

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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791547

研究課題名（和文） プロテオミクスによるヒト子宮内膜機能を担うシグナル分子群の探索

研究課題名（英文） Proteomics based exploration of signaling molecules responsible for human endometrial function

研究代表者

西川 明花（NISHIKAWA SAYAKA）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60445236

研究成果の概要（和文）:

本研究では、子宮内膜の増殖・分化に伴って活性化されるチロシンキナーゼ SRC が関与する細胞内シグナル伝達経路を、主にプロテオミクスの手法を用いて分子レベルで解明し、着床ならびに妊娠成立・維持における役割を明らかにすることを目的とする。その研究のための主要なマテリアルとして、活性化型 SRC のアデノウイルスベクターの作成を試みたが、最終的には作成には至っていない。しかし、内膜分化の指標となるレポーターのコンストラクト、不死化ヒト内膜細胞株、*in vivo* 内膜再構成システムなど、諸実験に必要なその他の研究マテリアル・研究ツールの準備・作成・確立は行い得た。一方、内膜腺上皮の機能発現においては、N-カドヘリンの関与する epithelial mesenchymal transition (EMT) が重要な役割を担う可能性を示した。

研究成果の概要（英文）:

The aim of this research project was to explore the signaling molecules and pathways particularly involving SRC responsible for human endometrial function using proteomics methods. We attempted to construct an adenovirus vector expressing constitutively active SRC that was required as an essential material to accomplish this project, but we did not succeed yet. Instead, we successfully prepared several research materials and tools such as reporter constructs, an immortalized human endometrial cell line, and *in vivo* model of human endometrial reconstitution. We also demonstrated that epithelial mesenchymal transition (EMT) involving N-cadherin played a role in human endometrial epithelial cell function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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)子宮内膜 (2)シグナル伝達 (3)脱落膜化 (4)着床 (5)キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

着床や絨毛・胎盤形成の過程において、子宮内膜（特に間質細胞）の分化である脱落膜化は重要な役割を果たす。その主な生理学的

意義は、様々な生理活性物質の産生や細胞間相互作用を通じて、絨毛の発育・侵入および胎盤の形成・維持を制御することにある。脱落膜化を主にドライブするものとして、着床

胚からのシグナルも重要だが、ヒトではプロゲステロンが第一義的な誘導因子である。近年、様々なシグナル伝達経路とプロゲステロン受容体とのクロストークが脱落膜化を制御することが明らかになってきた。特に cAMP シグナルがその中心的な役割を果たす(1,2)。最近、cAMP およびプロゲステロンシグナルに加えて、ヒト子宮内膜間質細胞 (human endometrial stromal cells, hESC) の脱落膜化に伴い、SRC チロシンキナーゼ活性が上昇することに加えて、SRC ノックアウトマウスでは適切に脱落膜化が起きないことが報告されている(3-6)。SRC は分子量約6万のタンパク質チロシンリン酸化酵素(チロシンキナーゼ)であり、殆ど全ての組織に発現している。リガンドにより活性化された様々な膜受容体と会合して、細胞内へシグナルを伝える。このように SRC は、非受容体型チロシンキナーゼとして、細胞の増殖・分化・運動・形態・癌化などに重要な役割を果たす(7)。本研究の端緒として、ドミナントネガティブ SRC を用いた SRC 活性の遮断により、STAT5 を不活化し脱落膜化を阻止できたことから、STAT5 の上流分子として SRC は脱落膜化に必須であることが報告された(8)。この報告を受けて、ドミナントアクティブ SRC (DA-SRC) の導入により、脱落膜化をドライブする SRC 下流分子群がチロシンリン酸化を通じて活性化されると想定した。脱落膜化において、SRC の下流にある標的分子は上述の STAT5 以外は未だ不明である。DA-SRC を用いれば、通常検知するのが難しいチロシンリン酸化状態が顕著になることにより、SRC の標的分子群を容易に網羅的に同定できるのではないかと考えた。その戦略として、プロテオミクスを用いて網羅的に探索することを目指した。

1. Gellersen B, Brosens J (2003) Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol* 178:357-372.
2. Maruyama T, Yoshimura Y (2008) Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. *Endocr J* 55:795-810.
3. Maruyama T, Yoshimura Y, Yodoi J, Sabe H (1999) Activation of c-Src kinase is associated with in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 140: 2632-2636.
4. Yamamoto Y, Maruyama T, Sakai N, Sakurai R, Shimizu A, Hamatani T, Masuda H, Uchida H, Sabe H, Yoshimura Y (2002) Expression and subcellular

distribution of the active form of c-Src tyrosine kinase in differentiating human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 8: 1117-1124.

5. Shimizu A, Maruyama T, Tamaki K, Uchida H, Asada H, Yoshimura Y (2005) Impairment of decidualization in SRC-deficient mice. *Biol Reprod* 73: 1219-1227.
6. Maruyama T, Yamamoto Y, Shimizu A, Masuda H, Sakai N, Sakurai R, Asada H, Yoshimura Y (2004) Pyrazolo pyrimidine-type inhibitors of SRC family tyrosine kinases promote ovarian steroid-induced differentiation of human endometrial stromal cells in vitro. *Biol Reprod* 70: 214-221.
7. Thomas SM, Brugge JS (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 513-609.
8. Nagashima T, Maruyama T, Uchida H, Kajitani T, Arase T, Ono M, Oda H, Kagami M, Masuda H, Nishikawa S, Asada H, Yoshimura Y (2008) Activation of SRC kinase and phosphorylation of STAT5 are required for decidual transformation of human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 149:1227-1234.

2. 研究の目的

本研究では、子宮内膜の増殖・分化に伴って特異的に活性化されるチロシンキナーゼ SRC が関与する細胞内シグナル伝達経路を、分子レベルで解明し、着床ならびに妊娠成立・維持における役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

DA-SRC は既に cDNA を有しているため、これをもとに、発現プラスミドベクターおよびアデノウイルスベクターの作成を試みた。続いて、作成されたベクターを hESC に導入し、DA-SRC の invitro 子宮内膜脱落膜化への影響を検討を予定した。具体的には、DA-SRC 単独あるいは短期間の estrogen+progesterone 刺激により、i) 大型円形細胞像を特徴とする脱落膜化様形態変化が得られるか、ii) 脱落膜化マーカーの mRNA および蛋白レベルで発現が誘導されるか、iii) 脱落膜化マーカーのプロモーターを用いたレポーターアッセイで、それぞれのプロモーターが活性化されているか、などの検討を予定した。そのために、レポーターコンストラクトを作成した。また、DA-SRC を用いた内膜 SRC 下流シグナル分子の同定として、プロテオミクス手法による網羅的チロシンリン酸化蛋白の同定を試みた。具体的には、a) チロシンリン酸化

抗体を用いた2次元電気泳動法によるwestern blot, b) a)と同じサンプルを用いたクマシー染色&銀染色ゲルからのスポット解析として, 2次元電気泳動, クマシー染色あるいは銀染色, およびチロシンリン酸化抗体 4G10 によるウエスタンブロットングを複合的に用いたプロテオミクス解析を試みた.

4. 研究成果

チロシンキナーゼ SRC の種々の変異体を発現するアデノウイルスベクターの構築を試みた. 特に, 構成的に活性化している活性化型 SRC (dominant active SRC; DA-SRC) を発現するウイルスベクターの構築を主に行った. 当初は, DA-SRC の cDNA を pShuttle ベクターに挿入した後に, それを含む全発現カセットを I-Ceu I と P1-Sce I の制限酵素で切り出し, 予め両制限酵素で処理されている Adeno-X viral DNA に挿入する戦略を採用した. 条件を適宜変えながら様々な方法でウイルス構築を試みたが, 目的のアデノウイルスは得られなかった. そこで, 新しい version である pShuttle2 ベクターに変更して最初からやり直したが, DA-SRC アデノウイルスは得られなかった. この結果をふまえて, DA-SRC レンチウイルスの作成, あるいは第三者からの DA-SRC アデノウイルスの供与に戦略を変更した. 一方, 脱落膜化に伴って発現が上昇するプロラクチンおよびインスリン様成長因子結合蛋白 1 型 (IGFBP-1) については, それぞれの発現プロモーターを有するルシフェラーゼレポータープラスミドを用意し得た. プロラクチンについては第三者から供与を受け一方, 後者については, ヒトゲノムから目的の IGFBP-1 プロモーター領域を PCR クローニングして PGL3 レポーターベクターに挿入した.

分化誘導させた初代内膜培養細胞より抽出した蛋白を用いて, チロシンリン酸化抗体を用いた2次元電気泳動法によるウエスタンブロットと, それと並行して行った泳動ゲル銀染色の結果を比較検討したところ, いくつかの新たなリン酸化スポットが分化誘導した内膜細胞に認められた. しかしながら, 恐らく個体差によると思われるバラツキが検体間に認められたため, 安定した結果を得るためには細胞株の使用が望ましいと判断し, 不死化内膜間質細胞株の樹立作業のプロセスに参画した. その結果, 樹立した不死化内膜細胞株は, 初代内膜培養細胞と同様に性ステロイドホルモンに反応して分化することが明らかとなった. また, より生体内に近い細胞内シグナル伝達経路を明らかにするためには, 単一の細胞だけを用いるのではなく, 腺上皮細胞と間質細胞を含んだ内膜様組織での検討が必要なため, 内膜再構成システ

ムでの検討に着手した. その一環として, 腺上皮細胞は性ステロイドだけでなく着床胚のシグナルを受けて分化誘導と機能獲得が促進されるので, *in vitro* 着床モデルを用いて, 腺上皮細胞の着床期周辺の振り舞い検討したところ, N-カドヘリンを中心に上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition, EMT) が生じていることが判明し, 細胞骨格の調節分子でもある SRC との相互作用を調べるうえで, 重要な知見が得られた.

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 3 件)

Uchida H, Maruyama T, Nishikawa-Uchida S, Oda H, Miyazaki K, Yamasaki A, Yoshimura Y: Studies using an *in vitro* model show evidence of involvement of epithelial-mesenchymal transition of human endometrial epithelial cells in human embryo implantation. *J Biol Chem.* 2012, 287(7), 4441-4450. 査読有
Ono M, Kajitani T, Uchida H, Arase T, Oda H, Nishikawa-Uchida S, Masuda H, Nagashima T, Yoshimura Y, Maruyama T*: OCT4 expression in human uterine myometrial stem/progenitor cells. *Hum Reprod.* 2010; 25(8), 2059-2067. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

Masanori Ono, Tetsuo Maruyama Takashi Kajitani, Hiroshi Uchida Hideyuki Oda, Sayaka Uchida, Toru Arase, Akiko Yamasaki, Takashi Nagashima, Hirotaka Masuda, Yasunori Yoshimura; Contribution of myometrial stem/progenitor cells to pregnancy-induced uterine remodeling. 2nd World Congress on Reproductive Biology(WCRB). October 9-12, 2011, Cairns, Australia.

Hiroshi Uchida, Tetsuo Maruyama, Sayaka Uchida-Nishikawa, Yasunori Yoshimura; Possible evidence for epithelial-mesenchymal transition mediating displacement of endometrial cells away from the site of embryo implantation. 2nd World Congress on Reproductive Biology(WCRB). October 9-12, 2011, Cairns, Australia.

Toru Arase, Tetsuo Maruyama, Hiroshi Uchida, Kaoru Miyazaki,

Hideyuki Oda, Sayaka Uchida-Nishikawa, Maki Kagami, Akiko Yamasaki, Kayoko Tamaki, Yasunori Yoshimura; Possible involvement of UDP-glucose and its receptor P2RY14 in embryo implantation. 27th European Society of Human Reproduction & Embryology(ESHRE). July 3-6, 2011, Stockholm, Sweden.

Kaoru Miyazaki, Takashi Kajitani, Hirotaka Masuda, Toshio Hamatani, Hideyuki Oda, Akiko Yamasaki, Sayaka Nishikawa-Uchida Hiroshi Uchida, Yasunori Yoshimura, Tetsuo Maruyama; CD93 and CD31 as possible candidate markers for human endometrial stem/ progenitor cells. 9th International Society for Stem Cell Research(ISSCR). June 15-18, 2011, Tronto, Ontario Canada

[招 請 講 演] Tetsuo Maruyama, Hirotaka Masuda, Takashi Nagashima, Takashi Kajitani, Masanori Ono, Sayaka Nishikawa-Uchida Hideyuki Oda, Kaoru Miyazaki, Toru Arase, Maki Kagami, Hiroshi Uchida Hironori Asada, Yasunori Yoshimura; Possible involvement of endometrial stem/progenitor cells in the pathogenesis of endometriosis. 1st Asian Conference on Endometriosis(ACE). October 16-17, 2010, Shanghai, China.

Sayaka Nishikawa-Uchida, Tetsuo Maruyama, Hiroshi Uchida, Takashi Kajitani, Hideyuki Oda, Kaoru Miyazaki, Maki Kagami, Yasunori Yoshimura; Molecular Analysis of Mutated FSH Receptor Detected in a Patient with Spontaneous Ovarian Hyperstimulation Syndrome. 57th Society for Gynecologic Investigation(SGI). March 24-27, 2010, Orlando ,Florida, USA

丸山哲夫, 小澤伸晃, 会津義紀, 内田明花, 各務真紀, 宮崎 薫, 小田英之, 荒瀬 透, 内田 浩, 吉村泰典: 流産検体のアレイ CGH 解析により不育症夫婦に均衡型微細相互転座が判明した一例. 第 56 回日本人類遺伝学会(千葉県千葉市・幕張メッセ) 2011 年 11 月 9 日-12 日

西川明花, 丸山哲夫, 内田 浩, 各務真紀, 小田英之, 宮崎 薫, 青木大輔, 吉村泰典: 多嚢胞性卵巣腫大を反復する患者に見いだされた変異 FSH 受容体の機

能解析. 第 63 回日本産科婦人科学会(大阪府大阪市・大阪国際会議場) 2011 年 8 月 29 日-31 日

内田 浩, 丸山哲夫, 西川明花, 小田英之, 宮崎 薫, 各務真紀, 吉村泰典: ヒト着床における子宮内膜上皮細胞動態-卵巣ホルモンと低分子 G タンパク質の関与-. 第 84 回日本内分泌学会(兵庫県神戸市・神戸国際会議場) 2011 年 4 月 21 日-23 日

西川明花, 丸山哲夫, 内田 浩, 小田英之, 各務真紀, 宮崎 薫, 青木大輔, 吉村泰典: 自然発症した卵巣過剰刺激症候群症例における FSH 受容体の遺伝子変異とその機能解析. 第 62 回日本産科婦人科学会(東京都千代田区・東京国際フォーラム) 2010 年 4 月 23 日-25 日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

西川 明花 (NISHIKAWA SAYAKA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 60445236