

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 24 年 5 月 17 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791513

研究課題名（和文）SERM の子宮内膜上皮細胞に対する増殖促進・抑制作用の分子機構の解析

研究課題名（英文）The analysis of molecular mechanism of the precipitation/inhibition of uterine endometrial epithelial cell proliferation by SERM.

研究代表者

網田 光善（AMITA MITSUYOSHI）

山形大学・医学部・助教

研究者番号：30420061

研究成果の概要（和文）：

排卵誘発に用いるクエン酸クロミフェン(CC)は選択的エストロゲン受容体モジュレーター(SERM)の一つである。CC 治療は約 80%と高い排卵率に比し、妊娠率は 20~30%と低値である。その原因として、CC の抗エストロゲン作用による、子宮内膜細胞の増殖抑制が考えられているが、詳細な分子機構は明らかではない。本研究では、子宮内膜細胞に対するエストロゲン(E2)の増殖促進作用の CC による抑制の分子機構を検討し、その機序として、ER α とそのcoactivatorである SRC-1 の結合の阻害による転写活性の阻害が重要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Clomiphene citrate (CC), which has been used for anovulatory infertile women, is thought to be a selective estrogen receptor modulator (SERM). Although CC will restore ovulation in about 80% of anovulatory women, it will result in pregnancy in only about 20~30%. This discrepancy between ovulation and pregnancy success rates may be explained by the peripheral anti-estrogenic effects of CC at the level of the endometrium. However, the molecular mechanisms how CC acts to inhibit the endometrial cell proliferation are still remains to be elusive. We investigated the molecular mechanisms by which CC inhibits the estrogen (E2)-induced endometrial epithelial cell proliferation and CC may inhibit the E2-induced endometrial epithelial cell proliferation and ER α transactivation through inhibiting the recruitment of SRC-1 to ER α .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：(1)SERM (2)子宮内膜上皮 (3)増殖効果

1. 研究開始当初の背景 | によるものが約 20%を占め、卵管因子に次いで 2 番目に多い。40 年以上にわたり、排卵障
- 不妊症の原因は多岐にわたるが、排卵障害

害に対する第一選択薬として、クエン酸クロミフェン(CC)が使用されてきた。CC治療における排卵率は良好で約80%に及ぶが、妊娠率は20~30%と排卵率に比し低値に留まることが知られている。CC治療の妊娠率が低値に留まる原因として子宮内膜及び子宮頸管に対するCCの抗エストロゲン作用が考えられている。すなわち、子宮頸管において、頸管粘液を減少させることと、子宮内膜に対して、子宮内膜を菲薄化し着床を阻害することである。

特に、子宮内膜の菲薄化と妊娠・着床率の低下については数多くの報告があり、Gonenらは人工授精周期において、子宮内膜が6mm未満の場合妊娠が成立しなかったと報告している。またDickeyらは、IVF周期において、子宮内膜が8mm未満の場合有意に妊娠率が低く、子宮内膜が9~13mmの時に妊娠率が高かったと報告している。子宮内膜の菲薄化は、受精卵の着床を障害し妊娠率の低下を招くと考えられるが、子宮内膜の菲薄化を予防する有効な治療法は確立していないのが現状である。

E2はエストロゲンレセプター(ER)を介して、子宮内膜上皮細胞の増殖に重要な役割を担っている。ERは核内受容体スーパーファミリーの一種で、ER α とER β のサブタイプが存在しそれぞれ異なった標的遺伝子に作用する。ERはA~Fまでの領域に分割されるが、転写促進能はA/B領域とE領域の2カ所が担っている。特に、E領域の転写促進能(AF-2)はリガンド結合誘導的で、コアクチベーター、コプレッサーなどの転写共役因子群とともに遺伝子転写を調節している。

近年、選択的エストロゲン受容体モジュレーター(SERM)という薬剤の概念が提唱されている。SERMはERにリガンドとして結合するが、標的組織によりアゴニストあるいはアンタゴニストとして働く。CCは、子宮ではエストロゲンアンタゴニストとして働き、E2による子宮内膜増殖を抑制するが、動物実験において、骨や心血管系においてエストロゲンアゴニストとして作用するとの報告があり、SERMの一種である。

SERMが標的組織特異的に、アゴニストあるいはアンタゴニスト作用を示す機序として、組織により、SERMがリガンドとして結合した際に複合体形成されるコアクチベーターなどの転写共役因子が異なるということが考えられている。

これまで、CCの子宮内膜に対する抗エストロゲン作用の作用機序については、ERに対して拮抗阻害することや、ERの数を減少させることなどが考えられてきた。しかし、前述のように、CCがSERMとしての作用を示すことを考えると、従来の考え方のみでは十分に説明がつかず、さらに詳細な分子機構の

