

## 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 20 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791536

研究課題名（和文） 子宮内膜および子宮内膜症の再構築に関する研究

研究課題名（英文） Tissue remodeling associated with endometrium and endometriosis

研究代表者

津野 晃寿（TSUNO AKITOSHI）

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30457634

研究成果の概要（和文）：

クモ膜下出血後の脳血管攣縮に対して使用されている ROCK inhibitor である fasudil dihydrochloride が、子宮内膜症間質細胞の  $\alpha$ -SMA、ROCK-I、ROCK-II の発現を抑制することにより myofibroblast への分化と contractility を抑制し、癒着形成を抑制すること、また、G2/M 期の細胞周期を停止させ細胞増殖を抑制し apoptosis を誘導することを解明した。

Fasudil dihydrochloride は副作用が少なく、安全性が高い薬剤であり、不妊症の原因となる子宮内膜症による癒着や癒着形成を標的とした治療薬としての新たな有用性を発見した。

研究成果の概要（英文）：

Fasudil significantly inhibited the proliferation and contractility of ECSC and induced the cell cycle arrest in the G2/M phase and apoptosis of these cells. Morphological observation revealed the suppression of ECSC attachment to collagen fibers and decrease of cell density by fasudil. The expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin, RhoA, ROCK-I, and ROCK-II proteins was inhibited by fasudil administration. The expression of the antiapoptotic factors, Bcl-2 and Bcl-XL, in two-dimensional cultured ECSC were down-regulated by the addition of fasudil, whereas, the expression of p16INK4a and p21Waf1/Cip1 was up-regulated by the addition of fasudil.

The present findings suggest that fasudil is a promising agent for the treatment of endometriosis. The inhibition of cell proliferation, contractility, and myofibroblastic differentiation, the attenuation of attachment to collagen fibers, the decrease of cell density, and the induction of cell cycle arrest and apoptosis of ECSC are involved in the active mechanisms of fasudil.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：産婦人科  
 科研費の分科・細目：産科婦人科  
 キーワード：子宮内膜症、collagen gell、癒痕化、

1. 研究開始当初の背景

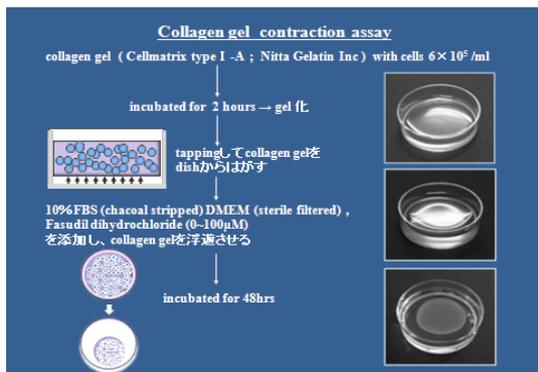
子宮内膜症は、癒着や癒痕化を特徴とし、その結果、不妊症や慢性骨盤痛等の症状が出現する。私は、tissue remodeling の観点から子宮内膜症における癒痕形成について検討し、正常子宮内膜間質細胞に比べて子宮内膜症間質細胞の contractility は増強しており、より癒痕化しやすいことを報告してきた。

2. 研究の目的

Fasudil dihydrochloride は、Rho-kinase (Rock) inhibitor であり、従来より血管拡張薬としてクモ膜下出血後の脳血管攣縮に使用されている。子宮内膜症による癒痕化に対する Fasudil の有効性について子宮内膜症性間質細胞の collagen gel 三次元培養法を用いて検討した。

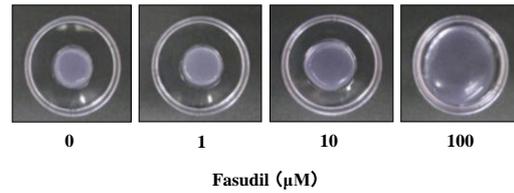
3. 研究の方法

卵巣子宮内膜症性嚢胞の手術時 (n=5) に、文書による患者の同意を得て嚢胞壁を採取し、子宮内膜症性間質細胞を分離・培養した。Type I collagen 溶液内に  $6 \times 10^5$  cell/ml の細胞濃度になるように子宮内膜症性間質細胞を懸濁した。37°C で 2 時間培養して gel 化させた。Tapping して collagen gel を dish から浮遊させ、Fasudil dihydrochloride (1-100  $\mu$ g/ml) を添加し、10%血清存在下で培養した。48 時間後に gel の表面積を測定した。

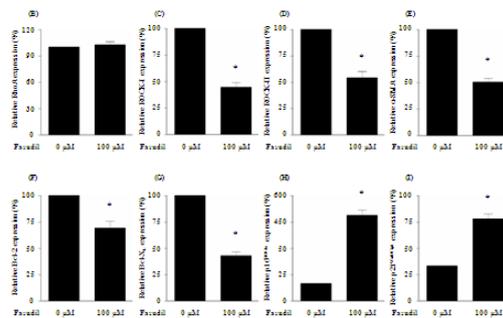
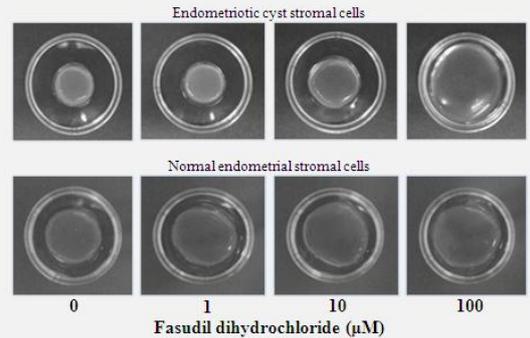


さらに collagen gel の収縮メカニズムについて解明するため、癒痕形成の際に生じる myofibroblast のマーカーである  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 及び contractility に関与する Rho A、ROCK 1、ROCK 2 の発現を western blot 法を用いて検討した。細胞増殖能は Brdu 取り込みにより評価した。

Collagen gel contraction assay (48hr)

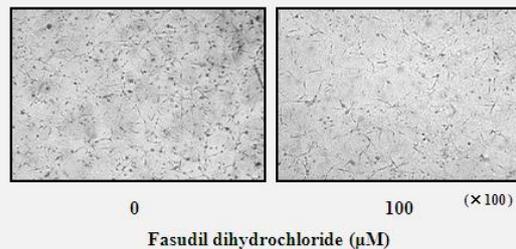


Collagen gel contraction assay (48hr)



Collagen gel内の子宮内膜症間質細胞の分布と形態

Collagen gel : Giemsa stain



また、Fasudil dihydrochloride の添加により  $\alpha$ -SMA、ROCK 1、ROCK 2 の蛋白発現が著明に抑制され、細胞増殖能は 71%に抑制され

た。Fasudil dihydrochloride は  $\alpha$ -SMA、ROCK1、ROCK2 の発現を抑制することにより、子宮内膜症性間質細胞の myofibroblast への分化と contractility を抑制すること、細胞増殖を抑制することが判明した。Fasudil dihydrochloride は、子宮内膜症の癥痕を標的とした薬剤として有用な可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Akitoshi Tsuno, Kaei Nasu, Yasushi Kawano, Akitoshi Yuge, Hairi Li, Wakana Abe, Hisashi Narahara  
Fasudil inhibits the proliferation and contractility and induces cell cycle arrest and apoptosis of human endometriotic stromal cells: A promising agent for the treatment of endometriosis  
J Clin Endocrinol Metab. 2011 96(12)  
査読有
- ② Masatake Adachi, Kaei Nasu, Akitoshi Tsuno, Akitoshi Yuge, Yasushi Kawano, Hisashi Narahara  
Attachment to extracellular matrices is enhanced in human endometriotic stromal cells: a possible mechanism involved in the pathogenesis of endometriosis  
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2011 155: 85-88  
査読有
- ③ Yulie Kawano, Kaei Nasu, Haili Li, Akitoshi Tsuno, Wakana Abe, Noriyuki Takai, Hisashi Narahara  
Application of the histone deacetylase inhibitors for the treatment of endometriosis: histone modifications as

pathogenesis and novel therapeutic target

Human Reprod. 2011 26(9): 2486-2498  
査読有

- ④ Kaei Nasu, Nishida Masakazu, Yasushi Kawano, Akitoshi Tsuno, Wakana Abe, Akitoshi Yuge, Noriyuki Takai, Hisashi Narahara  
Aberrant expression of apoptosis-related molecules in endometriosis: a possible mechanism underlying the pathogenesis of endometriosis  
Reprod Sci. 2011 18: 206-218  
査読有
- ⑤ 透析医療と他科連携 -見逃しやすい疾患を中心に: 婦人科【透析患者と月経異常・不正性器出血】  
津野晃寿、甲斐健太郎、河野康志、楢原久司  
臨牀透析 2011-2; Vol.27 No.2(10)  
査読なし

[学会発表] (計 2 件)

- ① 津野晃寿  
エンドメトリオーシス学会  
2012 年 1 月 21 日  
ホテルニュー長崎  
子宮内膜症に対する Fasudil dihydrochloride の効果

津野晃寿

第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会  
2011 年 8 月 29 日  
大阪国際会議場  
子宮内膜症による癥痕化に対するヘパリンの作用

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

津野 晃寿 (TSUNO AKITOSHI)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：3045763

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：