

令和元年6月18日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11113

研究課題名（和文）子宮・胎盤における非古典的プロゲステロン受容体の病態生理学的役割の解明

研究課題名（英文）The role of a non-classical progesterone receptor in the uterus and placenta

研究代表者

吉江 幹浩 (Yoshie, Mikihiro)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：50434014

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、妊娠成立・維持に不可欠である子宮内膜間質細胞の脱落膜化、内膜腺の成熟化、胎盤形成における非古典的なプロゲステロン受容体として知られるプロゲステロン受容体膜構成因子1（PGRMC1）の役割について解析した。その結果、月経周期の分泌期における時期特異的なPGRMC1発現の低下が、胞胚受容能の獲得（着床に向けた内膜の変化）を促進させること、また、PGRMC1は胎盤形成における栄養膜細胞の分化にも寄与することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来より知られている妊娠の成立・維持におけるプロゲステロン受容体に加え、非古典的プロゲステロン受容体として位置づけられているPGRMC1が、受精卵（胞胚）の着床に向けた子宮内膜の受け入れ準備や妊娠時の胎盤形成に関与することを明らかとした。これらの知見は、生殖生理におけるPGRMC1の重要性を示唆するだけでなく、婦人科系疾患の治療標的として発展する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the roles of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1), known as a non-classical progesterone receptor, in the decidualization of endometrial stromal cells, maturation of endometrial glandular cells and differentiation of placental trophoblast cells which are indispensable for the establishment and maintenance of pregnancy. We demonstrated that secretory phase-specific downregulation of endometrial PGRMC1 expression during the menstrual cycle may promote the acquisition of endometrial receptivity for implantation. In addition, we also found possible roles of PGRMC1 in trophoblast differentiation during pregnancy.

研究分野：生殖内分泌学、薬理学

キーワード：PGRMC1 脱落膜化 胎盤形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロゲステロン (P_4)は、主に排卵後の黄体組織で産生・分泌され、エストロゲンによって増殖・肥厚した子宮内膜に作用し、内膜間質細胞の脱落膜化を誘起し、胞胚の着床に適した環境を作り出す。着床後、胎盤が形成されると P_4 の主要な産生組織は、黄体から胎盤へと変わり、妊娠の進行と共に P_4 産生は著増する。妊娠期間内では、母体及び胎児は高濃度の P_4 に暴露されており、分娩による胎盤の娩出によりその濃度が激減するまで妊娠維持、妊娠中の排卵抑制、子宮平滑筋の収縮抑制などの多彩かつ、妊娠に不可欠な役割を担う。

P_4 の作用は、典型的なリガンド依存性 DNA 結合性転写制御因子である P_4 受容体 (PR) を介したゲノミックな調節機構が中心的な役割を演じている。子宮内膜間質細胞 (ESC) の脱落膜化過程では、 P_4 は、PR を介してプロラクチン (PRL) やインスリン様成長因子結合タンパク質 1 (IGFBP-1) などの遺伝子発現を正に調節している。 P_4 は、妊娠子宮の平滑筋に対し、PR-B を介してその収縮を抑制している。ラットやマウスでは、妊娠期間を通じて P_4 は卵巣で産生されているが、分娩時は黄体退縮による P_4 レベルの低下が起点となって分娩が開始する。ヒトでは、分娩直前に転写活性部位を欠如した PR-A の発現が上昇することにより PR-B を介した作用が相対的に減少し、子宮平滑筋が収縮するという「機能的な P_4 作用の減弱」による分娩誘発機構が提唱されている。このように妊娠の成立・維持と分娩過程における古典的な PR を介した作用の中心的な役割が確立されている。さらに、これらの過程の異常に起因した不妊症、子宮内膜症、早産などの疾患における P_4 の改善効果が期待されている。

上記の典型的な PR を介した P_4 作用に対して、遺伝子の発現制御を伴わない、または、これら PR を介さない P_4 作用の存在が報告されている。 P_4 receptor membrane component 1 (PGRMC1) は P_4 に親和性を示す非古典的 PR としての機能が卵巣などで知られているが、妊娠成立・維持などにおける役割に関しては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、非古典的 PR として知られる PGRMC1 の妊娠成立・維持における生理的意義を明らかにすることにより、 P_4 作用の分子機構を多角的に捉え、その異常により発症する病態の理解に繋げることである。

3. 研究の方法

(1) ラット妊娠子宮における PGRMC1 発現

Wistar-今道系ラットの妊娠 3、5、7、9 日目 (交配日を妊娠 0 日目とする) の子宮における PGRMC1 の発現と局在を解析した。さらに、着床遅延モデルと偽妊娠ラットの子宮内にオイルを投与して人為的に脱落膜化を誘導するモデルを用いて、着床時並びに脱落膜形成時の PGRMC1 発現の変化を調べた。

(2) ヒト子宮内膜における PGRMC1 発現とその調節機構

月経周期の増殖期と分泌期の子宮内膜における PGRMC1 発現を免疫組織染色にて解析した。また、ヒト子宮内膜より ESC を単離・培養し、 P_4 ($1 \mu\text{M}$) と cAMP 誘導体 (db-cAMP: 0.5 mM) を 6 日間処置して脱落膜化を誘導した (脱落膜化細胞)。PGRMC1 発現を脱落膜化細胞と未分化細胞で比較した。分泌期における PGRMC1 発現の減弱機構に関わるマイクロ RNA を探索し、miR-98 を見出した。培養 ESC に miR-98 mimic をトランスフェクションし、PGRMC1 発現への影響について調べた。

(3) ESC の脱落膜化における PGRMC1 の機能解析

ヒト ESC の *in vitro* 脱落膜化モデルを用いて、脱落膜化に対する PGRMC1 ノックダウンと阻害薬 (AG205) の効果について検討した。予め、PGRMC1 siRNA または、AG205 を処置した ESC に脱落膜化刺激を加え、脱落膜化マーカーである IGFBP1 と PRL の発現を調べた。また、脱落膜化過程で見られる細胞老化と PGRMC1 との関係について、老化関連 ガラクトシダーゼ (SA-b-Gal) 活性を指標に評価した。

(3) 腺上皮細胞の成熟化における PGRMC1 の機能解析

子宮内膜腺上皮における PGRMC1 の役割を調べるため、内膜上皮細胞株 (EM1) を用いた。EM1 に AG205 を前処置した後、成熟化刺激として db-cAMP を添加した。その後、着床関連因子として知られるシクロオキシゲナーゼ 2 (COX2) の発現への影響について検討した。

(4) 胎盤栄養膜細胞の機能的分化における PGRMC1 の機能解析

胎盤栄養膜由来絨毛癌細胞株 (BeWo 細胞) を用い、栄養膜細胞の機能的分化と PGRMC1 との関係について調べた。BeWo 細胞に AG205 を前処置した後、分化刺激として cAMP 誘導体を添加した。その後、分化マーカーである絨毛性ゴナドトロピン (HCG) の産生への影響について検討した。

4. 研究成果

(1) ラット妊娠子宮における PGRMC1 発現と脱落膜化との関係

着床前である妊娠 3、5 日目の妊娠子宮では、PGRMC1 は、腺上皮細胞、管腔上皮細胞と間質

細胞に発現がみられ、妊娠 5 日目では管腔上皮の直下に位置する間質細胞にも局在していた。着床後である妊娠 7、9 日目の子宮では、間質細胞が増殖・分化した脱落膜細胞、腺上皮細胞と管腔上皮細胞に PGRMC1 の発現が観察された。

着床遅延モデルを用いた検討では、着床を誘起した子宮において、着床胚を取り囲む脱落膜細胞で PGRMC1 発現が亢進すること、偽妊娠子宮にオイルを投与して人為的に誘導した脱落膜においても PGRMC1 発現が亢進することを明らかとした。以上の結果から、ラット子宮における PGRMC1 の発現は、妊娠初期過程において時間・空間的に制御されており、腺上皮や管腔上皮における役割と間質細胞の脱落膜化への関与が示唆された。

(2) ヒト月経周期内での子宮内膜における PGRMC1 発現変動と脱落膜化との関係

増殖期及び分泌期の子宮内膜において PGRMC1 は、間質細胞と腺上皮細胞に発現しており、増殖期と比較して分泌期では PGRMC1 発現が低いことを明らかとした。また、初代培養 ESC に P4 と cAMP 誘導体を処置して脱落膜化を誘起すると、インスリン様成長因子結合タンパク質 1 (IGFBP1) やプロラクチン (PRL) の発現を指標とした脱落膜化の進行とともに PGRMC1 発現量が減少した。

脱落膜化過程における PGRMC1 発現の調節機構を調べるため、PGRMC1 発現を負に調節する因子としてマイクロ RNA を探索したところ、その候補として miR-98 を見出した。初代培養 ESC に miR-98 mimic を導入すると PGRMC1 発現は減弱した。さらに、*in vitro* 脱落膜化過程において、miR-98 発現は、その進行とともに発現レベルが増加した。これらの結果から、分泌期における PGRMC1 発現の低下には、一部 miR-98 を介した発現調節機構が関与することを明らかとした。

(3) ESC の脱落膜化における PGRMC1 の役割と発現調節機構

分泌期における子宮内 PGRMC1 発現低下の生理的意義を解明するため、初代培養 ESC の脱落膜化に対する PGRMC1 ノックダウンと PGRMC1 阻害薬の効果について検討した。siRNA の導入による PGRMC1 ノックダウンは、P4 と cAMP 誘導体の共処置による脱落膜化 (IGFBP1、PRL 発現) を促進した。また、PGRMC1 阻害薬 AG205 の処置によっても ESC の脱落膜化が亢進した。また、脱落膜化過程では、細胞老化が生じることが知られており、PGRMC1 とこの細胞老化との関係について解析したところ、ESC に AG205 を処置後、脱落膜化刺激を加えると老化関連 ガラクトシダーゼ (SA-b-Gal) 活性が有意に増加することを見出した。

これらの知見から、分泌期における PGRMC1 発現の低下が着床環境の準備に寄与することが推察された。また、興味深いことに cAMP 誘導体のみの脱落膜化刺激においても PGRMC1 阻害による脱落膜化促進作用がみられた。このことから、PGRMC1 発現・機能阻害による脱落膜化の促進機構には、P4 作用に依存しない系が存在することも示唆された。

(4) 内膜腺上皮細胞における PGRMC1 の役割

上記の通り、ラット及びヒト子宮内膜の腺上皮細胞においても PGRMC1 発現が確認された。ヒト内膜腺上皮細胞株 (EM1) を用いて着床関連因子として知られるシクロオキシゲナーゼ 2 (COX2) の発現に対する AG205 の効果を調べた。EM1 における COX2 発現は、AG205 単独処置により増加した。また、cAMP 誘導体の処置による COX2 発現誘導に対しても AG205 は促進的に作用した。

(5) 胎盤栄養膜細胞における PGRMC1 の役割

胎盤を構成する絨毛性栄養膜細胞に PGRMC1 の発現を確認しているが、その役割については不明である。そこで、胎盤栄養膜由来絨毛癌細胞株 (BeWo 細胞) を用い、栄養膜細胞の機能的分化 (絨毛性ゴナドトロピン (HCG) 産生) と PGRMC1 との関係について調べた。AG205 処置による PGRMC1 の機能抑制は、cAMP 刺激下での HCG 産生を顕著に増加させた。

以上、子宮内膜における PGRMC1 は、脱落膜化や着床関連因子の制御因子であり、分泌期に起こるマイクロ RNA を介した PGRMC1 発現の低下やそれに伴う細胞老化が胞胚受容能の獲得 (着床に向けた内膜の変化) に積極的に関与することが示唆された。また、妊娠後においても PGRMC1 の発現制御が胎盤形成に重要な栄養膜細胞の分化に寄与することが推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kusama K, Tamura K, Bai H, Sakurai T, Nishi H, Isaka K, Imakawa K, Yoshie M. Exchange protein directly activated by cAMP (EPAC) promotes transcriptional activation of the decidual prolactin gene via CCAAT/enhancer-binding protein in human endometrial stromal cells. *Reprod Fertil Dev*. 査読有 11:1454-1461, 2018

〔学会発表〕(計 22 件)

吉江 幹造、田村 和広、米川 涼、千葉 翼、井坂 恵一、桑原 直子、立川 英一、ラット妊娠初期子宮における PGRMC1 の発現解析、日本薬学会 第 137 年会 (2017 年)

毛野 恵理子、吉江 幹造、田村 和広、石川 源、井坂 恵一、桑原 直子、立川 英一、ニフェジピンによる胎盤栄養膜細胞の分化促進機構、日本薬学会 第 137 年会 (2017 年)

毛野 恵理子、吉江 幹造、玉腰 琳奈、田村 和広、石川 源、中井 章人、竹下 俊行、井坂 恵一、桑原 直子、立川 英一、cAMP シグナル伝達経路を介した 栄養膜細胞の分化に対する 細胞内カルシウムイオンの役割、第 21 回 日本生殖内分泌学会学術集会 (2017 年)

M. Yoshie, K. Tamura, R. Yonekawa, H. Nishi, K. Isaka, N. Kuwabara, E. Tachikawa. Possible roles of uterine PGRMC1 in the implantation and decidualization. International Federation of Placenta Associations Meeting 2017 (2017 年)

K. Tamura, M. Yoshie, K. Kusama, H. Bai, T. Sakurai, K. Imakawa, H. Nishi, K. Isaka, E. Tachikawa. Regulation of decidual prolactin through EPAC-mediated CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP- β) in endometrial stromal cells. 4th World Congress of Reproductive Biology (WCRB 2017) (2017 年)

M. Yoshie, K. Tamura, R. Yonekawa, H. Nishi, K. Isaka, N. Kuwabara, E. Tachikawa. Expression of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in the peri-implantation rat uterus. 4th World Congress of Reproductive Biology (WCRB 2017) (2017 年)

吉江 幹造、田村 和広、千葉 翼、井坂 恵一、桑原 直子、立川 英一、ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化における 5 α -還元酵素の役割、第 136 回 日本薬理学会関東部会 (2017 年)

千葉 翼、吉江 幹造、田村 和広、毛野 恵理子、西洋孝、井坂 恵一、桑原 直子、立川 英一、妊娠成立に不可欠なヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化における 5 α -還元酵素を介したプロゲステロン代謝調節機構の役割、第 61 回 日本薬学会関東支部大会 (2017 年)

吉江 幹造、田村 和広、千葉 翼、毛野 恵理子、西洋孝、井坂 恵一、桑原 直子、立川 英一、ヒト子宮内膜間質細胞における 5 α -還元酵素を介したプロゲステロン代謝と脱落膜化への関与、第 25 回 日本胎盤学会学術集会 (2017 年)

米川 涼、吉江 幹造、田村 和広、桑原 直子、立川 英一、井坂 恵一、西洋孝、妊娠成立に向けた子宮内膜細胞の変化におけるプロゲステロン受容体膜構成因子 1 (PGRMC1) の役割、第 76 回 西東京内分泌代謝研究会 (2017 年)

千葉 翼、吉江 幹造、田村 和広、桑原 直子、立川 英一、井坂 恵一、西洋孝、ヒト子宮内膜間質細胞における 5 α -還元酵素を介した局所的なプロゲステロン代謝と脱落膜化との関係、第 138 回 日本薬理学会関東部会 (2017 年)

米川 涼、吉江 幹造、田村 和広、桑原 直子、立川 英一、井坂 恵一、西洋孝、子宮内膜の着床準備機構におけるプロゲステロン受容体膜構成因子 1 (PGRMC1) の役割、第 138 回 日本薬理学会関東部会 (2017 年)

田村 和広、吉江 幹造、小島 淳哉、井坂 恵一、西洋孝、桑原 直子、立川 英一、子宮内腔良性腫瘍摘出術が子宮内膜の着床因子に与える影響、日本薬学会第 138 年会 (2018 年)

吉江 幹造、米川 涼、田村 和広、小島 淳哉、井坂 恵一、西洋孝、桑原 直子、立川 英一、胞胚受容能の獲得におけるプロゲステロン受容体膜構成因子 1 (PGRMC1) の役割、日本薬学会 第 138 年会 (2018 年)

M. Yoshie, K. Tamura, T. Chiba, S. Nakajima, N. Kuwabara, E. Tachikawa, K. Isaka, and H. Nishi. Involvement of 5 α -reductase-mediated progesterone metabolism in the decidualization of human endometrial stromal cells. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (2018 年)

千葉 翼、吉江 幹造、田村 和広、毛野 恵理子、中嶋 彩葉、小島 淳哉、井坂 恵一、西洋孝、ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化における 5 α -還元酵素を介したプロゲステロン代謝調節機構、第 36 回 日本受精着床学会総会・学術講演会 (2018 年)

米川 涼、吉江 幹造、田村 和広、小島 淳哉、西洋孝、井坂 恵一、子宮内膜の胞胚受容能の獲得におけるプロゲステロン受容体膜構成因子 (PGRMC1) の役割、第 36 回 日本受精着床学会総会・学術講演会 (2018 年)

M. Yoshie, T. Chiba, S. Nakajima, J. Kojima, H. Nishi, K. Isaka, K. Tamura. Changes in progesterone metabolism in endometrial stromal cells during decidualization. The 7th Asian Conference on Endometriosis (ACE2018) (2018 年)

M. Yoshie, T. Chiba, S. Nakajima, J. Kojima, H. Nishi, K. Isaka, and K. Tamura. Implications of 5 α -reductase-mediated progesterone metabolism for decidualization of human endometrial stromal cells. International Federation of Placenta Associations Meeting 2018 (IFPA2018) (2018 年)

R. Yonekawa, M. Yoshie, K. Tamura, J. Kojima, H. Nishi, K. Isaka. Stage-specific downregulation of Progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) during the menstrual cycle stimulates human endometrial stromal cells decidualization. International Federation of Placenta Associations Meeting 2018 (IFPA2018) (2018 年)

②中嶋 彩葉、吉江 幹造、田村 和広、小島 淳哉、西洋孝、ヒト子宮内膜における 5 α -還元酵素を介した局所的なプロゲステロン代謝と脱落膜化との関係、第 182 回 東京医科大学医学会

総会（2018年）

⑫吉江 幹造、米川 涼、小島 淳哉、西 洋孝、井坂 惠一、田村 和広、月経周期の分泌期におけるプロゲステロン受容体膜構成因子1（PGRMC1）の発現低下が子宮内膜間質細胞の脱落膜化を促進する、第92回日本薬理学会年会（2019年）

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.ps.toyaku.ac.jp/shinkeiyakuri/>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：田村 和広

ローマ字氏名： Kazuhiro Tamura

研究協力者氏名：井坂 惠一

ローマ字氏名： Keiichi Isaka

研究協力者氏名：西 洋孝

ローマ字氏名： Nishi Hiroataka

研究協力者氏名：小島 淳哉

ローマ字氏名： Ishikawa Gen

研究協力者氏名：石川 源

ローマ字氏名： Ishikawa Gen

研究協力者氏名：久保田 海雄

ローマ字氏名： Kubota Kaiyu

研究協力者氏名：米川 涼

ローマ字氏名： Yonekawa Ryo

研究協力者氏名：千葉 翼

ローマ字氏名： Chiba Tsubasa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。