

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19370025
 研究課題名（和文） 生殖内分泌系器官における組織の破壊と再構築の制御メカニズムの解明
 研究課題名（英文） Regulatory mechanism of breakdown and reconstruction of reproductive organs
 研究代表者
 高橋 純夫（TAKAHASHI SUMIO）
 岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
 研究者番号：90144807

研究成果の概要（和文）： 細胞増殖，機能発現ならびにアポトーシス（細胞死）は，細胞から分泌されるホルモンや成長因子，サイトカイン等のシグナル分子や，細胞外マトリックスなどの細胞外環境からのシグナルによって制御される。本研究では，マウス下垂体や子宮内膜における細胞増殖とアポトーシスについて解析した。細胞増殖を促進する成長因子やホルモンの遺伝子の発現制御機構と，成長因子やホルモン作用を調節する因子について解析した。

研究成果の概要（英文）：Proliferation, differentiation and apoptosis (programmed cell-death) are regulated by signaling molecules secreted from cells, hormones, growth factors and cytokines, and by extracellular matrices surrounding cells. The present study was aimed at studying regulatory mechanism of the proliferation and apoptosis in the mouse pituitary and uterus. We showed regulatory mechanisms of gene expression of growth factors and hormones that were associated with proliferation in the pituitary and uterus, and also factors which modified actions of growth factors and hormones.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：分子内分泌学

科研費の分科・細目：形態・構造

キーワード：細胞増殖，アポトーシス，成長因子，下垂体，卵巣，子宮，遺伝子発現，マウス

1. 研究開始当初の背景

生体の器官の構造と機能は，構成する組織の破壊と再構築，機能発現がバランスよく制

御されることにより維持されている。組織を構成する細胞は，アポトーシスにより排除されたり，傷害を受け細胞死に至り，細胞外マ

トリックスも分解され、組織の崩壊が起こる。失われた細胞や傷害を受けた組織は、新たに細胞分裂により生じる細胞や、細胞外マトリックスの新製により補完され、組織は再構築され、機能が発現し、器官としての恒常性が保たれる。

細胞増殖、機能発現ならびに細胞死は、細胞から分泌されるホルモンや成長因子、サイトカイン等のシグナル分子や、細胞外マトリックスなどの細胞外環境からのシグナルによって制御される。細胞外マトリックス分子の分解は細胞により制御される。

子宮は、子宮内膜及び筋層、漿膜によって構成される。子宮内膜は、排卵周期（月経周期）や妊娠、分娩により、その構造と機能がダイナミックに変化し、組織の破壊と再構築が、著明に且つ短期間で繰り返しおきている。子宮内膜の上皮細胞は、卵巣由来の発情ホルモンにより増殖が促進され、それに引き続いて卵巣由来の黄体ホルモンにより子宮内膜の間質細胞が増殖する。これらの結果として子宮内膜組織は、肥厚し分泌機能が高まり受精卵の着床に備える。受精卵が子宮内膜に着床すれば、胎盤が形成され妊娠が維持される。分娩とともに子宮内膜は新たな周期的な変化を開始する。その一方、着床が無い場合は、発情ホルモン、黄体ホルモンの分泌の低下に伴い、肥厚した子宮内膜は崩壊し（月経）、新たな組織構築が開始される。このような周期的な子宮内膜の構造と機能の変化を誘起する因子の解明は不十分な状況であった。そこで、我々の研究グループは、科学研究費補助金の交付を得て、1994年よりマウス子宮内膜の増殖機構の研究を開始し、インスリン様成長因子1(IGF-1), transforming growth factor α (TGF- α), transforming growth factor β 1, β 2, β 3(TGF- β 1, - β 2, - β 3)が、局所調節因子として子宮内膜の細胞増殖を制御する因子であることを示した(Shiraga *et al.*, 1997,2000; Komatsu *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2005; Ohtsuki *et al.*, 2005, 2007)。さらに、我々は、炎症性サイトカインの一つである interleukin-18 (IL-18)が、マウス子宮内膜で発現することを世界に先駆けて発見した(Kusumoto *et al.*, 2005)。さらに解析を進め、子宮内膜において IL-18 が、子宮内膜細胞に細胞死を誘導するとともに、細胞外マトリックスを分解する matrix metalloproteinase (MMP)の遺伝子発現制御することを示唆した(Murakami *et al.*, 2005, Otsuki *et al.*, 2007)。

下垂体は、前葉と中葉、後葉から構成される。下垂体前葉には、6種の前葉ホルモンを産生する細胞が存在している。各前葉ホルモンの合成・分泌は、間脳視床下部で産生される視床下部ホルモンや、卵巣などの末梢内分泌器官から分泌されるホルモンによって制御されている。

前葉ホルモンのプロラクチンは、哺乳に必須のホルモンである。妊娠中の雌動物の下垂体前葉では、出産後の哺乳に備えプロラクチン産生細胞数が増加し、哺乳中の下垂体前葉では細胞数が最大に達し、プロラクチンの分泌も亢進することを示した(Matsumura *et al.*, 2004)。授乳終了後には速やかに、プロラクチン産生細胞は減少し、非妊娠状態に回復することが知られている。また、我々は、雌ラットやマウス下垂体前葉においては、発情周期（排卵周期）に伴い、プロラクチン産生細胞の増殖が亢進することを明らかにし(Takahashi *et al.*, 1984)、このプロラクチン産生細胞の増殖は、下垂体で産生されるホルモンや成長因子、サイトカインによって傍分泌的に制御されることを示した(Oomizu *et al.*, 1998,2000; Honda *et al.*, 2003)。この例のように、下垂体前葉は、ホルモン分泌の変化とともにダイナミックに構造を改変させる器官であることが分かってきた。このことは、下垂体が子宮と同様に、組織の破壊と再構築、機能発現の調節機構を解析するのに適切な器官であることを示している。我々は下垂体前葉細胞の機能発現や細胞増殖の制御に、下垂体細胞で産生される成長因子やサイトカインが関与することを示してきており(総説, Takahashi, 2004)、本研究計画の基礎データは十分に揃っている。とりわけ、下垂体前葉において IL-18 が発現することを発見するとともに(Kusumoto *et al.*, 2005)、プロラクチン産生細胞の退縮期やアポトーシスが高まる時期に IL-18 作用が高まる可能性を示唆する知見を得た(Kusumoto *et al.*, 未発表)。

2. 研究の目的

器官における破壊（細胞死）、再構築（細胞増殖）と機能発現（細胞分化）の一連の過程を司るシステムを、哺乳類の生殖内分泌系器官である子宮と内分泌中枢である下垂体に注目して明らかにする。本研究では、組織の破壊と再構築、機能発現を制御するシステムにおいて、ホルモンや成長因子、サイトカインの役割を多角的に解析する。

本研究では、下垂体前葉細胞の増殖とアポトーシスの関係を明らかにする。Melanocyte stimulating hormone α (MSH α) E が細胞増殖に関与すると考えられるので、proopiomelanocortin (POMC) の遺伝子転写制御機構と (MSH α) E の受容体である melanocortin 3 (MC3R) の遺伝子制御機構について解析した。

子宮内膜においても細胞増殖とアポトーシスの関連を解析する。子宮内膜の増殖には IGF1 が関与するので、IGF1 遺伝子のプロモーター制御機構、IGF1 作用の制御機構について詳細に解析することを目的とする。

転写因子 Runx3 は、細胞増殖の制御に関与することが知られている。Runx3 ノックアウトマ

ウスを用いて, Runx3 の雌マウスの生殖機能への関与を解析する。

3. 研究の方法

(1) 下垂体前葉細胞と子宮内膜細胞のDNA合成とアポトーシスの解析

DNA合成はbromodeoxyuridine (BrdU)の核への取り込みを免疫細胞化学的に検出して解析し, アポトーシスはTunel法により検出し解析した。

(2) 子宮内膜上皮細胞の単離と初代培養

3週齢の雌マウスの子宮より, Komatsu et al (2003)の方法により細胞を単離し, DMEM/F12培地で培養した。

(3) マウス子宮脱落膜の形成と破壊実験

卵巣摘出した雌マウスにestradiolを注射しprogesterone含有のチューブを移植した後に, 一側の子宮内膜内腔にオイルを注入し, 脱落膜腫を誘導する。progesterone含有のチューブを, その後除去し, 脱落膜腫を縮退させる。

