

平成 30 年 4 月 6 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440173

研究課題名(和文) 雌性生殖器官の組織分化と腫瘍化のメカニズム解析

研究課題名(英文) Analysis for cell proliferation, differentiation and tumorigenesis in female reproductive tracts in mice

研究代表者

宮川 信一 (MIYAGAWA, SHINICHI)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・講師

研究者番号：30404354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：輸卵管・子宮・膣からなる雌性生殖管は、生殖の場として生物の根源に関わる役割を担っており、その細胞増殖・分化は、女性ホルモン(エストロゲン)によってダイナミックに制御されている。女性ホルモンシステムの破綻は、乳癌や子宮癌・膣癌などの雌性生殖器官の癌の要因となるため、女性ホルモン及びその作用をメディエイトするシグナル因子の同定と作用メカニズム解明は喫緊の課題である。本研究では、上皮-間質相互作用の観点からエストロゲン受容体の役割を解明するとともに、Fgfをはじめとする新たな膣上皮のホメオスタシスに作用する因子を同定した。

研究成果の概要(英文)：The female reproductive tract consists of the sites for reproduction and is of significant concern for women's health and disease, notably tumorigenesis. Despite the importance of this organ system, the molecular and cellular mechanisms that regulate cell proliferation and differentiation of these organs are not yet fully understood. In this analysis, we analyzed tissue-specific roles of estrogen receptors and showed that epithelial estrogen receptor 1 intrinsically mediates squamous differentiation in the mouse vagina. We also identified several growth factors, including epidermal growth factors (EGFs) and fibroblast growth factors (Fgfs), are involved in terminal differentiation of vaginal epithelial cells.

研究分野：発生内分泌学

キーワード：膣 エストロゲン マウス ホルモン

1. 研究開始当初の背景

雌性生殖器官の細胞増殖・分化を制御しているのは、ヒトにおける月経周期を見ても明らかのように、女性ホルモン(エストロゲン)である。女性ホルモンは経口避妊薬や閉経後のホルモン療法薬としても身近に広く用いられているが、その有用性の反面、乳癌や子宮癌のリスク要因としてよく知られている。近年の雌性生殖器官の癌の発症率の増加に伴い、女性ホルモンによる細胞増殖機構、そして発癌に至るプロセス解明は急務となっている。しかしながら、雌性生殖器官において、正常時あるいは腫瘍形成時の女性ホルモンの細胞増殖や分化に対する作用をメディエイトする因子の実体やそのメカニズムは、適切な *in vivo* 実験モデルを欠いているために、生体レベルではほとんど理解が進んでいなかった。

2. 研究の目的

本研究はマウス雌性生殖管をモデルとして、女性ホルモンと、その作用をメディエイトするシグナル因子とのクロストーク解析の観点から、正常時のホルモン作用、及びホルモンシステム破綻のメカニズムを明らかにすることを目的とする。また、これまで子宮、膣、乳腺などの雌性生殖器官の女性ホルモン依存的な細胞増殖は、女性ホルモンがまず間質の ER に作用し、それによって発現する分泌性増殖因子が上皮に作用して、その細胞増殖を誘導するというモデルが、古典的な上皮および間質組織の貼替え実験によって示されてきた。本研究では、遺伝子改変技術を用いた組織特異的遺伝子ノックアウトマウス解析を行うことにより、生体レベルで上皮-間質相互作用解析をおこない、組織レベルでのエストロゲン作用機構を解明することも目的とした。

3. 研究の方法

膣上皮細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現するマウス(K5-Cre)と、Pten^{flox} または ER^{flox} マウスを掛け合わせ、膣上皮細胞特異的 PI3K/Akt シグナル活性化マウス (Pten コンディショナルノックアウト (CKO) マウス; K5Cre/+; Pten^{flox}/flox) または膣上皮細胞特異的 ER CKO マウス (K5Cre/+; ER^{flox}/-)を作成した。K5-Cre マウスは大阪大学竹田潤二教授、ER^{flox} マウスは Institute for Genetics and Cellular and Molecular Biology (フランス) シャンボン教授との共同研究として供与されたものである。Pten^{flox} マウスはジャクソン研究所より入手した。

