

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 5 月 31 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成 22 年 ～ 平成 24 年

課題番号：22591829

研究課題名（和文） 脂肪細胞由来生理活性物質の子宮内膜機能への影響に関する研究

研究課題名（英文） The effect of adipose-tissue derived substances on endometrial functions.

研究代表者

河野 康志（KAWANO YASUSHI）

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：40274758

研究成果の概要（和文）：子宮内膜における AMP-activated protein kinase (AMPK) を介する生理活性物質の産生調節に注目した。AMPK の活性化により IL-8、MCP-1 および PGE2 の産生が抑制された。AMPK は炎症を抑制することが最近の知見から確認されており、子宮内膜において AMPK は IL-1 などの炎症性サイトカインの刺激による炎症性変化を調整し内膜の機能を維持し、炎症性変化に対するバランスを保つ役割を演じる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Our objective was to clarify the effect of AMPK on production of chemokines and prostaglandins by human endometrial stromal cells (ESCs). The phosphorylations of AMPK were observed by treatment with AICAR. Moreover, IL-1-stimulated chemokines and PG production was decreased by a mechanism involving AMPK. AMPK may play an important role in the anti-inflammatory effect resulting to reduction of chemokines and PG production, which may contribute to the modulation of a local factor in human endometrium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 23 年度	600,000	180,000	780,000
平成 24 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

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

1. 研究開始当初の背景

生殖年齢にある肥満女性は正常体重女性と比較して流産率が高いことが報告されてきた。

これらの研究結果からは、肥満が子宮内環境を悪化させることが示唆され、その原因が脂肪細胞から分泌される生理活性物質にある可

能性が推察される。AMP活性化プロテインキナーゼ (AMPK) は、セリン/スレオニンキナーゼに属し細胞内のエネルギーセンサーとして働きエネルギーバランスを調整している。脂肪組織由来の生理活性物質の子宮・卵巣に対する分子機構を解明することは、メタボリックシンドロームの研究にとどまらず、生殖機能への影響を分子レベルで明らかにすることにもつながると考えられる。

2. 研究の目的

子宮内膜におけるAMPKを介する生理活性物質の産生調節に注目し免疫系の変化におよぼすメカニズムを解明する。子宮内膜においてAMPKがI κ Bのような既知の細胞内情報伝達系とどのような相互作用を引き起こすかについて検討する。これらの現象が妊娠維持や流産および不育症などの生殖現象にどのように関わっているかを検討し、不妊・不育症の病態解明に役立てたいのに加えて、それらを標的とした治療法の開発が可能かどうかを検討する。

3. 研究の方法

子宮内膜間質細胞培養

子宮筋腫摘出時にインフォームドコンセントを得て子宮内膜を採取し、子宮内膜組織を細切の後、酵素で処理し、遠心ののち、子宮内膜間質細胞を分離した。得られた細胞は10%胎児牛血清添加RPMI 1640で培養した。

培養上清中の物質の測定

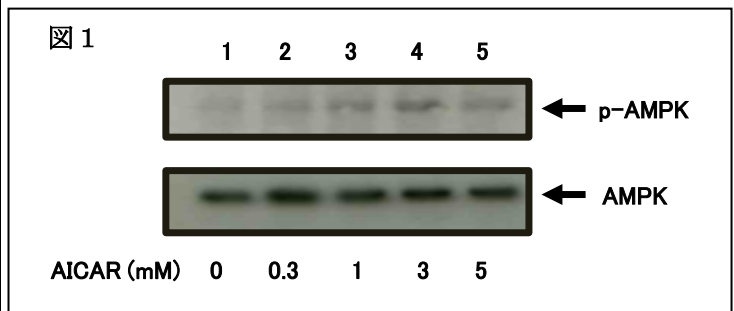
培養細胞に対し、interleukin (IL)-1、AICARを時間的、濃度的変化を加えて添加し、培養ののち、培養上清中のIL-8、monocyte chemoattractant protein (MCP)-1等のケモカインやprostaglandins (PGs)をELISA法を用いて定量し検討する。また、既知のI κ B等の細胞内情報伝達系を活性化させる物質とAMPKの相互作用を検討する目的で上記物質の産生を調べる。

細胞内情報伝達系の検討

細胞内情報伝達系にはAMPKが重要であることが示唆されている。従って、アディポネクチンおよびAICARを時間的、濃度的変化を加えて添加し、刺激後のAMPKのリン酸化をWestern innumoblot analysisにより解析する。また、AMPKカスケードの特異的な阻害剤を添加し、AMPKの活性を抑制することで、IL-8、MCP-1やプロスタグランジン等の産生に変化がみられるかどうかを検討する。また、既知のMAP kinase等の細胞内情報伝達系を活性化させる物質とAMPKの相互作用を検討する目的でERK、p38のリン酸化を調べる。

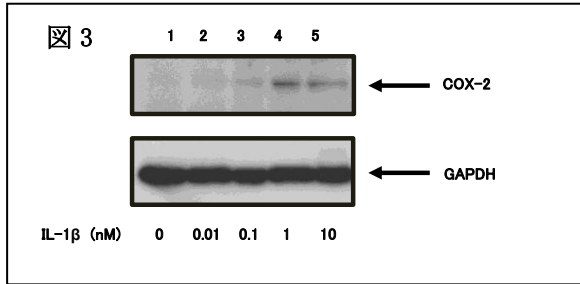
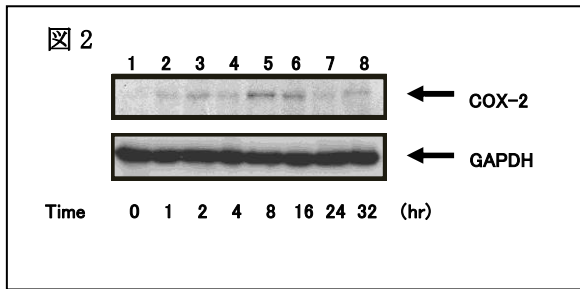
4. 研究成果

子宮内膜間質細胞を培養し、AMPKを活性化させるAICARを時間的、濃度的変化を加えて添加し、AMPKのリン酸化を解析した(図1)。

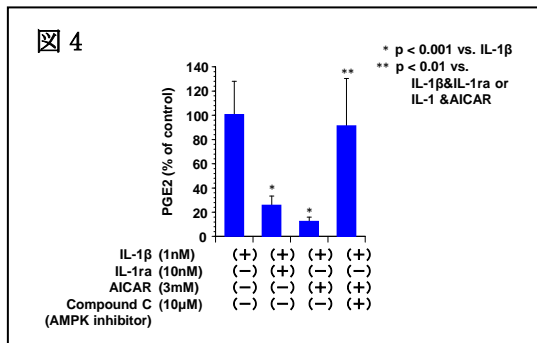


IL-1の添加で培養上清中のIL-8、MCP-1は有意に増加したが、この増加はIL-1 receptor antagonistならびにAICARの添加で抑制された [IL-8: IL-1 (1nM); 73.0 ± 15.9 ng/mL, IL-1+AICAR (1mM); 46.7 ± 6.0 ng/mL ($p < 0.01$); MCP-1: IL-1 (1nM); $8,136.3 \pm 1,394.6$ pg/mL, IL-1+AICAR (1mM); $4,685.1 \pm 432.8$ pg/mL ($p < 0.01$)].

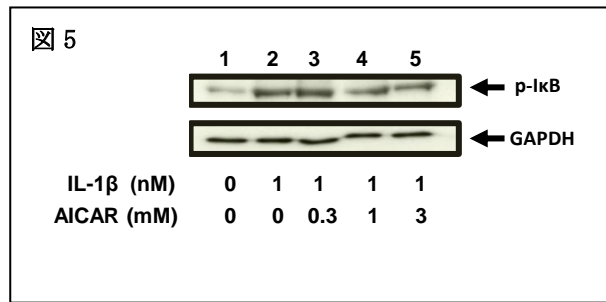
プロスタグランジン合成酵素 (COX-2) の発現調節を検討したところ、IL-1によりCOX-2の発現がIL-1の時間的、濃度的に亢進した。



培養上清中の PGE₂ を ELISA 法を用いて定量したところ、同様に産生量が増加した。次に、AMPK を活性化するとされている AICAR を IL-1 とともに時間的、濃度的変化を加えて添加したところ、IL-1 により発現が誘導された COX-2 は、AMPK の活性化により発現が低下した。また、培養上清中の PGE₂ も同様の変化呈した。



これらの機序をさらに解明するため、I κ B-NF κ B 系に注目し検討した。I κ B は IL-1 添加により 5 分後から活性化がみられた。これに AICAR を添加し I κ B の活性化を検討したところ、IL-1 により活性化された I κ B は AMPK により活性化が抑制された。



今回の結果から、COX-2 は IL-1 の刺激により、I κ B-NF κ B 系が活性化され、NF κ B が核内移行し発現が亢進するが、AMPK はこの部分を抑制することで COX-2 の発現を調節している可能性が示唆された。以上より、AMPK は炎症反応を負の方向に調節する働きを持つことが示された。

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 6 件)

- ① Kawano Y, et al. The production of VEGF involving MAP kinase activation by low level laser therapy in human granulosa cells. *Laser Therapy* 査読有 2012; 21: 269-274.
- ② Kawano Y, et al. Regulation of interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production by amnion-derived (WISH) cells. *Clin Exp Obstet& Gynecol* 査読有 2012; 29: 43-48.
- ③ Kawano Y, et al. The effects of epidermal growth factor and transforming growth factor- α on secretion of interleukin-8 and growth-regulated oncogene α in human granulosa-lutein cells. *Gynecol Obstet Invest* 査読有 2012; 73: 189-194.
- ④ Karakida S, Kawano Y, et al. Effect of heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin on the MAP kinase-induced production of vascular endothelial growth factor by human granulosa cells. *Growth*

Factors 査読有 2011; 29: 271-277.

- ⑤ Kawano Y, et al. Cadmium chloride induces the expression of metallothionein mRNA by endometrial stromal cells and amnion-derived (WISH) cells. Kawano Y, et al. Gynecol Obstet Invest 査読有 2011; 71: 240-244.
- ⑥ Kawano Y, et al. Thrombin-induced chemokine production in endometrial stromal cells. Hum Reprod 査読有 2011; 26: 407-413.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 宇津宮由布子、河野康志、他. 卵巣顆粒膜細胞における AMP-activated protein kinase (AMPK) の役割. 第 57 回日本生殖医学会・学術講演会 2012 年 11 月 8-9 日 長崎市、ブリックホール
- ② 河野康志、他. 子宮内膜における 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) の役割. 第 6 回日本生殖再生医学会 2012 年 3 月 25 日 東京都、シェーンバッハ・サボー
- ③ 河野康志、他. 子宮内膜における 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) の役割. 第 26 回日本生殖免疫医学会 2011 年 12 月 2-3 日 名古屋市、ウイंकあいち
- ④ Kawano Y, et al. The role of 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) in human endometrial stromal cells. 第 63 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 2011 年 8 月 29-31 日 大阪市、国際会議場
- ⑤ Kawano Y, et al. The role of 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) in human endometrial stromal cells. 16th World congress on in vitro fertilization. 2011 年 9 月 10-13 日 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 康志 (KAWANO YASUSHI)
大分大学・医学部・准教授
研究者番号：40274758

(2) 研究分担者

檜原 久司 (NARAHARA HISASHI)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：50211447

(3) 連携研究者

奈須 家栄 (NASU KAEI)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：30274757