

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462475

研究課題名(和文) 子宮筋腫におけるミトコンドリアの形態観察と機能解析

研究課題名(英文) Morphology and functional analysis of mitochondria in uterine leiomyoma

研究代表者

石川 博士 (ISHIKAWA, Hiroshi)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70553973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：子宮筋腫は低酸素に長期間暴露されているためにミトコンドリアの機能に異常が起こるとの仮説を立て、子宮筋腫における低酸素反応を検討した。筋腫組織では、子宮筋よりも低酸素誘導因子 Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) の発現が有意に高く、培養筋腫細胞では、低酸素によるHIF-1 発現量の増加、核内HIF-1 発現の誘導、HIF標的遺伝子のプロモーター領域への結合増加が確認された。さらにHIF標的遺伝子のmRNA発現が増加し、アポトーシスが誘導された。以上より子宮筋腫ではHIFを介した低酸素反応が起こっていることが示された。

研究成果の概要(英文)：Severe hypoxia may cause mitochondrial dysfunction in uterine leiomyoma; therefore, we clarified hypoxic responses in uterine leiomyoma. Expression of hypoxia inducible factor (HIF)-1 was significantly higher in uterine leiomyoma tissues than those in the adjacent myometrium. Hypoxia significantly induced HIF-1 protein expression and intranuclear distribution of HIF-1 in primary cultured uterine leiomyoma cells. Hypoxia also induced recruitment of HIF-1 binding to the putative HIF response element on the promoter of HIF-responsive genes and subsequent mRNA expression of the HIF-responsive genes in uterine leiomyoma cells. Hypoxia significantly induced apoptosis of uterine leiomyoma cells. Taken together, hypoxia may induce HIF-mediated hypoxic responses in uterine leiomyoma.

研究分野：婦人科学

キーワード：子宮筋腫 低酸素 HIF-1 ミトコンドリア 解糖

## 1. 研究開始当初の背景

子宮筋腫は豊富な細胞外マトリックスと無血管領域を有し、著しい低酸素環境 (hypoxia) にある。癌細胞では低酸素下で、転写因子 Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) が誘導されて嫌気性解糖、血管新生などが起こり、細胞は hypoxia に順応する。ところが、筋腫では HIF-1 の発現はみられないとの報告があり、hypoxia に対して HIF-1 非依存性の代謝調節系が機能している可能性がある。一方、筋腫で HIF-1 の発現があるという別の報告も存在し、HIF-1 の発現を再検討する必要がある。

われわれは、子宮筋腫細胞を低酸素下に培養し、発現アレイ-Gene ontology 解析を行った。その結果、筋腫細胞では、解糖と糖新生に関わる遺伝子群と、免疫関連シグナル、呼吸鎖関連遺伝子群の発現が変化していることを見いだした。

また、筋腫細胞を用いて、C12 酢酸によるトレーサー解析 (GC-MS) およびメタボローム解析を行った。その結果、筋腫では多くの解糖系中間代謝物質が増加し、逆に TCA 回路の代謝産物が減少していた。また、解糖系からの側反応の結果と思われるペントースリン酸経路代謝産物、N-アセチルアスパラギン酸などの増加が観察された。以上より筋腫では TCA 回路に障害があり、代償的に解糖系によるエネルギー産生が亢進していることが示唆された。TCA 回路と酸化リン酸化によるエネルギー産生反応は、ミトコンドリアが担当していることから、われわれはミトコンドリアの機能異常が筋腫と関連しているとの仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

(1) 子宮筋腫における HIF-1 の発現を再検討する

(2) 子宮筋腫における低酸素誘導反応を明らかにする

(3) 子宮筋腫におけるミトコンドリア異常を明らかにする

## 3. 研究の方法

(1) 子宮筋腫・子宮筋組織の採取と初代培養細胞の作成

本研究の実験プロトコールはすべて千葉大学大学院医学研究院倫理委員会の承認を得た。動物実験プロトコールは千葉大学動物実験委員会の承認を得た。また、臨床検体を採取する際には事前に患者から口頭と文書にて本研究の同意を得た。子宮筋腫のために摘出された子宮から採取した筋腫と正常子宮筋組織を実験に用いた。また、組織を消化し、初代培養細胞として実験に用いた。

(2) 子宮筋腫平滑筋細胞・子宮筋細胞の低酸素培養

初代培養細胞を低酸素 (hypoxia, 1% 酸素) と通常酸素 (normoxia, 21% 酸素) で培養し、全 RNA とタンパクを抽出した。Hypoxia を模倣するために normoxia で培養した初代培養細胞に 100  $\mu$ M の塩化コバルトを添加した。

(3) 子宮筋腫組織、細胞における HIF-1 発現の検討

子宮筋腫組織における HIF-1 タンパク発現をウエスタンブロット法で、正常子宮筋腫組織と比較した。筋腫は大量の細胞外マトリックスを含むため、全タンパクを抽出すると細胞外マトリックス関連タンパクの影響を受けると考えられた。そこで筋腫、正常子宮筋組織から核タンパクを抽出した。HIF-1 タンパク発現量は  $\beta$ -actin タンパク発現量で補正し、Image-J ソフトにより定量化した。

次に培養細胞を用いて hypoxia による子宮筋腫平滑筋細胞の HIF-1 タンパク発現誘導を検討した。培養細胞は細胞外マトリックスを持たないため、全タンパクを用いてウエスタンブロット法を行った。初代培養細胞を継代し、hypoxia で 2、4、6、12 時間培養した後、あるいは normoxia で 6 時間培養した後タンパクを抽出した。さらに塩化コバルトを添加後 normoxia で 6 時間培養し反応を止め、陽性対照とした。

次に、子宮筋腫平滑筋細胞で hypoxia による HIF-1 タンパク発現の局在の変化を、蛍光細胞免疫染色を用いて検討した。Hypoxia、normoxia で 6 時間培養した後、細胞を 2% パラホルムアルデヒドで固定し、抗 HIF-1 抗体添加後、蛍光 2 次抗体にて発色させ、蛍光顕微鏡により HIF-1 タンパクの細胞内局在を観察した。

(4) 子宮筋腫細胞における HIF 標的遺伝子発現の検討

KEGG データベースから HIF 標的遺伝子のうち、解糖系、グルコース輸送、血管新生にかかわる 9 遺伝子を選択し、hypoxia 培養時の mRNA 発現の変化を検討した。解糖系関連遺伝子として、*ALDOA*、*ENO1*、*GAPDH*、*PFKL*、*HK1*、*LDHA*、*PFKB3* の 7 遺伝子、グルコース輸送関連遺伝子として *SLC2A1*、血管新生関連遺伝子として *VEGFA* の発現を検討した。細胞を hypoxia、normoxia で培養し 6 時間後に全 RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法を行った。各 mRNA 発現量は *ACTB* ( $\beta$ -actin をコードする遺伝子) mRNA 発現量で補正した。

(5) 子宮筋腫細胞における HIF-1 と HIF 標的遺伝子の結合量の検討

HIF 標的遺伝子のうち、プロモーター領域の推定される HIF 反応配列が明らかになっている 3 遺伝子 (*ENO1*、*LDHA*、*VEGFA*) の HIF 反応配列への HIF-1 タンパクの集積をクロマチン免疫沈降法にて検討した。

(6) 子宮筋腫細胞低酸素培養下の増殖、アポトーシスの検討

子宮筋腫平滑筋細胞を hypoxia で培養した際の細胞増殖、アポトーシスの変化を normoxia と比較した。子宮筋腫平滑筋細胞を hypoxia で 2, 6, 12, 24 時間培養した後、細胞増殖は Cell Counting Kit-8、アポトーシスは Caspase 3/7-Glo Assay kit を用いて測定した。

(7) 統計学的解析

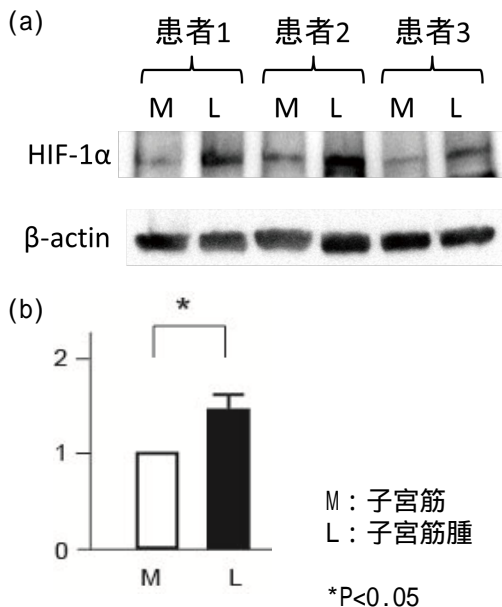
統計学的解析には JMP statistical software (SAS Institute Inc. USA) を用いた。子宮筋腫・正常子宮筋のペアとなるサンプル、同一細胞における hypoxia と normoxia の比較を paired t-test を用いて検討した。統計学的有意差は  $P < 0.05$  とした。

4. 研究成果

(1) 子宮筋腫組織、細胞における HIF-1 タンパクの発現

HIF-1 は hypoxia により発現が誘導される HIF-1 と、細胞内に恒常的に発現している HIF-1 のヘテロダイマーから成る。これを中心とした HIF 転写複合体が、HIF 標的遺伝子の HIF 反応配列に結合し、その標的遺伝子の転写を調節する。Normoxia では HIF-1 はユビキチン・プロテアソーム系で分解されているが、hypoxia ではこの分解が阻害され HIF-1 の発現量が上昇する。

筋腫で HIF-1 の発現がみられないとされた報告では全タンパクを用いた検討が行われていた。しかしながら、子宮筋腫は大量の細胞外マトリックスを含んでおり、全タンパクでは細胞内タンパクの検出感度が大幅に下がると考えられた。したがって本研究では、核タンパクを用いて HIF-1 タンパクの検出を試みた。その結果、HIF-1 タンパクは子宮筋腫組織で正常子宮筋よりも有意に高発現していることが明らかとなった(図 1a, b)



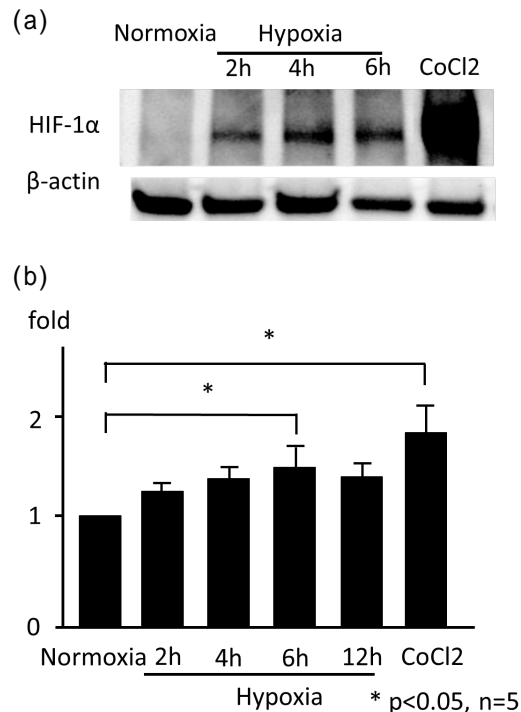
(図 1) 子宮筋腫・正常子宮筋組織における HIF-1 タンパク発現

(a) 代表的ウエスタンブロット: -actin 発現は筋腫と正常筋で差がみられなかった。(b) 6 ペア検体による HIF-1 タンパク発現量の検討: HIF-1 タンパク発現量は -actin タンパク発現量で補正した。

(2) 子宮筋腫平滑筋細胞における hypoxia による HIF-1 の発現誘導

次に初代培養細胞を用いて、子宮筋腫における hypoxia による細胞内 HIF-1 タンパク発現誘導を検討した。

Normoxia では HIF-1 タンパクの発現を検出することができなかったが、hypoxia では培養開始 2 時間で HIF-1 タンパクの発現がみられた(図 2a)。この HIF-1 タンパクの発現は、12 時間後もみられた。塩化コバルト添加後 6 時間では、HIF-1 タンパクの発現増加はさらに顕著となった(図 2b)。



(図 2) 子宮筋腫平滑筋細胞における hypoxia による HIF-1 タンパクの発現誘導

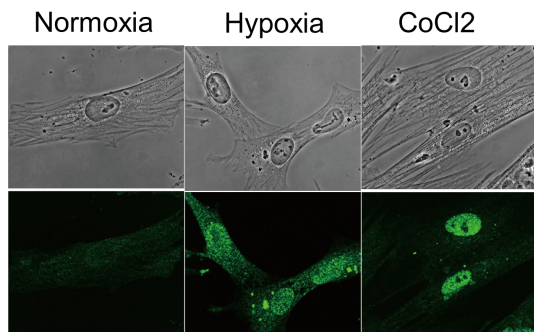
(a) 代表的ウエスタンブロット: 細胞を hypoxia で 2, 4, 6 時間培養し、核タンパクを抽出した。陽性対照として 100 μM の塩化コバルトを添加し normoxia で 6 時間培養した (CoCl2 レーン)。

(b) 6 検体の hypoxia による HIF-1 タンパク発現量: HIF-1 タンパク発現量は -actin タンパク発現量で補正した。

(3) 子宮筋腫平滑筋細胞における hypoxia による HIF-1 細胞内局在の変化

Hypoxia 培養 6 時間後の細胞内 HIF-1 タ

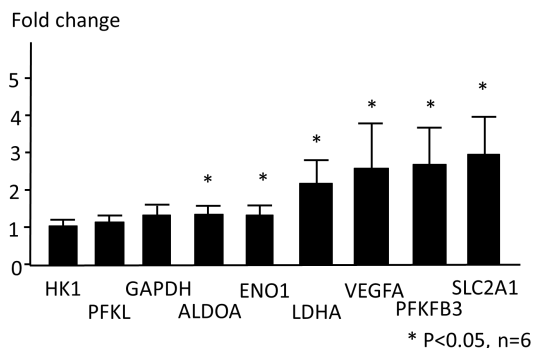
ンパクの局在変化を検討した。Hypoxia により核内の HIF-1 タンパクの発現が有意に増加した(図3)。塩化コバルト添加でも同様に核内の HIF-1 タンパクの発現が増加した。



(図3)子宮筋腫平滑筋細胞における hypoxia による HIF-1 タンパク細胞内局在の変化 (上段)位相差顕微鏡所見 (下段)蛍光顕微鏡所見 陽性対照として 100 μM 塩化コバルトを添加後 normoxia で 6 時間培養した (CoCl<sub>2</sub>)。

(4) 子宮筋腫平滑筋細胞における HIF 標的遺伝子発現の検討

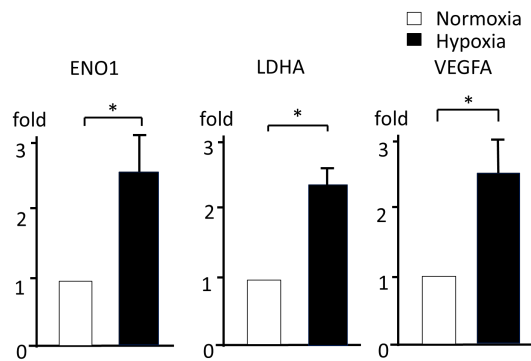
9 個の HIF 標的遺伝子のうち、Hypoxia により 6 遺伝子 (*ALDOA*, *ENO1*, *LDHA*, *VEGFA*, *PFKFB3*, *SLC2A1*) の mRNA 発現量が有意に増加した(図4)。



(図4)子宮筋腫平滑筋細胞における hypoxia による HIF 標的遺伝子 mRNA 発現量の変化 Hypoxia 培養を行い、6 時間後に全 RNA を抽出した。各遺伝子の mRNA 発現量は *ACTB* mRNA 発現量で補正した。

(5) 子宮筋腫細胞における HIF-1 と HIF 標的遺伝子の結合量の検討

Hypoxia により、HIF 標的遺伝子である *ENO1*, *LDHA*, *VEGFA* のプロモーター領域への HIF-1 タンパク集積の有意な増加がみられた(図5)。これらの遺伝子の mRNA 発現量も hypoxia により増加することから、HIF 反応配列に HIF-1 を含む HIF 転写複合体が結合し、転写を調節していると考えられた。

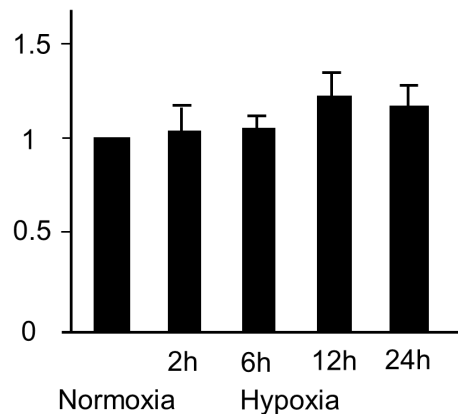


(図5)子宮筋腫平滑筋細胞における hypoxia による HIF 標的遺伝子の HIF 反応配列への HIF-1 集積の変化 Hypoxia 培養 6 時間で反応を停止させ、ChIP-qPCR 法にて *ENO1*, *LDHA*, *VEGFA* のプロモーター領域への HIF-1 の結合をみた。

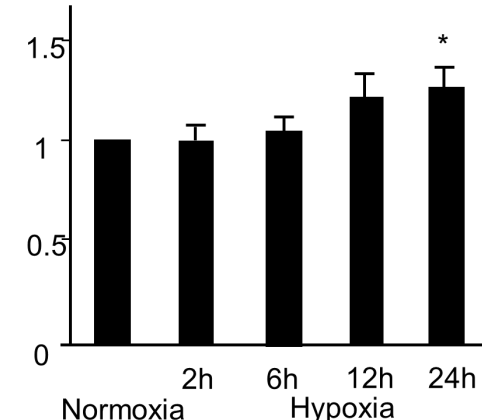
(6) 子宮筋腫平滑筋細胞の hypoxia による細胞増殖、アポトーシスの変化

子宮筋腫平滑筋細胞を hypoxia で培養しても細胞増殖には変化がみられなかった(図6a)。一方、アポトーシスは hypoxia 培養 24 時間で normoxia よりも有意に亢進した(図6b)。

(a) ratio



(b) ratio



(図6) hypoxiaによる子宮筋腫平滑筋細胞の細胞増殖、アポトーシスの変化

(a)細胞増殖: Cell Counting Kit-8

(b)アポトーシス: Caspase 3/7-Glo Assay kit

以上の結果から、子宮筋腫および子宮筋腫平滑筋細胞では、hypoxiaによりHIF-1の発現が増加し、核内のHIF-1の発現が誘導されることが明らかになった。また、HIF転写複合体がHIF標的遺伝子のプロモーターにあるHIF反応配列に結合することで、この標的遺伝子の転写を調節することが示唆された。

子宮筋腫においてもHIF-1とHIF標的遺伝子の発現調節による低酸素誘導反応が起こり、細胞がhypoxiaに順応していると考えられた。一方、hypoxiaによるHIF-1の発現上昇はhypoxia12時間後からは減弱する傾向にあり、HIFを介さない低酸素誘導反応の存在も示唆された。また、hypoxiaにより子宮筋腫平滑筋細胞のアポトーシスが亢進することが明らかとなった。しかしながら、本研究では子宮筋腫のミトコンドリア機能異常を検討することができなかつたため、今後の検討課題としたい。

#### 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 7件)

1. Kawarai Y, Ishikawa H, Segawa T, Teramoto S, Tanaka T, Shozu M. High serum progesterone associated with infertility in a woman with nonclassic congenital adrenal hyperplasia. J Obstet Gynecol Res. 2017 Epub ahead of print. 査読あり
2. Ishikawa H, Unno Y, Omoto A, Shozu M. Local injection of diluted vasopressin followed by suction curettage for cervical ectopic pregnancy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2016 ;207:173-177. 査読あり
3. Iida M, Ishikawa H, Shozu M. Spontaneous parasitic leiomyoma in a postpartum woman. J Obstet Gynecol Res 2016; 42: 1874-1877. 査読あり
4. 石川博士. 子宮筋腫発育についての最新の理解. 産科と婦人科, 2016; 83: 89-94. 査読なし
5. Matsuoka A, Tate S, Nishikimi K, Ishikawa H, Shozu M. Elevated serum progesterone levels in postmenopausal women with mucinous ovarian tumors. Menopause. 2016; 23:544-9. 査読あり
6. Ishikawa H, Kiyokawa T, Okayama J, Usui H, Shozu M. Tubal pregnancy associated with additional conception in a contralateral tube. J Obstet Gynaecol Res

2015; 41:1487-90. 査読あり

7. Ishikawa H, Sanada M, Shozu M. Ovarian pregnancy associated with a fresh blastocyst transfer following in vitro fertilization. J Obstet Gynaecol Res. 2015; 41: 1823-5. 査読あり

[学会発表](計 10件)

1. ISHIKAWA Hiroshi, NISHIWAKI Tetsuji, SHOZU Makio. Hypoxia induced cell proliferation and apoptosis in uterine leiomyoma and myometrial cells. 第69回日本産科婦人科学会、リーガロイヤルホテル広島(広島県広島市)、2017年4月13日-16日
2. Hiroshi Ishikawa. Hypoxia induces hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) and its related gene expression in uterine leiomyoma. 3rd Congress of SEUD (Society of Endometriosis and Uterine Disorders), Singapore, Singapore, 2017年4月5日-8日
3. ISHIKAWA Hiroshi, SONE Kunizui, WANG Guiwen, NISHIWAKI Tetsuji, SHOZU Makio. Hypoxic response mediated by hypoxia inducible factor-1 in uterine leiomyoma and myometrium. 第68回日本産科婦人科学会、東京国際フォーラム(東京都千代田区)、2016年4月21日-24日
4. Hiroshi Ishikawa, Yoshimasa Kawarai, Hiromi Hayashida, Midori Kawano, Makio Shozu. Giant ovarian endometriotic cyst associated with non-communicating rudimentary uterine horn in the absence of dysmenorrhea in an adolescent girl. ACE 2016, 5th Asian Conference on Endometriosis. 大阪国際会議場(大阪府大阪市)、2016年9月22日-24日
5. Hiroshi Ishikawa, Rie Shinno, Akiko Omoto, Youichi Unno, Hirokazu Usui, Makio Shozu. Local injection of diluent vasopressin followed by suction curettage as initial treatment of cervical ectopic pregnancy. European Society of Human Reproduction and Embryology 32nd annual meeting, Helsinki, Finland. 2016年6月3日-6日
6. Hiroshi Ishikawa, LinLin Xu, Tatsuya Kobayashi, Guiwen Wang, Makio Shozu. Hypoxic response mediated by hypoxia inducible factor-1 in uterine leiomyoma and myometrium. Society for Reproductive Investigation 63rd annual meeting, Montreal, Canada 2016年3月16日-19日
7. 石川博士、曾根国瑞、徐琳琳、小林達也、生水真紀夫. 子宮筋腫・子宮筋におけるHIF-1の発現とHIFを介した低酸素反応の検討. 第33回内分泌代謝サマーセミナー、御花(福岡県柳川市)、2015年7月9日-11

日

8. 石川博士、曾根国瑞、西脇哲二、生水真紀夫。子宮筋腫では低酸素により低酸素誘導因子 HIF1 の発現が誘導される。第 67 回日本産科婦人科学会パンフィコ横浜（神奈川県横浜市）2015 年 4 月 10 日-12 日
9. 石川博士、王桂文、小林達也、生水真紀夫。重症免疫不全マウスの腎被膜下移植子宮筋腫 xenograft モデル。第 19 回日本生殖内分泌学会、千里ライフサイエンスセンター（大阪府大阪市）2015 年 1 月 10 日
10. Hiroshi Ishikawa, Kunizui Sone, Linlin Xu, Tatsuya Kobayashi, Makio Shozu. Hypoxia induces hypoxia-inducible factor-1 alpha in uterine leiomyoma cells. Society for Reproductive Investigation 62nd annual meeting, San Francisco, CA, USA, 2015 年 3 月 25 日-28 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)  
取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石川 博士 (ISHIKAWA, Hiroshi)  
千葉大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：70553973

##### (2) 研究分担者

生水 真紀夫 (SHOZU, Makio)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：30226302

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

小林 達也 (KOBAYASHI, Tatsuya)  
徐 琳琳 (XU, Linlin)