動物実験に関しては、所属大学の動物実験委員会及び組換え DNA 実験安全委員会の承認のもと、関連する法令に従い、動物愛護の精神をもって行った。

4. 研究成果

膣上皮細胞特異的に ER を欠損させたマウスを解析したところ、膣上皮に ESR1 がなくても上皮は細胞増殖し多層化した。しかしこの上皮は、細胞増殖はするが、角化細胞への分化(ケラチン化)ができず(例えば典型的な分化マーカーである CK1、最終分化マーカーであるフィラグリンは全く発現していない)、細胞増殖能を保ったまま上層に上がっていく異常な細胞増殖像を呈した。したがって、上皮細胞自身の ESR1 は角質化分化へのコミットメントに必要であることが明らかとなった。さらに器官培養系を用いた実験から、この分化過程には、アンフィレギュリンをはじめとする EGF 様成長因子が関与することを見出した。したがって、膣上皮におけるエストロゲン作用は、まず間質の ER を介して、間質細胞からの分泌性成長因子が上皮細胞の増殖を誘導し、次に上皮細胞が自らの ER がアンフィレギュリンなどの分泌性成長因子の発現制御を介して上皮細胞の適切な増殖を制御していると推定される(図1)。マウス膣における、ER の関与する上皮-間質相互作用を生体レベルで解析した研究はこれが初めてである。

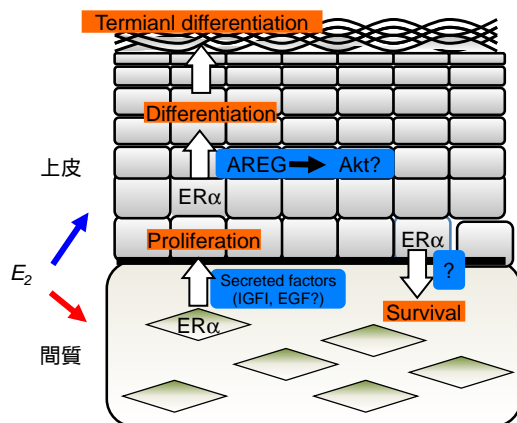


図1.膣組織におけるERαの作用機序のモデル図

PI3K/Akt 経路は多くの分泌性シグナル因子の下流に位置し、さまざまな組織で腫瘍形成に寄与している経路である。特に遺伝子改変マウスを用いた解析から、皮膚を含む多くの重層扁平上皮から構成される器官での発癌が報告されている。そこで次に膣組織における Pten 及び PI3K/Akt 経路に注目した。膣上皮細胞特異的 Pten ノックアウトマウスでは、エストロゲン非依存に suprabasal cell (基底細胞より上層の細胞)において過形成が起き、部分的に上皮層内に内胞を形成した、異常な組織像を呈することが分かった。したがって膣組織において Pten は suprabasal cell の細胞増殖を抑え、角質化への正常な分化を誘導しているものと考えられた。さらに Pten は、エストロゲン濃度によって上皮で発現する部位がシフトし、癌抑制に関する役割が異なることを明らかにした。以上のように、エストロゲンの関わる子宮内膜症や

