

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09290

研究課題名(和文) 新たな選択的Estrogen受容体調節薬を用いた子宮内膜症治療の開発

研究課題名(英文) Development of a New Selective Estrogen Receptor Modulator for the Treatment of Endometriosis

研究代表者

原田 省 (HARADA, Tasuku)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：40218649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症に対する新規の選択的estrogen受容体調整薬の開発を目指した。子宮内膜症モデルマウスと子宮内膜症細胞培養系を使い既存の薬剤とは全く異なる作用機序を持った薬物の開発を目標とした。新しいSERMであるSR-16234を子宮内膜症モデルマウスに投与することで、病変の数の変化と炎症抑制効果を調べた。SR-16234に対する応答遺伝子の検証にはChIP-seq解析を行い、対照リガンドを用いることで、有用性を検討解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、子宮内膜症の治療としては外科的治療と薬物治療が行われるが、外科的治療の術後再発率が高いことや、現在使用されている薬物治療の薬剤の副作用は問題であり、より安全に長期的に使用できる新しい効果を持った薬剤の開発が必要とされている。現在の薬物療法はホルモン剤による薬物療法が主体であり、基本的に排卵抑制による無月経が主要な作用機序である。既存の薬剤とは全く異なる作用機序を持った薬物の開発は長期の症状コントロールや治療を行いながらの妊娠治療に結びつき、子宮内膜症の薬物療法に新しい展開をもたらす。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop the novel selective estrogen receptor modulators for endometriosis. Our goal is to develop a novel drugs with a completely different mechanism from existing drugs using the endometriosis model mouse and the endometriosis derived-cell culture system. Using a endometriosis model mouse, the efficacy of a new SERM, SR-16234, on changes in the number of lesions and anti-inflammation action in was investigated. We performed ChIP-seq analysis to validate the responsive genes to SR-16234, and examine their usefulness.

研究分野：子宮内膜症

キーワード：子宮内膜症 Estrogen受容体 選択的Estrogen受容体調整薬

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は Estrogen 依存性疾患である。子宮内膜症組織では Estrogen 受容体 (Estrogen receptor : ER) α 発現が少なく、ER β が発現していることを示した。ER β には ER α 抑制作用を持つことが示唆されていることから、本研究では ER β を標的とした新しい薬物療法開発を目指す。子宮内膜症細胞培養系と子宮内膜症マウスモデルを用いて、ER α 及び ER β が子宮内膜症の発生・進展における役割を探索するとともに新規の選択的 Estrogen 受容体調整薬 (Selective Estrogen Receptor Modulator : SERM) による治療開発に向けた研究を行う。子宮内膜症に対しては外科治療と薬物治療が行われるが、術後再発率が高いことと副作用が問題であり、より長期に安全に使用できる薬剤の開発が待たれている。また、これまでは ホルモン剤による薬物療法が主体であり、基本的に排卵抑制による無月経が主要な作用機序である。既存の薬剤とは全く異なる作用機序を持った薬物の開発は長期の症状コントロールや治療を行いながらの妊娠治療に結びつき、子宮内膜症の薬物療法に新しい展開をもたらす。

2. 研究の目的

子宮内膜症に対しては外科治療と薬物治療が行われるが、術後再発率が高いことや副作用が問題であり、より安全に使用できる 薬剤の開発が待たれている。本研究では子宮内膜症と正所性子宮内膜症における ER α および ER β の発現と役割を明らかにし、その特性の違いを利用した新規の選択的エストロゲン受容体調整薬 (SERM) による子宮内膜症の治療薬を開発する。

3. 研究の方法

- (1) 子宮内膜症細胞 (ESC)の採取・培養[手術患者の同意を得て、摘出された卵巣チョコレート嚢胞壁から子宮内膜症間質細胞を分離・培養する。嚢胞壁は細切後にコラーゲン処理を行い、メッシュを通すことで上皮と間質細胞を分離する。間質細胞の純度は 98%以上であることを免疫染色で確認している。細胞培養に関しては内膜症細胞については、初代から 3 代までの細胞を用いる (原田、谷口)]
- (2) ESC の ER および PR 発現とプロモーター解析[子宮内膜症(ESC)と子宮内膜から total RNA を採取して cDNA を作成する。ER α 、ER β 1-5 のサブタイプおよび PR に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行って発現解析を行う(谷口)。さらに、ER については、組織特異的なプロモーター解析のためのプライマーを設計して RT-PCR による発現解析を行う (谷口)]
- (3) 新規 SERM に対する応答性遺伝子発現の解析[新規 SERM である SR-16234 について RT2 Profiler PCR アレイ解析により応答性遺伝子について検証する。SERM としては、SR-16234、Tamoxifen、Raloxifene、Bazedoxifene を用いて、対照リガンドとして PPT(ER α 特異リガンド)、DPN(ER β 特異リガンド)、R5020(PR 特異リガンド)を使って比較検証する (谷口)]
- (4) 新規 SERM に対する応答遺伝子の検証[SR-16234 を添加した細胞の ER 抗体、PR 抗体を用いた ChIP(Chromatin immuno-precipitation)-seq 解析により、ゲノムワイド受容体認識領域と関連遺伝子を選別抽出する。対照リガンドとして PPT, DPN, R5020 を用いて 比較検証する。]
- (5) SERM および選択的 ER リガンドの細胞増殖に対する作用[SR-16234 が IL-6 および IL-8 蛋白発現に及ぼす影響を細胞培養上清中の サイトカイン濃度を ELISA 法により測定する (原田、谷口)。細胞増殖への影響は、細胞核内への BrdU の取り込み量を指標に検討する (谷口)。]

4. 研究成果

子宮内膜症のマウスモデルを用いて新しい SERM である SR-16234 の子宮内膜症病変発生への作用を検討した。このマウスモデルは、子宮内膜症の病態である慢性炎症を想定したものであり、薬剤の作用を検証するために適していると考えられる。7 週令のメス BALB/c マ

ウスを用いて、卵巣摘出後にエストロゲン(E2)を毎週1回6週間投与した。E2を2週投与時点でドナーマウスから子宮を摘出して細切後、レシピアントマウスに小切開創から移植した。この時、lipopolysaccharide(LPS)を同時に投与した。その後の4週間にSR-16234、Tamoxifen、Bazedoxifenの投与を行った。薬剤投与の4週後にレシピアントマウスの腹腔内を検索して、子宮内膜症病変の数と表面積をイメージ解析で算出した。

SR-16234の投与によって子宮内膜症病変の数と表面積は優位に減少するなどの効果が得られた。正常な子宮内膜への影響は見られなかった。SR-16234の投与はLPS投与によって刺激されたInterleukin6(IL-6)、Vascular endothelial growth factor(VEGF)、Prostaglandin 2(Ptgs-2)およびエストロゲン受容体(ER)などの遺伝子発現を抑制した。Ki-67とER陽性細胞比率は低下し、CD3、F4/80およびTLR4発現も低下した。さらに、SR-16234を用いて子宮内膜症病変発生への作用も検討を行った。このマウスモデルは子宮内膜症の病態である慢性炎症を想定しており、薬剤作用の検証に適していた。SR-16234を用いることで発生や進展を抑制できることも、病変写真の表面積でイメージ解析を行うことで、確認できた。さらに、病変組織は遺伝子探索のためにRNAの抽出を行い、Ki67などの免疫染色を行い、サイトカイン産出に対する薬剤の影響を知るため、定量的なRT-PCR法での検証も行った。さらにヒト子宮内膜症細胞を用いた実験を行って、マウスモデルと同様にIL-6、IL-8などのサイトカイン生産を抑制することを確認した。これらの子宮内膜症モデルマウスを用いた検証結果を用い、新規の選択的Estrogen受容体調整薬、既存の薬剤とは全く異なる作用機序を持った副作用の少ない、より長期に安全に使用できる治療薬の開発を進めていきたい。

子宮内膜症治療は、手術による外科療法と薬物療法に大別される。外科治療は子宮内膜症による疼痛に対して最も有効な治療であるが、再発率が高いことや卵巣予備能への悪影響があることが問題となる。本症の根治は難しいことから薬物療法との組み合わせが必要となっている。薬物療法としては、ホルモン剤を使って排卵を抑制して無月経や月経血量の減少を誘導する方法が主流となっている。したがって、ホルモン療法には女性ホルモン低下による副作用や排卵抑制によって使用期間には妊娠できないという問題点がある。そこで、排卵抑制を介さない機序の新しい作用機序の薬剤が求められている。本研究では、子宮内膜症組織の特徴的なエストロゲン受容体発現様式をターゲットとする新規薬物療法であり、これまでにない効果が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Izawa M, Taniguchi F, Harada T	4. 巻 2
2. 論文標題 GATA6 expression promoted by an active enhancer may become a molecular marker in endometriosis lesions.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J reprod Immunol	6. 最初と最後の頁 81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/aji.13078.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 IZAWA M, Taniguchi F, Harada T.	4. 巻 2
2. 論文標題 GATA6 expression promoted by an active enhancer may become a molecular marker in endometriosis lesions.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J reprod Immunol	6. 最初と最後の頁 81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/aji.13078.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Khine YM, Taniguchi F, Nagira K, Nakamura K, Ohbayashi T, Osaki M, Harada T.	4. 巻 5
2. 論文標題 New insights into the efficacy of SR-16234, a selective estrogen receptor modulator, on the growth of murine endometriosis-like lesions.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Reprod immunol.	6. 最初と最後の頁 80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/aji.13023.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	谷口 文紀 (TANIGUCHI Fuminori) (40322218)	鳥取大学・医学部・准教授 (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------