

学位論文（博士）

Establishment of a 3D spheroid culture system to evaluate the
responsiveness of uterine leiomyoma cells to female hormones

（女性ホルモンに反応性を有する子宮筋腫平滑筋細胞の
3D スフェロイド培養系の確立）

氏名 坂井 宜裕

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 産科婦人科学講座

令和 7 年 6 月

目次

【要旨】	2
【研究の背景と目的】	3
【方法】	5
【結果】	13
【考察】	18
【結語】	20
【謝辞】	21
【参考文献】	22

【要旨】

背景：子宮筋腫細胞は *in vivo* の異種移植モデルにおいては女性ホルモンに反応し増殖するが、*in vitro* でのホルモン反応性については平面培養系・三次元培養系ともに統一見解は得られていない。また子宮筋腫検体の約 70%で *MED12* 遺伝子の変異が検出されるが、*MED12*変異を有する *MED12*(+)筋腫と有さない *MED12*(-)筋腫の間で女性ホルモンへの反応性に差異があるかは検討されていない。そこで、本研究では *in vitro* においてエストロゲン (E) およびプロゲステロン (P) に反応性を有する培養系の確立を目的とし、さらに *MED12*(+)と *MED12*(-)筋腫の間で E および P への反応性に差異があるかを検討した。

方法：患者の同意を得て採取した子宮筋腫組織をコラゲナーゼで 6 時間処理し、単一細胞に分離して初代培養に供した。この子宮筋腫細胞は約 80%が α -SMA 陽性の平滑筋細胞であり、E と P の受容体を有することを免疫染色で確認した。女性ホルモンへの反応性を検討するため、細胞を 2 日間前培養した後、下記の培養系において次のようにホルモン添加培養を行った。① 平面培養系では、コントロール、E のみ、P のみ、E+P の 4 群に分け 7 日間培養し、細胞数を計測した。② 三次元培養系では、細胞を低接着性の 96 ウェルプレートで培養し、24 時間後にスフェロイドの形成を確認した後、コントロール、E のみ、P のみ、E+P、E+P+選択的プロゲステロン受容体修飾薬 (SPRM) の 5 群に分け 7 日間培養し、スフェロイドの断面積を測定した。

結果：① 平面培養では *MED12*(+)および *MED12*(-)筋腫とも、いずれのホルモンを添加しても細胞は増殖しなかった。② 三次元培養では *MED12*(+)および *MED12*(-)筋腫とも、E+P および P 添加群でスフェロイドは縮小せず、その成長が維持された。一方、コントロール、E のみ、E+P+SPRM 群ではスフェロイドは縮小し、組織学的に平滑筋細胞が縮小していることが示唆された。従って、P が子宮筋腫スフェロイドの成長を維持していること、

および MED12(+)と MED12(-)筋腫間では P の効果に差は無い事が明らかになった。一方、MED12(+)筋腫でのみ、P を添加した E+P と P 群のスフェロイドにおいてトリクローム染色により膠原線維が検出された。この結果は、*in vivo* における筋腫サブタイプ間でのコラーゲン線維産生能の違いを、*in vitro* において再現している可能性がある。

結論：子宮筋腫平滑筋細胞の培養において、プロゲステロンに反応性を有する三次元スフェロイド培養系を確立した。

【研究の背景と目的】

子宮筋腫は平滑筋細胞（SMC）に由来し、婦人科腫瘍の中で最も発症頻度の高い疾患である¹。子宮筋腫は良性疾患ではあるが、重度の月経痛や貧血を引き起こし、不妊症や流産の原因にもなるため、女性の quality of life を損なう^{1, 2}。子宮筋腫の根治には子宮摘出や子宮筋腫核出といった手術療法が必須であるが、昨今のライフスタイルの変化による晩婚化および出産の高年齢化に伴い、子宮温存が可能な薬剤療法への要望が高まっている。有効な薬剤の開発には子宮筋腫の病態の解明や薬効の検証が必要であり、そのためには *in vivo* の子宮筋腫の特性を反映したモデル系が必要である。

子宮筋腫にはこれまでに、その発生に関わるドライバー変異として Mediator complex subunit 12 (*MED12*) 遺伝子のミスセンス変異がみつかっており、この変異は民族にかかわらず約 70%の子宮筋腫検体で検出される^{3-10, 12}。したがって、子宮筋腫は、*MED12* 遺伝子に変異のある MED12(+)筋腫と、変異のない MED12(-)筋腫の 2 つのサブタイプに分類される¹¹。近年、これらの筋腫サブタイプ間では膠原線維量や細胞成分における組織学的組成が異なることが明らかになっている¹¹。我々も、MED12(+)筋腫は膠原線維を豊富に含み、約 60%の SMC と 40%の線維芽細胞（FB）で構成されているのに対し、MED12(-)

筋腫は膠原線維量が低く、約 80%の SMC と 20%の FB で構成されていることを報告した¹²。また、患者の子宮筋腫検体から分離した細胞をマウスの腎被膜下に移植する異種移植モデル系を用いた研究により、SMC と FB は女性ホルモンに対する反応性が異なり、SMC の増殖にはエストロゲン (E) とプロゲステロン (P) の両方が必要であるのに対し、FB は E だけで増殖することが示されている^{11, 13}。臨床研究においては、E と P の分泌を抑制するゴナドトロピン放出ホルモンアナログ (GnRHa) の筋腫縮小効果が、MED12(+)筋腫よりも MED12(-)筋腫で高いことが明らかとなり¹⁴、これらの筋腫サブタイプ間では EP 消退の効果が異なることが示されている。これらの知見から、各筋腫サブタイプは女性ホルモンへの反応性がそれぞれ異なると予想される。

これまでに、子宮筋腫細胞における女性ホルモンへの反応性に関する研究は、その多くが平面培養系で行われてきた。それらの先行研究には、子宮筋腫細胞は平面培養において女性ホルモンに反応して増殖するといった報告¹⁵⁻¹⁸と、その反対に増殖しないといった報告¹⁹⁻²¹があり、統一した見解が得られていない。さらに、先行研究の多くは、筋腫サブタイプの概念がまだなかったため、使用した筋腫検体のサブタイプは区別されておらず、結果がどちらの筋腫サブタイプによるものであるかは不明である。また、子宮筋腫細胞の平面培養では、培養過程において SMC が選択的に失われ、培養細胞が徐々に FB で占められることが報告されている^{22, 23}。したがって、先行研究における女性ホルモンの効果は、SMC と FB のどちらの細胞によるものかは判らない。加えて、平面培養下では、子宮筋腫細胞における、エストロゲン受容体 (ESR1) およびプロゲステロン受容体 (PGR) の発現が急速に低下することおよび、ゲノムワイドな遺伝子発現プロファイルが変化すること等が報告されている^{24, 25}。このように、平面培養では、*in vivo* における子宮筋腫細胞の本来の特性を維持することは困難であることが明らかになってきている。子宮筋腫の 3D スフェロ

イド培養系は平面培養系に比べて、*in vivo* の特性をより正確に反映しているとされるが²⁶⁻
²⁸、女性ホルモンへの反応性や、筋腫サブタイプ間における反応性の差異について検討した
報告はこれまでにない。

本研究では、子宮筋腫細胞における P の効果をさらに検証するため、PGR の機能を阻害
する選択的プロゲステロン受容体修飾薬 (SPRM) であるウリプリスタル酢酸 (UPA)²⁹ の
効果も検討した。これまでに、子宮筋腫細胞の平面培養において、UPA は、アポトーシス
を誘導して細胞数を減少させること³⁰、膠原線維の産生を減少させること³¹、および血管
内皮細胞増殖因子とその受容体の発現を抑制すること³²が報告されている。しかしながら、
これらの研究においても、使用した子宮筋腫細胞については、筋腫サブタイプが区別され
ておらず、SMC の割合、および女性ホルモン受容体の発現は確認されていない。

そこで本研究では、MED12(-)および MED12(+)筋腫のそれぞれにおいて、SMC 比率お
よび女性ホルモン受容体の発現を確認した子宮筋腫細胞を用いて、平面培養および 3D ス
フェロイド培養を行い、子宮筋腫細胞の増殖における女性ホルモンの効果を検討した。そ
の結果、3D スフェロイド培養により、女性ホルモンへの反応性を評価できる培養系が確立
された。

【方法】

1. 患者の組織検体

本研究では、子宮筋腫の手術を受けた日本人の患者 18 人から採取した子宮筋腫検体を
解析に用いた (表 1)。MED12(-)筋腫は、34~51 歳の女性 9 名 (平均±標準偏差: 45.9±5.3
歳) から、MED12(+)筋腫は、32~54 歳の女性 11 名 (46.0±7.1 歳) から採取された。こ
のうち 2 名の患者からは、MED12(-)と MED12(+)筋腫の両方が提供された。いずれの患

者も、女性ホルモンあるいは GnRHa による治療は受けていない。

ULM ID	MED12 mutation	Age	Major axis × minor axis (mm × mm)	Type	Surgical method	Collagen fiber rate (%)	SMC rate (%)
MED12m(-)-ULM							
Monolayer-culture							
#44	-	46	45×39	Submucosal	TLH	24.5	81.8
#47	-	48	67×53	Intramural	TLH	16.6	89.2
#62-1	-	50	77×64	Intramural	TLH	19.1	76.8
#63	-	48	192×78	Intramural	AT	16.1	85.5
Mean±SD		48.0±1.6				19.1±3.8	83.3±5.3
Spheroid-culture							
#65	-	46	71×70	Submucosal	RAH	22.1	75.3
#68-1	-	51	67×58	Intramural	RAH	17.9	82.7
#69	-	49	37×27	Intramural	TLH	20.6	89.0
#73	-	34	48×44	Intramural	LM	11.1	87.1
#86	-	41	34×30	Submucosal	LM	4.7	87.7
Mean±SD		44.2±6.8				15.3±7.3	84.4±5.6
Total							
Mean±SD		45.9±5.3				17.0±6.0	83.9±5.1
MED12m(+)-ULM							
Monolayer-culture							
#52	c.131G>A	37	36×36	Intramural	LM	27.5	69.6
#55	c.130G>A	44	42×29	Intramural	TLH	38.4	65.7
#60	c.130G>A	49	42×40	Submucosal	RAH	52.6	69.8
#62-2	c.131G>T	50	39×38	Intramural	TLH	43.1	62.7
Mean±SD		45.0±7.2				40.4±12.7	67.0±3.4
Spheroid-culture							
#68-2	IVS1-8T>A	51	35×32	Intramural	RAH	43.1	67.4
#70	c.[130G>A; 131G>A]	49	42×36	Intramural	AT	56.9	62.7
#72	c.126_149del24	32	90×70	Subserous	LM	41.0	62.2
#74-1	c.131G>A	39	100×71	Intramural	LM	29.7	-
#74-2	c.131G>A	39	28×23	Intramural	LM	43.1	54.0
#76	c.131G>T	52	23×15	Intramural	AT	25.1	59.0
#82-1	+	54	25×25	Intramural	RAH	44.9	62.7
#82-2	c.124_144del21	54	35×27	Intramural	RAH	46.0	68.6
#84	c.130G>A	48	31×20	Intramural	RAH	47.8	68.6
Mean±SD		46.4±7.9				42.0±9.5	63.2±5.1
Total							
Mean±SD		46.0±7.1				41.5±9.4	64.4±4.8

表 1. 本研究の平面培養およびスフェロイド培養で使した子宮筋腫検体の基本的な情報

略語： AT, 腹式子宮全摘術；LM, 筋腫核出術；RAH, ロボット支援下子宮全摘術；

SMC, 平滑筋細胞；TLH, 腹腔鏡下子宮全摘術

*欠失変異を有するが塩基配列を決定できなかった検体。

膠原線維率（%）と SMC 率（%）は既報検体と同様に計算した（文献#12）。

本研究は、当院の医学研究倫理審査委員会の承認を得ている。検体を採取する前にすべての患者から書面によるインフォームド・コンセントを得て、採取した組織検体は不可逆的に匿名化して研究に使用した。ヒトの組織検体を取り扱う全ての実験はヘルシンキ宣言の教義に則って行われた。

2. ゲノム DNA の抽出および *MED12* 遺伝子領域のゲノム配列決定

子宮筋腫検体からのゲノム DNA の抽出は以前の報告と同様に行った³³⁻³⁷。組織検体をプロテインナーゼ K で処理した後、フェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行い、ゲノム DNA を抽出した。

子宮筋腫検体における *MED12* 遺伝子エクソン 2 領域の塩基配列の決定は、以前の報告と同様に行った^{3, 8-10}。10ng のゲノム DNA をテンプレートとして用い、1.25 ユニットの DNA ポリメラーゼ (PrimeSTAR GXL) と、5'-GCCCTTTCACCTTGTTTCCTT-3' および 5'-TGTCCCTATAAGTCTTCCCAACC-3' のプライマーセットにより、98°C で 10 秒、60°C で 15 秒、68°C で 20 秒による 35 サイクルの反応条件で、PCR を行った。得られた PCR 産物については、QIAquick PCR 精製キットで精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用い、サンガーシーケンサー (ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer) にて配列を決定した。*MED12* 変異の有無は、得られたシーケンスのクロマトグラムを基に判定した。

3. 子宮筋腫の初代培養細胞の調整と、平面培養および 3D スフェロイド培養

初代培養細胞の調製は栗田らの方法³⁸に準じて行った。子宮筋腫組織を 1~2 mm 角に細切し、5 倍量のコラゲナーゼ-DNase 溶液 (1.5 mg/mL コラゲナーゼ Type I、10

$\mu\text{g/mL}$ DNase I、および 1% 抗生物質-抗真菌剤を添加した HBSS 溶液)を加え、250 rpm で振とうし、37°Cで 6 時間インキュベートした。得られた溶液を 100 μm のセルストレーナーで濾過して細胞のデブリスを除去し、単一細胞にした子宮筋腫細胞の細胞数を TC20 自動セルカウンターにて計測した。子宮筋腫細胞を 10cm のコラーゲンコートディッシュに 2×10^6 細胞/dish の密度で播種し、10% FBS、2mM L-グルタミン、および 1% 抗生物質-抗真菌剤を加えた DMEM/F12 培地を用いて、5%CO₂、95%空気、37°Cの条件で培養した。

平面培養およびスフェロイド培養を含む全ての初代培養細胞について、培養 3 日目に免疫化学染色を行い、培養細胞における SMC の割合および、女性ホルモン受容体である ESR1 および PGR の発現を調べた。免疫染色の方法は後述の方法 5.に記載した。培養細胞は、ほぼ全て vimentin 陽性である間葉系の細胞であった (図 1B)。 α -SMA 陽性である SMC (図 1B) の割合は、MED12(-)筋腫で平均 $83.7\% \pm 7.6\%$ 、MED12(+)筋腫で平均 $82.7\% \pm 6.7\%$ であり、本研究における子宮筋腫細胞の大部分は SMC であった。PGR 陽性細胞 (図 1C) の割合は MED12(-)筋腫で $36.5\% \pm 13.4\%$ 、MED12(+)筋腫で $47.2\% \pm 11.2\%$ で、ESR1 陽性細胞 (図 1D) の割合は MED12(-)筋腫で $16.7\% \pm 4.4\%$ 、MED12(+)筋腫で $24.7\% \pm 15.3\%$ であった。各筋腫サブタイプ間で α -SMA、PGR、および ESR1 陽性細胞の割合に有意差はなかった。

平面培養では、培養 2 日目に初代培養細胞を 0.5%ゼラチンでコートした 12 ウェルプレートへ継代した。播種した細胞の密度は、MED12(-)筋腫では 2×10^5 細胞/well、MED12(+)筋腫では 5×10^5 細胞/well とした。継代 24 時間後から、子宮筋腫細胞を E+P、P 単独 (P)、E 単独 (E)、E および P を添加しないコントロール (CTRL) の 4 群に分けて 7 日間ホルモン処理を行った (図 1A)。

3D スフェロイド培養では、初代培養細胞を培養 2 日目に低接着性の 96 ウェルプレートへ 5×10^4 細胞/well の密度で継代した。継代から 24 時間後にはスフェロイドの形成が確認された (図 2B)。このスフェロイドを継代 24 時間後から、E+P、P、E、CTRL、および E+P+SPRM の各ホルモン群にわけて 7 日間処理した (図 2A)。SPRM にはウリプリスタル酢酸 (UPA) を使用した。UPA はあすか製薬よりご提供いただいた。スフェロイドは 7 日間のホルモン処理後、一部は組織学的解析用に、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で固定し、パラフィン包埋した。

子宮筋腫細胞は、平面培養および 3D スフェロイド培養とも、2% charcoal stripped FBS、2mM L-グルタミン、および 1% 抗生物質-抗真菌剤を加えた DMEM/F12 培地を用いて、37°C、5%CO₂、95%空気の条件で培養した。添加した E、P、および SPRM の最終濃度はそれぞれ 10^{-8} M、 10^{-6} M、および 10^{-7} M とした。培地は一日おきに交換した。

4. ホルモン反応性の評価

平面培養における女性ホルモンの効果は、細胞増殖アッセイにて評価した³⁹⁻⁴⁰。女性ホルモン添加培養 7 日後に、子宮筋腫細胞をトリプシン処理して単一細胞懸濁液とし、細胞数計測機 Vi-CELL XR を用いて生細胞数を各ウェル (12 ウェルプレート) について測定した。細胞数の測定は、MED12(-)および MED12(+)筋腫とも各 4 検体を用いて、各筋腫サブタイプの各添加条件について 3 ウェルずつ計測し、平均値±SD で示した。

3D スフェロイド培養における女性ホルモンの効果は、ホルモン添加培養 7 日後のスフェロイドのサイズ、および組織学的形態にて評価した。スフェロイドのサイズは、検体あたり 6 個のスフェロイドを用い、各スフェロイドの最大断面積を Keyence BZ-X710 顕微

鏡で撮影した像を基に ImageJ で測定し、その平均値として算出した。5 検体の MED12(-) 筋腫および 9 検体の MED12(+)筋腫についてスフェロイドサイズを測定し、平均値±SD で評価した。統計学的検定は Mann-Whitney 検定を使用した（有意差 p 値<0.05）。

5. 平面培養および 3D スフェロイド培養における子宮筋腫細胞の蛍光免疫染色

平面培養では、継代後 1 日目に子宮筋腫細胞の免疫細胞化学染色を以前報告した方法に従って行った³³。子宮筋腫細胞を 4% PFA で 15 分間固定し、0.5% triton-X100 で透過処理後、ブロッキング溶液（10%FBS および 1%BSA を添加した PBST 溶液）で 60 分間ブロッキングした後、一次抗体として抗 α -SMA モノクローナル抗体（Abcam、ab_262054、1:500 希釈）、抗 vimentin モノクローナル抗体（Abcam、ab_10562134、1:1000 希釈）、抗 ESR1 モノクローナル抗体（Abcam、ab_1310196、1:500 希釈）、および抗 PGR モノクローナル抗体（Abcam、ab_443421、1:500 希釈）を用いて 4°Cで一晩インキュベートした。二次抗体として Alexa Fluor 488 conjugated 抗マウス IgG（Abcam、1:1000 希釈）あるいは Alexa Fluor 594 conjugated 抗ウサギ IgG（Abcam、1:1000 希釈）を用いて遮光条件下で 45 分間インキュベートし、DAPI にて核を染色した。SMC（ α -SMA 陽性細胞）、PGR および ESR1 陽性細胞の割合は、標本毎に無作為に選んだ倍率 200 倍の 6 つの視野において ImageJ で測定し、平均値±SD で表した。

3D スフェロイド培養では、ホルモン添加培養 7 日後に 4% PFA で固定し、パラフィン包埋ブロックを作製した。スフェロイドの免疫組織化学染色は以前報告した方法に従って行った^{8, 12, 41, 42}。スフェロイドのパラフィン切片（5 μ m）を脱パラフィンし、一次抗体として抗 α -SMA モノクローナル抗体および、抗 vimentin モノクローナル抗体（Abcam、ab_10562134、1:1000 希釈）と 4°Cで一晩インキュベートし、二次抗体として Alexa Fluor

488 conjugated 抗マウス IgG おおよび、Alexa Fluor 594 conjugated 抗ウサギ IgG を用いて遮光条件下で 45 分間インキュベートした。核は DAPI で染色した。

6. 子宮筋腫細胞の 3D スフェロイド標本におけるトリクローム染色

3D スフェロイドにおけるコラーゲン線維は、トリクローム染色キット (ScyTec Laboratories) を用いて染色した^{8, 12}。スフェロイドのパラフィン切片 (5 μ m) を脱パラフィンし、ブアン溶液で固定し、ワイゲルト鉄ヘマトキシリンで 10 分間染色し、Biebrich 緋酸フクシン溶液に 10 分間浸漬し、リンモリブデン酸で 15 分間染色し、アニリンブルーで 15 分間染色し、1%酢酸に 1 分間浸漬した。各検体あたり 6 個のスフェロイドを用いて、スフェロイド毎に無作為に選んだ倍率 200 倍の 5 視野について青く染色されたコラーゲン線維の面積を ImageJ で測定し、平均値を算出した。MED12(-)および MED12(+)筋腫とも 3 検体について測定し、コラーゲン線維の面積比 (%) は平均値 $\pm$ SD で示した。

7. 子宮筋腫細胞の 3D スフェロイド標本における TUNEL 染色

3D スフェロイドにおけるアポトーシス細胞は、In Situ アポトーシス検出キット (Takara) を用いて TUNEL 染色により検出した。スフェロイドのパラフィン切片 (5 μ m) を脱パラフィンし、20 μ g/mL プロテイナーゼ K で 15 分間透過処理し、3% H_2O_2 による 5 分間の処理で内在性ペルオキシダーゼをブロックした。抗 FITC-HRP 標識抗体を 37°C で 30 分間インキュベートし、ジアミノベンジジンにより発色させ、メチルグリーンで核を染色した。TUNEL 陽性細胞のコントロールとして、キットに含まれたラット乳腺の組織標本を使用した。MED12(-)および MED12(+)筋腫とも各 3 検体を用いて、アポトーシス細胞の有無について検討した。

8. 統計学的解析

Kruskal-Walis 検定および Mann-Whitney 検定を用いてデータの有意差について解析した。p 値 <0.05 を統計的有意差とみなした。全ての統計解析は R ソフトウェアプログラム (Ver 3.6.1) を用いて行った。

