

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570066

研究課題名（和文）

マウス子宮内膜におけるインスリン様成長因子結合タンパク質 3 の生理機能の解析

研究課題名（英文） Physiological roles of insulin-like growth factor binding protein 3 in mouse endometrium

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）： Insulin-like growth factor (IGF) 結合タンパク質 3 (IGFBP3) は、IGF1 の子宮内膜間質細胞に対する DNA 合成作用を阻害した。IGFBP3 mRNA 発現は estradiol (E2) や transforming growth factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) により抑制された。IGFBP3 の分解酵素と考えられる Matrix metalloproteinase (MMP) 3 とセリンプロテアーゼ Kallikrein (Klk1) の発現を解析した。MMP3 mRNA 発現は TGF $\alpha$  により促進され、Klk1 mRNA 発現は E2 により促進されることを示した。MMP3 や Klk1 の産生増加は、IGFBP3 の分解を促進し、IGF1 作用を増強すると考えられる。マウス子宮内膜においては、E2 や TGF $\alpha$  により IGFBP3 の発現が調節され、IGF1 作用が増強されることを示した。

研究成果の概要（英文）： IGFBP3 inhibited IGF1-induced proliferation of endometrial cells. *Igfbp3* mRNA expression in the endometrial stromal cells was decreased by estradiol-17 $\beta$  (E2) and TGF $\alpha$ . MMP3 and Kallikrein (Klk) 1 degrade IGFBP3. *Mmp3* mRNA expression was increased by TGF $\alpha$ , and *Klk1* mRNA expression was by E2. Enhanced production of MMP3 and Klk1 decrease IGFBP3 levels in the endometrium, resulting in the increase in free IGF1 levels. E2 increased *Igf1* mRNA expression. These findings provide the possible regulatory mechanism of endometrial stromal cell proliferation that E2 stimulates IGF1 production, while E2 and TGF $\alpha$  decrease IGFBP3 level, leading to the stimulation of endometrial cell proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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，成長因子，子宮，インスリン様成長因子 1，インスリン様成長因子結合タンパク質 3，発情ホルモン，マウス

## 1. 研究開始当初の背景

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、上皮細胞と間質細胞で構成される。子宮内膜は、排卵周期や妊娠、分娩により、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間質細胞が増殖する。これらの結果、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に周期的な変化を開始する。排卵後に着床が無い場合は、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、新たな組織構築が開始される。

前述の子宮内膜の構造と機能の変化を制御する機構の解明は不十分であった。そこで、申請者は、1994年よりマウス子宮内膜の増殖機構の研究を開始し、IGF1, Transforming growth factor (TGF)  $\alpha$ , TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 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、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)。ついで、IL-18 は、子宮内膜細胞にアポトーシスを誘導するとともに、ECMを分解する matrix metalloproteinase (MMP) の遺伝子発現を制御することを示唆した(Murakami *et*

*al.*, 2005, Otsuki *et al.*, 2005)。

## 2. 研究の目的

これまでの研究より、IGFBP3 が子宮内膜間質細胞の増殖制御において IGF1 とともに重要な役割を担うと考えるに至った。子宮内膜において、発情ホルモンや黄体ホルモンにより IGF1 産生は促進され、この IGF1 が子宮内膜細胞の増殖を促進する。子宮内膜間質細胞培養系において、IGF1 の DNA 合成促進作用は、IGFBP3 により阻害されることを発見した。これは、IGFBP3 が IGF1 と結合することにより、遊離の IGF1 分子を減少させるためであると考えられる。IGFBP3 は、IGF1 作用の発現に関して重要な因子であることが示唆される。このように、子宮内膜間質細胞培養系を用いた解析から、IGF1 と IGFBP3 を基軸とする子宮内膜間質細胞の増殖制御機構の仮説を提唱する。本研究では、生体の子宮内膜組織において、本制御機構の成立を検証する。

## 3. 研究の方法

ICR系雌マウスを用いた。3週齢の個体の子宮を摘出し、Shiraga *et al.* (1997) と Komatsu *et al.* (2003) の方法により子宮内膜上皮細胞と間質細胞をそれぞれ単離し、初代培養をおこなった。IGF1 や IGFBP3 投与を行い、DNA 合成を検出し、細胞増殖への関与を解析した。さらに、estradiol-17 $\beta$  (E2), progesterone (P4), TGF $\alpha$  や TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 を投与し、IGF1 や IGFBP3 の発現に及ぼす効果を、real-time PCR により解析した。

## 4. 研究成果

(1) IGF1 および IGFBP3 の発現に関わる因子

IGF1 子宮では、*Igf1* mRNA 発現は、発情ホルモン受容体(ER) $\alpha$ を介して促進され、ER $\beta$

を介して抑制されることを示した。また、卵巣顆粒膜細胞では、ER $\beta$ が多く発現しているので、発情ホルモン・・・により *Igf1* mRNAは発現が抑制された。子宮内膜細胞において、TGF $\alpha$ は *Igf1* mRNA発現を高濃度で抑制した。

**IGFBP3** E2 は、子宮内膜上皮細胞においては *Igfbp3* mRNA発現を促進するが、間質細胞においては *Igfbp3* mRNA発現を抑える。TGF $\alpha$  や、TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 も *Igfbp3* mRNA発現を抑制した。

(2) IGFBP3 を分解する MMP3 とセリンプロテアーゼ Kallikrein(K1k)1 の発現に関わる因子

MMP3 と K1k1 は IGFBP3 を分解するといわれている。子宮内膜間質細胞において、*Mmp3* mRNA と *K1k1* mRNA が発現していた。*Mmp3* mRNA 発現は TGF $\alpha$ によって増加し、*K1k1* mRNA 発現は E2 によって増加した。*Tgfa* mRNA 発現は E2 により増加した。したがって、E2, TGF $\alpha$  によって IGFBP3 は分解が促進されることが示唆された。IGFBP3 の現象にともない、IGF1 作用が増強されると推察される。

(3) *Igf1* プロモーターの解析

マウス *Igf1* の第1プロモーターのプロモーター解析をした。転写開始点から5'上流-390bp の領域で最大のプロモーター活性が得られ、この領域内に最小プロモーターがあることが推察された。また、5'上流 88bp の領域までに、核タンパク質の結合する領域があることをゲルシフト解析で明らかにした。

(4) 糖尿病マウスにおける *Igf1* と *Igfbp3* の発現

Streptozotocin 投与により雌マウスに糖尿病を発症させると、血糖値の上昇に伴い発情周期が停止し無排卵になり、子宮は萎縮した。子宮内膜の *Igf1* mRNA と *Igfbp3* mRNA 発

現に変化は無かったが、糖尿病を発症したマウスでは、卵巣摘出後には子宮における *Igf1* mRNA 発現が有意に低下し、E2 に対する反応性も低下していた。

以上の結果から、(1) マウス IGF1 プロモーターの最小プロモーター領域には、核抽出タンパク質の結合部位があることを示し、子宮内膜では ER $\alpha$ により転写が促進され、ER $\beta$ により抑制されることを明らかにした。

(2) 子宮内膜組織内における IGFBP3 の生理的役割を解析し、子宮内膜で発現する TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 が転写抑制することを示した。*Igfbp3* の発現は、E2 による内分泌的調節のほかに、子宮内膜内の成長因子による局所調節をうけることが分かった。

(3) 子宮内膜組織内において、IGFBP3 の分解酵素と考えられる MMP3 と K1k1 の発現制御機構と生理的役割を示した。子宮内膜間質細胞の MMP3 は、TGF $\alpha$ により転写が促進され、K1k1 は、E2 により転写が促進され、分泌が高まることが示され、細胞外で IGFBP3 を分解することが示唆された。すなわち、子宮内膜細胞において IGFBP3 は、転写レベルとともに、翻訳後のタンパク質レベルにおいても制御を受けることが推察された。

## 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4件)

① Manabe, Y., Tochigi, M., Moriwaki, A., Takeuchi, S., Takahashi, S. Insulin-like Growth Factor 1(IGF1) mRNA Expression in the Uterus of Streptozotocin (STZ)-treated Diabetic Mice, Journal of Reproduction and Development, 査読有, 印刷中

②前川哲弥, 竹内 栄, 高橋純夫 マウス子宮内膜におけるインスリン様結合タンパク質

3の役割, 岡山実験動物研究会報, 査読無, 印刷中

③ Tsuchiya, Y., Saito, Y., Taniuchi, S., Sakuma, A., Maekawa, T., Fukamachi, H., Takeuchi, S., Takahashi, S. Runx3 expression and its roles in mouse endometrial cells, Journal of Reproduction and Development, 査読有, 58巻, 2012, 592-598 DOI: DN/JST.JSTAGE/jrd/2012-066 [pii]

④ Maekawa, T., Sakuma, A., Taniuchi, S., Ogo, Y., Iguchi, T., Takeuchi, S., Takahashi, S. Transforming growth factor- $\beta$  mRNA expression and its possible roles in mouse endometrial stromal cells, Zoological Science, 査読有, 29巻, 2012, 377-383 DOI: 10.2108/zsj.29.377

[学会発表] (計9件)

① 高橋純夫 マウス下垂体・卵巣系における転写因子Runx3の役割について 第15回下垂体形態学ミーティング 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 (香川) 2013年3月27日

② 小島史也・斉藤優佳・土屋由起子・竹内栄・高橋純夫 マウス下垂体前葉における転写因子Runx3の機能 日本動物学会第83回大会 (大阪) 2012年9月13日

③ 斉藤優佳・小島史也・土家由起子・谷内秀輔・竹内栄・高橋純夫 雌マウス卵巣におけるRunx3の生理的機能 第82回日本動物学会大会 (旭川) 2011年9月22日

④ 小島史也・斉藤優佳・土家由起子・谷内秀輔・竹内栄・高橋純夫 マウス下垂体前葉における転写因子Runx3の発現 第82回日本動物学会大会 (旭川) 2011年9月22日

⑤ 斉藤優佳・土家由起子・竹内栄・稲垣兼一・大塚文男・楨野博史・高橋純夫 雌マウス卵巣におけるRunx3の生理的機能 第81回日本動物学会大会 (東京) 2010年9月25日

⑥ 小郷由貴・竹内栄・高橋純夫 子宮におけるインスリン様成長因子1遺伝子の発現に関わる発情ホルモン受容体の解析 第81回日本動物学会大会 (東京) 2010年9月25日

⑦ 南條沙也香・入江紗弥香・稲熊あすみ・竹内栄・高橋純夫 マウスにおけるインスリン様成長因子1(IGF1)の転写制御機構の解析 第35回日本比較内分泌学会大会 (静岡) 2010年11月19日

⑧ 高橋純夫 IGF1調節系とオーバービュー シンポジウム「分野・領域を超えた内分泌学・生殖内分泌学の研究ネットワーク (岡山大学研究開発委員会 第4ワーキング主催)」(岡山) 2010年12月11日

⑨ 小郷由貴・谷内秀輔・工藤季之・竹内栄・高橋純夫 マウス子宮におけるインスリン様成長因子1遺伝子の転写制御に関わる発情ホルモン受容体の解析 第63回日本動物学会中国四国支部大会 (高松) 2011年5月14日

[図書] (計1件)

① 岡山大学生物学教科書作成委員会 (代表 高橋純夫) , 岡山大学出版会, 現代生物学入門 第2版, 2011年, 186 (41-46, 110-129)

## 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