

微小子宮筋腫の腫瘍血管新生に関する組織学的研究

小林徳男¹ 羽生忠義² 武市和之³
中川敏浩⁴ 安部仁晴⁴ 渡邊弘樹⁴

Histological Study on Tumor Angiogenesis of Minute Uterine Myoma

Tokuo KOBAYASHI¹, Tadayoshi HANYU², Kazuyuki TAKEICHI³
Toshihiro NAKAGAWA⁴, Kimiharu AMBE⁴ and Hiroki WATANABE⁴

We reported the structure of postmenopausal uterine leiomyomas. Elucidation of myomatous structure will constitute a fundamental contribution to the development of therapies that lead leiomyomas to cell death. In this study, we examined leiomyomas and blood vessels in them with immunohistochemical staining and transmission electron microscopy (TEM).

Angiogenic tumor vessels and preexisting capillary vessels were present in the fibroids. Tumor angiogenesis is initiated by enlargement of lumens of preexisting capillaries and protrusion of enlarged endothelial cell vacuoles to the basal side. Endothelial cells that formed leafy tentacles and migrated to the stroma bound the cytoplasm and formed angiogenic tumor blood vessels. On the other hand, there were tumor vessels in a state of degenerative necrosis.

These results suggest that neoplastic vessels nourish myoma cells and fibroblasts and make minute leiomyomas proliferate.

Key words : uterine leiomyoma, tumor blood vessel, immunohistochemical staining, electron microscope

緒 言

良性腫瘍である子宮筋腫の発育には性ステロイドホルモンに加えてサイトカインや血管増生因子そして増生する細胞外基質が密接に関与していることが報告されている¹⁻⁵⁾。有経時の子宮筋腫の増殖増大を組織学的に証明するには実質と間質に栄養と酸素を供給する腫瘍血管の存在を示すことである⁶⁻⁹⁾。Walochaら⁷⁾は筋腫の血管鑄型を走査

電顕で検索し直径3mm以下の壁内筋腫には腫瘍血管が確認出来なかったとして増殖する可能性について否定的な報告をしている。一方、筋腫核摘出術後の筋腫再発は残存する筋腫の増殖によるものと推測されるが摘出すべき大きさの基準について明確な答えは得られていない¹⁰⁻¹³⁾。本研究では肉眼で確認できる大きさの微小壁内筋腫における腫瘍血管存在の有無、かつ、筋腫と腫瘍血管形成過程を明らかにするために免疫組織学および電

受付：平成31年1月17日，受理：平成31年2月7日
小林医院¹
坪井病院²
会津中央病院³
奥羽大学生体構造学講座口腔組織学分野⁴

Kobayashi Clinic¹
Tsuboi Hospital²
Aizu Chuo Hospital³
Division of Oral Histology, Department of Morphological Biology, Ohu University School of Dentistry⁴

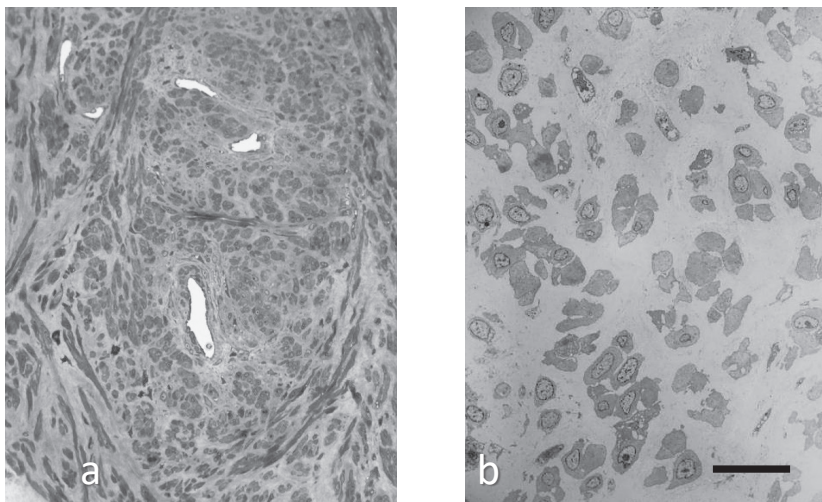


図1 微小筋腫

トルイジンブルー染色×50 (a)

TEM像散在する筋腫細胞が認められるbar=10 μm (b)

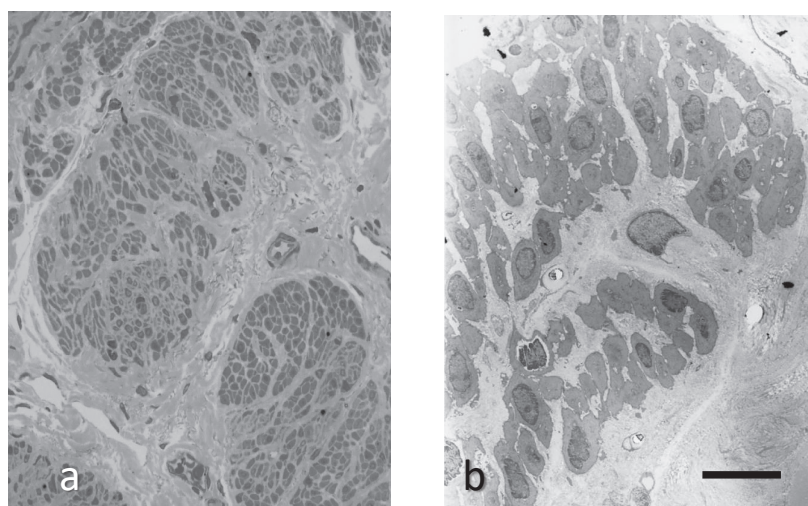


図2 通常型筋腫

トルイジンブルー染色×100 (a)

TEM像筋腫細胞密に存在するbar=10 μm (b)

顕的に検索した。

材料および方法

年齢40歳～44歳の子宮筋腫の診断で子宮摘出術を施行し、書面により本人の理解と同意を得られた6症例について、微小壁内筋の10個を採取し研究に供するとともに通常型筋腫（直径1 cm）との比較を行った。

筋腫を実体顕微鏡の下で2等分し、一方の組織片を光顕用に他方を電顕用の標本に作成した。

1. 光顕用標本作製法

10%中性ホルマリン液で1週間固定後所定の手順を経て組織片を作製し、HE染色、エラスチカマッソン染色及び抗CD-34と抗VEGFおよび抗Ki-67免疫染色を行い組織学的に観察ならびに1mm²における反応陽性の血管をカウントした

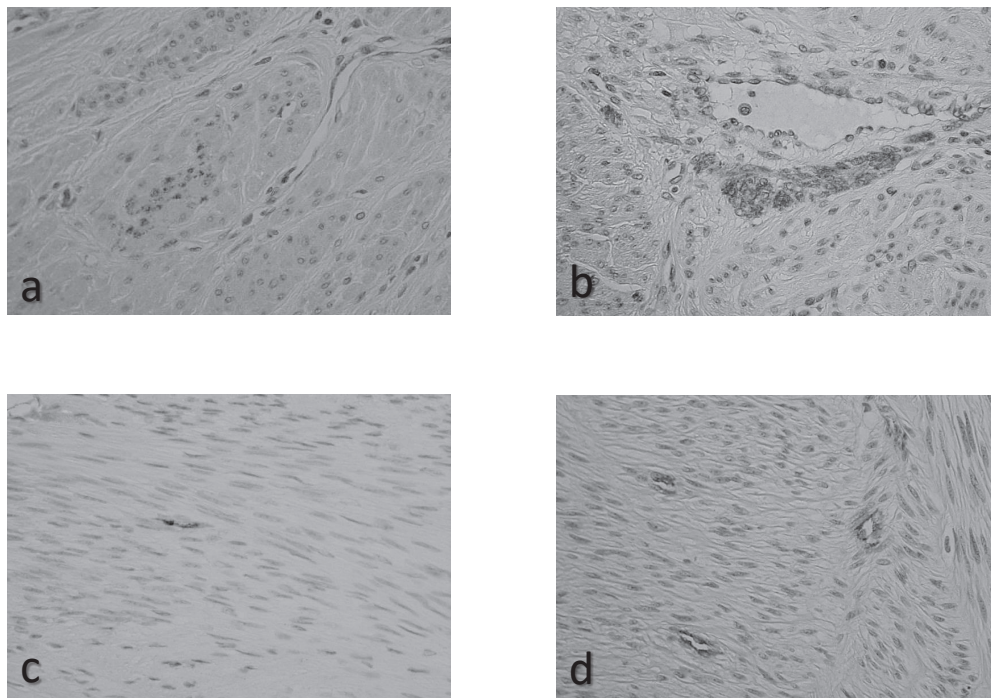


図3 微小筋腫の免疫染色像

a, b : Anti-VEGF抗体反応×400散在する陽性細胞(a)と集簇する陽性細胞(b)
c, d : Anti-CD34抗体反応×400間質内に存在する陽性細胞(c)と管腔形成部の陽性細胞(d)

(表1)。

2. 電顕標本作製法

採取した組織片を細切し、2%グルタルアルデヒド液に固定し、四酸化オスミウム酸で再固定した。脱水後Epon812で包埋、薄切片をトルイジンブルー染色し光顕標本とした。超薄切片は酢酸ウラシルと硝酸鉛で重染色後JEM-1200EX透過型電子顕微鏡(TEM)で観察した。

結 果

組織学的所見

肥大した内皮細胞の胞体は不規則な形状を呈して基底側へ突出している。血管周囲間質は浮腫状であるが炎症性細胞の浸潤は認めない。以上通常型組織像を示す所見である(図1-a)。びまん性に増生した線維結合織内に散在性あるいは10数個集簇している筋腫細胞は異型性に乏しく、核、胞体比は正常筋細胞に類似し、細胞核を有する細胞は少ない(図1-b)。一方、通常型においては

表1 組織学的所見による有経時通常型微小筋腫と直径1 cmの筋腫の比較

	微小筋腫	直径1 cmの筋腫
筋腫細胞の分布	散在性	集簇性
間質の分布	粗	密
血管密度 (/mm)	2~5	20~50

筋腫細胞が集団として密に存在している(図2-a, b)。免疫染色においては、筋腫細胞集団内に血管内皮増成因子であるVEGF陽性細胞を認めた(図2-a)。腫瘍血管近傍に集簇したVEGF陽性細胞の存在を確認出来た(図2-b)。さらに血管内皮細胞特異的抗原の1つであるCD-34陽性細胞が筋腫間質細胞内に散在性あるいは管腔様構造を形成して存在していた(図3-a, b)。なお、微小筋腫と通常型筋腫の違いを表1に示す。

電顕的所見

1. 内皮の遊走

筋腫細胞間内の細胞成分の少ない間質内にみら

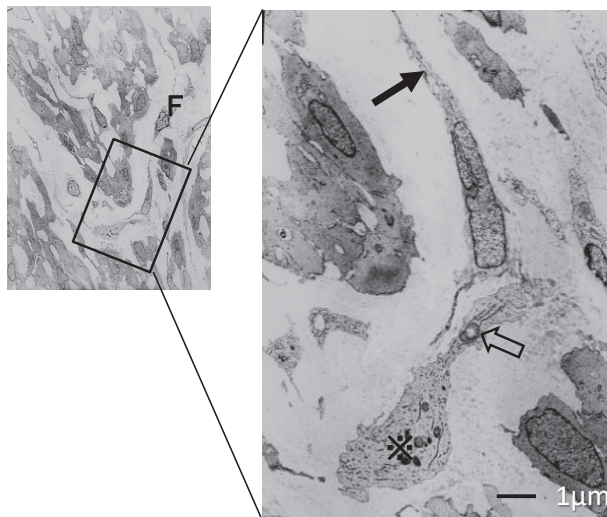


図4 筋腫細胞集団とその拡大
筋腫間質内の血管内皮細胞(E)
葉状仮足(※), アクチンフィラメント(⇒), リトラクションファイバー(→)

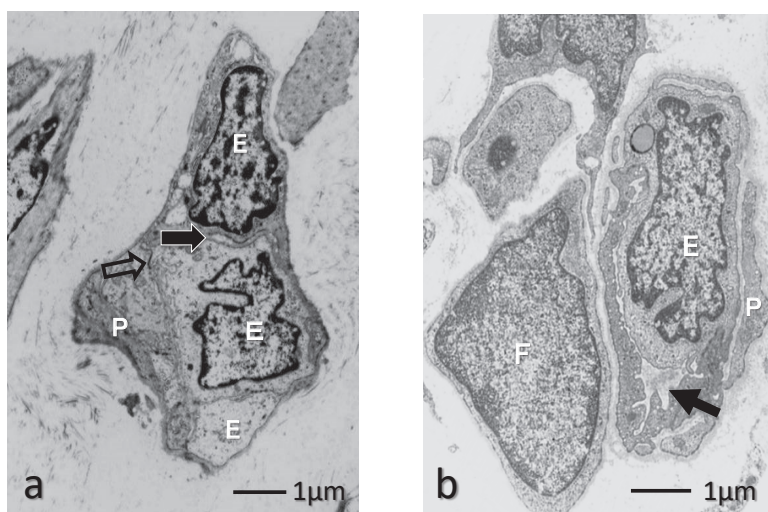


図5 管腔形成初期
内皮細胞(E)と周皮細胞(P) Desmosome(⇒)と内腔の形成(→)

れるリトラクションファイバーを有す血管内皮細胞と発達した葉状仮足を広げ、胞体内に20nm程の粒子が数珠状に10数個に連なったアクチンフィラメントが存在し、波状で不規則な形状の胞体辺縁を示す細胞が接していた。(図4)。一方、内皮細胞周囲に少数の線維芽細胞が存在するが炎症性細胞の浸潤は認めなかった(図4)。

2. 管腔形成

幼弱な細胞が高電子密度の細胞間結合で連結した状態の横断面がみられた。細胞間には約60nm程の狭いスリット状の管腔と内皮細胞の管腔面には多数の小窩を認めた。周囲間質に線維芽細胞はみられなかった(図5-a)。内皮細胞の管腔面には多数の小窩を認め内腔は約120nm程に拡大し、

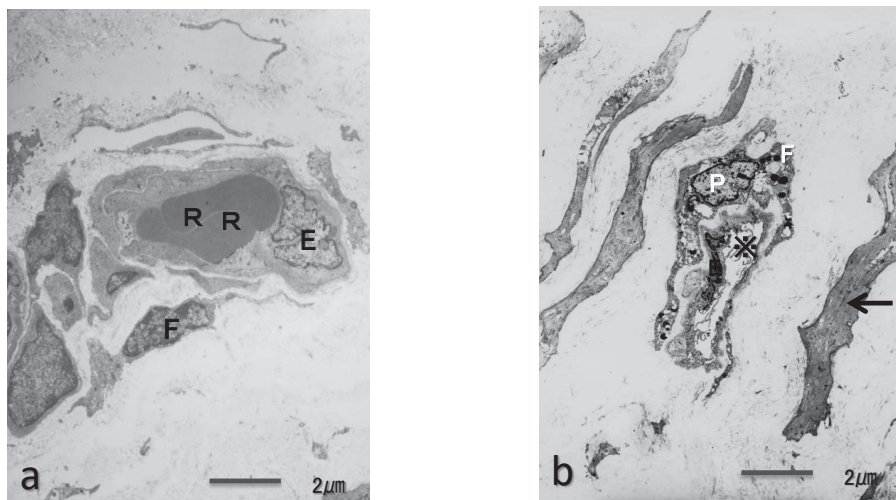


図6 新生血管と変性腫瘍血管

- a: 赤血球の存在する新生腫瘍血管, 幼弱な内皮細胞 (E), 赤血球 (R), 線維芽細胞 (F)
 b: 変性した腫瘍血管; 周皮細胞の変性 (P) 筋腫細胞の変性 (⇒) がみられる。内腔 (*)

管腔形成段階を示していた。周囲間質の線維芽細胞はやや萎縮していた (図5-b)。

さらに、内皮細胞核に不規則な切れ込みのある幼弱な内皮細胞よりなる腫瘍血管の内腔には赤血球が存在し、血管周囲の線維芽細胞は正常像を示し、近傍に存在する腫瘍血管内腔は未拡大であった (図6-a)。また、粗な間質内に萎縮変性した筋腫細胞と腫瘍血管が存在するも、拡大した腫瘍血管内腔に血球は存在せず、内皮細胞および周皮細胞は萎縮し、胞体には空胞がみられた (図6-b)。

考 察

1. 組織学的所見

有経時における微小筋腫との直径1cmの筋腫を比較した結果より通常型比較して微小筋腫は血管密度が低いことから腫瘍性増殖能は低い状態であると考えられる。一方で、免疫染色において筋腫細胞及び線維芽細胞の一部にVEGF陽性反応を示す細胞が、また、CD-34陽性細胞血管のみならずCD-34陽性細胞が間質内に存在したことは増殖傾向を示す所見であり、両者は相反している。これについては、子宮筋腫腫瘍内に新生と壊死とがすることと深く関連するものである。

