

平成 22 年 5 月 30 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890058

研究課題名（和文） 子宮内膜および子宮内膜症における AMP キナーゼの機能解析と臨床応用

研究課題名（英文） Function analysis and clinical application of AMP kinase in endometrium and endometriosis

研究代表者

竹村 由里（TAKEMURA YURI）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00453697

研究成果の概要（和文）：AMP キナーゼ（AMPK）は、細胞のエネルギー維持の調節因子で、炎症抑制作用や子宮内膜での AMPK リン酸化作用から、着床や子宮内膜症への関与が考えられた。AMPK は、子宮内膜で着床期での発現増加、不妊症の患者での発現低下を介して着床と関わっている可能性が示唆された。子宮内膜症に対する従来のエストロゲン抑制や排卵抑制が不可避の薬物療法とは異なる新しい治療法として、メトフォルミンは、子宮内膜症細胞・組織の検討で AMPK を介して子宮内膜症に抑制的に作用することがわかった。

研究成果の概要（英文）：AMP kinase (AMPK), a regulator of energy homeostasis of the cell, has anti-inflammatory effects with AMPK phosphorylation of endometrial cells, and I surmised that AMPK was involved in implantation and endometriosis. I detected the increased expression of AMPK in the human endometrium in the implantation period and the decreased expression of AMPK in the endometrium of infertile women, suggesting that AMPK may play a physiological role in the implantation. Contrary to conventional hormonal anti-endometriotic drugs that unavoidably suppress estrogen and ovulation, the present study suggest a unique therapeutic potential for metformin as an anti-endometriotic drug.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮内膜、子宮内膜症、AMP キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜における受精卵の着床は、一種の炎症反応と考えられている。この炎症反応の

調節障害により着床現象が障害され不妊症を引き起こすと考えられるが、この機序は未だ明らかではない。一方、子宮内膜症は、生殖

年齢の女性の約10%に発生するとされ、月経痛や不妊症を引き起こす。炎症・血管新生・線維化を本態とする慢性増殖性炎症性疾患と考えられており、これまでに多くの研究がなされてきたが、子宮内膜症の原因は解明されておらず、女性ホルモンの抑制以外の有効な薬物療法もない。しかし現在、着床障害も子宮内膜症も増加傾向にある。

AMP キナーゼ (AMPK) は、あらゆる真核生物の細胞に発現しており、細胞および全身のエネルギー維持に重要な調節因子である。AMPK は、アディポネクチンなどのホルモンの作用を調節し、インスリン感受性増加作用を持つ糖尿病治療薬メトフォルミンの作用発現にも関わっている。アディポネクチンは、インスリン感受性増加等の作用を持つ脂肪由来の重要なサイトカインで、特異的受容体である AdipoR1 と AdipoR2 を介して、この AMPK を活性化し、その作用を発揮する。アディポネクチンは、この抗糖尿病作用の他に、抗炎症、抗血管新生等の様々な作用を持つことが知られている。

私達はこれまでに、子宮内膜症患者では、腹腔内貯留液中および血清中のアディポネクチン濃度が正常女性に比べ低下していること、ヒト正常子宮内膜に月経周期を通じてアディポネクチン受容体である AdipoR1・AdipoR2 が発現しており、分泌期中期すなわち着床の時期にその発現が高まること、アディポネクチン受容体が刺激されると AMPK のリン酸化を介して抗炎症などの作用を発揮し、着床期の生殖生理や子宮内膜症の抑制に関わっている可能性があることを突き止めた。すなわち、アディポネクチンの分泌が十分にあり、AMPK がリン酸化により活性化されていることが、正常子宮内膜にとってよい状態であり、子宮内膜症の抑制にもつながると考えられた。そこで、正常子宮内膜における AMPK の機能を着床に注目してさらに詳細に検討することにした。また、子宮内膜症に対する従来の治療法であるエストロゲンの抑制とは異なる機序の新しい治療法として、AMPK を活性化して作用する糖尿病治療薬であるメトフォルミンに注目し検討したところ、細胞レベルではメトフォルミンが子宮内膜症に抑制的に作用することがわかり、臨床応用を目指してさらに検討することにした。

2. 研究の目的

(1) 正常子宮内膜における AMPK の機能についての検討

正常子宮内膜は、ホルモンの影響を受けながら、月経周期を通じて、ダイナミックに変動している。排卵の約1週間後にあたる分泌期中期は、受精卵が子宮内膜に着床する時期にあたり、着床期というが、この時期の受精

卵と子宮内膜の炎症反応様の相互作用が着床に不可欠と考えられている。AMPK は、エネルギー維持の調節因子で、炎症反応の調節作用も持つこと、私達のこれまでの研究で正常子宮内膜においてアディポネクチンやエストロゲンの投与により AMPK のリン酸化を認めることから、着床期の子宮内膜のエネルギー維持や炎症反応の調節に AMPK が深く関与しているのではないかと考えた。

インフォームド・コンセントの下、良性婦人科疾患に対する手術検体より得られた各種月経周期の正常子宮内膜の組織を用いて、AMPK およびリン酸化 AMPK の発現を調べ、月経周期における変化、着床期に増加を認めるかどうかを検討する。また、不妊症の患者では、正常女性と比較して AMPK の発現に変化を認めるかどうかについても検討する。また、同様にして得られた正常子宮内膜細胞にエストロゲンを投与した際の AMPK のリン酸化について調べ、その下流にある細胞増殖やサイトカイン産生への影響を検討する。さらに、正常子宮内膜細胞にアデノウイルスベクターを用いて dominant negative AMPK (dn AMPK) を遺伝子導入し、AMPK が働かない状態の細胞でも同様の検討を行い、実験結果の裏づけをする。

AMPK は、全ての細胞のエネルギー維持に不可欠であるのも関わらず、正常子宮内膜における検討は世界的にもない。AMPK は、着床期の子宮内膜の機能解明における新しい着眼点であり、着床と AMPK との関係が明らかになれば、着床障害による不妊症に対する新たな治療戦略につながると考える。

(2) 子宮内膜症の新規治療薬としてのメトフォルミンの検討

子宮内膜症は、エストロゲン依存性疾患であり、腹腔内の炎症が子宮内膜症の進展を促進すると考えられている。国内の生殖期の女性の約10% (100万~200万人) が子宮内膜症の患者であり、月経血の腹腔内への逆流が子宮内膜症の発症に関わるとされているが、9割もの女性に逆流が認められるのに対して実際に子宮内膜症となる女性は10%である。すなわち、腹腔内の炎症の有無、アディポネクチン濃度などを含めた個々人の体質の差異が子宮内膜症の発症・進展に関わっていると考えられる。

メトフォルミンは、インスリン抵抗性改善作用を持ち、糖尿病治療薬として現在広く使用されており、産婦人科領域では、多嚢胞性卵巣症候群の治療に使用され成功している。メトフォルミンは、ビッグアナイド薬に属し、1950年代に臨床に登場したスルフォニルウレア薬と並ぶ最も古い経口血糖降下薬であり、インスリン分泌作用がないため、単独使用では低血糖を起こさず体重増加を来しにくいな

ど副作用が少ない点で優れた薬剤である。長い間メトホルミンの分子作用メカニズムは不明であったが、AMPK を介して作用することが判明し、注目を集めている。メトホルミンは、インスリン抵抗性改善作用の他に、抗炎症作用や癌抑制効果、ステロイド合成調節作用を持つことが報告されている。

以上のことから、メトホルミンの抗炎症作用およびステロイド合成調節作用が子宮内膜症を抑制する方向に働く可能性があると考えられ、子宮内膜症細胞で検討したところ、メトホルミンは、子宮内膜症細胞において、IL-8 産生、細胞増殖、アロマターゼ活性を抑制することを突き止め、細胞レベルでは子宮内膜症の治療薬となり得る可能性が示唆された。よって臨床応用のために動物実験レベルでの検討が必要と考えられた。

また、多嚢胞性卵巣症候群での治療実績から、メトホルミンは、血清CRP 値を低下させ炎症を抑制すること、妊娠中の服用で催奇形性は認められないことがわかっており、生殖期の子宮内膜症女性に対して使用しやすい薬剤と考えられる。

インフォームド・コンセントの下、子宮内膜症性卵巣嚢胞に対する手術検体より得られた子宮内膜症細胞の初代培養系を用いて、メトホルミンによるAMPK のリン酸化について検討する。子宮内膜症細胞にアデノウイルスベクターを用いて dominant negative AMPK (dn AMPK) を遺伝子導入し、AMPK が働かない状態でも同様の検討を行い、実験結果の裏づけをする。また、同様にして得られた子宮内膜症の組織を用いて、AMPK およびリン酸化AMPK の発現を調べる。さらに、マウス子宮内膜症モデルを用いて、子宮内膜症病変に対するメトホルミンの治療効果の有無、副作用の有無について検討する。

子宮内膜症は、生殖期の女性に認められ、不妊症を合併することが多いにも関わらず、これまでの子宮内膜症の治療薬(GnRH アゴニストやダナゾール)は、エストロゲンを抑制して子宮内膜症を退縮させるため、更年期症状の出現や無排卵が不可避であった。これに対して、メトホルミンは、エストロゲン抑制作用や排卵抑制作用がないことから、実際に不妊を呈する多嚢胞性卵巣症候群の治療にも使用され成功している。メトホルミンを子宮内膜症治療薬として臨床応用することができれば、その需要は計り知れないと考える。

3. 研究の方法

(1) 正常子宮内膜におけるAMPK の機能についての検討

良性婦人科疾患に対する手術検体より得られた各種月経周期の正常子宮内膜の組織を用いて、AMPK およびリン酸化AMPK の発現を免

疫組織化学染色法で調べ、月経周期における変化、着床期に増加を認めるかどうかを検討した。不妊症の患者の子宮内膜を正常女性のものと比較してAMPK の発現に差異を認めるかどうかについても検討した。また、正常子宮内膜細胞にエストロゲンを投与した際のAMPK のリン酸化をWestern blot 法を用いて検討した。

① 正常子宮内膜組織におけるAMPK の発現に関する検討

良性婦人科疾患のために手術を受ける患者より書面によるインフォームド・コンセントを得た上で、正常子宮内膜組織を採取した。以上の工程は、すでに東京大学研究倫理委員会の承認を得ており、これまでと同様に行った。採取した各種月経周期の子宮内膜組織に対して、AMPK 抗体およびリン酸化AMPK 抗体を用いて、AMPK およびリン酸化AMPK の発現を免疫組織化学染色法で検討した。

② 不妊症の有無による着床期正常子宮内膜組織のAMPK の発現の差異に関する検討

同様にして採取した着床期(分泌期中期)の子宮内膜組織に対して、AMPK 抗体およびリン酸化AMPK 抗体を用いて、AMPK およびリン酸化AMPK の発現を免疫組織化学染色法で検討し、不妊症の有無で比較した。

③ エストロゲンの投与が正常子宮内膜細胞におけるAMPK のリン酸化に及ぼす影響の検討

同様にして採取した正常子宮内膜組織より子宮内膜間質細胞を分離培養して得られた初代培養系を用いて行った。子宮内膜間質細胞に種々の濃度および時間でエストラジオールを添加し、AMPK のリン酸化をWestern blot 法を用いて調べ検証した。

(2) 子宮内膜症の新規治療薬としてのメトホルミンの検討

子宮内膜症性卵巣嚢胞に対する手術検体より得られた子宮内膜症細胞の初代培養系を用いて、メトホルミンによるAMPK のリン酸化についてWestern blot 法で検討した。また、同様にして得られた子宮内膜症の組織を用いて、AMPK およびリン酸化AMPK の発現を免疫組織化学染色法で調べた。

① メトホルミンによる子宮内膜症細胞におけるAMPK のリン酸化の検討

子宮内膜症性卵巣嚢胞のために手術を受ける患者より書面によるインフォームド・コンセントを得た上で、子宮内膜症組織を採取した。以上の工程は、すでに東京大学研究倫理委員会の承認を得ており、これまでと同様に行った。採取した子宮内膜症組織より子宮内膜症間質細胞を分離培養した。得られた子宮内膜症間質細胞に種々の濃度および時間でメトホルミンを添加し、AMPK のリン酸化をWestern blot 法を用いて調べ検証した。

② 子宮内膜症組織における AMPK の発現に関する検討

同様に採取した子宮内膜症組織に対して、AMPK 抗体およびリン酸化AMPK 抗体を用いて、AMPK およびリン酸化AMPK の発現を免疫組織化学染色法で検討した。

4. 研究成果

(1) 正常子宮内膜における AMPK の機能についての検討

AMPK は、子宮内膜において、着床期での発現増加、不妊症の患者では正常女性と比較しての発現低下を介して着床と関わっている可能性が示唆された。

① 正常子宮内膜組織における AMPK の発現に関する検討

良性婦人科疾患の手術検体より得られた各種月経周期の子宮内膜の組織を用いて、AMPK の発現を調べたところ、月経周期による変動が見られた。分泌期中期(着床期)に AMPK の発現が増加しており、AMPK のリン酸化が着床に関与していると考えられた。

② 不妊症の有無による着床期正常子宮内膜組織の AMPK の発現の差異に関する検討

同様に得られた各種月経周期の子宮内膜の組織を用いて、AMPK の発現を調べ、不妊症の有無で比較したところ、着床期の AMPK の発現が不妊症患者では正常女性に比べ低下している傾向があり、AMPK のリン酸化が着床に関与していると考えられた。

③ エストロゲンの投与が正常子宮内膜細胞における AMPK のリン酸化に及ぼす影響の検討

正常子宮内膜組織より分離培養して得られた子宮内膜間質細胞に種々の濃度および時間でエストラジオールを添加し、AMPK のリン酸化を Western blot 法を用いて調べたところ、エストラジオール添加後 5-30 分(10分が最強)で濃度依存性に AMPK のリン酸化が認められた。子宮内膜における AMPK のリン酸化は、1 つにはエストロゲンにより起こることがわかった。

(2) 子宮内膜症の新規治療薬としてのメトフォルミンの検討

子宮内膜症に対する従来の治療法はエストロゲン抑制や排卵抑制が不可避であるため、これらとは異なる機序の新しい治療法として、AMPK を活性化して作用する糖尿病治療薬であるメトフォルミンに注目し検討したところ、細胞レベルではメトフォルミンが AMPK を介して子宮内膜症に抑制的に作用することがわかった。今後は臨床応用を目指してマウス子宮内膜症モデルを作成してさらに検討したい。

① メトフォルミンによる子宮内膜症細胞における AMPK のリン酸化の検討

子宮内膜症組織より分離培養して得られた子宮内膜症間質細胞に種々の濃度および時間でメトフォルミンを添加し、AMPK のリン酸化を Western blot 法を用いて調べたところ、メトフォルミン添加後 5-60 分(10分が最強)で濃度依存性に AMPK のリン酸化が認められた。メトフォルミンの細胞レベルでの子宮内膜症抑制作用は、AMPK のリン酸化を介して起こることがわかった。

② 子宮内膜症組織における AMPK の発現に関する検討

子宮内膜症性卵巣嚢胞の手術検体より得られた子宮内膜症組織を用いて、AMPK の発現を調べたところ、子宮内膜症組織に AMPK の発現が見られ、メトフォルミンは子宮内膜症細胞の AMPK を活性化して作用していることがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

- ① 竹村由里、大須賀穰、異所性(腸管・膀胱・膣・肺)子宮内膜症に対するジェノゲスト療法の効果、HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY、査読無、Vol.16 No.13、2009、88-92
- ② Takamura M, Koga K, Osuga Y, Takamura Y, et al Post-operative oral contraceptive use reduces the risk of ovarian endometrioma recurrence after laparoscopic excision. Human Reproduction 査読有 12 2009 3042-8
- ③ Kodama A, Yoshino O, Osuga Y, Harada M, Hasegawa A, Hamasaki K, Takamura M, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Takamura Y, et al Progesterone decreases bone morphogenetic protein (BMP) 7 expression and BMP7 inhibits decidualization and proliferation in endometrial stromal cells. Human Reproduction 査読有 3 2010 751-6

[学会発表](計 3 件)

- ① 竹村由里、低用量ピルの術後投与は腹腔鏡下子宮内膜症性卵巣嚢胞摘出術後の再発率を低下させる、第 49 回日本産科婦人科内視鏡学会、2009 年 9 月 4 日、高知
- ② 竹村由里、ART 妊娠における前置胎盤のリスクについての検討、第 54 回日本生殖医学会、2009 年 11 月 22 日、金沢

- ③ 竹村由里、腸管子宮内膜症における薬物療法の意義について、第31回日本エンドメトリーシス学会、2010年1月17日、京都

[その他]

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/emsis/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹村 由里 (TAKEMURA YURI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00453697

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし