

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09622

研究課題名(和文) 子宮内膜症の癒痕形成メカニズムの解明と薬物療法の開発

研究課題名(英文) Pathogenesis of endometriosis-associated fibrosis and development of novel medical treatment

研究代表者

奈須 家栄 (Nasu, Kaei)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：30274757

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)：正常子宮内膜間質細胞と比較して、子宮内膜症間質細胞において発現が減少している hsa-miR-199a-3p について機能解析を行った。その結果、hsa-miR-199a-3p の強制発現は p21-activated kinase 4 (PAK4) の発現を抑制することにより、子宮内膜症間質細胞の運動能、浸潤能、収縮能を抑制することが明らかとなった。さらに PAK4 阻害薬である PF-3758309 について、子宮内膜症の治療薬としての可能性を評価した。その結果、PF-3758309 は子宮内膜症間質細胞の運動能、浸潤能、収縮能を抑制することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器線維症は肺、心臓、肝臓、腎臓、皮膚等の臓器がダメージの修復過程で異常な線維化を生じ、機能が低下する疾患である。臓器線維症に対する治療薬の開発は肺線維症を中心に進んでおり、抗線維化剤が日常臨床で用いられている。

子宮内膜症は月経周期に伴って出血、凝血、吸収を繰り返して癒痕化、線維化を生じ、病態が進行する疾患で、臓器線維症の1つと位置付けられる。本研究では p21-activated kinase 4 阻害剤である PF-3758309 について検討を行い、癒痕化の抑制を含む治療効果を確認した。現時点では、子宮内膜症に伴う癒痕化、線維化に対する治療薬は存在しないため、本研究の社会的貢献度は極めて高い。

研究成果の概要(英文)：Our previous study demonstrated that expression of the microRNA hsa-miR-199a-3p is attenuated in human endometriotic cyst stromal cells (ECSCs). The current study aimed to define the roles of hsa-miR-199a-3p in the development of endometriosis. Expression of p21-activated kinase 4 (PAK4) mRNA in ECSCs was significantly higher than that in normal endometrial stromal cells. Transfection of hsa-miR-199a-3p inhibited the migration, invasion, and contractility of ECSCs via inhibition of PAK4 mRNA expression. Transfection of PAK4 small interfering RNA and the PAK4 inhibitor PF-3758309 also inhibited ECSC migration, invasion, and contractility. Attenuation of hsa-miR-199a-3p expression was favorable for ECSCs to acquire the highly invasive, motile, and contractile characteristics of endometriotic cells and is involved in the development of endometriosis. Accordingly, PAK4 inhibitors may be promising for the treatment of endometriosis.

研究分野：Endometriosis

キーワード：子宮内膜症 癒痕形成 細胞増殖 アポトーシス 収縮能 細胞外マトリックス 細胞周期 薬物療法

1. 研究開始当初の背景

臓器線維症は肺、心臓、肝臓、腎臓、皮膚等の臓器がダメージの修復過程で異常な線維化を生じ、機能が低下する疾患である。臓器線維症に対する治療薬の開発は肺線維症を中心に進んでおり、抗線維化剤が日常臨床で用いられている。

子宮内膜症は月経周期に伴って出血、凝血、吸収を繰り返して癒痕化、線維化を生じ、病態が進行する疾患で、臓器線維症の1つと位置付けられる。子宮内膜症は全女性の3-10%に発生し、慢性骨盤痛、月経痛、性交痛や不妊などの症状を呈するエストロゲン依存性の良性腫瘍であり、子宮内膜症患者の quality of life は著しく低下する。子宮内膜症は年々増加しており、内分泌学的要因、遺伝性素因、免疫学的要因など様々な病因が考えられているが、その発症メカニズムはいまだ不明である。近年、マイクロRNAによる調節、DNAのメチル化、ヒストン修飾などのエピジェネティクス機構の異常が発症に関与していると報告されている。

子宮内膜症の治療薬として、GnRH アゴニストや低用量経口避妊薬、プロゲスチンなど、血中エストロゲンレベルを低下させることを機序とするホルモン療法が行われているが、現行の薬物療法は副作用や高い再発率の点が問題である。また、子宮内膜症に伴う癒痕化、線維化に対する治療薬は未だ存在しないため、新しい薬物療法の開発が求められている。

2. 研究の目的

我々は以前に卵巣子宮内膜症性嚢胞間質細胞(以下、子宮内膜症間質細胞)および正常子宮内膜間質細胞を用いてマイクロRNA microarray による網羅的解析を行い、正常子宮内膜間質細胞と比較して子宮内膜症間質細胞で異常発現しているマイクロRNAを抽出した(表1)(Abe et al., 2013¹⁾)。本研究では発現異常が認められるマイクロRNAのうち、子宮内膜症間質細胞で発現が減少している hsa-miR-199a-3p に着目し、その役割について研究した。

表1. 子宮内膜症細胞において発現異常が認められるマイクロRNA 群

(A) 子宮内膜症間質細胞で発現が減少しているマイクロRNA 群

Systemic name	FDR-adjusted P value	Fold change
hsa-miR-199b-5p	0.107397	0.08
hsa-miR-503	0.107397	0.22
hsa-miR-424	0.107397	0.26
hsa-miR-196b	0.200067	0.29
hsa-miR-199a-3p	0.227034	0.41
hsa-miR-214	0.227034	0.46
hsa-miR-29b	0.216796	0.48
hsa-miR-455-3p	0.227034	0.49

(B) 子宮内膜症間質細胞で発現が増加しているマイクロRNA 群

Systemic name	FDR-adjusted P value	Fold change
hsa-miR-210	0.200067	4.30
hsa-miR-100	0.241585	3.57
hsa-miR-132*	0.227034	2.17
hsa-miR-181a	0.107397	2.16

3. 研究の方法

(1) 子宮内膜症組織および正常子宮内膜組織の採取

卵巣子宮内膜症性嚢胞に対する手術時に、患者より文書による同意を得て子宮内膜症組織を採取した。また、子宮筋腫の手術時に、患者より文書による同意を得て正常子宮内膜症組織を採取し、対照群とした。なお、本研究計画の内容を含む我々の研究は、2022年11月に大分大学医学部倫理審査委員会の審査に基づく承認(承認番号: 2431)を受けた。採取した組織から、以下の方法で間質細胞を分離した。

(2) 子宮内膜症間質細胞および正常子宮内膜間質細胞の分離・培養

採取した子宮内膜症組織および正常子宮内膜組織より、子宮内膜症間質細胞および正常子宮内膜間質細胞を分離・培養した(Nishida et al., 2004²⁾)。

(3) hsa-miR-199a-3pの標的遺伝子の検索

Online public databaseのTargetScanHuman (<http://www.targetscan.org/>, Release 7.0) およびmiRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>)を用いて、子宮内膜症の病態形成に関与すると考えられる hsa-miR-199a-3pの標的遺伝子の検索を行った。

(4) hsa-miR-199a-3pの強制発現と機能解析

Lipofectamine 法を用いて hsa-miR-199a-3p を子宮内膜症間質細胞に強制発現させ、浸潤能、遊走能、運動能および収縮能に対する効果について検討した。また、hsa-miR-199a-3pの標的遺

伝子として抽出された p21-activated kinase 4 (PAK4)の阻害剤である PF-3758309 の治療効果について検討した。

4. 研究成果

Online public database の検索により、今回の研究目的に合致する hsa-miR-199a-3p の標的遺伝子として PAK4 が抽出できた。

まず、子宮内膜症間質細胞および正常子宮内膜間質細胞における hsa-miR-199a-3p および PAK4 mRNA の発現について検討した。その結果、子宮内膜症間質細胞では hsa-miR-199a-3p の発現が低下し、PAK4 mRNA の発現は増加していた (図 1)。

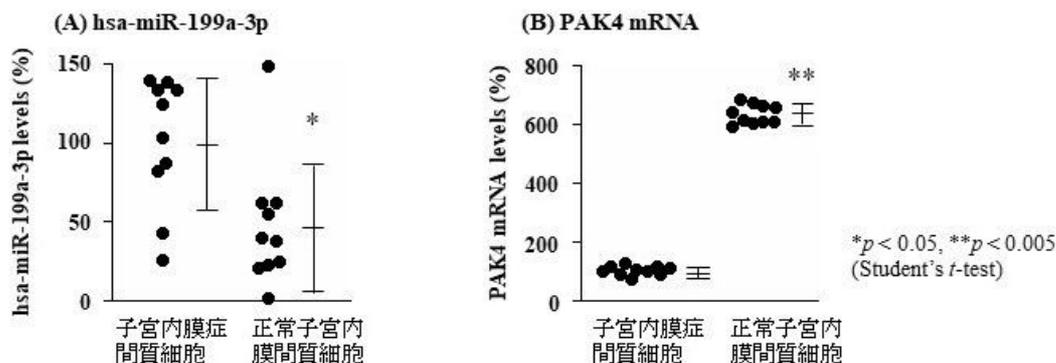


図1. 子宮内膜症間質細胞および正常子宮内膜間質細胞における hsa-miR-199a-3p および PAK4 mRNA の発現

hsa-miR-199a-3p の強制発現により、子宮内膜症間質細胞の hsa-miR-199a-3p の発現は増加し、PAK4 mRNA の発現は減少した (図 2)。

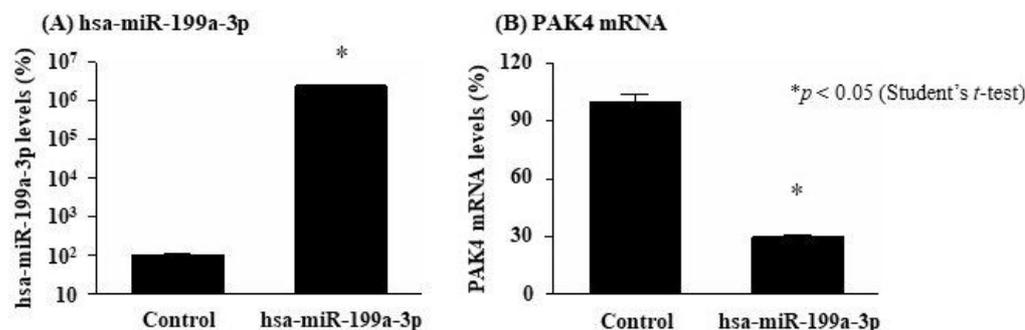


図2. 子宮内膜症間質細胞への hsa-miR-199a-3p の強制発現による hsa-miR-199a-3p および PAK4 mRNA の変化

次に hsa-miR-199a-3p の機能解析を行った。hsa-miR-199a-3p の強制発現により、子宮内膜症間質細胞の遊走能、浸潤能、運動能および収縮能は抑制された (図 3)。

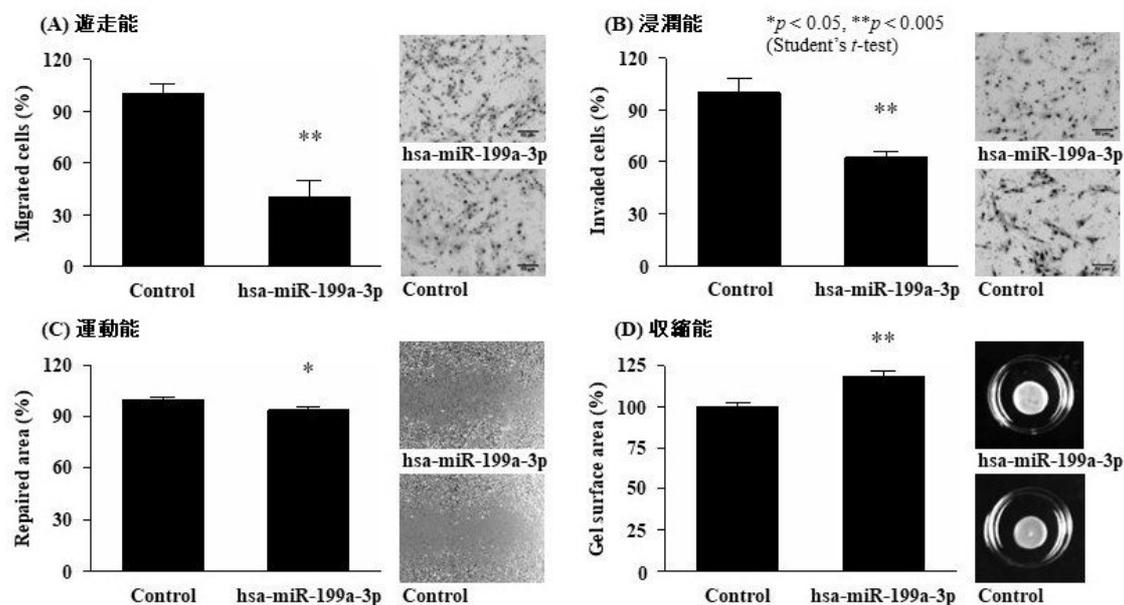


図3. 子宮内膜症間質細胞の細胞機能に対する hsa-miR-199a-3p の効果

PAK4 siRNA の強制発現により、子宮内膜症間質細胞の遊走能、浸潤能、運動能および収縮能は抑制された (図 4)。

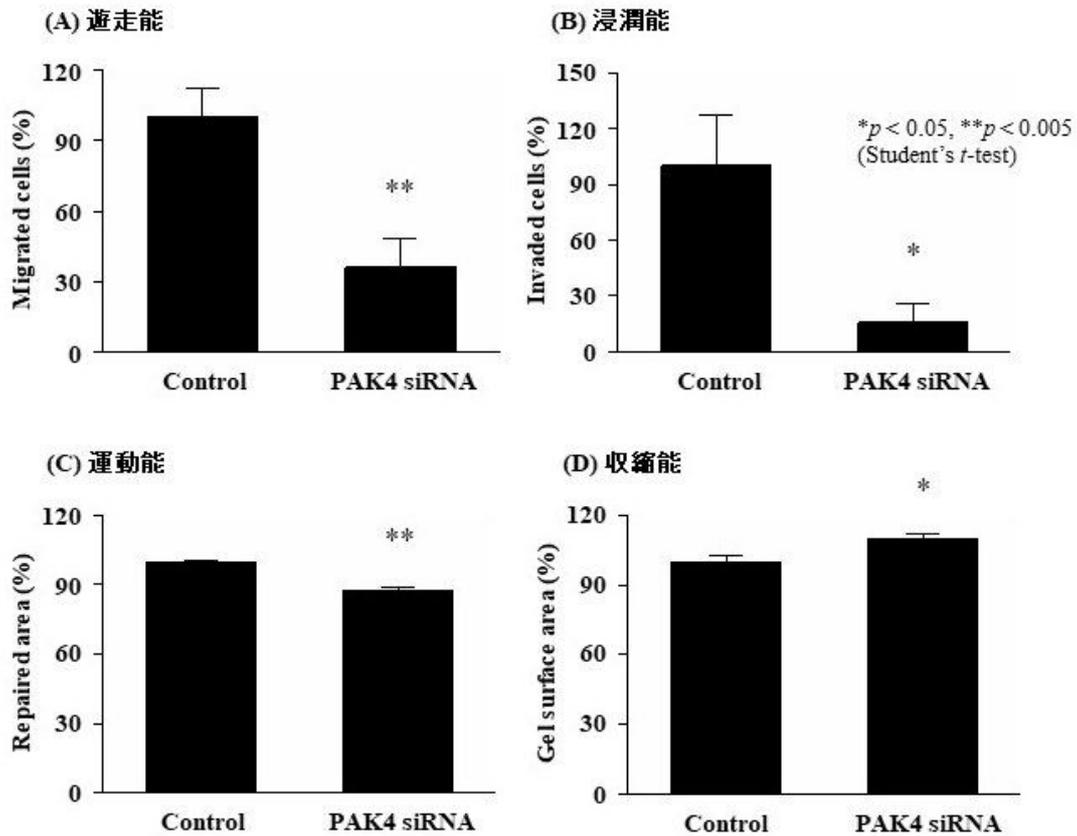


図4. 子宮内膜症間質細胞の細胞機能に対するPAK4 siRNAの効果

PAK4 阻害剤 PF-3758309 により、子宮内膜症間質細胞の遊走能、浸潤能、運動能および収縮能は抑制された (図 5)。

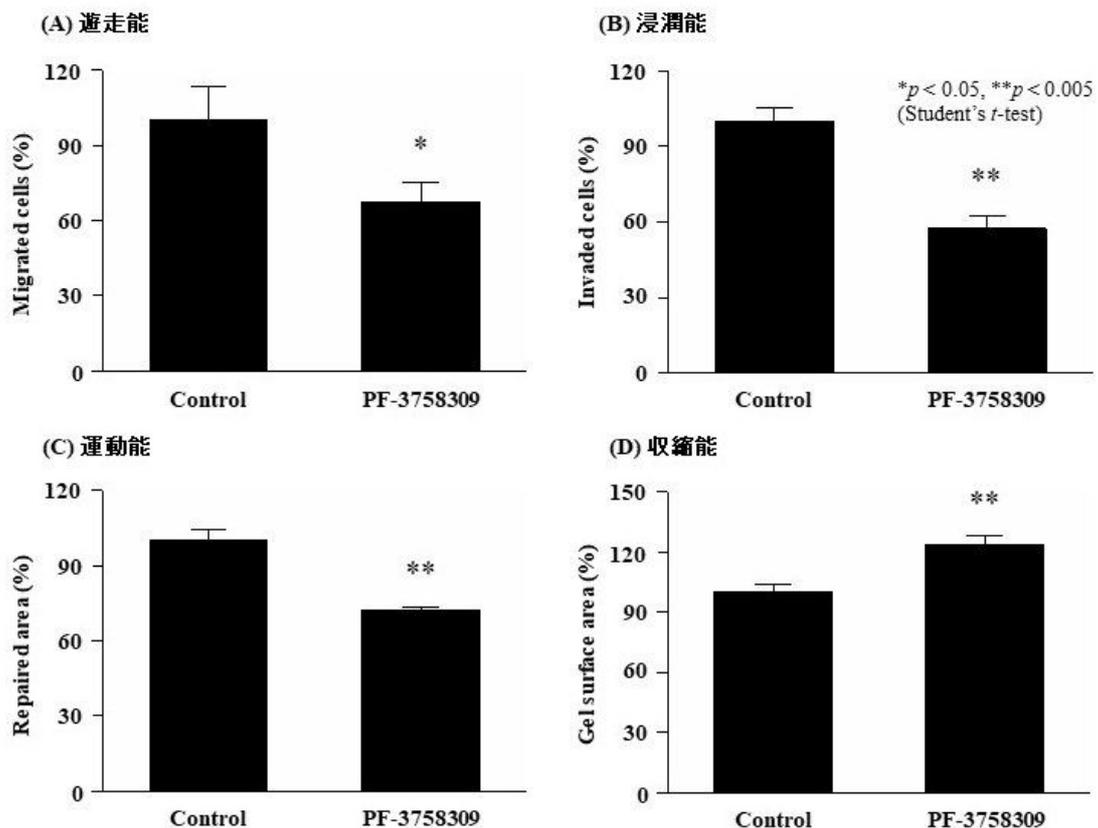


図5. 子宮内膜症間質細胞の細胞機能に対するPF-3758309の効果

以上の結果から、

1. 子宮内膜症細胞における hsa-miR-199a-3p の発現は低下していること
2. PAK4 は hsa-miR-199a-3p の標的遺伝子であること
3. hsa-miR-199a-3p は PAK4 の発現を抑制することにより、子宮内膜症間質細胞の遊走能、浸潤能、運動能および収縮能を抑制すること
4. PAK4 阻害剤 PF-3758309 は子宮内膜症間質細胞の遊走能、浸潤能、運動能および収縮能の抑制により、子宮内膜症の抑制効果を示し、治療薬として有望なことが明らかとなった。

<引用文献>

- 1) Abe W, Nasu K, Nakada C, Kawano Y, Moriyama M, Narahara H. miR-196b targets c-myc and Bcl-2 expression, inhibits proliferation and induces apoptosis in endometriotic stromal cells. Hum Reprod 2013; 28: 750-61.
- 2) Nishida M, Nasu K, Fukuda J, Kawano Y, Narahara H, Miyakawa I. Down-regulation of interleukin-1 receptor type 1 expression causes the dysregulated expression of CXC chemokines in endometriotic stromal cells: a possible mechanism for the altered immunological functions in endometriosis. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 5094-100.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Kaei Nasu, Yoko Aoyagi, Ruofei Zhu, Mamiko Okamoto, Kentaro Kai, Yasushi Kawano	4. 巻 55
2. 論文標題 Promising therapeutic targets of endometriosis obtained from microRNA studies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 85-90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-021-00308-3	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 Kaei Nasu, Yoko Aoyagi, Ruofei Zhu, Mamiko Okamoto, Kentaro Kai, Yasushi Kawano	4. 巻 55
2. 論文標題 Role of overexpressed microRNAs in endometriosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-021-00303-8	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 Ruofei Zhu, Kaei Nasu, Naoki Hijiya, Masato Yoshihashi, Tomoko Hirakawa, Yoko Aoyagi, Hisashi Narahara	4. 巻 28
2. 論文標題 hsa-miR-199a-3p inhibits cell motility, invasiveness, and contractility of human ovarian endometriotic stromal cells by inhibition of p21-activated kinase 4 expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reproductive Sciences	6. 最初と最後の頁 3498-3507
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s43032-021-00604-4	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 Zhu Ruofei, Nasu Kaei, Aoyagi Yoko, Hirakawa Tomoko, Takebayashi Kanetoshi, Narahara Hisashi	4. 巻 138
2. 論文標題 Chemokine expression profiles of ovarian endometriotic stromal cells in three-dimensional culture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 103100 ~ 103100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jri.2020.103100	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 Takebayashi Kanetoshi、Nasu Kaei、Okamoto Mamiko、Aoyagi Yoko、Hirakawa Tomoko、Narahara Hisashi	4. 巻 18
2. 論文標題 hsa-miR-100-5p, an overexpressed miRNA in human ovarian endometriotic stromal cells, promotes invasion through attenuation of SMARCD1 expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reproductive Biology and Endocrinology	6. 最初と最後の頁 31～31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12958-020-00590-3	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 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 矢野光剛, 奈須家栄, 安田政実
2. 発表標題 内膜症関連卵巣癌ではHDAC6が高発現しており、明細胞癌では予後因子となる
3. 学会等名 第43回エンドメトリオーシス学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青柳陽子, 奈須家栄, 河野康志
2. 発表標題 PAK4阻害薬は卵巣子宮内膜症間質細胞の細胞遊走、浸潤および収縮能を抑制する
3. 学会等名 第43回エンドメトリオーシス学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kaei Nasu
2. 発表標題 Aberrantly expressed microRNAs in endometriosis
3. 学会等名 1st virtual International Scientific Conference of Endometriosis Adenomyosis Society of Bangladesh (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青柳陽子, 奈須家栄, 甲斐健太郎, 河野康志, 檜原久司
2. 発表標題 miR-132はAkt1を介して子宮内膜症の病態形成に関与する
3. 学会等名 令和4年度大分産科婦人科学会・大分県産婦人科医会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 麻生咲季, 奈須家栄, 青柳陽子, 甲斐健太郎, 岡本真実子, 小林栄仁
2. 発表標題 SIRT5選択的阻害剤による子宮内膜症の治療効果
3. 学会等名 第68回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kaei Nasu
2. 発表標題 Recently developed evidences on the hormonal treatments of endometriosis
3. 学会等名 International Congress on Endometriosis 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 麻生咲季, 奈須家栄, 青柳陽子, 甲斐健太郎, 岡本真実子, 小林栄仁
2. 発表標題 第45回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会
3. 学会等名 HDAC10阻害剤による子宮内膜症の治療効果
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 奈須家米	4. 発行年 2022年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 276
3. 書名 疾患バイオマーカーとしてのマイクロRNAと診断応用	

〔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	平川 東望子 (Tomoko Hirakawa) (20516132)	大分大学・医学部・客員研究員 (17501)	
研究分担者	西田 正和 (Masakazu Nishida) (90404384)	大分大学・医学部・講師 (17501)	
研究分担者	甲斐 健太郎 (Kentaro Kai) (90457622)	大分大学・医学部・助教 (17501)	

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