2. 脈管形成

浸潤転移のない子宮筋腫の腫瘍血管研究は血管

の分布と構築に関するもので、特に微小筋腫の腫瘍血管構造に関する報告はわずかである¹⁴⁻¹⁸⁾。今回微小筋腫をTEMと免疫染色とで検索した結果、腫瘍血管の存在と形成過程を明らかにすることが出来た。さらに、血管形成過程の初期である出芽遊走と管腔形成について考察を加える。

1) 出芽遊走について

筋腫細胞及び線維芽細胞の一部にVEGF陽性細胞が存在する事を証明できたことは、VEGFに既存の毛細血管皮細胞が反応して内腔を拡大し、また細胞形態は肥大し細胞小器官が活性化して胞体が基底側方向に突出出芽したと考える。そして間質内に血管内皮細胞の特異抗原の1つであるCD-34陽性細胞が存在する事に加えてアクチンフィラメントを有する葉状仮足を形成した細胞が単独で存在する所見は血管内皮細胞が血管壁から遊走移動した事を示唆している¹⁹⁾。

2) 管腔形成について

間質に遊走した複数の内皮細胞が胞体を連結し高電子密度の細胞間結合をして約50nm程の狭いスリット状の管腔を形成した。この内皮細胞の管腔面には多数の表面小窩が存在しておりこのスリット状の管腔を血球が通過することは出来ないが管腔形成の準備を示唆する所見である¹⁹⁾。さらに新生した腫瘍血管内に赤血球を認める電顕像は

微小筋腫内に血液が循環し筋腫細胞及び線維芽細胞に栄養が供給されている事を示唆している。また、直径1 cm以上の筋腫において従来ある血管から脈管の形成がなされる発生型の腫瘍血管形成様式であるのに対し、微小筋腫では内皮細胞が互いに連結して他の血管に到着しスリット状管腔が広がることにより血液が流入して新しい血管網が完成する血管新生型であると結論する。

3) 腫瘍血管と腫瘍の組織構造について

筋腫細胞近傍の間質に形成された腫瘍血管は筋腫細胞より分泌されるVEGF等の因子により高度な構造と増殖能を有する血管が形成され、腫瘍細胞を増殖させる、一方筋腫細胞より離れた間質に存在する腫瘍血管ではVEGFの作用も低いと考えられ^{20,21)}、ゆえに構造自体がもろく、変性壊死に陥りやすく結果として周囲の筋腫細胞及び線維芽細胞に栄養障害が生じて線維化が進行すると推測される。

結 論

有経時の通常型組織像を呈する微小壁内筋腫をTEMと免疫染色とを用いてに検索し以下の結論を得た。

1. 微小壁内筋腫には血管新生型の腫瘍血管が存在する。

2. 腫瘍血管形成過程は、筋腫細胞及び線維芽細胞が有するVEGFに反応した内皮細胞が葉状仮足を形成して間質内を遊走移動し、胞体を連結結合させて腫瘍血管を形成した。

3. 腫瘍血管の存在とその形成状況により腫瘍組織の構造と形態が変化する。

以上より、腫瘍血管存在の存在が筋腫細胞と線維芽細胞を含む細胞外マトリックスに栄養と酸素を供給し、その結果微小筋腫が増大するものと考えられた。

本研究の要旨は第69回日本産科婦人科学会学術集会(2017年 仙台市)および第29回産科婦人科学会学術大会福島県地方部会(2018年 福島市)において発表した。

本研究における公開すべき利益相反はありません。

文 献

- 1) 小西郁生：症例から学ぶ婦人科腫瘍学 3) 子宮体病変子宮筋腫. 日産婦誌 57; N204-N206 2005.
- 2) Maruo, T., Ohara, N., Wang, J. and Matsuo, H. : Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. Hum. Repro. Update. 10; 207-220 2004.
- 3) Ishikawa, H., Ishi, K., Serna, V. A., Kakazu, R., Bulun, S. E. and Kurita, T. : Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma. Endocrinol. 151; 2433-2442 2010.
- 4) Ferrara, N. and Davis-Smyth, T. : The biology of vascular endothelial growth factor. Endocrine Rev. 18; 4-25 1997.
- 5) Stewart, E. A., Friedman, A. J., Peck, K. and Nowak, R. A. : Relative overexpression of collagen type I and collagen type III messenger ribonucleic acids by uterine leiomyomas during the proliferative phase of the menstrual cycle. J. Clin. Endocrinol Metab. 79; 900-906 1994.
- 6) Rogers, R., Norian, J., Malik, M., Christman, G., Abu-Asab, M., Chen, F., Korecki, C., Iatridis, J., Catherino, W. H., Tuan, R. S., Dhillon, N., Leppert, P. and Segars, J. H. : Mechanical homeostasis is altered in uterine leiomyoma. Am. J. Obstet. Gynecol. 198; 474.e1-11 2008.
- 7) Walocha, J. A., Litwin, J. A. and Miodoński, A. J. : Vascular system of intramural leiomyomata revealed by corrosion casting and scanning electron microscopy. Hum. Reprod. 18; 1088-1093 2003.
- 8) 栗田口康一：子宮筋腫の血管構築に関する研究. 日医大誌 49; 225-232 1982.
- 9) 山田耕司：子宮 B7 嚢胞・腫瘍様増殖・腫瘍. 現代産科婦科学大系 第2巻 A 臨床病理学 I. 鈴木雅州, 坂元正一, 倉智敬一編 113-115, 中山書店 東京 1976.
- 10) Dubuisson, J. B., Fauconnier, A., Chapron, C., Kreiker, G. and Nørgaard, C. : Second look after laparoscopic myomectomy. Hum. Repro. 13; 2102-2106 1998.
- 11) Farrer-Brown, G., Beilby, J. O. W. and Tarbit, M. H. : The blood supply of the uterus, 1. Arterial vasculature. J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw. 77; 673-81 1970.
- 12) Gustavsson, I., Englund, K., Faxén, M., Sjöblom, P., Lindblom, B. and Blanck, A. : Tissue differences but limited sex steroid responsiveness of c-fos and c-jun in human fibroids and myometrium. Mol. Hum. Reprod. 6; 55-59

- 2000.
- 13) Andersen, J., Grine, E., Eng, C. L., Zhao, K., Barbieri, R. L., Chumas, J. C. and Brink, P. R. : Expression of connexin-43 in human myometrium and leiomyoma. *AM. J. Obstet. Gynecol.* **169** : 1266-1276 1993.
 - 14) Forssman, L. : Blood flow in myomatous uteri as measured by intraarterial ¹³³Xenon. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* **55** : 21-24 1976.
 - 15) Gentry, C. C., Okolo, S. O., Fong, L. F., Crow, J. C., Maclean, A. B. and Perrett, C. W. : Quantification of vascular endothelial growth factor-A in leiomyomas and adjacent myometrium. *Clin. Sci.* **101** : 691-695 2001.
 - 16) Pollard, T. D. and Borisy, G. G. : Cellular motility driven by assembly of actin filaments. *Cell* **112** : 453-465 2003.
 - 17) Stradal, T. E., Rottner, K., Disanza, A., Confalonieri, S., Innocenti, M. and Scita, G. : Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends. Cell Biol.* **14** : 303-311 2004.
 - 18) Lefebvre, G., Vilos, G., Allaire, C., Jeffrey, J., Arneja, J., Birch, C., Fortier, M. and Wagner, M. S. : The management of uterine leiomyomas. *J. Obstet. Gynaecol. Can.* **25** : 396-418 2003.
 - 19) Sugihara, K., Nishiyama, K., Fukuhara, S., Uemura, A., Arima, S., Kobayashi, R., Köhn-Luque, A., Mochizuki, N., Suda, T., Ogawa, H. and Kurihara, H. : Autonomy and non-autonomy of angiogenic cell movements revealed by experiment-driven mathematical modeling. *Cell Rep.* **13** : 1814-1827 2015.
 - 20) 福原茂朋, 望月直樹 : 血管内皮細胞と接着・近接する細胞との相互制御生化学 **82** ; 290-301 2010.
 - 21) 高橋知子 : 血管新生に関わる血管内皮細胞増殖シグナル伝達系. *東北医科薬科大学研究誌* **63** ; 15-20 2016.
- 著者への連絡先：小林徳男, (963-8611) 郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学生体構造学講座口腔組織学分野
Reprint requests : Tokuo KOBAYASHI, Division of Oral Histology, Department of Morphological Biology, Ohu University School of Dentistry
31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan