

平成21年2月4日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390449
 研究課題名(和文) 子宮筋腫発育の性ステロイド制御機構解析に基づく新しい治療法開発に向けた戦略的研究
 研究課題名(英文) Strategy for the development of new therapy for uterine leiomyoma based on the analysis of sex steroidal action in leiomyoma growth
 研究代表者
 小原 範之(OHARA NORIYUKI)
 神戸大学・医学部附属病院・准教授
 研究者番号：70214210

研究成果の概要：我々は新しい子宮筋腫治療薬として期待されているプロゲステロン受容体モデュレーター(selective progesterone receptor modulator: SPRM)が子宮筋腫細胞において細胞増殖を抑制し、同時にアポトーシスを誘導することを世界に先駆けて明らかにした。今回の研究でSPRMは小胞体ストレス誘導に続いてアポトーシス関連蛋白発現に影響を及ぼしていることを示した。さらに、SPRMが子宮筋腫細胞での細胞外基質蛋白関連蛋白発現を修飾し、コラーゲン生成を抑制させることを初めて明らかにした。SPRMは子宮筋腫の細胞死を誘導し、またコラーゲン合成を抑制することで子宮筋腫発育を抑制している可能性が推測された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2007年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

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：子宮筋腫、プロゲステロン受容体モデュレーター、アポトーシス、細胞外基質蛋白、コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

近年の研究により、子宮筋腫は従来より考えられてきたエストロゲンによる発育制御機構以外に、プロゲステロンによっても発育が制御されていることが判明してきた。我々は、子宮筋腫細胞培養系を確立しプロゲステロン(progesterone: P4)の直接作用を検討することで、P4は子宮筋腫の増殖に密接に関わっ

ていることを明らかにしてきた。P4は子宮筋腫細胞の増殖を刺激し、アポトーシスを誘導して子宮筋腫発育に対して促進的に働く作用が主体であることを認めた。そのため、プロゲステロン受容体モデュレーター(selective progesterone receptor modulator: SPRM)は子宮筋腫発育に対して抑制的に働く可能性が推察され、実際に欧米での臨床試験において

SPRM は子宮筋腫体積の縮小をきたすことが報告された。我々は NIH および米国の TAP で開発された新しいタイプの SPRM である CDB-2914 と asoprisnil の提供を受け、SPRM の子宮筋腫細胞発育に及ぼす影響を基礎的に研究してきた。その結果、SPRM は子宮筋腫細胞の増殖能の抑制、アポトーシス誘導、局所成長因子発現の抑制など多面的な作用を有することが明らかになった。一方、SPRM は培養正常子宮筋細胞の増殖、アポトーシスには影響を及ぼさないことも確認している。

2. 研究の目的

子宮筋腫発育には種々の因子が関与していることが推測されている。子宮筋腫ではコラーゲンを代表とした細胞外基質蛋白発現が増強していることが知られており、細胞外基質蛋白が子宮筋腫発育に重要な役割を果たしていることが推測されている。しかし、現在のところ子宮筋腫発育に対する SPRM の作用機序の全体的な解明には至っていない。そこで、本研究では培養子宮筋腫細胞のアポトーシス調節機構および細胞外基質蛋白発現調節機構に SPRM が如何に関わるかを解析することにより子宮筋腫発育抑制における SPRM の役割を明らかにする。SPRM による子宮筋腫発育制御機構を検討する本研究は子宮筋腫発育の病態の一端を解明することを可能とし、さらに近い将来に臨床応用されることが期待される SPRM の子宮筋腫縮小作用機序の解明にもつながり、保存的子宮筋腫治療に多大な貢献をもたらすものと考えられる。

3. 研究の方法

(1)SPRM の培養子宮筋腫細胞における小胞体ストレス誘導およびアポトーシス誘導に及ぼす影響に関する検討

培養子宮筋腫細胞に asoprisnil を添加し、小胞体ストレス関連蛋白である ubiquitin, p-PERK, p-eIF2 α , ATF4, GRP78, Gadd153 蛋白発現を Western blot 法を用いて経時的に調べるとともに、アポトーシスの指標となる PARP 発現を Western blot 法にて調べた。IRE1 α および XBP-1 発現も同様に検討した。また、小胞体ストレス関連蛋白発現に対する asoprisnil の用量依存性についても検討を行った。

(2)Gadd153 の RNA interference が SPRM による培養子宮筋腫細胞におけるアポトーシス関連因子発現に及ぼす影響に関する検討
Gadd153 に対する特異的な small interfering RNA を合成し、これを培養子宮筋腫細胞に取り込ませることで Gadd153 蛋白発現を抑制した。RNA interference を行った培養子宮筋腫細胞に asoprisnil を添加し、p-PERK, p-eIF2 α , ATF4 蛋白発現に及ぼす影響を Western blot 法

を用いて検討した。また、RNA interference を行った培養子宮筋腫細胞に asoprisnil を添加し、TUNEL 陽性細胞率を計測するとともに、アポトーシス関連蛋白である Gadd34, TRB3, Bcl-2, Bax, Bak 発現に及ぼす影響を Western blot 法にて検討した。

(3)SPRM の培養子宮筋腫細胞における細胞外基質蛋白発現に及ぼす影響に関する検討

培養子宮筋腫細胞および正常子宮平滑筋細胞における EMMPRIN, collagen type I, collagen type III, MMP-1, MT1-MMP, TIMP-1, TIMP-2 蛋白発現を Western blot 法を用いて比較検討した。さらに、asoprisnil を培養子宮筋腫細胞および正常子宮平滑筋細胞に添加し、EMMPRIN, collagen type I, collagen type III, MMP-1, MT1-MMP, TIMP-1, TIMP-2 蛋白発現に対する影響を Western blot 法を用いて比較検討した。また、CDB-2914 添加が培養子宮筋腫細胞および正常子宮平滑筋細胞における EMMPRIN, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, collagen type I, collagen type III 発現に及ぼす影響を Western blot 法あるいは real-time RT-PCR 法を用いて調べた。CDB-2914 を添加した培養子宮筋腫細胞の培養液中における MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 酵素活性を activity assay を用いて調べた。

(4)Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN)の RNA interference が SPRM による培養子宮筋腫細胞における細胞外基質蛋白発現に及ぼす影響に関する検討
EMMPRIN に対する特異的な small interfering RNA を合成し、これを培養子宮筋腫細胞に取り込ませることで EMMPRIN 蛋白発現を抑制した。RNA interference を行った培養子宮筋腫細胞に CDB-2914 を添加し、MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, collagen type I, collagen type III 発現を Western blot 法あるいは real-time RT-PCR 法を用いて調べた。

4. 研究成果

(1)SPRM の培養子宮筋腫細胞における小胞体ストレス誘導およびアポトーシス誘導に及ぼす影響に関する検討

培養子宮筋腫細胞への 10⁻⁷ M asoprisnil 添加により、ubiquitin 蛋白発現は添加 2 時間目で有意に増強し始め、添加 6 時間目にピークに達した。p-PERK, p-eIF2 α , ATF4, GRP78 蛋白発現は 10⁻⁷ M asoprisnil 添加 4 時間目に有意に増強した。アポトーシス促進因子である Gadd153 蛋白発現は 10⁻⁷ M asoprisnil 添加 6 時間目に有意に増強し、その後も高値を持続した。Cleaved PARP 蛋白発現は 10⁻⁷ M asoprisnil 添加 8 時間目から有意に増強を示した。しかし、10⁻⁷ M asoprisnil 添加は IRE1 α および XBP-1 蛋白発現に影響を及ぼさなかった。培

養子宮筋腫細胞に 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M の asoprisnil を添加したところ、ubiquitin, p-PERK, p-eIF2 α , ATF4, GRP78、GRP94, Gadd153 蛋白発現は用量依存性に増加した。(2) Gadd153 の RNA interference が SPRM による培養子宮筋腫細胞におけるアポトーシス関連因子発現に及ぼす影響に関する検討

Gadd153 に対する RNA interference 実験では、asoprisnil 添加による培養子宮筋腫細胞の p-PERK, p-IF2 α , ATF4 蛋白発現に影響はなかった。Gadd153 に対する RNA interference を行った培養子宮筋腫細胞に asoprisnil を添加すると cleaved PARP 蛋白発現が減弱し、TUNEL 陽性細胞率が減少した。また、Gadd153 に対する RNA interference により、asoprisnil によるアポトーシス促進因子である Gadd34, TRB3, Bax, Bak 蛋白発現の増強が抑制され、一方アポトーシス抑制因子である Bcl-2 蛋白発現抑制作用が減弱した。

(3) SPRM の培養子宮筋腫細胞における細胞外基質蛋白発現に及ぼす影響に関する検討

培養子宮筋腫細胞では、培養正常子宮平滑筋細胞と比べて EMMPRIN, MMP-1, MT1-MMP 蛋白発現が減弱しており、一方 collagen type I, collagen type III, TIMP-1, TIMP-2 蛋白発現は増強していた。 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M の asoprisnil を培養子宮筋腫細胞および正常子宮平滑筋細胞に添加したところ、培養子宮筋腫細胞では 10^{-7} M, 10^{-6} M の asoprisnil 添加により EMMPRIN, MMP-1, MT1-MMP 蛋白発現が有意に増強したが、collagen type I, collagen type III, TIMP-1, TIMP-2 蛋白発現は有意に減少した。しかし、asoprisnil 添加は培養正常子宮平滑筋細胞における上記細胞外基質蛋白発現に影響を及ぼさなかった。また、 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M の CDB-2914 添加により、培養子宮筋腫細胞における EMMPRIN, MMP-1, MMP-8 蛋白発現は用量依存性に増強したが、TIMP-1, TIMP-2, collagen type I, collagen type III 蛋白発現は用量依存性に減弱した。 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M の CDB-2914 添加により、培養子宮筋腫細胞における MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 mRNA レベルは用量依存性に増強したが、TIMP-1, TIMP-2 mRNA レベルは用量依存性に減弱した。しかし、CDB-2914 添加は培養正常子宮平滑筋細胞における上記細胞外基質蛋白発現に影響を及ぼさなかった。培養子宮筋腫細胞の培養液中の MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 の酵素活性は CDB-2914 添加により有意に増加した。

(4) Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) の RNA interference が SPRM による培養子宮筋腫細胞における細胞外基質蛋白発現に及ぼす影響に関する検討

EMMPRIN に対する RNA interference 実験では、CDB-2914 添加による培養子宮筋腫細胞

の EMMPRIN, MMP-1, MMP-3, MMP-8 発現増強作用が抑制された。一方、EMMPRIN に対する RNA interference により、CDB-2914 添加による培養子宮筋腫細胞における TIMP-1, TIMP-2, collagen type I, collagen type III 発現抑制作用が阻害された。

以上の研究は SPRM が培養子宮筋腫細胞の発育を小胞体ストレスの誘導を介してアポトーシスを亢進させることで発育を抑制することを世界で初めて明らかにしたものである。また、SPRM が子宮筋腫における主要な細胞外基質蛋白であるコラーゲン合成を阻害することで子宮筋腫の tissue integrity を減弱させ、その結果として子宮筋腫発育を抑制している可能性が推測された。これらの成果は子宮筋腫治療に対する SPRM の有用性を示す基礎的裏付けとなる重要な新治験と考えられる。なお、今回の成果は一流国際医学雑誌にすでに掲載された。現在、コラーゲン以外の細胞外基質蛋白として versican に注目し、SPRM が子宮筋腫細胞における versican 発現に及ぼす影響を検討するとともに、transcription factor である SOX4 が子宮筋腫発育に及ぼす作用機序に関して鋭意検討中である。

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 10 件)

- ① Ohara N. A putative role of versican in uterine leiomyomas. Clin Exp Obstet Gynecol (in press), 査読有
- ② Ohara N. Sex steroidal modulation of collagen metabolism in uterine leiomyomas. Clin Exp Obstet Gynecol (in press), 査読有
- ③ 小原範之. プロゲステロンの実用化の現状. 日本医事新報 No. 4386, 94-95, 2008. 査読無
- ④ Ohara N. Regulatory mechanism of Bcl-2 in uterine leiomyomas. Clin Exp Obstet Gynecol 35:1240-241, 2008, 査読有.
- ⑤ Ohara N. Action of progesterone receptor modulators on uterine leiomyomas. Clin Exp Obstet Gynecol 35:165-166, 2008, 査読有.
- ⑥ Morikawa A, Ohara N, Xu Q, Nakabayashi K, DeManno DA, Chwalisz K, Yoshida S, Maruo T. Selective progesterone receptor modulator asoprisnil down-regulates collagen synthesis in cultured human uterine leiomyoma cells through up-regulating extracellular matrix metalloproteinase inducer. Hum Reprod 23:944-951, 2008, 査読有.
- ⑦ Xu Q, Ohara N, Liu J, Amano M, Sitruk-Ware R, Yoshida S, Maruo T.

Progesterone receptor modulator CDB-2914 induces extracellular matrix metalloproteinase inducer in cultured human uterine leiomyoma cells. *Mol Hum Reprod* 14:181-191, 2008, 査読有.

- ⑧ Xu Q, Ohara N, Liu J, Nakabayashi K, DeManno D, Chwalisz K, Yoshida S, Maruo T. Selective progesterone receptor modulator asoprisnil induces endoplasmic reticulum stress in cultured human uterine leiomyoma cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1002-E1011, 2007, 査読有.
- ⑨ Ohara N, Morikawa A, Chen W, Wang J, DeManno DA, Chwalisz K, Maruo T. Comparative effects of SPRM asoprisnil (J867) on proliferation, apoptosis, and the expression of growth factors in cultured uterine leiomyoma cells and normal myometrial cells. *Reprod Sci* 14:20-27, 2007, 査読有.
- ⑩ Maruo T, Ohara N, Matsuo H, Xu Q, Chen W, Sitruk-Ware R, Johansson EDB. Effects of levonorgestrel-releasing IUS and progesterone receptor modulator PRM CDB-2914 on uterine leiomyomas. *Contraception*, 75:S99-S103, 2007, 査読有.

[学会発表] (計 18 件)

- ① Maruo T. Attack on uterine fibroids by progesterone receptor modulator in a cell-type specific manner. International Workshop on Uterine Fibroids, December 10-13, 2008, Berlin, Germany.
- ② Maruo T, Matsuo H, Ohara N, Samoto T, Nakago S, Xu Q, Chen W, Wang J. Progesterone and progesterone receptor modulator in uterine leiomyoma growth. The Oxford-Kobe Biomedical Seminar: International Symposium on Translational Research in Uterine Biology, November 29-30, 2007, Kobe, Japan.
- ③ Maruo T. Effects of CDB-2914 on ECM expression in cultured leiomyoma cells. The 91th International Committee Meeting of the Population Council, October 23-25, 2007, New York, USA.
- ④ Xu Q, Ohara N, Liu J, Sasaki H, Morikawa A, Yoshida S, DeManno D, Chwalisz K, Maruo T. Selective progesterone receptor modulator asoprisnil induces endoplasmic reticulum stress in cultured uterine leiomyoma cells. The 20th Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynecology, September 21-25, 2007, Tokyo, Japan.
- ⑤ Maruo T, Matsuo H, Samoto T, Nakago S, Xu Q, Chen W, Wang J, Ohara N.

Progesterone and progesterone receptor modulator in uterine leiomyoma growth: their implication in reproductive health. The 12th Annual Conference of the Egyptian Fertility and Sterility Society, September 6-7, 2007, Cairo, Egypt.

- ⑥ Xu Q, Ohara N, Liu J, Morikawa A, Sasaki H, Maruo T. Selective progesterone receptor modulator asoprisnil induces endoplasmic reticulum stress in cultured human uterine leiomyoma cells. 第 59 回日本産科婦人科学会、平成 19 年 4 月 14 日～4 月 17 日、京都.
- ⑦ 森川 哲、小原範之、中林幸士、丸尾 猛. 子宮筋腫における選択的プロゲステロン受容体モデュレーター-J867 のコラーゲン関連タンパク発現への影響の検討. 第 59 回日本産科婦人科学会、平成 19 年 4 月 14 日～4 月 17 日、京都.
- ⑧ 小原範之. プロゲステロン受容体モデュレーターならびに GnRH antagonist によるヒト子宮筋腫細胞発育制御機構の解析. 第 59 回日本産科婦人科学会、平成 19 年 4 月 14 日～4 月 17 日、京都.
- ⑨ Maruo T, Ohara N, Morikawa A, Chen W, Wang J, DeManno D, Chwalisz K. Comparative effects of SPRM asoprisnil (J867) on the proliferation, apoptosis and the expression of growth factors and ECM in cultured uterine leiomyoma cells and normal myometrial cells. The 8th International Conference on the Extracellular Matrix of the Female Reproductive Tract, November 11-13, 2006, Maui, Hawaii, USA.
- ⑩ Maruo T, Ohara N, Matsuo H, Nakago S, Yamada T, Chen W, Xu Q, Wang J, Sitruk-Ware R, Johansson EDB. In vitro effects of progesterone and progesterone receptor modulator on uterine leiomyoma growth. The XVIII FIGO World Congress of Gynecology and Obstetrics, November 5-10, 2006, Kuala Lumpur, Malaysia.
- ⑪ Maruo T, Ohara N, Xu Q, Chen W, Sitruk-Ware R, Johansson EDB. Progesterone receptor modulator (CDB-2914) induces apoptosis and inhibits proliferation and VEGF expression in cultured uterine leiomyoma cells but not in cultured normal myometrial cells. The XVIII FIGO World Congress of Gynecology and Obstetrics, November 5-10, 2006, Kuala Lumpur, Malaysia.
- ⑫ Maruo T, Matsuo H, Ohara N, Xu Q, Chen W, Sitruk-Ware R, Johansson EDB. Comparative effects of progesterone and PRM CDB-2914 on cultured uterine leiomyoma cells and myometrial cells. The

89th International Committee Meeting of the Population Council, October 27-28, 2006, New York, USA.

- ⑬ Maruo T. Effects of CDB-2914 on PR-A and PR-B in leiomyoma and normal myometrium. The 89th International Committee Meeting of the Population Council, October 24-26, 2006, New York, USA.
- ⑭ Maruo T, Matsuo H, Samoto T, Shimomura Y, Kurachi O, Nakago S, Yamada T, Xu Q, Chen W, Wang J, Ohara N. Progesterone and selective progesterone receptor modulator in uterine leiomyoma growth. The 92th Annual Congress of the Korean Society of Obstetrics and Gynecology, September 30-October 1, 2006, Seoul, Korea.
- ⑮ 徐 沁、小原範之、佐々木紘子、陳 衛、丸尾 猛。プロゲステロン受容体モデューレーターCDB-2914 は培養子宮筋腫細胞における VEGF, adrenomedullin とその受容体発現を抑制する。第 58 回日本産科婦人科学会、平成 18 年 4 月 22 日～4 月 25 日、横浜。
- ⑯ 森川 哲、小原範之、陳 衛、王 佳茵、丸尾 猛。選択的プロゲステロン受容体モデューレーターJ867 は組織選択的に培養子宮筋腫細胞の増殖を阻害し、アポトーシスを誘導する。第 58 回日本産科婦人科学会、平成 18 年 4 月 22 日～4 月 25 日、横浜。
- ⑰ Maruo T, Ohara N, Chen W, Wang J, DeManno D, Chwalisz K. SPRM asoprisnil (J867) inhibits the proliferation and induces apoptosis in cultured uterine leiomyoma cells but not in cultured normal myometrial cells. The 12th World Congress of Gynecological Endocrinology, March 2-5, 2006, Florence, Italy.
- ⑱ Maruo T, Matsuo H, Xu Q, Chen W, Wang J, Ohara N. Progesterone and selective progesterone receptor modulator in uterine leiomyoma growth. International Seminar in Reproductive Endocrinology, February 28, 2006, Siena, Italy.

[図書] (計 3 件)

- ① Ohara N, Xu Q, Matsuo H, Maruo T. Elsevier, Amsterdam, Progesterone and progesterone receptor modulator in uterine leiomyoma growth. Translational research in uterine biology, 2008, 161-178. 査読有
- ② 小原範之、丸尾 猛。中外医学社、子宮筋腫と SPRM: 子宮筋腫治療の新戦略. Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌, 2008, 198-204. 査読有
- ③ 小原範之、丸尾 猛。メジカルビュー社。

子宮筋腫研究の最近の話題と今後の展望.
子宮筋腫の臨床, 2008, 246-251. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小原 範之 (OHARA NORIYUKI)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 70214210

(平成 19 年度まで)

丸尾 猛 (MARUO TAKESHI)

神戸大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 60135811

(2) 研究分担者

吉田茂樹 (YOSHIDA SHIGEKI)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 70294212

中林幸士 (NAKABAYASHI KOJI)

神戸大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 80362789

松尾博哉 (MATSUO HIROYA)

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号: 60229432

(3) 連携研究者

該当なし