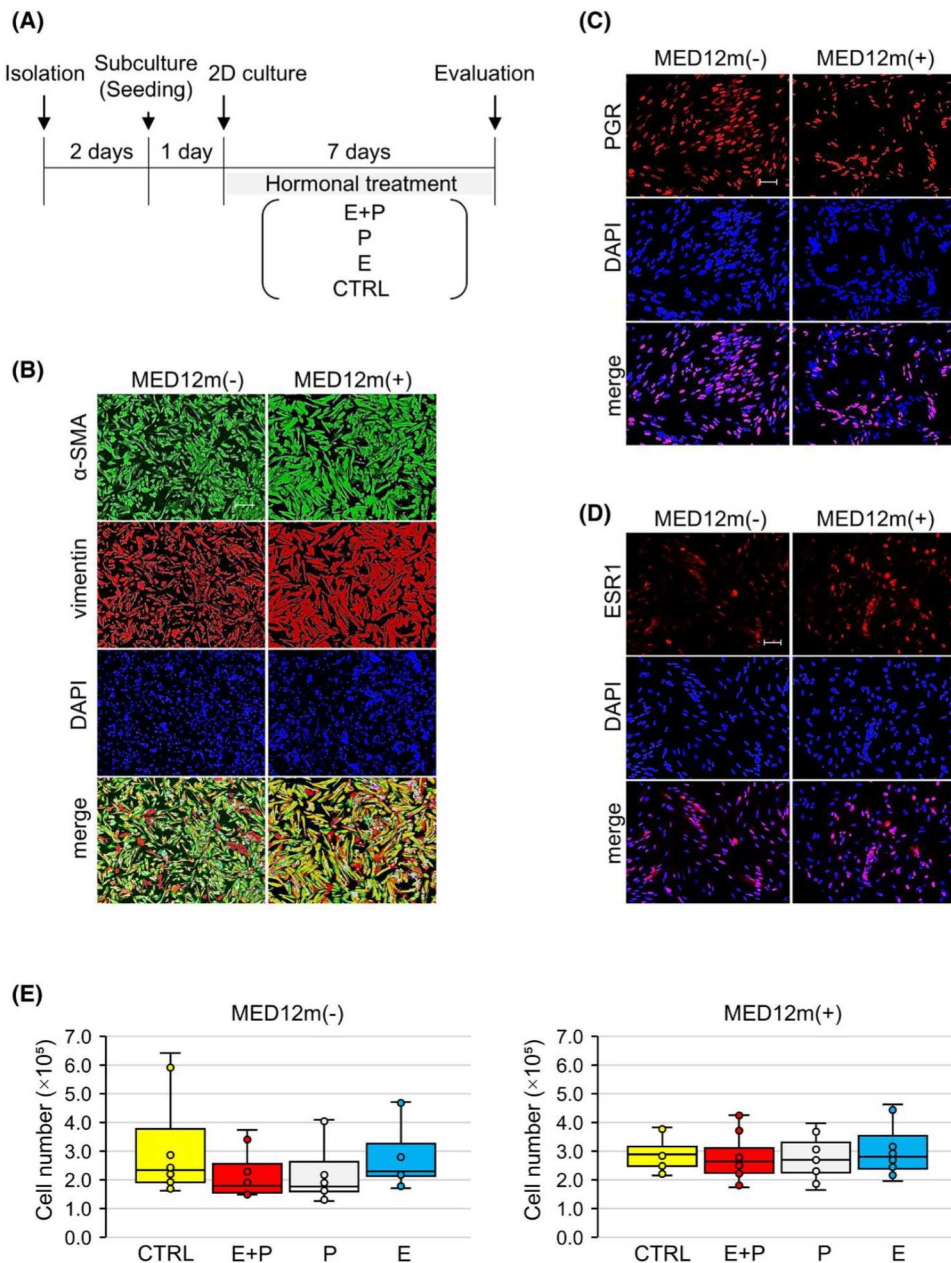


図1 平面培養における子宮筋腫細胞への女性ホルモンの効果

(A) 女性ホルモン添加培養の概要：培養2日目の子宮筋腫細胞を継代し，継代1日後からエストロゲン（E）＋プロゲステロン（P）（E+P），P単独（P），E単独（E），およびコントロール（CTRL）の4群に分け7日間処理した。EおよびPは最終濃度 10^{-8} M および 10^{-6} M で添加した。女性ホルモンへの反応性は細胞増殖アッセイで評価した。(B, C, D) MED12(-)およびMED12(+)筋腫細胞の培養3日目における免疫染色像。スケールバー＝ $50\mu\text{m}$ 。(B) α -SMA（緑）およびvimentin（赤）の二重染色（C）PGR染色，（D）ESR1染色。いずれもDAPIで核染色した。(E) 各筋腫サブタイプにおける細胞増殖アッセイの結果。MED12(-)およびMED12(+)筋腫とも各4検体を用い，各添加条件において3ウェルずつ培養し，平均の細胞数を算出した。箱ひげ図は平均値 $\pm$ SDで示した。

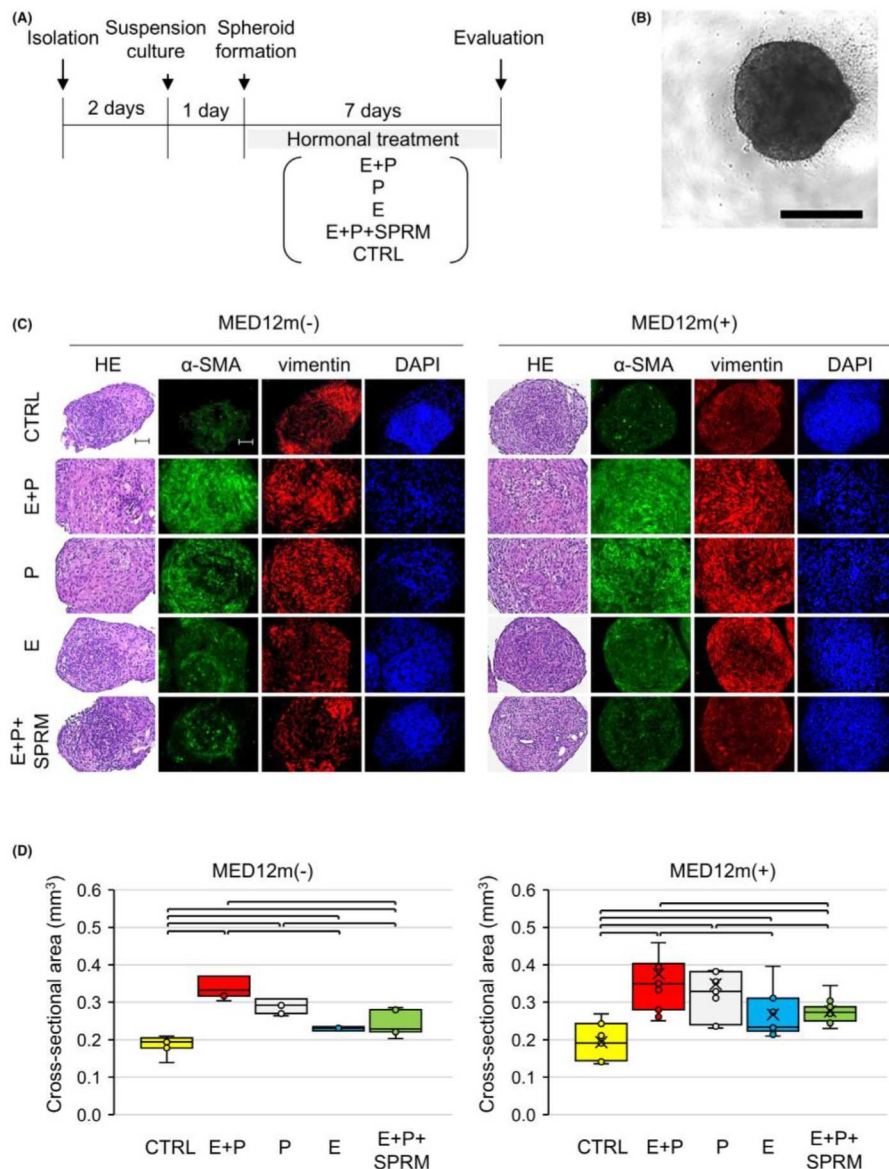


図2 子宮筋腫細胞の3Dスフェロイド培養における女性ホルモンの効果

(A) 女性ホルモン添加培養の概要：培養2日目に継代した子宮筋腫細胞は、24時間以内にスフェロイドを形成した。形成したスフェロイドをE+P, P, E, CTRL, E+P+SPRMの5群に分けて7日間処理した。E, P, SPRMは最終濃度 10^{-8}M , 10^{-6}M , 10^{-7}M で添加した。(B)形成されたMED12(-)筋腫スフェロイドの代表的な像。スケールバー=500 μm 。(C) 女性ホルモン処理7日後のMED12(-)およびMED12(+)筋腫スフェロイド標本におけるHEおよび α -SMA(緑)とvimentin(赤)による免疫組織染色。核染色はDAPIで行った。スケールバー=50 μm 。(D) 各筋腫サブタイプの各ホルモン添加条件におけるスフェロイドサイズ。スフェロイドサイズは、検体あたり6個のスフェロイドそれぞれについて最大断面積をImageJで測定し、その平均値として算出した。箱ひげ図は5検体のMED12(-)筋腫と9検体のMED12(+)筋腫について、各添加条件におけるサイズの平均値 $\pm\text{SD}$ を示した。括弧は各ホルモン添加群間の有意差を示す(p値<0.05、Mann-Whitney検定)。

【結果】

1. 子宮筋腫細胞の平面培養における女性ホルモンの効果

女性ホルモン処理 7 日後における生細胞数は、両方の子宮筋腫サブタイプとも、いずれの添加条件においても差がなかった（図 1E）。

2. 子宮筋腫細胞の 3D スフェロイド培養における女性ホルモンの効果

女性ホルモン処理 7 日後において、CTRL 群ではスフェロイドにおける α -SMA と vimentin のシグナルは弱かったが、DAPI により核は明瞭に検出された（図 2C）。両方の筋腫サブタイプにおいて、 α -SMA と vimentin のシグナルは E+P と P 群で他の群に比べて明らかに強かった（図 2C）。

女性ホルモンを添加した群（E+P、P、E、E+P+SPRM）のスフェロイドのサイズは、両筋腫サブタイプとも CTRL 群に比べて有意に大きかった（図 2D）。E+P 群のスフェロイドのサイズは、E および E+P+SPRM 群よりも有意に大きく、P 群とほぼ同じであった（図 2D）。E と E+P+SPRM 群では、スフェロイドサイズに有意差はなく（図 2D）、SPRM による PGR の阻害効果が 3D スフェロイド培養において明確に示された。これらの結果から、本研究で確立した 3D スフェロイド培養は、子宮筋腫細胞の女性ホルモンへの反応性を筋腫サブタイプに依らず評価できる培養系であると考えられた。

3. 子宮筋腫細胞の 3D スフェロイド培養におけるトリクローム染色

子宮筋腫スフェロイドのコラーゲン線維をトリクローム染色により組織学的に調べた。女性ホルモン処理 7 日後において、MED12(-)筋腫ではいずれのホルモン添加群のスフェロイドでも、青く染色されたコラーゲン線維は検出されなかった（図 3A）。一方、MED12(+)

筋腫では、E+P、P、E+P+SPRM 群でコラーゲン線維が観察されたが、P を含まない群 (E および CTRL) では検出されなかった (図 3A)。さらに、MED12(+)筋腫では、コラーゲン線維が占める割合が、E + P 群で他の群と比較して有意に高かった (図 3B)。これらの結果から、MED12(+)筋腫の子宮筋腫細胞はスフェロイド培養において、女性ホルモンの効果により、より多くのコラーゲン線維を産生したことが示唆される。

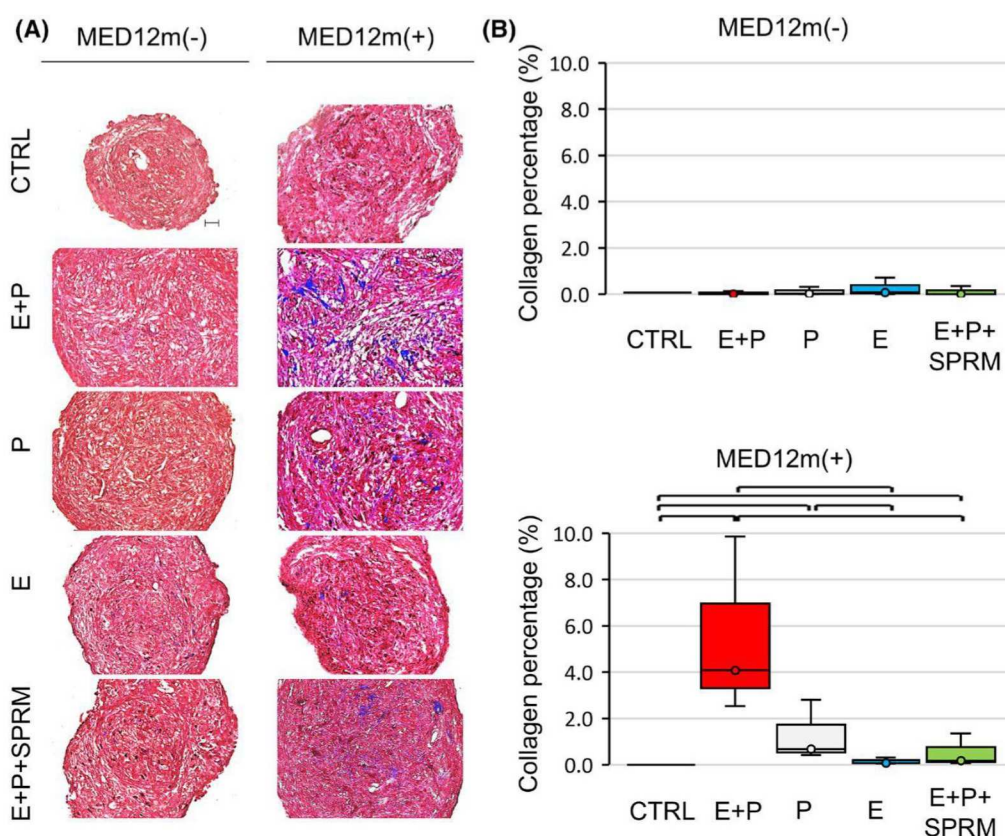


図3 子宮筋腫スフェロイドにおけるトリクローム染色によるコラーゲン線維の検出

(A) 女性ホルモン添加培養7日後のMED12(-)およびMED12(+)筋腫スフェロイドにおけるトリクローム染色の代表的な像。トリクローム染色では、コラーゲン線維は青色に、細胞成分は赤茶色に染色される。スケールバー=100 μ m。(B) 各筋腫スフェロイドの各添加条件におけるコラーゲン線維が占める面積の割合(%)。各検体あたり6個のスフェロイドを用いて、スフェロイド毎に無作為に選んだ倍率200倍の5視野についてコラーゲン線維の面積を測定し、平均値を算出した。コラーゲン線維の面積比(%)は、MED12(-)およびMED12(+)筋腫とも3検体について測定し、箱ひげ図には平均値 $\pm$ SDで示した。括弧は各ホルモン添加群間の有意差を示す(p値<0.05、Mann-Whitney検定)。

4. 子宮筋腫細胞の 3D スフェロイド培養における TUNEL 染色

スフェロイドにおける子宮筋腫細胞のアポトーシスについて TUNEL 染色を用いて組織学的に調べた。両方の筋腫サブタイプのいずれの女性ホルモン添加条件においても、TUNEL 陽性のアポトーシス細胞は検出されなかった (図 4)。この結果は、CTRL、E、E + P + SPRM 群でみられたスフェロイドサイズの縮小は、子宮筋腫細胞のアポトーシスによるものではないことを示唆している。

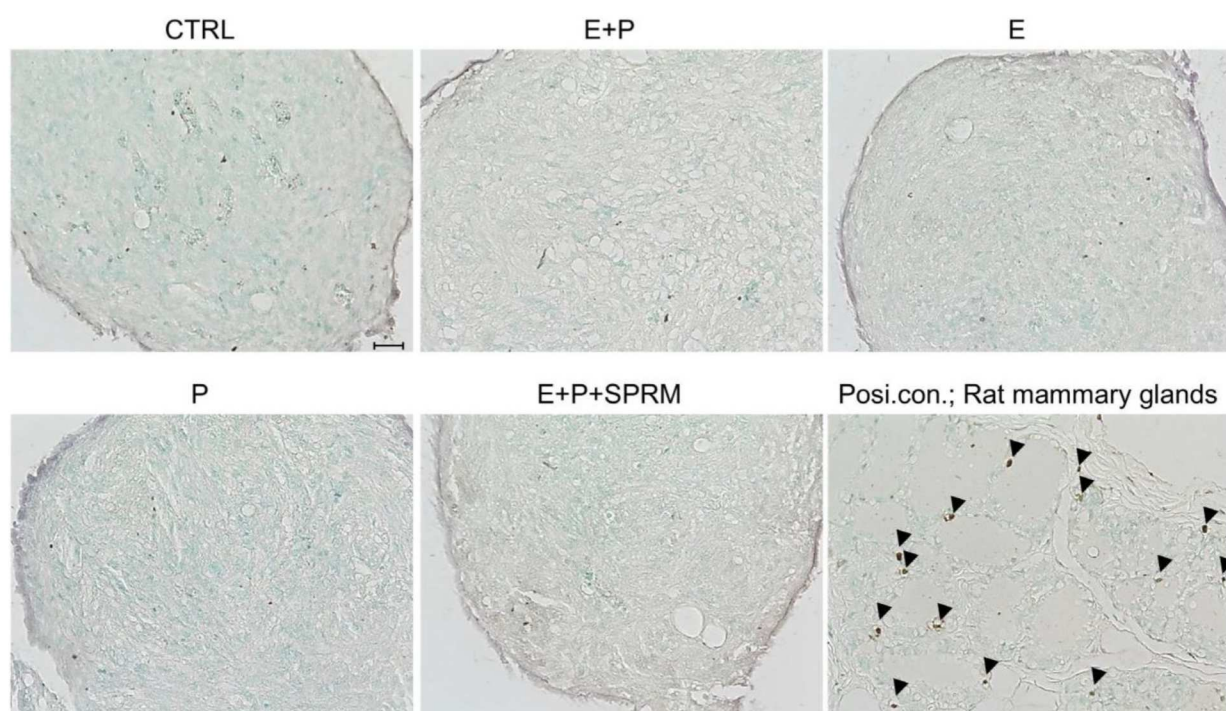


図 4 スフェロイドにおける子宮筋腫細胞の TUNEL 染色によるアポトーシス細胞の検出
写真は、女性ホルモン添加培養 7 日後における MED12(-)筋腫スフェロイドの代表的な
TUNEL 染色の像を示している。TUNEL 陽性であるアポトーシス細胞のコントロールとし
て、ラット乳腺の組織標本を用いた。TUNEL 染色では、アポトーシス細胞は暗赤褐色の
核を持つ細胞として検出される (矢尻)。核のカウンター染色はメチルグリーンで行った。
スケールバー = 50 μ m。MED12(-)および MED12(+)筋腫とも各 3 検体における検討で
は、いずれの女性ホルモン添加群においても、TUNEL 陽性のアポトーシス細胞は検出さ
れなかった。

【考察】

本研究では、子宮筋腫の各サブタイプにおける平面培養と 3D スフェロイド培養において、子宮筋腫細胞の増殖における女性ホルモンの効果を調べた。平面培養では、両方の筋腫サブタイプにおいて女性ホルモンによる細胞増殖は認められず、女性ホルモンの効果を評価することはできなかった。一方、3D スフェロイド培養では、CTRL 群ではスフェロイドのサイズが縮小したが、E+P または P 群ではサイズが維持された。従って、本研究で確立した 3D スフェロイド培養系は子宮筋腫細胞の *in vitro* における女性ホルモンの効果を評価する上で、平面培養よりも有用である。類似した知見は、マウスの不死化線維芽細胞株を用いた研究でも得られており、3D スフェロイド培養の方が平面培養よりエストロゲンの反応性が高いことが報告されている⁴³。

本研究の平面培養における実験結果は、子宮筋腫細胞が E、P、および E+P によって増殖するとの過去の知見とは一致しなかった¹⁵⁻¹⁸。この相違は、培養条件あるいは培養に用いた細胞の組成の違いに起因する可能性がある。我々は、コラーゲンが細胞の足場として機能し、子宮筋腫細胞（特に SMC）の増殖を促進するとの報告があったため²¹、初代培養にはコラーゲンコートしたディッシュを使用した。実際、本研究における子宮筋腫細胞中の SMC の割合は非常に高く（それぞれ、MED12(-)筋腫で 83.7%、MED12(+)筋腫で 82.7%）、子宮筋腫細胞は主に SMC から構成されていた。一方、これまでの研究のほとんどにおいて、使用した細胞の SMC 比率が調べられていない。また、子宮筋腫細胞における SMC の割合は培養期間中あるいは継代を経て徐々に減少し、最終的に平面培養における細胞の大部分が FB で占められていたという報告もある²²⁻²³。さらに、本研究では、両方の筋腫サブタイプにおいて、子宮筋腫細胞における PGR と ESR1 の発現を確認している。この結果は、子宮筋腫細胞における PGR および ESR1 の発現喪失が、平面培養において女性

ホルモンに反応しなかった原因ではないことを示唆している。ただし、本研究では、細胞のサイズを測定できなかったため、女性ホルモンが平面培養において子宮筋腫細胞の大きさに影響を与えた可能性は否定できていない。

本研究は、スフェロイド培養において、子宮筋腫細胞の女性ホルモンへの反応性を検討した初めてのものである。初代培養の子宮筋腫細胞を用いた 3D スフェロイド培養においては、細胞老化や細胞の生存性に関する研究はいくつかあるが²⁶⁻²⁸、子宮筋腫細胞の増殖に対する女性ホルモンの効果を 3D スフェロイド培養により検討した研究はこれまでにない。本研究における 3D スフェロイド培養では、スフェロイドの断面積を測定することで、両方の筋腫サブタイプにおいて女性ホルモンの効果を評価できることが示された。本研究では、スフェロイド培養における P の作用をさらに検討するため、SPRM (UPA) の効果も検討した。E+P+SPRM 群では、両方の筋腫サブタイプにおいてスフェロイドサイズが E+P 群に比べて縮小し、E 群に近い値を示した。この結果は、我々のスフェロイド培養系において、SPRM により PGR の機能阻害が生じたことを示唆している。UPA は平面培養において、子宮筋腫細胞のアポトーシスを誘導することが報告されているが、本培養系では E+P+SPRM を含むいずれの培養群においても TUNEL 陽性のアポトーシス細胞は観察されなかった。先述したように、この結果の相違は、本研究とこれまでの研究における細胞構成や培養条件の違いに起因する可能性がある。本スフェロイド培養系においてアポトーシス細胞が観察されなかったことは、スフェロイドサイズの減少は、個々の細胞の縮小に起因し、細胞数の減少によらないことを示唆している。また、本研究の結果は、異種移植モデルを用いて示された、女性ホルモンの消退あるいはプロゲステロン受容体拮抗薬 RU486 (ミフェプリストン) の投与による移植腫瘍の縮小は、アポトーシスによる細胞数の減少ではなく、個々の細胞のサイズの減少に起因したという知見^{13, 44}と類似している。

本研究のリミテーションとしては、スフェロイドにおける子宮筋腫細胞の密度が高すぎ、細胞サイズを測定できず、実際にスフェロイドサイズの減少が個々の細胞の縮小によるかどうかを示せなかったことが挙げられる。

MED12(+)筋腫のスフェロイド培養では、P 添加群においてのみコラーゲン線維が観察された。子宮筋腫サブタイプにおけるコラーゲン産生能の差は、*in vivo* における子宮筋腫検体の組織学的構成からも明白であり、MED12(+)筋腫では、腫瘍のほぼ半分をコラーゲン線維が占めるのに対し、MED12(-)筋腫では、コラーゲン線維の含有量はるかに少ない^{11, 12}。また、我々の各筋腫サブタイプ検体を用いたトランスクリプトーム解析により、コラーゲンを含む細胞外基質の産生に関連するシグナル伝達経路は、MED12(+)筋腫では正常子宮筋層と比べて活性化されており、逆に MED12(-)筋腫では不活化されていることが明らかになっている¹²。したがって、本培養系は、*in vivo* での筋腫サブタイプ間におけるコラーゲン線維産生能の違いを、*in vitro* において再現している可能性がある。さらに、本研究の結果は、2つの筋腫サブタイプ間におけるコラーゲン産生能の差異が P 依存的に生じることを示した。我々は、このコラーゲン産生能の差異には、MED12(+)筋腫の SMC における、MED12 変異タンパクと PGR あるいは、MED12 変異タンパクと Pシグナリングの下流タンパクにおける相互作用が関わる可能性を推測している。実際に、MED12(+)筋腫の SMC において、MED12 変異タンパクと PGR による相互作用により、RANKL 遺伝子の発現が異常に亢進されることが報告されている^{45, 46}。

【結語】

本研究において、子宮筋腫細胞の女性ホルモンへの反応性を評価できる 3D スフェロイド培養系を確立した。この培養系は、子宮筋腫の病態のさらなる解明および、子宮筋腫に

有効な薬剤のスクリーニングに有用な手段となると考えられる。

【謝辞】

本研究の一部は、あすか製薬株式会社、日本学術振興会科学研究費補助金(JP24K12533、JP24K12579、JP24K12626、JP24K19699、JP24K23514、JP23K27734、JP23K08889、JP23K08824、JP23K07312、JP23K15838、JP22K19603、JP22K09620)の助成を受けた。

資金提供者は本試験の実施や結果の報告には関与していない。本論文は Reproductive Medicine and Biology. 2025;24:e12627.の論文の和訳であり、学位論文として用いることを許可されている。

【参考文献】

1. Stewart EA. Uterine fibroids. *Lancet*. 2001;357:293–298. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03622-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03622-9)
2. Bajekal N, Li TC. Fibroids, infertility and pregnancy wastage. *Hum Reprod Update*. 2000;6:614–620. <https://doi.org/10.1093/humupd/6.6.614>
3. Mäkinen N, Mehine M, Tolvanen J, Kaasinen E, Li Y, Lehtonen HJ, et al. MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas. *Science*. 2011;334(6053):252–255. <https://doi.org/10.1126/science.1208930>
4. Mehine M, Kaasinen E, Makinen N, Katainen R, Kampjarvi K, Pitkanen E, et al. Characterization of uterine leiomyomas by whole-genome sequencing. *N Engl J Med*. 2013;369(1):43–53. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1302736>
5. Mittal P, Shin YH, Yatsenko SA, Castro CA, Surti U, Rajkovic A. Med12 gain-of-function mutation causes leiomyomas and genomic instability. *J Clin Invest*. 2015;125(8):3280–3284. <https://doi.org/10.1172/JCI81534>
6. McGuire MM, Yatsenko A, Hoffner L, Jones M, Surti U, Rajkovic A. Whole exome sequencing in a random sample of north American women with leiomyomas identifies MED12 mutations in majority of uterine leiomyomas. *PLoS One*. 2012;7(3):e33251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033251>
7. Bertsch E, Qiang W, Zhang Q, Espona-Fiedler M, Druschitz S, Liu Y, et al. MED12 and HMGA2 mutations: two independent genetic events in uterine leiomyoma and leiomyosarcoma. *Mod Pathol*. 2014;27(8):1144–1153. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.243>
8. Tamehisa T, Sato S, Sakai T, Maekawa R, Tanabe M, Ito K, et al. Establishment of noninvasive prediction models for the diagnosis of uterine leiomyoma subtypes. *Obstet Gynecol*. 2024;143(3):358–365. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000005475>
9. Sato S, Maekawa R, Yamagata Y, Tamura I, Lee L, Okada M, et al. Identification of uterine leiomyoma-specific marker genes based on DNA methylation and their clinical application. *Sci Rep*. 2016;6:30652. <https://doi.org/10.1038/srep30652>
10. Sato S, Maekawa R, Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, et al. Potential mechanisms of aberrant DNA hypomethylation on the X chromosome in uterine leiomyomas. *J Reprod Dev*. 2014;60(1):47–54. <https://doi.org/10.1262/jrd.2013-095>
11. Wu X, Serna VA, Thomas J, Qiang W, Blumenfeld ML, Kurita T. Subtype-specific tumor-associated fibroblasts contribute to the pathogenesis of uterine leiomyoma. *Cancer Res*. 2017;77(24):6891–6901. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1744>
12. Maekawa R, Sato S, Tamehisa T, Sakai T, Kajimura T, Sueoka K, et al. Different DNA methylome, transcriptome and histological features in uterine fibroids with and without MED12 mutations. *Sci Rep*. 2022;12(1):8912. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12899-7>
13. Ishikawa H, Ishi K, Serna VA, Kakazu R, Bulun SE, Kurita T. Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma. *Endocrinology*. 2010;151:2433–2442. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1225>
14. Nagai K, Asano R, Sekiguchi F, Asai-Sato M, Miyagi Y, Miyagi E. MED12 mutations in uterine leiomyomas: prediction of volume reduction by gonadotropin-releasing hormone agonists. *Am J Obstet Gynecol*. 2023;228:e1–e9. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2022.09.024>
15. Shimomura Y, Matsuo H, Samoto T, Maruo T. Up-regulation by progesterone of proliferating cell nuclear

- antigen and epidermal growth factor expression in human uterine leiomyoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(6):2192–2198. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.6.4879>
16. Yin P, Lin Z, Cheng YH, Marsh EE, Utsunomiya H, Ishikawa H, et al. Progesterone receptor regulates Bcl-2 gene expression through direct binding to its promoter region in uterine leiomyoma cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(11):4459–4466. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-0725>
 17. Luo N, Guan Q, Zheng L, Qu X, Dai H, Cheng Z. Estrogen-mediated activation of fibroblasts and its effects on the fibroid cell proliferation. *Transl Res.* 2014;163(3):232–241. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.11.008>
 18. Milewska G, Ponikwicka-Tyszko D, Bernaczyk P, Lupu O, Szamatowicz M, Sztachelska M, et al. Functional evidence for two distinct mechanisms of action of progesterone and selective progesterone receptor modulator on uterine leiomyomas. *Fertil Steril.* 2024;122(2):341–351. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2024.02.046>
 19. Maruo T, Ohara N, Wang J, Matsuo H. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Hum Reprod Update.* 2004;10(3):207–220 <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh019>
 20. Yamada T, Nakago S, Kurachi O, Wang J, Takekida S, Matsuo H, et al. Progesterone down-regulates insulin-like growth factor-I expression in cultured human uterine leiomyoma cells. *Hum Reprod.* 2004;19(4):815–821. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh146>
 21. Bonazza C, Andrade SS, Sumikawa JT, Batista FP, Paredes-Gamero EJ, Girão MJ, et al. Primary human uterine leiomyoma cell culture quality control: some properties of Myometrial cells cultured under serum deprivation conditions in the presence of ovarian steroids. *PLoS One.* 2016;11(7):e0158578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158578>
 22. Bloch J, Holzmänn C, Koczan D, Helmke BM, Bullerdiek J. Factors affecting the loss of MED12-mutated leiomyoma cells during in vitro growth. *Oncotarget.* 2017;8(21):34762–34772. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16711>
 23. Nadine Markowski D, Tadayyon M, Bartnitzke S, Belge G, Maria Helmke B, Bullerdiek J. Cell cultures in uterine leiomyomas: rapid disappearance of cells carrying MED12 mutations. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014;53(4):317–323. <https://doi.org/10.1002/gcc.22142>
 24. Zaitseva M, Vollenhoven BJ, Rogers PA. In vitro culture significantly alters gene expression profiles and reduces differences between myometrial and fibroid smooth muscle cells. *Mol Hum Reprod.* 2006;12(3):187–207. <https://doi.org/10.1093/molehr/gal018>
 25. Severino MF, Murray MJ, Brandon DD, Clinton GM, Burry KA, Novy MJ. Rapid loss of oestrogen and progesterone receptors in human leiomyoma and myometrial explant cultures. *Mol Hum Reprod.* 1996;2(11):823–828. <https://doi.org/10.1093/molehr/2.11.823>
 26. Vidimar V, Chakravarti D, Bulun SE, Yin P, Nowak R, Wei JJ, et al. The AKT/BCL-2 Axis mediates survival of uterine leiomyoma in a novel 3D spheroid model. *Endocrinology.* 2018;159(3):1453–1462. <https://doi.org/10.1210/en.2017-03191>
 27. Xie J, Xu X, Yin P, Li Y, Guo H, Kujawa S, et al. Application of ex-vivo spheroid model system for the analysis of senescence and senolytic phenotypes in uterine leiomyoma. *Lab Investig.* 2018;98(12):1575–1587. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0117-5>
 28. Xu X, Kim JJ, Li Y, Xie J, Shao C, Wei JJ. Oxidative stress-induced miRNAs modulate AKT signaling and promote cellular senescence in uterine leiomyoma. *J Mol Med (Berl).* 2018;96(10):1095–1106. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1682-1>
 29. Rabe T, Saenger N, Ebert AD, Roemer T, Tinneberg HR, De Wilde RL, et al. Selective progesterone receptor modulators for the medical treatment of uterine fibroids with a focus on Ulipristal acetate.

- Biomed Res Int. 2018;2018:1374821. <https://doi.org/10.1155/2018/1374821>
30. Xu Q, Takekida S, Ohara N, Chen W, Sitruk-Ware R, Johansson ED, et al. Progesterone receptor modulator CDB-2914 down-regulates proliferative cell nuclear antigen and Bcl-2 protein expression and up-regulates caspase-3 and poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase expression in cultured human uterine leiomyoma cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(2):953–961. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1569>
 31. Xu Q, Ohara N, Liu J, Amano M, Sitruk-Ware R, Yoshida S, et al. Progesterone receptor modulator CDB-2914 induces extracellular matrix metalloproteinase inducer in cultured human uterine leiomyoma cells. *Mol Hum Reprod.* 2008;14(3):181–191. <https://doi.org/10.1093/molehr/gan004>
 32. Xu Q, Ohara N, Chen W, Liu J, Sasaki H, Morikawa A, et al. Progesterone receptor modulator CDB-2914 down-regulates vascular endothelial growth factor, adrenomedullin and their receptors and modulates progesterone receptor content in cultured human uterine leiomyoma cells. *Hum Reprod.* 2006;21(9):2408–2416. <https://doi.org/10.1093/humrep/del159>
 33. Sato S, Maekawa R, Tamura I, Shirafuta Y, Shinagawa M, Asada H, et al. SATB2 and NGR1: potential upstream regulatory factors in uterine leiomyomas. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36(11):2385–2397. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01582-y>
 34. Maekawa R, Ota Y, Ota I, Mihara Y, Takasaki H, Sato S, et al combined histological and DNA methylome profiling approaches may provide insights into the pathophysiology of ovarian endometriomas. *Reprod Med Biol.* 2023;22(1):e12548. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12548>
 35. Maekawa R, Sato S, Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, et al. Genome-wide DNA methylation analysis reveals a potential mechanism for the pathogenesis and development of uterine leiomyomas. *PLoS One.* 2013;8(6):e66632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066632>
 36. Maekawa R, Yagi S, Ohgane J, Yamagata Y, Asada H, Tamura I, et al. Disease-dependent differently methylated regions (D-DMRs) of DNA are enriched on the X chromosome in uterine leiomyoma. *J Reprod Dev.* 2011;57(5):604–612. <https://doi.org/10.1262/jrd.11-035a>
 37. Yamagata Y, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Tamura I, Tamura H, et al. Aberrant DNA methylation status in human uterine leiomyoma. *Mol Hum Reprod.* 2009;15(4):259–267. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap010>
 38. Serna VA, Kurita T. Patient-derived xenograft model for uterine leiomyoma by sub-renal capsule grafting. *J Biol Methods.* 2018;5(2):e91. <https://doi.org/10.14440/jbm.2018.243>
 39. Hayashi-Okada M, Sato S, Nakashima K, Sakai T, Tamehisa T, Kajimura T, et al. Identification of long noncoding RNAs downregulated specifically in ovarian high-grade serous carcinoma. *Reprod Med Biol.* 2024;23(1):e12572. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12572>
 40. Nakashima K, Sato S, Tamura I, Hayashi-Okada M, Tamehisa T, Kajimura T, et al. Identification of aberrantly expressed long non-coding RNAs in ovarian high-grade serous carcinoma cells. *Reprod Med Biol.* 2020;19(3):277–285. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12330>
 41. Tamura I, Doi-Tanaka Y, Takasaki A, Shimamura K, Yoneda T, Takasaki H, et al. High incidence of decidualization failure in infertile women. *Reprod Med Biol.* 2024;23(1):e12580. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12580>
 42. Nishimoto Y, Murakami A, Sato S, Kajimura T, Nakashima K, Yakabe K, et al. Decreased carbonyl reductase 1 expression promotes tumor growth via epithelial mesenchymal transition in uterine cervical squamous cell carcinomas. *Reprod Med Biol.* 2018;17(2):173–181. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12086>
 43. Montani C, Steimberg N, Boniotti J, Biasiotto G, Zanella I, Diafera G, et al. Fibroblasts maintained in 3

- dimensions show a better differentiation state and higher sensitivity to estrogens. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;280(3):421–433. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.08.021>
44. Serna VA, Wu X, Qiang W, Thomas J, Blumenfeld ML, Kurita T. Cellular kinetics of MED12-mutant uterine leiomyoma growth and regression in vivo . *Endocr Relat Cancer.* 2018;25(7):747–759. <https://doi.org/10.1530/ERC-18-0184>
45. Liu S, Yin P, Kujawa SA, Coon JS, Okeigwe I, Bulun SE. Progesterone receptor integrates the effects of mutated MED12 and altered DNA methylation to stimulate RANKL expression and stem cell proliferation in uterine leiomyoma. *Oncogene.* 2019;38(15):2722–2735. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0612-6>
46. Ikkena DE, Liu S, Kujawa S, Esencan E, Coon JS, Robins J, et al. RANKL/RANK pathway and its inhibitor RANK-fc in uterine leiomyoma growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(5):1842. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-01585>