

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09295

研究課題名（和文）子宮内膜症のエストロゲン関連受容体による伝達系に基づく新規分子標的治療の基盤確立

研究課題名（英文）Establishing the basis for new molecular-targeted therapies based on the signal transduction system by estrogen-related receptors for endometriosis

研究代表者

北脇 城（Kitawaki, Jo）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：00204925

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：子宮内膜症は、エストロゲン依存性に増殖するが、古典的なER を介するシグナル伝達経路はむしろ少なく、estrogen-related receptor (ERR) の代表的共役因子であるPGC-1 を介した伝達経路が存在する。今回の研究では、PGC-1 の共役因子の1つRXR のアンタゴニストであるHX531が、PGC-1 を阻害し、ER 、炎症性サイトカインであるIL-6、IL-8、そして抗アポトーシス遺伝子であるsurvivinの上昇を抑制することにより、子宮内膜症細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。PGC-1 を介した系は新たな治療戦略確立に有望であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、エストロゲン依存性増殖機構は古典的なER を介するシグナル伝達経路によってのみ説明されてきたが、本研究では子宮内膜症においてPGC-1 を中心とした新たなエストロゲン依存性増殖機構を示した。さらにこの系を阻害することによって子宮内膜症の細胞増殖が抑制されることを示した。現在まで子宮内膜症を完治させる治療法はなく、疼痛を緩和させるための内分泌療法が存在するのみであった。本研究成果は新たな治療戦略確立に有望であることが示された。

研究成果の概要（英文）：Endometriosis grows and regresses in an estrogen-dependent manner. However, the classical estrogen receptor (ER) -mediated signaling pathway is less dominant. The major pathway is that mediated via PGC-1, a representative coactivator of estrogen-related receptor (ERR). In this study, we demonstrated that HX531, an antagonist of RXR (one of the coactivators of PGC-1), suppresses cell proliferation of endometriosis by inhibiting PGC-1 and suppressing the elevation of ER, IL-6 and IL-8, inflammatory cytokines, and survivin, an anti-apoptotic gene. Our findings suggest that the PGC-1 -mediated system is promising for establishing new therapeutic strategies.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：子宮内膜症 エストロゲン関連受容体 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は、子宮内膜またはその類似組織が子宮以外の部位で増殖、発育し、機能する疾患である。腹膜病変、子宮内膜症性卵巣嚢胞(チョコレート嚢胞)、癒着などの多彩な病態を呈する。主な症状は、月経痛、慢性骨盤痛、性交痛などの疼痛、および不妊であり、これらによって思春期から閉経後に至るまで女性の半生にわたって quality of life (QOL) を著しく損ねる。性成熟期女性の約 10% が罹患し、晩婚・少産化のため受療患者数は 222,000 名で、受療率は増加傾向にある。しかし、現在まで完治させる治療法はなく、疼痛を緩和させるための内分泌療法が存在するのみである。

子宮内膜症の病因は未だに不明であるが、主として 10 歳代後半から性成熟期にかけて発生し、閉経や卵巣摘出によりその多くが退縮することから、エストロゲン依存性に増殖することには異論がない。古典的な分子機構は、体循環のエストロゲンが核内のエストロゲン受容体(ER) α と結合し、この複合体がゲノム上の標的遺伝子の上流プロモーターの estrogen response element (ERE) に直接結合することによって下流の mRNA 転写を促進する。正所性子宮内膜にももっぱら ER α が発現しており、エストロゲン作用が率直に発揮される。しかし、子宮内膜症組織の増殖はこのような単純な古典的経路によらないことが下記のように次第に明らかになってきた。

子宮内膜症組織では正所性子宮内膜と異なり ER β が ER α より多く発現する。過剰発現した ER β が ER α と共通の結合部位である ERE を占拠することによって ER α の作用を阻害する(N Engl J Med, 2009)。我々は、前回の科研費研究(H27-29)において、イソフラボンの 1 種であるダイゼイン・リッチ・アグリコン型イソフラボンが、ER β -NF κ B 経路を介してヒト子宮内膜症培養細胞系とモデルマウスの子宮内膜症様病変の増殖を抑制するとともに炎症を抑制することを示している(Takaoka O, et al., J Steroid Biochem Mol Biol, 2018)。

リガンド未知のオーファン核内受容体として発見された estrogen-related receptor (ERR) は ER と非常に類似した構造を有するが、その作用は未だ十分に明らかにされていない。ERR は ER と同様に ERE やその half site である ERRE を認識するが、ER の ERE を介した作用に対して促進/抑制的に働くことでエストロゲン応答を修飾する。ERR には α 、 β 、 γ の 3 種のサブタイプがある。我々は、子宮体癌において ERR α が ER α を介するエストロゲン応答を抑制すること(Watanabe A, et al., J Clin Endocrinol Metab, 2006)、子宮頸癌において ERR α がエストロゲン非依存性に VEGF の転写や発現を制御することを示してきた(Yamamoto T, et al., BMC Cancer, 2015)。また ERR γ が子宮体癌の予後不良因子であることを明らかにし、ERR γ をターゲットとした治療が新たな内分泌療法となりうる可能性について世界に先駆けて示してきた(Matsushima H, et al., Oncotarget, 2016)。子宮内膜症組織においても ERR が発現することを我々は発表している。

子宮内膜症組織にはエストロゲン生合成酵素アロマターゼが過剰発現しており、病変自らが局所でエストロゲンを産生しその濃度を高めていることを、我々は初めて明らかにした(Kitawaki J, et al., Biol Reprod, 1997)。そして科研費研究(H24-26)において、ERR α の代表的共役因子である PPAR γ アゴニストコアクチベーター 1 α (PGC-1 α) が子宮内膜症性卵巣嚢胞においてアロマターゼ発現を亢進させ局所エストロゲン濃度を上昇させていることを明らかにしている(Suganuma I, et al., J Clin Endocrinol Metab, 2014)。

さらに、細胞膜貫通型の G 蛋白共役受容体である G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER-1) が非ゲノミック作用による速いエストロゲン応答を担っている(Nat Rev Endocrinol, 2011)。しかし、その作用は未だ十分に明らかにされていない。前回の科研費研究(H27-29)において、我々は子宮内膜症組織においても GPER1 が発現し、GPER1 アゴニストである G1 が子宮内膜症組織の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することを報告している(Mori T, et al., Fertil Steril 2015)。

このように、子宮内膜症においてエストロゲンによる増殖機構を一部ではあるが解明し、これに着目した治療薬候補を提案してきたが、同時にこの増殖機構がさらに複雑かつ多岐にわたることが鮮明となってきた。(1)これらの分子制御機構をさらに明らかにし、(2)子宮内膜症の新たな分子標的治療の基礎的な戦略を提案していくことが求められている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、前回の科研費研究(H27-29)の成果をさらに発展させて、子宮内膜症由来培養細胞系およびマウス子宮内膜症モデルを用いて、(1)子宮内膜症におけるエストロゲンのエストロゲン関連受容体を介した増殖機構の分子制御機構を明らかにし、さらに(2)子宮内膜症の新たな分子標的治療の基礎的な戦略を提案する。このことによって、より効果的で副作用の少

ない新たな治療薬の開発が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 子宮内膜症組織

京都府立医科大学医学倫理審査委員会の承認および患者の同意を得て、子宮内膜症性卵巣嚢胞の手術時に採取する子宮内膜症組織、および対照として同じ患者および非子宮内膜症患者の正所性子宮内膜を用いた初代細胞培養系を使用した。

(2) 子宮内膜症間質細胞の細胞増殖抑制は WST-8 アッセイ、コロニーフォーメーションアッセイで測定、IL-6、IL-8、アロマトラーゼおよび COX-2 の遺伝子発現をリアルタイム PCR で測定、プロスタグランジン (PG) E2 のタンパクレベルを ELISA で、アロマトラーゼ酵素活性をトリチウム水法で測定した。アロマトラーゼの免疫染色には、我々が新規に開発した感度特異度の高い抗体を使用した。ベクターや siRNA を用いて遺伝子導入させた。NF- κ B 関連タンパクレベルはウェスタンブロットおよび蛍光免疫染色で測定した。

(3) 子宮内膜症モデルマウス

BALB/c マウスに同種マウスの細切した子宮組織を腹腔内に移植したものをを用いた。腹腔内に形成される嚢胞の個数や重量を計測する。Ki67 免疫染色で増殖能を、炎症関連分子の発現は免疫染色で評価した。

4. 研究成果

(1) PGC-1 α を中心とした子宮内膜症増殖機構

我々は核内レセプターと相互反応する転写因子の 1 つである PGC-1 α に着目した。本来は寒冷、食事、低酸素などの環境刺激に関与するが、血管新生やステロイド産生にも影響する。しかし、子宮内膜症における役割は知られていなかった。子宮内膜症の病態メカニズムに関して、アロマトラーゼによって産生されたエストロゲンは ER を介して PG 生成酵素である COX-2 を刺激することにより PGE2 の産生を亢進し、また炎症性サイトカインの上昇をもたらす。そして PGE2 がアロマトラーゼを刺激するという悪循環を形成して、炎症と増殖を促進していると考えられている。

このサイクルの中で PGC-1 α とアロマトラーゼの関係を調べると、子宮内膜症性嚢胞において PGC-1 α とアロマトラーゼは同じ細胞に発現しており、子宮内膜症性嚢胞により強く発現している。PGC-1 α とアロマトラーゼの mRNA 発現量は正の相関をとっている。ChIP アッセイでは、PGC-1 α がアロマトラーゼのプロモータに直接結合することを示している。初代培養した子宮内膜症間質細胞に PGC-1 α を過剰発現させると、予想どおりアロマトラーゼの転写活性は上昇した。しかし、アロマトラーゼ遺伝子上流 PGC-1 α 結合部位の配列に mutation を加えるとこの上昇は起こらなかった。アロマトラーゼを刺激する転写因子である SF-1 の発現も上昇した。では何が PGC-1 α を増加させているのか？ TNF α により上昇がみられたが、E2 や低酸素では上昇はみられなかった。以上をまとめると、PGC-1 α はアロマトラーゼを刺激、エストロゲンを増殖を促し、TNF α は PGC-1 α を刺激する、という悪循環が存在する。

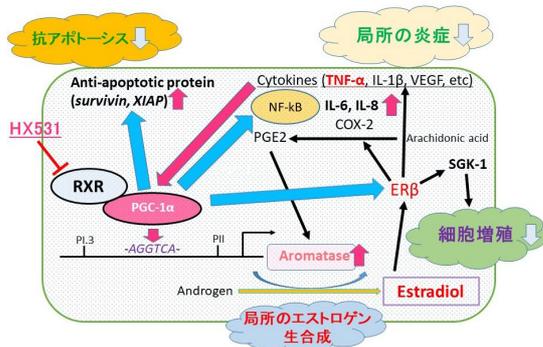


図 PGC-1 α による子宮内膜症のエストロゲン増殖機構とその阻害による増殖抑制

(2) PGC-1 α の阻害による子宮内膜症増殖抑制

そこで、この PGC-1 α を中心とした系を阻害することを試みた。子宮内膜症性間質細胞は、PGC-1 α 過剰発現により増殖亢進し、ノックダウンにより増殖抑制されるが、これらの変化は正常子宮内膜ではみられなかった。

そこで、PGC-1 α の共役因子の 1 つ RXR α のアンタゴニストである HX531 を使用したところ、HX531 添加により PGC-1 α の転写活性は抑制された。子宮内膜症性嚢胞において、RXR α は

PGC-1 α と同じ細胞に発現し、その染色強度は正常子宮内膜より強かった。PGC-1 α は、子宮内膜症で強く発現するER β とSKG-1を亢進させるが、ER α を抑制した。PGC-1 α はアロマトラーゼを刺激するが、HX531はその作用をキャンセルした。同様に、PGC-1 α は炎症性サイトカインであるIL-6、IL-8をNF- κ Bのリン酸化を介して刺激するが、HX531はその作用をキャンセルした。さらに、PGC-1 α は抗アポトーシス遺伝子であるsurvivinとXIAPの発現を刺激したが、HX531はsurvivin刺激作用をキャンセルした。以上のことから、PGC-1 α はアロマトラーゼを刺激することによる悪循環を形成することに加えて、ER β 、炎症性サイトカイン、抗アポトーシスを刺激するが、HX531はこれらのPGC-1 α 作用を抑制することが明らかとなった(図)。

以上のことから、PGC-1 α を介した系は新たな治療戦略確立に有望であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maeda Eiko, Koshiba Akemi, Mori Taisuke, Ito Fumitake, Kataoka Hisashi, Okimura Hiroyuki, Sugahara Takuya, Tarumi Yosuke, Kusuki Izumi, Khan Khaleque N., Kitawaki Jo	4. 巻 7
2. 論文標題 Atherosclerosis-related biomarkers in women with endometriosis: The effects of dienogest and oral contraceptive therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology: X	6. 最初と最後の頁 100108 ~ 100108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.eurox.2020.100108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Umemura Shiori, Sowa Yoshihiro, Iizumi Yosuke, Kitawaki Jo, Sakai Toshiyuki	4. 巻 111
2. 論文標題 Synergistic effect of the inhibitors of RAF/MEK and AXL on KRAS mutated ovarian cancer cells with high AXL expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2052 ~ 2061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14414	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kokabu T, Mori T, Matsushima H, Yoriki K, Kataoka H, Tarumi Y, Kitawaki J.	4. 巻 42
2. 論文標題 Antitumor effect of XCT790, an ERR inverse agonist, on ER -negative endometrial cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Oncol (Dordr)	6. 最初と最後の頁 223-235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13402-019-00423-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoriki K, Mori T, Kokabu T, Matsushima H, Umemura S, Tarumi Y, Kitawaki J.	4. 巻 9
2. 論文標題 Estrogen-related receptor alpha induces epithelial-mesenchymal transition through cancer-stromal interactions in endometrial cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 6697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43261-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama K, Nishioka K, Khan KN, Tanaka Y, Mori T, Nakaya T, Kitawaki J.	4. 巻 82
2. 論文標題 Molecular detection of microbial colonization in cervical mucus of women with and without endometriosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Reprod Immunol	6. 最初と最後の頁 e13147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aji.13147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kataoka H, Mori T, Okimura H, Matsushima H, Ito F, Koshiba A, Tanaka Y, Akiyama K, Maeda E, Sugahara T, Tarumi Y, Kusuki I, Khan KN, Kitawaki J.	4. 巻 34
2. 論文標題 Peroxisome proliferator-activated receptor- coactivator 1 -mediated pathway as a possible therapeutic target in endometriosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hum Reprod	6. 最初と最後の頁 1019-1029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/humrep/dez067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takaoka O, Mori T, Ito F, Okimura H, Kataoka H, Tanaka Y, Koshiba A, Kusuki I, Shigehiro S, Amami T, Kitawaki J	4. 巻 181
2. 論文標題 Daidzein-rich isoflavone aglycones inhibit cell growth and inflammation in endometriosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Steroid Biochem Mol Biol	6. 最初と最後の頁 125-132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsbmb.2018.04.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okimura H, Tatsumi H, Ito F, Yamashita S, Kokabu T, Kitawaki J	4. 巻 44
2. 論文標題 Endometrioid carcinoma arising from diaphragmatic endometriosis treated with laparoscopy: A case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res	6. 最初と最後の頁 972-977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.13595	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koshihara A, Mori T, Okimura H, Akiyama K, Kataoka H, Takaoka O, Ito F, Matsushima H, Kusuki I, Kitawaki J	4. 巻 44
2. 論文標題 Dienogest therapy during the early stages of recurrence of endometrioma might be an alternative therapeutic option to avoid repeat surgeries	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res	6. 最初と最後の頁 1970-1976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.13725	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito F, Mori T, Tarumi Y, Okimura H, Kataoka H, Tanaka Y, Koshihara A, Kitawaki J	4. 巻 14
2. 論文標題 Equilin in conjugated equine estrogen increases monocyte-endothelial adhesion via NF- B signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0211462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0211462	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 北脇 城
2. 発表標題 特別講演3 子宮内膜症克服に向けてのあくなき探究
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北脇 城
2. 発表標題 シンポジウム23 生殖機能異常update 子宮内膜症におけるエストロゲンシグナル制御機構に基づく新たな治療戦略
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------