

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 山口 真奈子
学位 位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 1018 号
学位授与の日付 令和3年9月21日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Three-dimensional understanding of the morphological complexity of the human uterine endometrium.
(組織透明化技術によるヒト子宮内膜の立体構造の解明)

論文審査委員 主査 教授 近藤 英作
副査 教授 味岡 洋一
副査 准教授 三上 剛和

博士論文の要旨

(背景と目的)

ヒトは「月経」という子宮内膜の周期的な再生・剥離の生理現象を有する極めてまれな動物である。子宮内膜を構成している腺管は、コイル状のうねりや、しばしば分岐を伴いながら、表層の開口部から機能層（月経で剥がれ落ちる部分）を通して基底層（月経でも残存する部分）まで続いている。これまで子宮内膜の腺管は病理切片画像による2次元（2D）的な観察によって分岐単一管状構造であると考えられてきた。しかしながら、腺管はうねりや分岐を伴う複雑な形態をしているため、その正確な3次元（3D）構造は明らかになっていなかった。子宮内膜の腺管は受精卵の着床に必須であり、さらに子宮内膜関連疾患（子宮腺筋症、子宮内膜症、内膜症関連卵巣癌）や子宮体癌の発生母地でもある。申請者らのグループは病理学的に「正常」な子宮内膜腺管組織に多数の癌関連遺伝子変異があることを世界に先駆けて発表した。同一の癌関連遺伝子変異を持つ腺管が子宮内膜上に様々な大きさの広がりを持って存在していることが明らかになり、この発見は子宮内膜腺管が分岐単一管状構造であるという従来の概念では説明がつかなかった。

一方、近年の組織透明化技術の発展によって数cm大の組織の3D構造観察が可能となってきている。そこで、申請者らはこの技術を応用してヒト子宮内膜と子宮腺筋症の3D構造解析を計画するに至った。

(方法)

申請者らは、子宮内膜に病理学的に異常のない婦人科疾患のために子宮摘出手術を受けた方より研究参加の同意を得、摘出子宮から採取した組織の3D画像解析を行った。数mmから数cm角に切り出した子宮組織をClear, Unobstructed Brain/Body Imaging Cocktails and Computational analysis (CUBIC)という手法を用いて透明化し、さらに上皮組織のマーカーであるCK7で蛍光染色を行った。シート証明顕微鏡を用いて透明化した標本を撮影し、画像解析ソフトを用いて得られた画像データを3D化し、観察・解析した。合計で20個の正常子宮内膜サンプルと4個の子宮腺筋症サンプルを撮影し、その特徴的な3D構造を評価した。

(結果)

正常子宮内膜組織を3Dで観察することによって、これまでの2Dによる観察では十分に理解されていなかったヒト子宮内膜腺管の特徴的な形態が二つあることが分かった。一つ目は、腺管は全てが表層に開口するわけではなく、内膜の途中で閉塞している腺管が存在することである。閉塞腺管は分泌物を腺管内から排出することができないためしばしば膨張していた。閉塞腺管の個数は加齢に伴って増加する傾向があった。二つ目は、腺管が分岐するだけでなく、網目のような構造を形成し、しばしば複数の腺管が同一の網目構造を共有していることである。これまで子宮内膜の腺管は分岐単一管状腺と考えられてきたが、今回の3D解析では全体の37%の腺管が他の腺管とつながっており、その86%が内膜の下層1/3の部分で網目構造を介して連続していることが分かった。増殖期のサンプルの3D像から内膜腺管の立体的な層を150 μ mの厚みで作成し、筋層から表層までの腺管の形態を層別に視覚化したところ、筋層に近い層（下層）では網目状構造が目立つのに対して、層が表層に近づくにつれて腺管が円柱状になる様子が観察された。これらの事から、腺管の網目構造は主に内膜の下層に存在すると考えられた。次なる疑問点は、この内膜下層の網目構造が月経時にも残存する「基底層」に該当するののかということであった。そのため、月経期の子宮内膜9サンプルを3Dで観察したところ、全てのサンプルで網目構造が残存していたことから、腺管の網目構造は基底層の主な構成要素であると考えられた。

