

平成21年 6月16日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791165  
 研究課題名 (和文) 子宮内膜疾患の新規治療法開発を目的とした glycodelin による増殖制御の解析  
 研究課題名 (英文) Analysis for molecular mechanism of glycodelin regulating human endometrial epithelial cell growth.  
 研究代表者  
 太田 邦明 (OHTA KUNIAKI)  
 慶應義塾大学・医学部・共同研究員  
 研究者番号：90424142

研究成果の概要：着床関連タンパク Glycodelin は、細胞回転調節因子である p16、p21、p27 の発現増加を介して細胞回転の G1/S 停止を引き起こすことで、子宮内膜腺上皮細胞の細胞増殖を負に制御している。これらの結果は、子宮内膜増殖症や子宮体癌などの子宮内膜腺上皮細胞の増殖性疾患に対して、従来の増殖規定因子である性ホルモンによる生殖内分泌学的な治療アプローチとは独立して、Glycodelin を分子標的とした新しい治療戦略展開の分子基盤研究となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

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：子宮内膜／グリコデリン／子宮内膜症／子宮体癌／細胞増殖

## 1. 研究開始当初の背景

正所性子宮内膜の腺上皮細胞に分泌期に一致して発現が誘導されるタンパク Glycodelin は、子宮内膜症病変で高発現していることが知られる (Seppälä *et al.* 2002)。また、子宮内膜腺癌では、Glycodelin の発現量と正の相関をもって予後が良好であることも知られている (Than *et al.* 1988, Coronado *et al.*, 2001, Sivridis *et al.* 2002, Koistinen *et al.* 2005)。

これまで Glycodelin は、精子-卵子結合阻害能、免疫抑制機能などが報告され、多胎予

防や胚という semiallograft の受入れのための免疫寛容に効果を持つと考えられており、我々の研究グループは、Glycodelin が着床への直接関与もすることを報告してきた (Uchida *et al.* 2007)。

しかしながら、ヒト着床と子宮内膜腺上皮細胞の増殖は、何らかの関与が想定されながら、Glycodelin の子宮内膜腺上皮細胞の細胞増殖へ及ぼす影響に関しては何ら明らかとされていない。

## 2. 研究の目的

子宮内膜症や子宮体癌などの子宮内膜腺上皮細胞の増殖性疾患に対する新規治療戦略への応用を念頭に、Glycodelin の子宮内膜腺上皮細胞の増殖に対して影響を及ぼしうる因子であるか否かにつき明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

子宮内膜腺上皮細胞モデルとして、ヒト子宮内膜腺癌細胞株 Ishikawa を用いた。

蛍光蛋白 EGFP をタグとした Glycodelin 発現ベクターの遺伝子導入による強制発現後、フリーサイトメーターを用いて強制発現細胞を選別し(Glycodelin 群)、下記の解析を行った。

なお、コントロール (C 群) として、EGFP 単独発現細胞を用いた。

### (1) 細胞増殖速度の解析

単純培養による細胞増殖曲線の作成および、dehydrogenase を介した代謝経路が活性化されていることで生細胞の数を定量化する MTS 法を利用し、細胞増殖の程度を定量化した。

### (2) 細胞周期変化の解析

Hoechst33342 染色後 FACS を用いて、単一細胞あたりの DNA 量の計測を行い、細胞周期を可視化した。

### (3) 細胞周期関連因子の発現比較

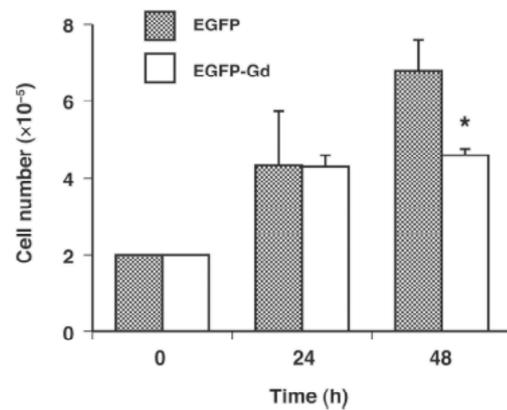
細胞周期の進行に関与する代表的なタンパク群 (cyclinD, cyclinE, Cdk2, Cdk4, Cdk6, p16, p21, p27, p53) に関して、RT-PCR 法を用いて、mRNA レベルでの (半) 定量化発現量比較を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞増殖速度の解析

単純培養 48 時間後より、有意差を以て、Glycodelin 群の細胞増殖抑制を認めた (図 1)。

MTS アッセイにおいても、同様に Glycodelin 群の生細胞数の減少が見られた。すなわち、Glycodelin の発現によって、子宮内膜腺上皮細胞の増殖能が負に影響を受けることが示唆された。

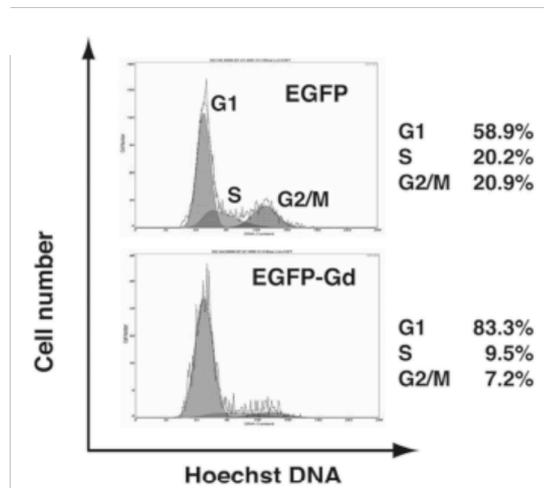


(図 1)

### (2) 細胞周期変化の解析

C 群と比較して、Glycodelin 群では顕著に S 分画と G2/M 分画が抑制され、G1 分画への集中が明らかとなった (図 2)。

この結果から、Glycodelin の強制発現が細胞周期の G1/S チェックポイントでの回転停止を引き起こすことが示された。

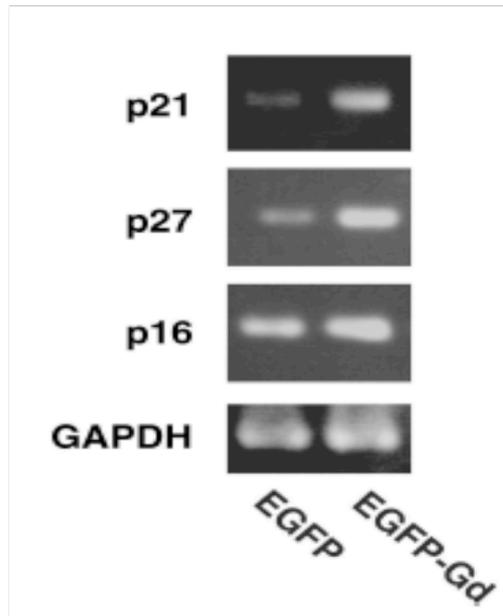


(図 2)

### (3) 細胞周期関連因子の発現比較

cyclinD, cyclinE, Cdk2, Cdk4, Cdk6, p53 に関しては特徴的な発現量変化を示さなかったものの、細胞周期調節因子 p16, p21, p27 の mRNA 発現は、Glycodelin 群において有意に上昇していた (図 3)。

すなわち、図 2 で示した細胞周期の G1/S 停止の分子機序は p16, p21, p27 の発現変化によるものであることが示された。ただし、glycodelin の発現上昇による p16, p21, p27 の発現変化の分子機序は依然不明である。



(図 3)

#### 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 4 件)

- \*coresponding author
- ① Ohta K, Maruyama T, Uchida H, Ono M, Nagashima T, Arase T, Kajitani T, Oda H, Morita M, Yoshimura Y: Glycodelin blocks progression to S phase and inhibits cell growth: a possible progesterone-induced regulator for endometrial epithelial cell growth. *Molecular human reproduction*.2008; 14, 査読有
  - ② Ono M, Maruyama T\*, Masuda H, Kajitani T, Nagashima T, Arase T, Ito M, Ohta K, Uchida H, Asada H, Yoshimura Y, Okano H, Matsuzaki Y: Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(47), 18700-18705.査読有
  - ③ Uchida H\*, Maruyama T, Ohta K, Ono M, Arase T, Kagami M, Oda H, Kajitani T, Asada H, Toshimura Y: Histone deacetylase

inhibitor-induced glycodelin enhances the initial step of implantation. *Human Reproduction* 2007; 22(10), 2615-2622.査読有

- ④ Uchida H, Maruyama T\*, Ono M, Ohta K, Kajitani T, Masuda H, Nagashima T, Arase T, Asada H, Yoshimura Y: Histone deacetylase inhibitors stimulate cell migration in human endometrial adenocarcinoma cells through up-regulation of glycodelin. *Endocrinology*. 2007; 148(2):896-902.査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① Masanori Ono, Tetsuo Maruyama, Takashi Kajitani, Hiroshi Uchida, Hirotaka Masuda, Takashi Nagashima, Toru Arase, Kuniaki Ohta, Hironori Asada, Yasunori Yoshimura; OCT-4 expression in human myometrium. AOCOG2007. September 12-15, 2007, Tokyo, Japan
- ② Hirotaka Masuda, Tetsuo Maruyama, Takashi Nagashima, Masanori Ono, Takashi Kajitani, Kuniaki Ohta, Toru Arase, Maki Kagami, Hironori Asada, Hideyuki Okano, Yumi Matsuzaki, Yasunori Yoshimura; Reconstruction and in vivo bioluminescence imaging of human endometrium in immunodeficient mice: its potential application as an endometriosis model. 23th Annual Meeting of the ESHRE. July 1-4, 2007 Lyon, France
- ③ Takashi Nagashima, Tetsuo Maruyama, Hiroshi Uchida, Takashi Nagashima, Masanori Ono, Toru Arase, Maki Kagami, Kuniaki Ohta, Hironori Asada, Yasunori Yoshimura; Src kinase activity is essential for decidualization of human endometrial stromal cells. 23th Annual Meeting of the ESHRE. July 1-4, 2007 Lyon, France

[図書]  
(計0件)

[産業財産権]  
○出願状況 (計0件)  
なし

○取得状況 (計0件)  
なし

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

太田 邦明 (OHTA KUNIAKI)  
慶應義塾大学・医学部・共同研究員  
研究者番号：90424142

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし