

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462505

研究課題名(和文) ヒト子宮内膜における転写因子Hand2の機能解析とその臨床的意義

研究課題名(英文) A functional analysis of a transcription factor Hand2 and its clinical significance in the human endometrium

研究代表者

岡田 英孝 (OKADA, Hidetaka)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：80330182

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)：ヒト子宮内膜での新規転写因子であるHand2の調節機構や役割を解明することを目的とした。培養ヒト子宮内膜間質細胞を分離培養し分子生物学的機能解析を行った。これらの細胞におけるHand2 mRNA発現は、プロゲステロンの時間・濃度依存的に誘導されていた。Hand2の発現抑制した細胞では、分化能(脱着膜化)が低下していることが明らかとなった。本研究により見出した新知見は、将来の生殖医療の発展に寄与すると考える。

研究成果の概要(英文)：The human uterine endometrium undergoes cyclic proliferation and differentiation controlled by the female sex hormones during the menstrual cycle. Decidualization of the human uterine endometrium involves the dramatic morphological and functional differentiation of the human endometrial stromal cells (ESCs) and is an essential preparative event for the successful establishment of pregnancy. This process occurs in the human endometrium in response to progestin. We investigated whether heart and neural crest derivatives expressed transcript 2 (HAND2) regulates during decidualization of human ESCs. Progestin induced HAND2 mRNA levels in ESCs in a time- and dose-dependent manner. Silencing of HAND2 expression significantly reduced decidualization marker. These results suggest that HAND2 plays a key role in the regulation of progestin-induced decidualization of human ESCs.

研究分野：産婦人科

キーワード：生殖医学

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜機能異常の病態は依然として不明であり、妊娠率向上のためにその病態解明や診断の確立は、少子化社会における重要な課題である。近年の生殖補助医療の進歩から、時宜を得た性ステロイドホルモンの補充が着床率の向上に重要であることが示されている。このような背景のもと、子宮内膜機能調節を理解するためには、プロゲステロンに制御される標的遺伝子の解析が重要となる。

ヒト子宮内膜局所においてプロゲステロンで制御される因子として、VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)、SDF-1 (Stromal cell-derived factor 1) などが報告されている。マイクロアレイ法による網羅的解析により、プロゲステロンで誘導される新規分子として Fibulin-1 (FBLN1) という細胞外基質タンパクを見出された。FBLN1 のプロモーター領域にある E-box 配列に結合する Hand2 が、FBLN1 遺伝子の転写に必要であることが判明した。

この新規転写因子である Hand2 は実験動物において着床や脱落膜化に必要であると国外の複数の研究グループから報告されている。しかしながら、Hand2 がヒト子宮内膜の細胞レベルでどのように制御されて、機能しているのか全く分かっていない。ヒト子宮内膜での Hand2 の調節機構や役割の解明が何より重要である。Hand2 のさらなる研究展開により、新たな子宮内膜機能調節の分子機構の解明が期待される。

2. 研究の目的

生殖現象でのヒト子宮内膜の研究は、実験動物では着床の様式と形態が異なり、また株化された内膜癌細胞では正常細胞と機能が異なるために、そのアプローチには大きな困難がある。ヒト子宮内膜培養細胞を用いて細胞分子生物学的研究を行い、性ステロイドホルモンの制御下にある成長因子、サイトカイン、免疫因子、接着因子、細胞外マトリックスが子宮内膜機能を調節していることを見出して報告してきた。

Hand2 発現をマウスの子宮局所で抑制すると着床が阻害されることから、Hand2 が子宮内膜機能調節に関与することを十分に支持するものであるが、これらの知見は動物実験により得られたものである。ヒト子宮内膜での Hand2 の調節機構やその役割の解明が必要である。

本研究では、Hand2 のまだ解明されていない基礎研究を完成し、Hand2 を利用した新しい診断方法や治療法への臨床応用に展開

するための基盤となる研究を行う。

3. 研究の方法

研究材料は、患者の同意のもとに関西医科大学附属病院および関連施設において、各種良性病変に対して行われる子宮摘出手術、不妊検査の一環として行う子宮内膜組織 (日付) 診、子宮内容掻爬術などで得られた組織を採取した。

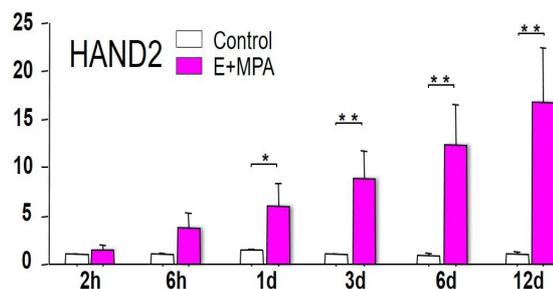
ヒト子宮内膜組織を機械的および酵素的に融解して、培養ヒト子宮内膜間質細胞を分離培養し分子生物学的機能解析を行った。これらの細胞にプロゲステロンあるいは子宮内膜調節因子である VEGF、SDF-1、Br-cAMP (8-bromo-cAMP) を単独あるいは同時に添加した。培養後の細胞から RNA を抽出・精製し、ゲノム DNA の混入を防ぐために DNase 処理をした RNA を用いて cDNA を作成してリアルタイム PCR 法を用い Hand2 の発現変化の時間的・空間的に検討した。

転写因子である Hand2 は、増殖、分化 (脱落膜化)、血管新生など多くの役割を果たしていると考えられている。Hand2 の機能解析を行うため、その発現抑制した細胞を作成し機能解析を行った。WST-8 アッセイにて増殖能を検討した。分化能については、脱落膜化マーカーであるプロラクチン分泌能を検討した。血管新生に関わる因子として VEGF、SDF-1 の発現を検討した。

4. 研究成果

培養ヒト子宮内膜間質細胞における Hand2 mRNA 発現は、プロゲステロンの時間依存的に誘導されており、添加培養 1 日目には既に有意な増加をみとめた。

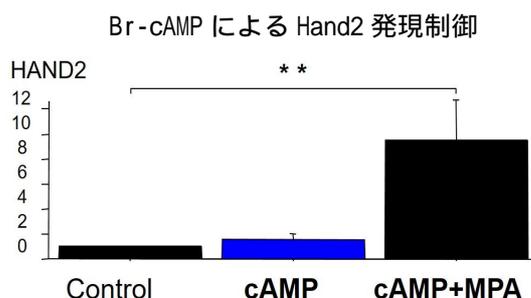
プロゲステロンによる Hand2 誘導



プロゲステロンレセプター拮抗剤の同時添加によりその効果が消失することも確認した。しかしながらエストロゲン添加では全く変化がみられなかった。これらの細胞にプロゲステロンあるいは子宮内膜を調節する重要な因子である VEGF、SDF-1 を単独あるいは同時に添加し、Hand2 の発現変化の時間的・空間的に検討した。プロゲステロンによる

Hand2 誘導効果に、これら局所因子の影響を認めなかった。

間質細胞の分化(脱落膜化)を促進させる Br-cAMP を単独あるいはプロゲステロンと同時に添加して解析した。Hand2 mRNA 発現は、Br-cAMP 添加で変化を認めなかったが、プロゲステロンとの同時添加により増加し相乗効果を認めた。



さらに、Hand2 の機能解析を行うため、その発現抑制した細胞を作成した。Hand2 に対する特異的な inhibitor が無いので、siRNA によりノックダウン(発現抑制)を行った。これらの細胞で増殖能を検討したが、明らかな変化を認めなかった。分化能については、脱落膜化のマーカーであるプロラクチン mRNA 発現を検討した。Hand2 の発現を抑制した脱落膜化細胞でプロラクチン発現が減少していることを明らかとした。Hand2 発現抑制した間質細胞で、血管新生因子 VEGF、SDF-1 の発現変化を認めなかった。

今回の検討により、Hand2 が子宮内膜機能を調整する重要な転写因子であることが示唆された。本研究により見出した新知見は、将来の生殖医療の発展に寄与すると考える。

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 7 件)

1. Tsuzuki T, Okada H, Shindoh H, Shimo K, Nishigaki A, Kanzaki H. Effects of the hypoxia-inducible factor-1 inhibitor echinomycin on vascular endothelial growth factor production and apoptosis in human ectopic endometriotic stromal cells. *Gynecol Endocrinol*. 2016;32(4):323-8. doi: 10.3109/09513590.2015.1121225. Epub 2015 Dec 10. PubMed PMID: 26654708. 査読有
2. Sumi G, Yasuda K, Tsuji S, Kanamori C, Tsuzuki T, Cho H, Nishigaki A, Okada H, Kanzaki H. Lipid-soluble fraction of Shakuyaku-kanzo-to inhibits

myometrial contraction in pregnant women. *J Obstet Gynaecol Res*. 2015 May;41(5):670-9. doi: 10.1111/jog.12618. Epub 2014 Nov 25. PubMed PMID: 25421109. 査読有

3. Okada H, Tsuzuki T, Shindoh H, Nishigaki A, Yasuda K, Kanzaki H. Regulation of decidualization and angiogenesis in the human endometrium: mini review. *J Obstet Gynaecol Res*. 2014 May;40(5):1180-7. doi: 10.1111/jog.12392. Review. PubMed PMID: 24754847. 査読有
4. Kanamori C, Yasuda K, Sumi G, Kimura Y, Tsuzuki T, Cho H, Okada H, Kanzaki H. Effect of cigarette smoking on mRNA and protein levels of oxytocin receptor and on contractile sensitivity of uterine myometrium to oxytocin in pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014 Jul;178:142-7. doi:10.1016/j.ejogrb.2014.03.037. Epub 2014 Apr 13. PubMed PMID: 24792665. 査読有
5. Shindoh H, Okada H, Tsuzuki T, Nishigaki A, Kanzaki H. Requirement of heart and neural crest derivatives-expressed transcript 2 during decidualization of human endometrial stromal cells in vitro. *Fertil Steril*. 2014 Jun ; 101(6):1781-90. e1-5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.03.013. Epub 2014 Apr 18. PubMed PMID: 24745730. 査読有
6. Sumi G, Yasuda K, Kanamori C, Kajimoto M, Nishigaki A, Tsuzuki T, Cho H, Okada H, Kanzaki H. Two-step inhibitory effect of kanzo on oxytocin-induced and prostaglandin F2 -induced uterine myometrial contractions. *J Nat Med*. 2014 Jul;68(3):550-60. doi: 10.1007/s11418-014-0835-y. Epub 2014 Apr 17. PubMed PMID: 24740432. 査読有

[学会発表](計 7 件)

1. 村田 紘末 木戸 健陽 木田 尚子 小林 真以子 小野 淑子 岡田 園子 都築 朋子 岡田 英孝 ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化においてプロゲステロンにより誘導される IL-15 と HAND2 の関連性 第 31 回日本生殖免疫学会総会・学術集会 2016/12/3 神戸 神戸国際会議場
2. Hidetaka Okada Endometrial and embryo

cross talk and Implantation window
2016/9/24 5th Asian Conference on
Endometriosis Osaka Osaka
International Convention Centre

3. Tomoko Tsuzuki, Takeharu Kido, Naoko Kida, Maiko Kobayashi, Hiromi Murata, Hidetaka Okada Effects of the hypoxia-inducible factor-1 inhibitor echinomycin on vascular endothelial growth factor production in human ectopic endometriotic stromal cells 2016/9/23 5th Asian Conference on Endometriosis Osaka Osaka International Convention Centre
4. 神道寿勇, 岡田英孝, 都築朋子, 村田紘未, 安田勝彦, 神崎秀陽 培養ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化における HAND2 の必要性について 第 67 回日本産科婦人科学会学術集会 2015/4/11 横浜 パシフィコ横浜
5. 都築朋子, 岡田英孝, 神道寿勇, 村田紘未, 神崎秀陽 子宮内膜症における HIF-1 阻害薬エキノマイシンの血管新生因子への影響 第 67 回日本産科婦人科学会学術集会 2015/4/11 横浜 パシフィコ横浜
6. 神道寿勇, 岡田英孝, 都築朋子, 角玄一郎, 安田勝彦, 神崎秀陽 血管新生因子 VEGF の卵胞発育・成熟への関与 第 66 回日本産科婦人科学会学術集会 2014/4/18 東京 東京国際フォーラム
7. 都築朋子, 岡田英孝, 神道寿勇, 神崎秀陽 低酸素および内分泌環境による子宮内膜における血管新生因子の発現制御 第 66 回日本産科婦人科学会学術集会 2014/4/18 東京 東京国際フォーラム

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
<http://www7.kmu.ac.jp/obgyn/>
<http://www.kmu.ac.jp/medical/2671t80000005145.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
岡田 英孝 (OKADA Hidetaka)
関西医科大学 医学部 教授
研究者番号 : 80330182

(2) 研究分担者
無し ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
神崎 秀陽 (KANZAKI Hideharu)
関西医科大学 医学部 教授
研究者番号 : 80135566

西垣 明実 (NISHIGAKI, Akemi)
関西医科大学 医学部 研究員
研究者番号 : 10724180

(4) 研究協力者
都築朋子 (TSUZUKI, Tomoko)
神道寿勇 (SHINDOH, Hisayuu)
村田紘未 (MURATA, Hiromi)
木田尚子 (KIDA, Naoko)
小林真以子 (KOBAYASHI, Maiko)
木戸健陽 (KIDO, Takeharu)