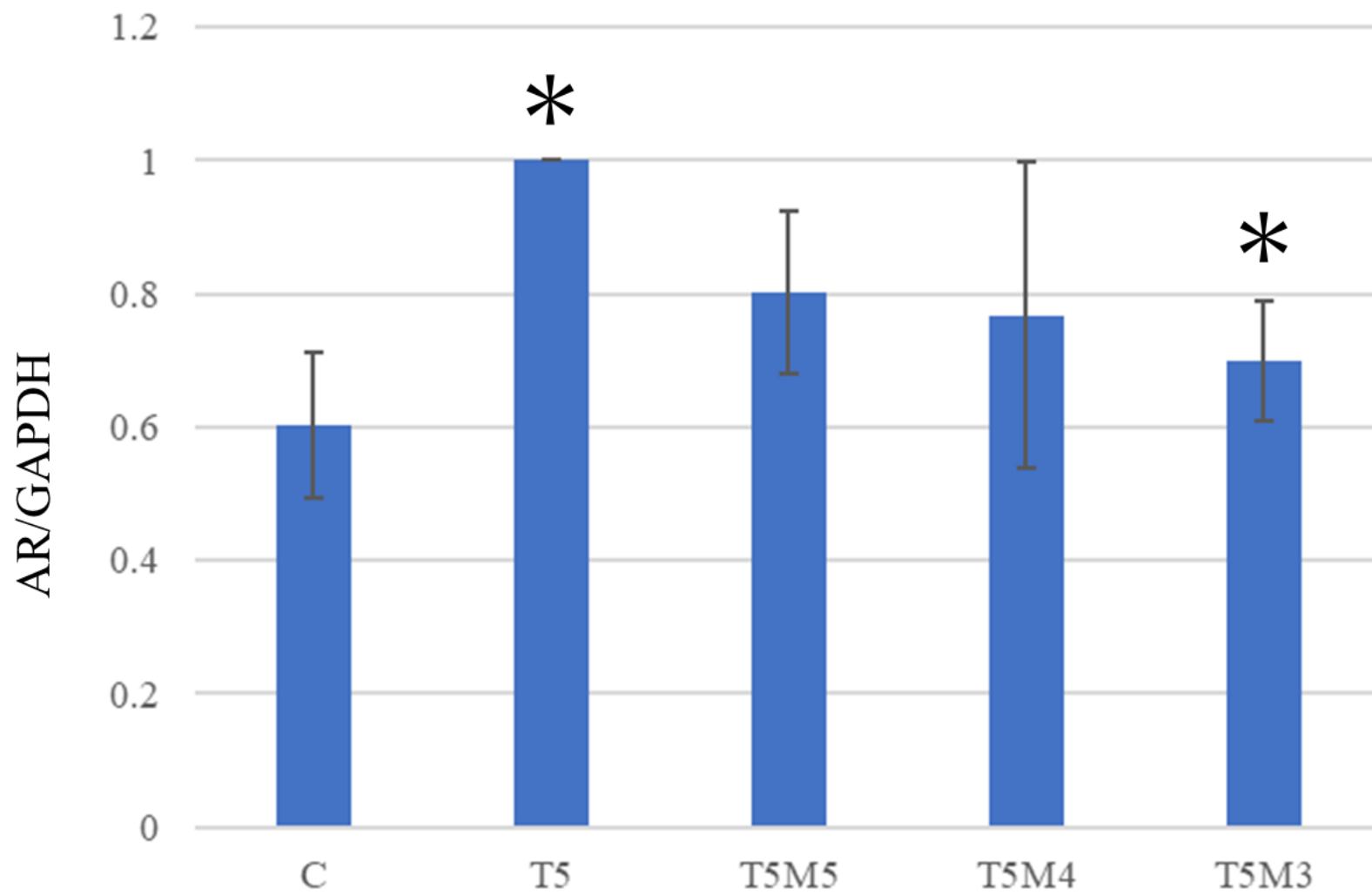


图 5-(1)

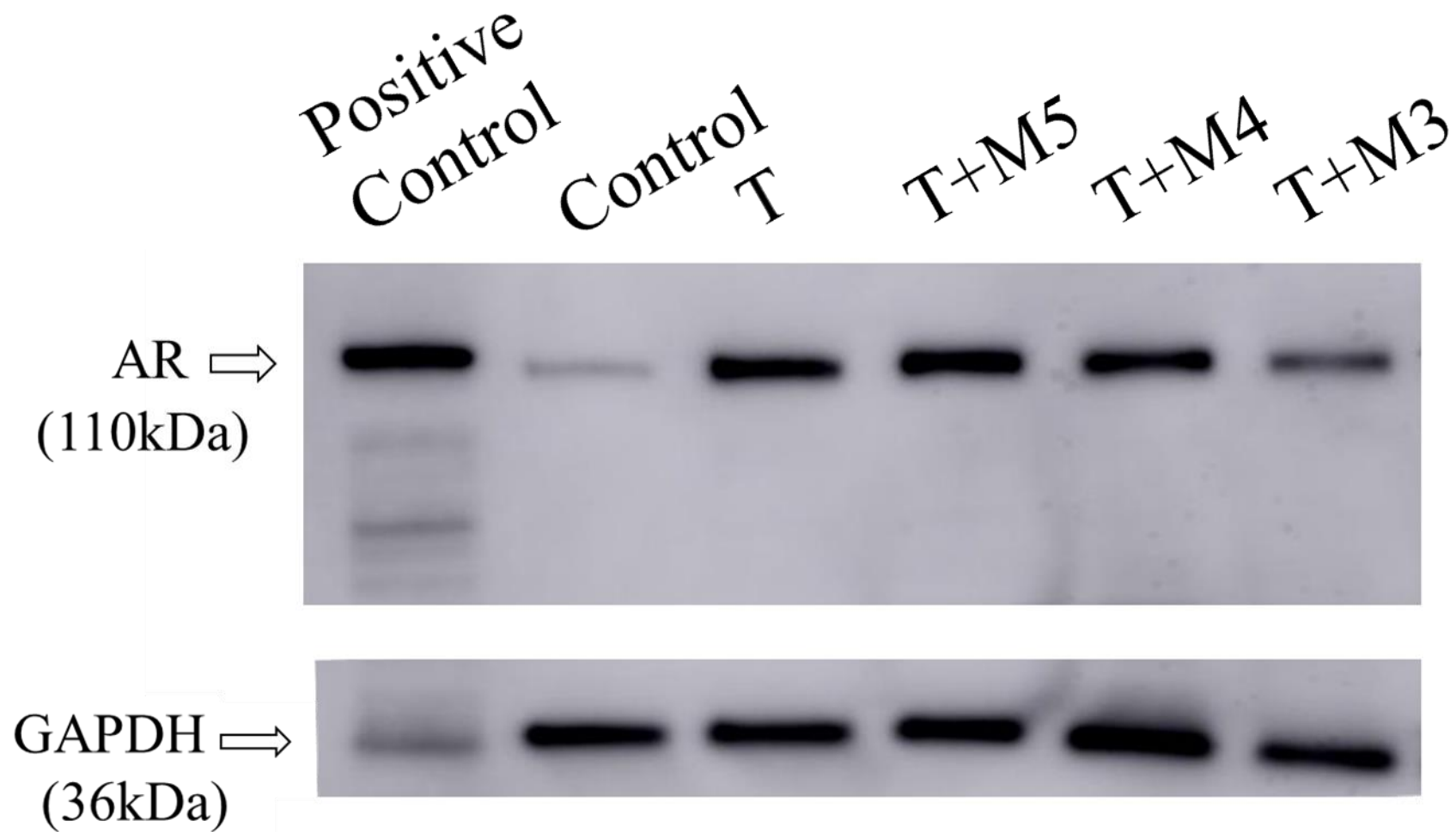


图 5-(2)

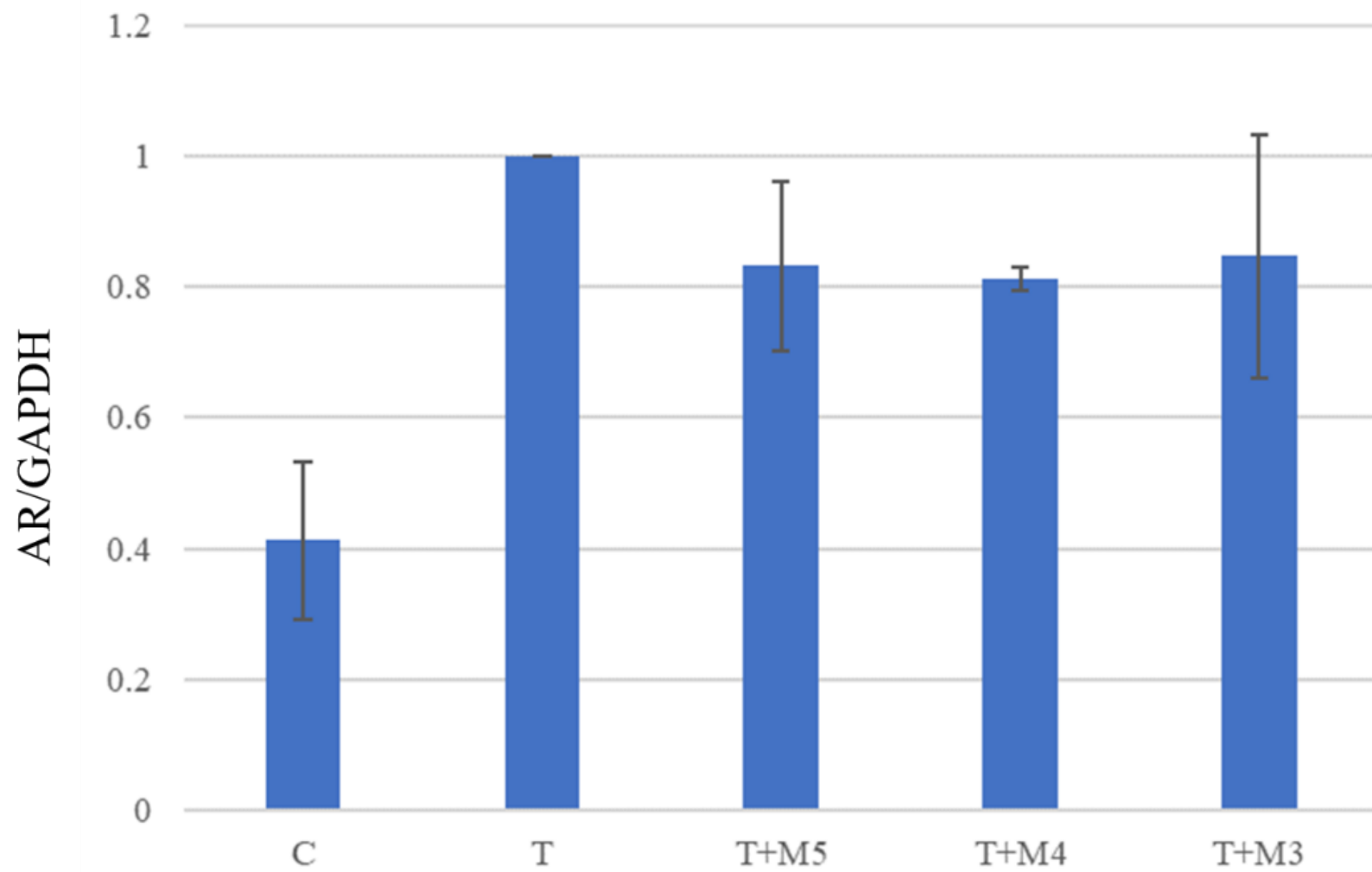


图 6

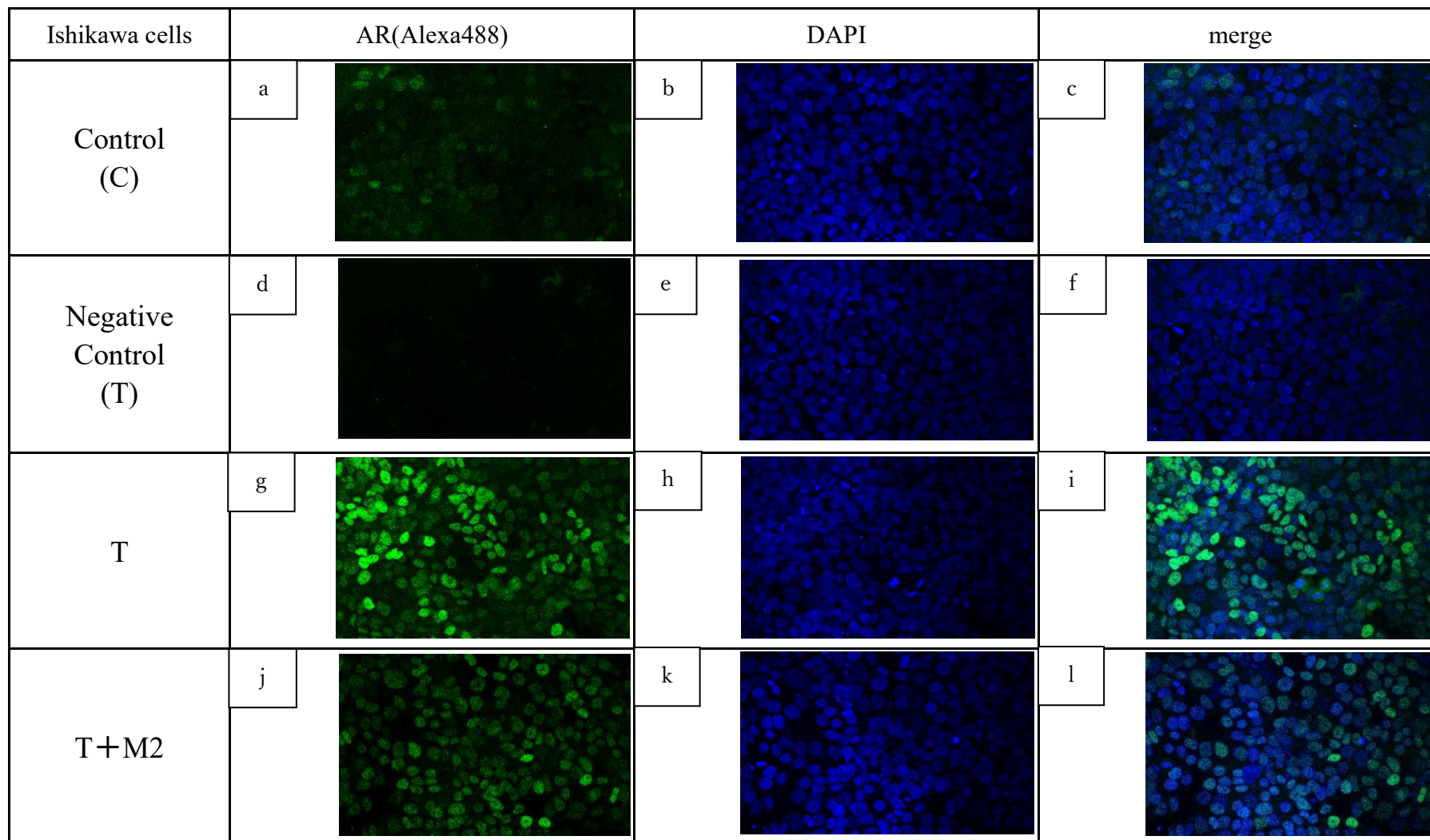


图 7

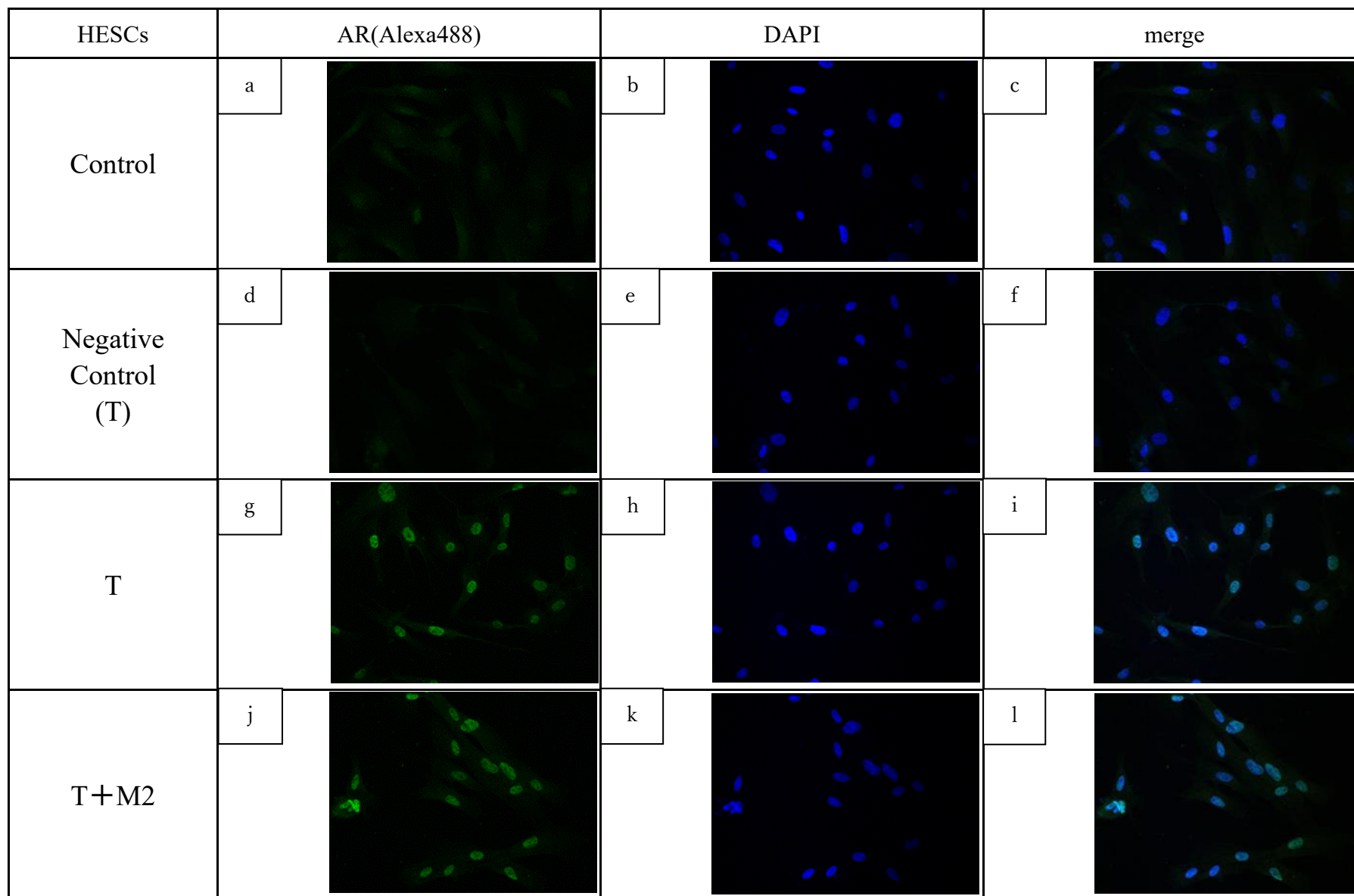


表1

非 PCOS 患者	非 PCOS 症例 1	非 PCOS 症例 2	非 PCOS 症例 3	非 PCOS 症例 4	非 PCOS 症例 5	平均	
周期	増殖	増殖	分泌	分泌	分泌	増殖 (症例 1,2)	分泌(症例 3,4,5)
HSCORE (AR・上皮)	279 ± 19.5	250 ± 13.5	245 ± 31.0	242 ± 20.0	229 ± 10.2	265 ± 16.5	239 ± 20.5
HSCORE (AR・間質)	273 ± 16.7	265 ± 36.1	246 ± 14.2	244 ± 20.8	230 ± 7.8	269 ± 26.4	240 ± 14.3
HSCORE (HOXA10)	328 ± 3.0	259 ± 17.5	366 ± 16.5	334 ± 12.7	351 ± 22.4	293 ± 10.2	350 ± 17.2

表2

PCOS 患者	PCOS 症例 1		PCOS 症例 2		PCOS 症例 3	
メトホルミン内服	前	後	前	後	前	後
排卵	無排卵	無排卵	無排卵	排卵有	無排卵	排卵有
周期	増殖	増殖	増殖	分泌	増殖	増殖
HSCORE (AR・上皮)	460 ± 24.6	311 ± 22.2	455 ± 41.2	271 ± 22.4	346 ± 2.9	217 ± 7.4
HSCORE (AR・間質)	319 ± 2.0	290 ± 12.9	375 ± 19.8	259 ± 40.2	342 ± 3.8	234 ± 13.0
HSCORE (HOXA10)	250 ± 19.6	298 ± 1.0	271 ± 4.4	377 ± 4.9	273 ± 2.8	308 ± 12.6

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、実験の計画から日々の実験方法に至るまで終始丁寧なご指導、ご助言を頂きました福島県立医科大学性差医療センター教授 小宮ひろみ先生、産科婦人科学講座講師 山口明子先生に深厚なる誠意を表します。また、産科婦人科学講座助手 斎藤史子先生、小児科学講座 前田創先生からは本研究に関わる実験手技のご指導をいただき、心より御礼申し上げます。男女共同参画支援室からは、久保千都さんに実験補助やデータ整理などのご支援を頂きましたことに、深く感謝いたします。さらに、博士課程への進学および研究全般にわたる多大なご支援とご指導を賜りました藤森敬也教授を始めとする福島県立医科大学産科婦人科学講座の先生方や、ふくしま子ども女性医療支援センターの先生方、皆様に深謝いたします。

最後に、この研究は日本学術振興会から科学研究費助成事業の補助を得て行いました。研究へのご支援をいただきましたことに感謝申し上げます、謝辞とさせていただきます。