癌など、女性生殖器官特有の多くの病態の発生メカニズムの一端を明らかにした。

最終分化ができない膺上皮細胞特異的 ER CKO マウスの膺組織を用いた解析から、このマウスでは複数の Fgf リガンドの発現が低下していることを見出した。卵巣を除去したマウスにエストロゲンを投与したところ、Fgf22、Fgf18 の発現変動が見られた。また各種 Fgf 受容体サブタイプは、上皮組織を含む組織局在を示した。以上の結果から、エストロゲンによる膺組織の制御にはアンフィレギュリンだけではなく、Fgf を含む各成長因子が複雑に相互作用しながら行われていくことが明らかになった。しかしながら、マウスの膺の器官培養系を用いた解析では、Fgf リガンド (Fgf22) を添加しても、エストロゲン非存在下では、角質化分化が誘導されなかった。またエストロゲン存在下においても、上皮に ER がないと角質化への分化は見られなかった。このことは Fgf22 に加え、その他の Fgf リガンド、あるいは他のシグナル因子も膺組織の最終分化過程に必要であることを示している。上皮特異的 Fgf 受容体 1 及び 2 (Fgfr1/2) のノックアウトマウス (Fgfr1/2CKO) 解析を試みたところ、このマウスは胎生致死であるため現段階では膺での役割解明に至っていない。一方で Fgf を含む様々なシグナル因子の複雑な相互作用が存在を明らかにしたことは、組織レベルでの女性ホルモンの作用機構解明において、受容体の寄与とその下流のシグナル分子のカスケードを明らかにしていく上で重要な知見となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Fujimoto N, Kitamura S, Uramaru N, Miyagawa S, Iguchi T. Identification of hepatic thyroid hormone-responsive genes in neonatal rats: potential targets for thyroid hormone-disrupting chemicals. *Toxicol Lett.* 286:48-53, 2018 査読有り DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.01.005

Matsubara K, Nakamura N, Sanoh S, Ohta S, Kitamura S, Uramaru N, Miyagawa S, Iguchi T, Fujimoto N. Altered expression of Olr59, Ethe1, and Slc10a2 genes in the liver of F344 rats by neonatal thyroid hormone disruption. *J Appl Toxicol.* 37:1030-1035, 2017 査読有り DOI: 10.1002/jat.3452.

Miyagawa S, Iguchi T. Epithelial estrogen receptor 1 intrinsically mediates squamous differentiation in the mouse vagina.

Proc Natl Acad Sci USA. 112:12986-12991, 2015 査読有り DOI: 10.1073/pnas.1513550112.

Miyagawa S, Sato M, Sudo T, Yamada G, Iguchi T. Unique roles of estrogen-dependent Pten control in epithelial cell homeostasis of mouse vagina. *Oncogene.* 34:1035-1043, 2015 査読有り DOI:10.1210/en.2013-2054 10.1038/onc.2014.62.

Omorii A, Miyagawa S, Ogino Y, Harada M, Ishii K, Sugimura Y, Ogino H, Nakagata N, Yamada G. Essential roles of epithelial bone morphogenetic protein signaling during prostatic development. *Endocrinology.* 155:2534-2544, 2014 査読有り DOI:10.1210/en.2013-2054

Miyagawa S, Harada M, Matsumaru D, Tanaka K, Inoue C, Nakahara C, Haraguchi R, Matsushita S, Suzuki K, Nakagata N, Ng RC, Akita K, Lui VC, Yamada G. Disruption of the temporally regulated cloaca endodermal -catenin signaling causes anorectal malformations. *Cell Death Differ.* 21: 990-997, 2014 査読有り DOI: 10.1038/cdd.2014.21

〔学会発表〕(計 3 件)

平野優、山田源、宮川信一、マウス膺上皮細胞の分化における Fgf シグナルの関与、日本比較内分泌学会第 42 回大会、2017 年

山田源、平野優、井口泰泉、宮川信一、マウス膺上皮細胞増殖と分化に関するエストロゲン受容体の機能解析、第 90 回日本内分泌学会学術総会、2017 年

宮川信一、井口泰泉、マウス膺上皮に発現するエストロゲン受容体の役割、日本動物学会第 73 回大会、2014 年

〔図書〕(計 2 件)

宮川信一、豊田賢治、井口泰泉、裳華房、環境と性、ホルモンから見た生命現象と進化、シリーズ第 3 巻-成長・成熟・性決定-、pp141-155、2016.

Miyagawa S, Iguchi T. Endocrine Disrupting Chemicals. In: Handbook of Hormones -Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research -, pp 571-589 Takei Y, Ando, Tsutsui K (Eds.), Elsevier Academic Press, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況（計 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 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

<https://sites.google.com/site/miyashinchi/home>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 信一 (MIYAGAWA, Shinichi)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・講師

研究者番号：30404354

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者