(4) IGF1, POMC, MC3R遺伝子のプロモーターの機能解析

各遺伝子の5'上流領域をルシフェラーゼ遺伝子の5'上流側に挿入したレポーターコンストラクトを作成し, プロモーター解析を行った。

(5) Runx3 ノックアウトマウスを用いたRunx3の生殖機能への影響の解析

Li et al. (2002)が作出したRunx3KOマウスを用いて実験を行った。

4. 研究成果

(1) 雌マウス下垂体前葉と子宮内膜細胞のDNA合成とアポトーシス

発情周期が5日周期の雌マウスを用いたところ, 下垂体前葉ではDFNA合成は, 発情前期と発情期に高く, アポトーシスは発情間期の1日目に高かった。子宮内膜上皮細胞では, DNA合成は発情間期3日目に, アポトーシスは発情間期1日目で, 間質細胞ではDNA合成は発情間期2日目に, アポトーシスは発情間期1日目に増加していた。

(2) 子宮内膜細胞の増殖制御

子宮内膜上皮細胞と間質細胞の初代培養系を用いて, insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)の作用について解析した。IGFBP3は, IGF1のDNA合成促進作用を抑制した。子宮内膜間質細胞では, IGFBP3 mRNA発現は, estradiolで抑制される。従って, estradiolは, IGF1発現を促進し, IGFBP3発現を抑制することにより, 間質細胞の増殖を促進することが示唆された。transforming growth factor α の作用についても解析したところ, IGFBP3発現を抑制することにより, 細胞増殖を促進していることが示唆された。

(3) 子宮内膜脱落膜腫の崩壊について

progesterone 刺激を除去し, 脱落膜腫を崩壊させるとIL-18受容体が脱落膜腫周囲に発現し, IL-18が組織崩壊に関与することを示唆した。

(4) IGF1, POMC, MC3R遺伝子のプロモーターの機能解析

IGF1遺伝子の第1プロモーターの最小プロモーター領域を明らかにすると共に, 新規にcAMP応答領域の候補を発見した。POMC遺伝子のTpit/Pitx1依存性のプロモーター制御機構を明らかにした。さらに, MCR3 遺伝子のプロモーター領域を明らかにした。

(5) Runx3による生殖機能制御

Runx3が卵胞成熟や排卵制御に関わっていることを明らかにした。さらに子宮内膜上皮細胞のestradiol依存性の細胞増殖にも関与していることを明らかにした。また, *in situ* hybridizationにより, 卵巣, 子宮内膜におけるRunx3発現細胞を明らかにした。

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10件)

① Local agouti signaling protein/ melanocortin signaling system that possibly regulates lipid metabolism in adipose tissues of chickens. Yabuuchi, M., Bando, K., Hiramatsu, M., Takahashi, S. and Takeuchi, S. Journal of Poultry Science (2010, in press) 査読有

② Estradiol, progesterone and transforming growth factor α regulate insulin-like growth factor-3 (IGFBP3) expression in mouse endometrial cells. Maekawa, T., Takeuchi, S., Kanayama, M., Takahashi, S. Zool. Sci., 26: 131-138 (2009) 査読有

③ Identification of unique thyrotropin receptor (TSHR) splice variants in the chicken: The chicken TSHR gene revisited Grommen, S. V., Taniuchi, S., Darras, V. M., S Takahashi, Takeuchi, S., Groef, B. D. Gen Comp Endocrinol 156: 460-463 (2008) 査読有

④ Loss of Runx3 affects ovulation and estrogen-induced endometrial cell proliferation in female mice. Sakuma, A., Fukamachi, H., Ito, K., Ito, Y., Takeuchi, S., Takahashi, S. Molec. Reprod. Dev., 75: 1653-1661 (2008) 査読有

⑤ Corticotropin-releasing hormone or dexamethasone regulate rat proopiomelanocortin transcription through Tpit/Pitx-responsive element in its promoter. Murakami, I., Takeuchi, S., Kudo, T., Sutou, S., Takahashi, S. J. Endocrinol., 193: 279-290 (2007) 査読有

⑥ Expression of interleukin-18 receptor mRNA in the mouse endometrium.

