

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18674

研究課題名(和文) ヒト子宮内膜症の新規発症モデルを用いた病態メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation for pathogenesis of endometriosis with a novel onset model

研究代表者

嶋田 浩志 (Shimada, Hiroshi)

札幌医科大学・医学部・訪問研究員

研究者番号：00838906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：正常の子宮内膜から内膜細胞を分離・培養して、子宮内膜症の進行に関与していることが知られている細胞シグナルと、細胞間結合蛋白の一つであるLSR/angulin-1に注目して、子宮内膜症の発症のメカニズムの解明を目指した。結果、LSR/angulin-1は子宮内膜上皮細胞において、細胞の防御機構や遊走、細胞分裂に密接に関係していることを見出した。また、細胞間結合分子の一つであるCingulinも子宮内膜上皮の細胞分裂に関わっていることも見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜症は全女性の10%の有病率であり、月経痛や不妊症の原因となっている。一方で治療方法は一部の内服治療や手術療法のみと限られており、新規治療開発が求められている。本研究は正常子宮内膜細胞を用いることで、子宮内膜症発症のメカニズムを解明し、将来的に子宮内膜症発症予防の治療につながる重要な研究と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated for pathogenesis of endometriosis focusing on tight junction protein, LSR/angulin-1 and cellular signal transduction related to progression of endometriosis. In results, we reported that LSR/angulin-1 was responsible for cellular barrier, migration and division in normal endometrial epithelial cells. Moreover, we found that one of tight junction protein, Cingulin was responsible for cellular division in normal endometrial epithelial cells.

研究分野：細胞科学、生殖内分泌治療学

キーワード：子宮内膜症 タイト結合 LSR/angulin-1 Cingulin

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は、通常腹膜や骨盤内臓器の漿膜表面に限局し、一般的には卵巣、子宮広間膜、ダグラス窩、仙骨子宮靭帯に生じる。比較的まれではあるが、卵管、小腸や大腸の漿膜表面、尿管、膀胱、脛、子宮頸部、手術創、胸膜、心膜でも発生する。有病率の報告は全女性の約10%とされているが、その病因の詳細は不明のままである。子宮内膜症は月経時に出血を起こすため、月経に伴う下腹部痛や病床部位によっては下血や吐血、気胸など重篤な症状を引き起こすこともある。発生機序としては、月経血の逆流による子宮内膜腹腔内移植説、機械的移植説、リンパ行性血行性転移説、直接浸潤説、内膜以外の組織を起源とする説などが考えられている。子宮内膜症の病期進行に伴って瘢痕形成が起こり、それが難治性の慢性疼痛や不妊症の一因となっている。さらに卵巣の内膜症性嚢胞は卵巣癌の危険因子であることがわかっているが、その病理発生機序も不明である。

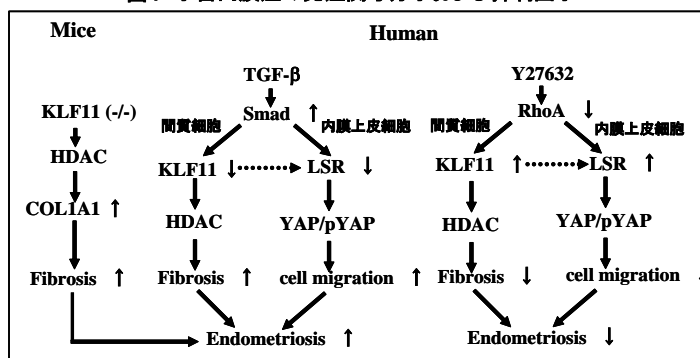
子宮内膜症の進行においては、TGF- β およびそのターゲット転写因子である Kruppel-like factor 11 (KLF11)との密接な関係が言われている (Daftary et al., 2013; Correa et al., 2016)。KLF11 欠損マウスにおいて子宮内膜症の発症の増加がみられる (Correa et al., 2016)。さらに、KLF11 は、ヒト子宮内膜間質細胞において、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)を誘導し、その結果コラーゲン 1A1 のプロモーター領域を脱アセチル化させ、線維化を抑制する (Zheng et al., 2016) (図1)。

一方、子宮内膜癌において、細胞間接着分子であるタイト結合蛋白の発現異常が報告されている (Ouban and Ahmed, 2010)。我々は最近3細胞間タイト結合蛋白 lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR)が、子宮内膜癌細胞の遊走、浸潤および増殖に密接に関与していることを報告した (Shimada et al., 2016, 2017b)。LSR の低下による子宮内膜癌細胞の遊走および浸潤の亢進は、正常細胞の大きさや数を制御し癌幹細胞の増殖にも関与がみられる Hippo pathway の中心分子である YAP/pYAP を介して行われていた (Shimada et al., 2017a)。そして子宮内膜症における LSR の局在異常も見出している (Shimada et al., 2016)。このことは、LSR が子宮内膜癌だけでなく、子宮内膜症の内膜上皮細胞の遊走、浸潤および増殖にも関与している可能性を示している (図1)。

最近、子宮内膜症において細胞接着および浸潤に関与する Rho A の発現亢進がみられ、Rho および ROCK 阻害薬 Y-27632 による子宮内膜症の瘢痕形成に対する治療薬の可能性が報告された (Nasu et al., 2010)。我々も、Rho および ROCK 阻害薬 Y-27632 の処置ヒト細胞を用いて DNA アレーおよび蛋白発現を解析したところ、KLF11 および LSR の発現に著しい変化がみられた。

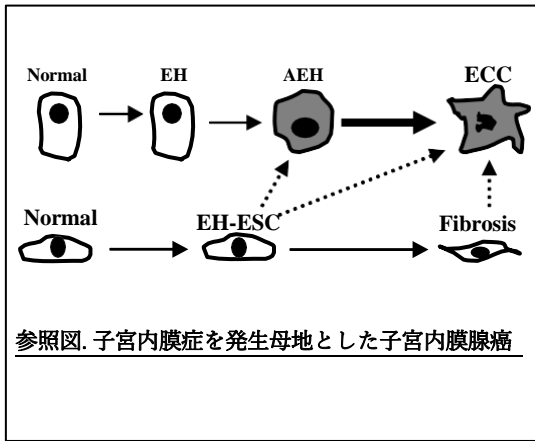
そこで今回我々は、子宮内膜症の剖検材料および以前報告した培養ヒト正常子宮内膜（上皮細胞および間質細胞の分離培養）を用いて、RhoA を介した KLF11 および LSR の発現変化と子宮内膜症との関係を詳細に解析し、子宮内膜症の新規の分子病理学的発症機序を解明し、子宮内膜症の治療に繋げることを目的としていた (図1)。さらに、子宮内膜症の癌化の病理発生機序についての検討も目指していた。

図1 子宮内膜症の発症関与分子および抑制因子



2. 研究の目的

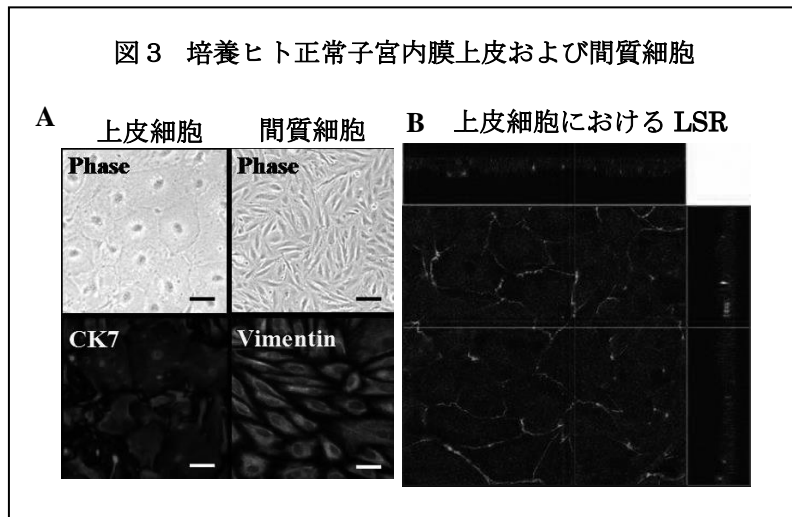
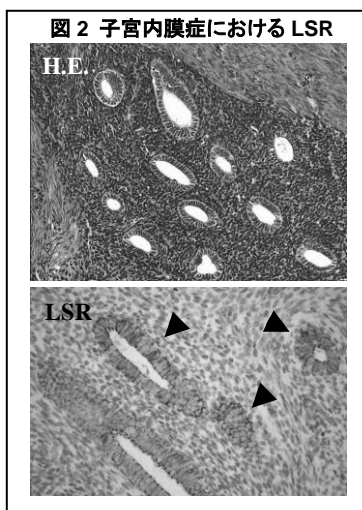
本研究の目的は、子宮内膜症の剖検材料および以前報告した培養ヒト正常子宮内膜（上皮細胞および間質細胞の分離培養（文献：1. Someya, et al., Cell Tissue Res. 2013; 354(2):481-494., 2. Shimada, et al., Oncotarget 2016; 7(19):27735-27752）を用いて、RhoA を介した KLF11 および LSR の発現変化と子宮内膜症との関係を詳細に解析し、子宮内膜症の新規の分子病理学的発症機序を解明し、子宮内膜症の治療に繋げる (図1)。さらに、子宮内膜症の癌化の病理発生機序についても検討する (参照図)。



3. 研究の方法

(1) ヒト剖検材料を用いて正常組織、子宮内膜症および子宮内膜癌における RhoA, KLF11 および LSR の発現および局在の変化を比較検討する。本研究開始前までに、子宮内膜症および子宮内膜癌における LSR の局在変化がみられていた (図 2)。

(2) 手術材料のヒト正常および子宮内膜症の組織より、内膜上皮細胞および内膜間質細胞を分離培養し (文献 1、2、図 3)、RhoA, KLF11 および LSR の発現および局在を RT-PCR, ウェスタンブロット、免疫染色などを用いて詳細に検討する。本研究開始前までに正常内膜上皮細胞において LSR および同様の 3 細胞間タイト結合分子 tricellulin (TRIC) の明らかな発現がみられていることは確認されていた (図 3)。



(3) 分離培養した内膜上皮細胞および内膜間質細胞、さらに LSR を高発現している癌細胞株 (Sawano 細胞) に LSR, KLF11 の siRNA を処置して LSR, KLF11 の発現低下した細胞の細胞増殖、コラーゲン産生能への影響を検討する。さらに YAP/pYAP の関与についても検討する。

(4) 分離培養した内膜上皮細胞および内膜間質細胞、さらに LSR を高発現している癌細胞株 (Sawano 細胞) に Rho および ROCK 阻害薬 Y27632, TGF- β , HDAC 阻害剤 (Tricostatin A) を処置して、RhoA, KLF11, LSR, claudin-1 の発現および局在の変化を RT-PCR, ウェスタンブロット、免疫染色などを用いて詳細に検討する。さらにコラーゲンゲルの収縮抑制効果も検討する。さらに、処置によるシグナル伝達機構の変化も検討する。本研究開始前までまでに、Y27632 処置内膜上皮細胞において、細胞浸潤の亢進がみられている。さらに、子宮内膜癌細胞株において Y27632 および TGF- β 処置による LSR および claudin-1 の発現低下がみられていた (図 4)。

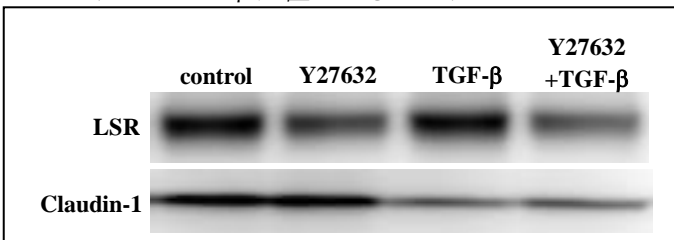


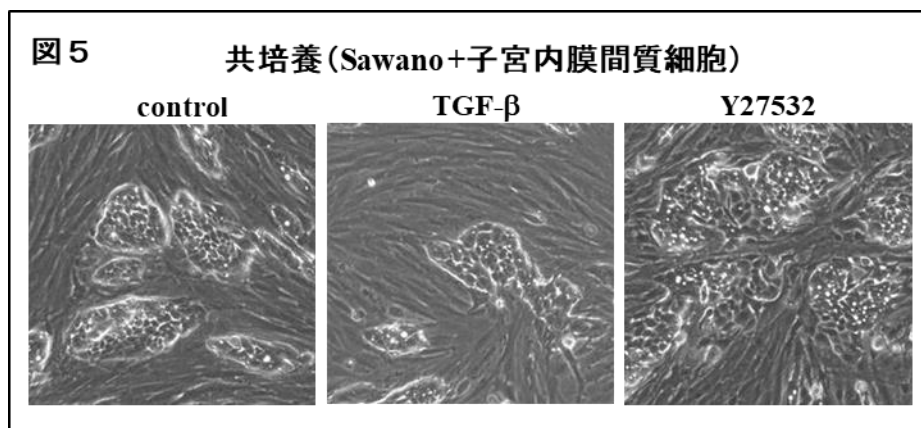
図 4 子宮内膜癌細胞株 (Sawano)

(5) 分離培養したヒト子宮内膜上皮細胞および間質細胞を免疫不全マウスの腹腔内、皮下あるいは腎皮膜下に移植し、エストロジェンを投与して子宮内膜症動物実験モデルを作製する。そし

て、RhoおよびROCK 阻害薬Y27632およびHDAC阻害剤(Tricostatin A)を処置して、移植細胞のRhoA, KLF11およびLSRの発現および局在の変化をRT-PCR, ウェスタンブロット、免疫染色などを用いて詳細に検討する。

4. 研究成果

(1) 本研究の過程で、3細胞間タイト結合分子 LSR について、その調整機構や癌の悪性化における役割についても詳細に解析していた。その実験の中で子宮内膜癌 (endometrioid adenocarcinoma)において2細胞間リーキー型タイト結合分子 claudin-2 の高発現を見出した (Okada et al., Reproductive Science 2020)。さらに子宮内膜癌細胞株において、LSR およびCingulinの発現低下により、claudin-2の発現誘導がみられた (Okada et al., 2020)。さらに子宮内膜癌細胞株と正常子宮内膜乾漆細胞の共培養系を確立することができるようになった (図5)。その共培養系でRho/ROCKシグナル阻害剤 Y27632 およびTGF- β 処置により細胞遊走の亢進を確認している (図5)。



(2) 本研究の過程で子宮内膜症および子宮内膜癌において、angulin-1/LSR がJNK/cofilin/actin を介してそのバリア機能および細胞遊走に関与していることを見出した (Konno et al., 2020)。また子宮内膜症および子宮内膜癌において、ASPP2の機能抑制によってLSR/YAPを介して細胞遊走と浸潤を亢進させることを見出した (Konno et al., 2020)。

(3) 本研究の過程で、微小管結合タイト結合分子 cingulin(CGN)に着目するに至り、子宮内膜癌細胞の分裂時において、midbody および中心体に局在し、バリア機能だけでなく細胞増殖にも関与していることを見出した(図6、Konno et al., 2020)。CGNは正常子宮内膜上皮細胞に発現がみられ、子宮内膜症・高分化子宮内膜癌に高発現し、悪性度上昇とともに発現の低下がみられていることがわかった (図7)。CGNの発現はLiver kinase B1 (LKB1) およびその下流ターゲットシグナルであるAMP-activated protein kinase (AMPK)により調節されており、その両方のシグナルにおいては癌との関係も報告されている (図8、Tsukita et al., 2019, Ouban and Ahmed, 2010)。以上よりCGNの発現変化は、他のタイト結合分子とともに子宮内膜症/子宮内膜癌に密接な関与の可能性のあることを見出した。

(4) ヒト正常子宮内膜上皮細胞、間質細胞、子宮内膜癌細胞株による共培養系を用い、抗腫瘍効果が知られているヒストン脱アセチル化酵素 (Histone Deacetylase : HDAC) 阻害剤を処置しLSRやclaudin-2、CGNの発現・局在変化と細胞増殖抑制の変化を検討、さらにYAP/TGF- β シグナルおよびEGFRシグナルの受容体阻害剤(EW-7197, AG-1478)を処置し、LSR、claudin-2、CGNの発現・局在変化と細胞増殖および細胞遊走の変化を検討した。結果汎HDAC阻害剤であるtricostatin A およびQuisinostat (JNJ26481585) 処置によりLSR、claudin-2、CGNの低下と共に、上皮バリアおよび細胞増殖・遊走の低下を確認した。さらにRho/ROCKシグナル阻害剤Y27632 およびTGF- β 処置により細胞の遊走の亢進も確認できた。

(5) 癌は代謝疾患の一つであることにより、癌細胞の代謝への影響を Okada et al., Reproductive Science 2020 における研究で報告した。具体的には細胞外フラックスアナライザー (XFe Series)を用いて、正常および癌細胞におけるグルコース代謝、ミトコンドリア呼吸代謝の変化を解析したものだ。この研究では子宮内膜癌細胞株のミトコンドリア呼吸代謝において、高 glucose 培地による亢進、低 glucose 培地による低下がみられていた。

図 6

CGN in midbody and centrosome

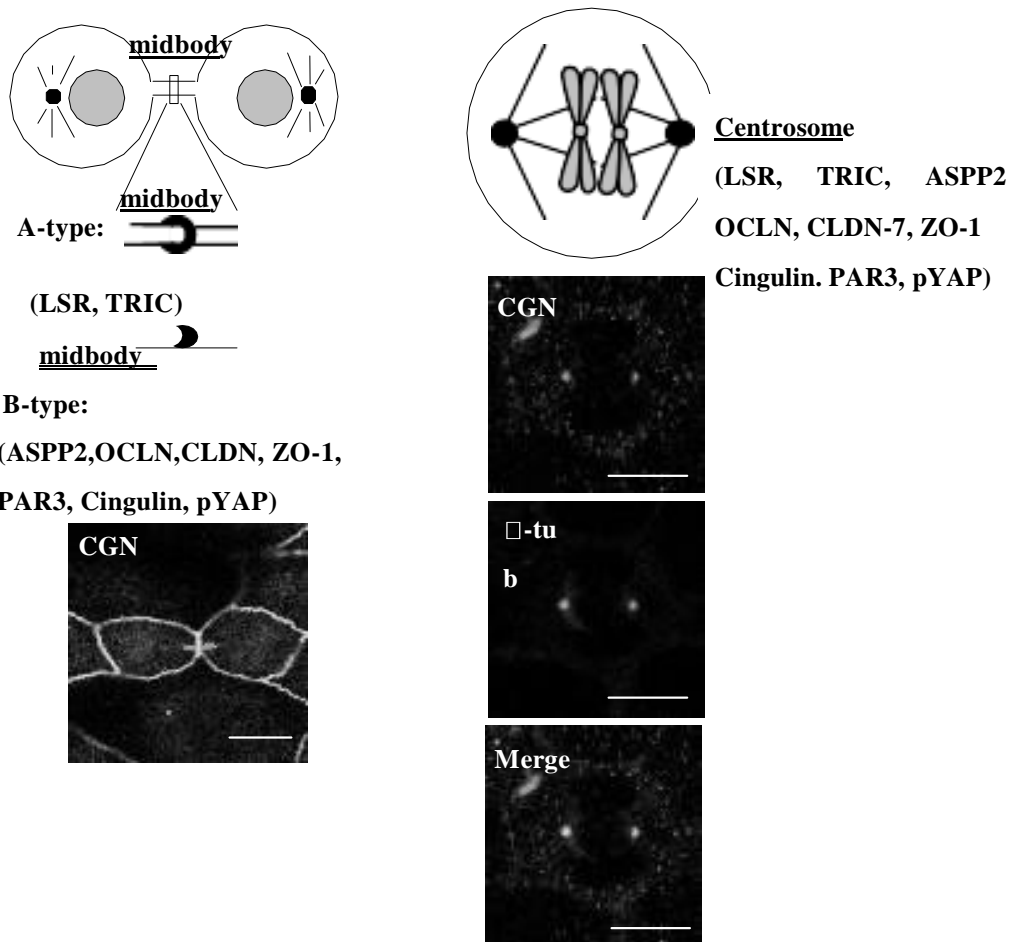


図 7

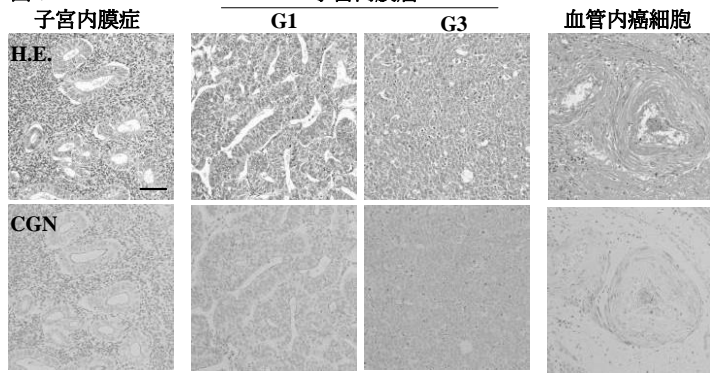
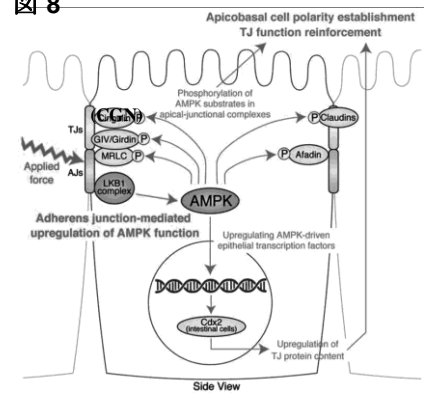


図 8



以上の研究は、別紙の通り 4 本の国際ジャーナルへの投稿、受理を得ており、他国内の学術集会で発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Konno T, Kohno T, Kikuchi S, Shimada H, Satohisa S, Saito T, Kondoh M, Kojima T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Epithelial barrier dysfunction and cell migration induction via JNK/cofilin/actin by angubindin-1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tissue Barriers.	6. 最初と最後の頁 1695475
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/21688370.2019.1695475.	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 Konno T, Kohno T, Kikuchi S, Shimada H, Satohisa S, Takano K, Saito T, Kojima T.	4. 巻 68
2. 論文標題 Localization of Tricellular Tight Junction Molecule LSR at Midbody and Centrosome During Cytokinesis in Human Epithelial Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Histochem Cytochem.	6. 最初と最後の頁 59-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1369/0022155419886263.	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 嶋田浩志、郷久晴朗、金野匠、幸野貴之、小島隆、齋藤豪.
2. 発表標題 子宮内膜癌の悪性化におけるASPP2の役割
3. 学会等名 第71回日本産婦人科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Konno T, Kohno T, Shimada H, Satohisa S, Kikuchi S, Saito T, Kojima T.
2. 発表標題 Loss of ASPP2 promotes cell invasion and migration via LSR and YAP in human endometrial cancer.
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Konno T, Kohno T, Shimada H, Satohisa S, Kikuchi S, Saito T, Kojima T.
2. 発表標題 Loss of ASPP2 promotes cell invasion and migration via LSR and YAP in human endometrial cancer.
3. 学会等名 第38回札幌国際がんシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Konno T, Kohno T, Shimada H, Satohisa S, Kikuchi S, Saito T, Kojima T.
2. 発表標題 Loss of ASPP2 promotes cell invasion and migration via LSR and YAP in human endometrial cancer.
3. 学会等名 第51回日本臨床分子形態学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田匡水、金野匠、嶋田浩志、郷久晴朗、幸野貴之、齋藤豪、小島隆
2. 発表標題 The role of tight junction molecule claudin-2 in malignancy of human endometrial cancer (endometrioid).
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Konno T, Kohno T, Shimada H, Satohisa S, Kikuchi S, Saito T, Kojima T.
2. 発表標題 Loss of ASPP2 promotes cell invasion and migration via LSR and YAP in human endometrial cancer.
3. 学会等名 ASCB (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kojima T., Konno T, Kohno T, Kikuchi S, Shimada H, Satohisa S, Saito T,
2. 発表標題 Bicellular and tricellular tight junction molecules localize to midbody and centrosome during cytokinesis in human endometrial carcinoma cell line.
3. 学会等名 ASCB (国際学会)
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