解析が必要である。

2. 研究の目的

CCがエストロゲン依存性の子宮内膜増殖を抑制する分子機構を明らかにすること。

3. 研究の方法

子宮内膜上皮由来の2つの細胞株、Ishikawa細胞(子宮内膜癌由来細胞株)、EM-E6/E7/hTERT細胞(子宮内膜上皮由来細胞株)を用いて、子宮内膜細胞におけるE2による増殖促進効果に対するCCの影響を以下の項目について検討した。(1)細胞数カウントとMTSアッセイを用いた、E2およびCCの細胞増殖効果、(2)Estrogen responsive element(ERE)-tk-luciferaseによるプロモーターアッセイ、(3)Green fluorescent proteinを結合させたER α (GFP-ER α)を細胞内に導入し、E2、CC、および抗エストロゲン剤であるICI182780(ICI)投与によるGFP-ER α の局在の変化、および(4)fluorescence recovery after photobleaching(FRAP)法による動態の観察。(5)steroid receptor coactivator-1(SRC-1)とER α の相互作用の免疫沈降法および免疫蛍光染色法による検討、(6)SRC-1siRNAを細胞内に導入。SRC-1 knock downによるE2の細胞増殖効果、およびERを介したERE転写活性に与える影響の検討。

4. 研究成果

(1)

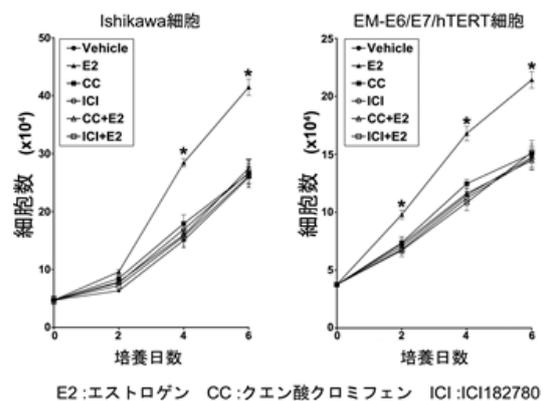


図1

E2は子宮内膜上皮細胞において細胞増殖効果を示し、この増殖効果はCCとICIにより有意に(p<0.01)抑制された。

(2)

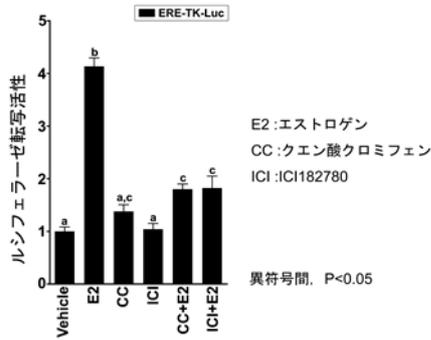


図 2

E2 は ERE-tk の転写を活性化した。E2 による転写活性化は、CC あるいは ICI を E2 に同時投与することにより有意に ($p < 0.05$) 阻害された。

(3)

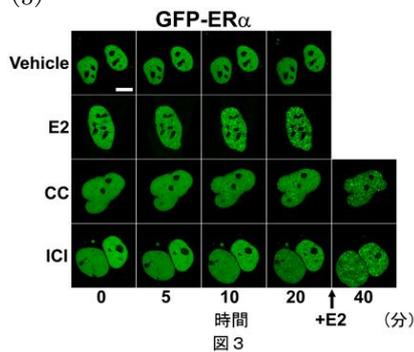


図 3

リガンド (E2、CC、ICI) 非存在下では GFP-ER α は核内に均一に分布したが、リガンド投与後は、いずれのリガンドの投与後にも投与 5 分後から、核内での不均一な集積を示した。しかし、その変化の程度には差があり、E2、ICI、CC の順で大きかった。また、CC、ICI を E2 と同時投与してみると、CC、ICI ともに E2 による GFP-ER α の核内での局在の変化を部分的に抑制した。

(4)

FRAP は、ICI、CC、E2 の順に回復が遅延した。ICI、CC による回復の遅延は、E2 投与により改善しなかった。

(5)

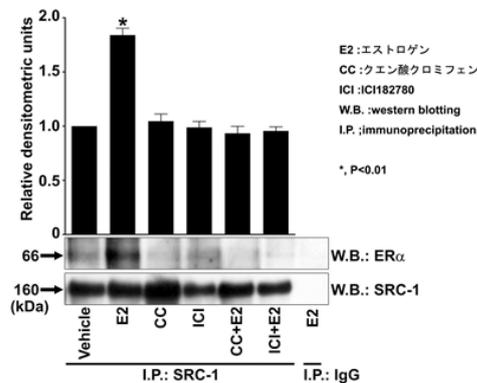


図 4

リガンド (E2、CC、ICI) 非存在下では GFP-ER α は核内に均一に分布したが、リガンド投与後は、いずれのリガンドの投与後にも投与 5 分後から、核内での不均一な集積を示した。しかし、その変化の程度には差があり、E2、ICI、CC の順で大きかった。また、CC、ICI を E2 と同時投与してみると、CC、ICI ともに E2 による GFP-ER α の核内での局在の変化を部分的に抑制した。