最後に、子宮内膜関連疾患である子宮腺筋症（子宮内膜組織が異所性に筋層内で増殖する疾患）の3D化を行った。その結果、腺管が子宮内膜から直接筋層へ侵入する様子を初めて3Dで捉えた。さらに、異所性の子宮内膜腺管組織が筋層内で細い枝を伸ばして広がっていき、蟻の巣のような3D構造を形成していることを発見した。子宮腺筋症の発症メカニズムには子宮内膜の筋層への直接侵入説、ミューラー管化生説、幹細胞移植説など様々な説があり、どのように筋層内で異所性の内膜組織が発生し、腺筋症病巣を形成するのかは理解されていなかったが、今回の3D解析結果は子宮内膜の侵入説を支持する所見であった。

（考察）

申請者らは、今回の3D画像解析の結果に基づいて、正常子宮内膜と子宮腺筋症の組織学的構造の新しい概念を提唱した。特に正常内膜の基底層の網目構造はこれまで百年来信じられてきた子宮内膜腺管の概念を覆すものであり、申請者らはこの構造を「地下茎（rhizome）」と名付けた。ヒト子宮内膜は剥離と再生を繰り返す組織であるため、幹細胞が存在すると言われているが、いまだにその正確な所在はわかっていない。また、周期的な剥離・再生を起ささないマウスの子宮内膜腺管3D解析の既報では今回のような地下茎構造は存在していない。ヒト子宮内膜基底層の地下茎構造は月経による剥離時の幹細胞の保護に有利に働いていると考えられ、今後の幹細胞研究の重要な要素となる可能性がある。さらに、近年正常子宮内膜腺管や子宮内膜症・子宮腺筋症の異所性子宮内膜上皮に癌関連遺伝子変異が存在することがわかっているが、これらの組織の3D構造とゲノム解析を組み合わせることで遺伝子変異の空間的な広がり方や子宮内膜関連疾患・子宮体癌の発症メカニズムの解明につながることを期待される。

審査結果の要旨

子宮内膜を構成している腺管は、表層の開口部から機能層（月経で剥がれ落ちる部分）を通過して基底層（月経でも残存する部分）まで続いており、同腺管は病理切片画像による2次元（2D）的な観察によって分岐単一管状構造であると考えられてきたが、その正確な3次元（3D）構造は明らかになっていなかった。申請者らのグループは病理学的に「正常」な子宮内膜腺管組織に多数の癌関連遺伝子変異があることを世界に先駆けて発表した。同一の癌関連遺伝子変異を持つ腺管が子宮内膜上に様々な大きさの広がりを持って存在していることが明らかになり、この発見は子宮内膜腺管が分岐単一管状構造であるという従来の概念では説明がつかなかった。この不明点を解決するため、申請者らは摘出子宮から採取した組織の3D画像解析をClear, Unobstructed Brain/Body Imaging Cocktails and Computational analysis (CUBIC)とい

う手法を用いて透明化し、上皮組織のマーカーである CK7 蛍光染色で 3D イメージングにより立体構造解析を行った。

結果、以下の 2 点が主に明らかとなった。

一つ目は、腺管は全てが表層に開口するわけではなく、内膜の途中で閉塞している腺管が存在することである。閉塞腺管は分泌物を腺管内から排出することができないためしばしば膨張していた。閉塞腺管の個数は加齢に伴って増加する傾向があった。二つ目は、腺管が分岐するだけでなく、網目のような構造を形成し、しばしば複数の腺管が同一の網目構造を共有していることである。これまで子宮内膜の腺管は分岐単一管状腺と考えられてきたが、今回の 3D 解析では全体の 37%の腺管が他の腺管とつながっており、その 86%が内膜の下層 1/3 の部分で網目構造を介して連続していることが分かった。

本研究による 3D 画像解析の結果に基づいて、正常子宮内膜と子宮腺筋症の組織学的構造の新しい概念を提唱した。特に正常内膜の基底層の網目構造はこれまで百年来信じられてきた子宮内膜腺管の概念を覆すものであり、申請者らはこの構造を「地下茎 (rhizome)」と名付けた。ヒト子宮内膜基底層の地下茎構造は月経による剥離時の幹細胞の保護に有利に働いていると考えられ、今後の幹細胞研究の重要な要素となる可能性がある。さらに、近年正常子宮内膜腺管や子宮内膜症・子宮腺筋症の異所性子宮内膜上皮に癌関連遺伝子変異が存在することがわかっているが、これらの組織の 3D 構造とゲノム解析を組み合わせることで遺伝子変異の空間的な広がり方や子宮内膜関連疾患・子宮体癌の発症メカニズムの解明につながる事が期待される。