Otsuki, M., Kusumoto, K., Murakami, Y., Kanayama, M., Takeuchi, S., Takahashi, S. J. Reprod. Dev., 53: 59-68 (2007) 査読有

⑦ Estrogen-dependent expression of the tissue kallikrein gene (Klk1) in the mouse uterus and its implications for endometrial tissue growth. Rajapakse, S., Yamano, N., Ogiwara, K., Hirata, K., Takahashi, S., Takahashi, T. Molec. Reprod. Dev., 74: 1053-1063 (2007) 査読有

⑧ Alternative leader exon usage in mouse IGF-I mRNA variants: class 1 and class 2 IGF-I mRNAs. Ohtsuki, T., Otsuki, M., Murakami, Y., Hirata, K., Takeuchi, S., Takahashi, S. Zool. Sci., 24: 241-247 (2007) 査読有

[学会発表] (計 53 件)

① Takahashi, S., Maekawa, T., Sakuma, A., Taniuchi, S., Kanayama, M., Iguchi, T., Takeuchi, S. Transforming growth factor- α regulates insulin-like growth factor binding protein-3 gene expression in the mouse endometrial stromal cells. 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, 2010年3月27日

② Tochigi, M., Manabe, Y., Moriwaki, A., Kanayama, M., Takeuchi, S., Takahashi, S. Decreased expression of IGF1 and TGF α mRNAs in the uterus of streptozotocin- induced diabetic mice. 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, 2010年3月27日

③ 都知木誠・真鍋芳江・鑛山宗利・竹内 栄・高橋純夫 糖尿病マウスの子宮におけるインスリン様成長因子-1mRNAの発現 第34回日本比較内分泌学会大会日本比較生理生化学会第31回大会合同大会(豊中) 2009年10月23日

④ 矢田篤志・鑛山宗利・竹内 栄・高橋純夫 マウス下垂体前葉および子宮内膜における細胞増殖とアポトーシス 第80回日本動物学会大会(静岡) 2009年9月17日
243. ラット子宮内膜細胞における細胞増殖とインスリン様成長因子 I 遺伝子発現の発情周期に伴う変化

⑤ 土家由起子・佐久間敦子・谷内秀輔・鑛山宗利・竹内 栄・高橋純夫 マウス卵巣および子宮における *Runx3* 遺伝子の発現第 80 回日本動物学会大会(静岡) 2009年9月17日

⑥ 高橋純夫・村上逸雄・入江紗弥香・竹内 栄 マウスのインスリン様成長因子 I 遺伝子プロモーターの解析 第79回日本動物学会大会(福岡) 2008年9月5日

⑦ 前川哲弥・竹内 栄・高橋純夫 マウス子宮内膜細胞における IGFBP-3 の発現制御の解析 第79回日本動物学会大会(福岡) 2008年9月5日

⑧ Takahashi, S., Sakuma, A., Fukamachi,

H., Ito, K., Ito, Y., S. Takeuchi, S. Loss of Runx3 affects ovulation and estrogen-induced endometrial cell proliferation in female mice. The Endocrine Society, 90th Annual Meeting, Program & Abstracts, p. 509, San Francisco, June 16, 2008.

⑨ 高橋純夫・稲熊あすみ・矢部祥子・村上逸雄・竹内 栄 マウスにおけるインスリン様成長因子 I 遺伝子発現の解析 第78回日本動物学会大会(弘前) 2007年9月22日

⑩1 青木健司・竹内 栄・高橋純夫 メラノコルチン3受容体遺伝子発現のプロモーター解析 第78回日本動物学会大会(弘前)

⑪1 前川哲弥・竹内 栄・高橋純夫 マウス子宮における TGF- α および IGFBP-3 mRNA の発現制御の解析 第78回日本動物学会大会(弘前) 2007年9月20日

⑫ 村上逸雄・竹内 栄・工藤季之・須藤鎮世・高橋純夫 ラット POMC 遺伝子プロモーターの CRH とグルココルチコイドによる制御 第78回日本動物学会大会(弘前) 2007年9月20日

[図書] (計 1 件)

① 高橋純夫他, 岡山大学出版会, 現代生物学入門, 2009, 142

ホームページ等

<http://www.biol.okayama-u.ac.jp/cccr/in dex.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 純夫 (TAKAHASHI SUMIO)
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号: 90144807

(2) 連携研究者

竹内 栄 (TAKEUCHI SAKAE)
岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号: 20226989
深町 博史 (FUKAMACHI HIROSHI)
東京医科歯科大学・大学院医学総合研究科・講師
研究者番号: 70134450