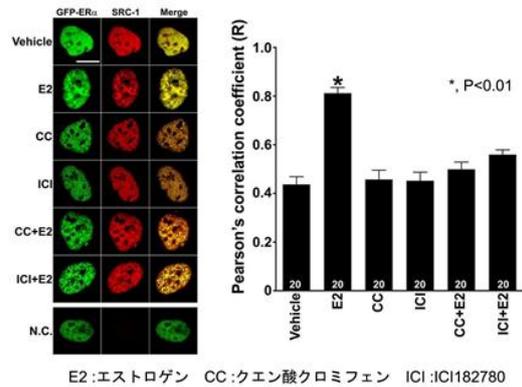


図 5

E2 により SRC-1 と ER α の結合は増加したが、CC および ICI の投与により有意に減少した。

(6)

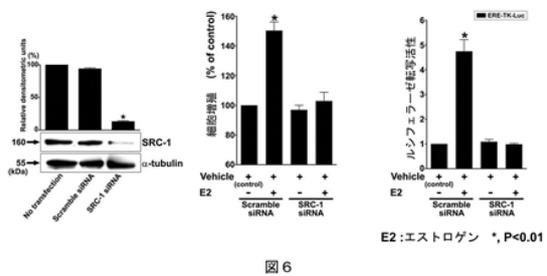


図 6

E2 による細胞増殖効果と ERE 転写活性化は SRC-1 siRNA 導入により抑制された。

E2 による子宮内膜細胞増殖効果、ならびに ERE の転写活性化は CC の同時投与により完全に抑制された。これまで、CC の抗エストロゲン作用については、ER に対して E2 を拮抗阻害することが重要であると考えられていた。今回、ER を介した遺伝子転写活性において重要である転写共役因子の SRC-1 に注目し検討したところ、CC は、E2 による ER α と SRC-1 の複合体形成を完全に抑制することが示唆された。子宮内膜細胞において ER を介したエストロゲン作用の発現に、SRC-1 との複合体形成が必要であることを確かめるため、siRNA の導入により SRC-1 タンパク発現を抑制すると、E2 による細胞増殖効果と ERE の遺伝子転写活性化が抑制された。

以上の結果から、E2 による子宮内膜増殖効果を CC が抑制する分子機構として、ER と SRC-1 の複合体形成の阻害が重要であることが示唆された。今後、CC が ER の数を減少させるか否かの検討と、減少させるとすればその分子機構についてさらなる研究が必要であると考えられる。

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2件)

- ① Hara S, Takahashi T, Amita M, Igarashi .H, Tsutsumi S, Kurachi.H: Bezafibrate restores the inhibition of FSH-induced follicular development and steroidogenesis by tumor necrosis factor-alpha through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway in an in vitro mouse preantral follicle culture. Biol Reprod 2011;85(5):895-906 (査読あり)
- ② Hara.S, Takahashi.T, Amita.M, Igarashi.H and Kurachi.H: Usefulness of bezafibrate for ovulation induction in clomiphene citrate-resistant polycystic ovary syndrome patients with dyslipidemia: a prospective pilot study of seven cases. Gynecol Obstet Invest 2010;70:166-72, (査読あり)

〔学会発表〕(計2件)

- ① 網田光善 高橋俊文 原周一郎 五十嵐秀樹 倉智博久: GFP 結合 ER α を用いた子宮内膜細胞におけるエストロゲン・抗エストロゲン作用の可視化、第62回日本産科婦人科学会学術講演会 東京国際フォーラム 2010.4.23
- ② 網田光善 高橋俊文 原周一郎 五十嵐秀樹 倉智博久: GFP-ER α を用いた子宮内膜細胞におけるエストロゲン・抗エストロゲン作用の可視化、第55回日本生殖医学会総会・学術講演会 徳島市あわぎんホール 2010.11.11

〔図書〕(計1件)

- ① 網田光善, 高橋俊文, 倉智博久: クエン酸クロミフェンによる子宮内膜増殖抑制作用の分子機構. 産婦人科の実際 2010;59(9):1399-1405

6. 研究組織

(1) 研究代表者

網田 光善 (AMITA MITSUYOSHI)
研究者番号: 30420061

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: