

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26870783

研究課題名（和文）子宮内膜症における接着性の解明とプロゲステロン感受性の検討

研究課題名（英文）Effect and mechanism of progesterone and attachment in endometriosis.

研究代表者

伊東 裕子 (ITO, HIROKO)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：30632161

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000 円

研究成果の概要（和文）：子宮内膜症は、既存の病変から分離し腹膜表面に接着し生着し、侵入・増殖し新たな病変を形成します。組織構築におけるmatrix metalloproteinases (MMPs) が必要で進行に関与しているとされています。今回、正常子宮内膜と子宮内膜症におけるプロゲステロン (P) とTransforming growth factor α 1 (TGF α 1) の効果を検討しました。今回の検討から両者においてTGF α 1はPを抑え、初めて子宮内膜症での働きが明らかとなりました。PとTGF α 1がマトリックス統合性の調節という重要な役割を担って、子宮内膜症ではPによりその働きを不応なものにすることが示唆されました。

研究成果の概要（英文）：Invasion of ectopic endometrium into peritoneal mesothelium requires matrix metalloproteinases (MMPs) for tissue remodeling. Here, we tested the hypothesis that TGF α 1 modifies progesterone-induced effects on the secretion of MMPs in normal and ectopic endometrium. The results indicate that MMP2 and MMP9 are not increased by TGF α 1 in endometrioma stromal cells. Although progesterone prevents attachment of endometrioma cells to matrix components of the abdominal wall, it does not ameliorate these abnormal stromal cell responses to TGF α 1. These data support that TGF α 1 has endogenous antiprogestational effects in HESC and ectopic endometrium from endometriosis. We suggest that the opposing effects of progesterone and TGF α 1 are important in regulation of matrix integrity in HESC but that ectopic endometrium is refractory to regulation of MMP activity by progesterone.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：子宮内膜症 プロゲステロン TGF α 1 MMP

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は、生殖年齢女性の約 10%に発生するとされ、同世代の若い男性でこれほどの頻度を占める疾患はありません。月経痛や慢性骨盤痛などの症状を呈し不妊症の原因ともなることから女性の生活の質に大きな影響を及ぼし、さらに晩婚化・少子化に伴ってその発症は増えているためよりよい治療法が期待されています。

子宮内膜症は、既存の病変から分離し腹膜表面に接着し生着します。その後、侵入・増殖し新たな子宮内膜症病変を形成するとされています。異所性子宮内膜の腹膜への浸潤には組織構築における matrix metalloproteinases (MMPs) が必要とされています。そのうちの MMP9 は基底膜の退化に重要な酵素の一つであり、子宮内膜症の進行に関係しているといわれているものの、詳細なメカニズムはいまだ不明であり理想的な治療法は確立していません。このような背景から、有効な治療法の確立には正常子宮内膜との比較を通した子宮内膜症の病態の解明が必須と考えました。

2. 研究の目的

子宮内膜症は、子宮内膜組織に類似する組織が子宮内腔以外の部位に発育するため、その進展における初期段階では既存の病変から分離して腹水中に浮遊している子宮内膜症細胞が腹膜表面に接着し生着するとされています。しかし、生体内の子宮内膜症が接着し増悪するそのメカニズムは十分に解明されていません。子宮内膜症細胞を用いて、細胞外マトリックスを評価の指標として子宮内膜症に有効性をしめす分子の同定を目指します。

細胞の侵入機構に深く関与している種々の細胞外マトリックス蛋白に対する子宮内膜症の接着性とこれらの細胞外マトリックス蛋白に対する受容体の発現について検討し新たな治療法の確立を検討します。すなわち、エストロゲンにより促進され、プロゲステロンにより抑制される子宮内膜症を治療する現行の薬物療法の効果を強める方法が確立できれば、子宮内膜症患者の更なる症状改善が期待できます。

今回我々は、正常子宮内膜と子宮内膜症において、プロゲステロンと Transforming growth factor 1 (TGF 1) が MMP 分泌に与える効果、またそれぞれの細胞の接着性に及ぼす影響を解明することを目的としました。

3. 研究の方法

(1) 子宮内膜症と正常子宮内膜とでの検討をおこないました。子宮内膜症と正常子宮内膜組織から子宮内膜症間質細胞および正常子宮内膜間質細胞を分離し培養をおこない、培養細胞と培養上清を回収します。同時にそれぞれの細胞に対して progesterone、

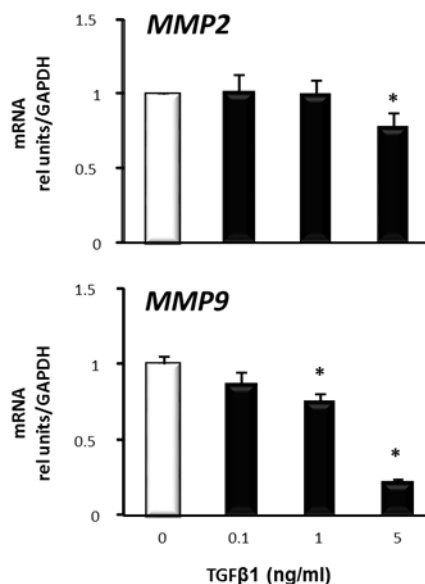
TGF 1、もしくはその両方を添加して培養上清および培養細胞を回収します。

(2) 子宮内膜症組織および培養細胞の免疫組織学的評価に細胞の確認を行います。培養子宮間質細胞の培養上清を immunoblot analysis で分析、培養細胞の mRNA 発現を qPCR 法によって検討しました。

4. 研究成果

(1) まず、さまざまな月経周期の正常子宮内膜組織を用いて検討したところ、MMP2 mRNA や MMP9 mRNA は分泌期後期と月経前期に発現の増加を認めました。TGFb family (TGFb1, TGFb2, and TGFb3) も同時期に増加することを確認しました。

(2) そこで、正常子宮内膜は月経周期の分泌期後期のものを用いて分離培養を行いました。正常子宮内膜において、MMP2 mRNA と MMP9 mRNA の発現は TGF 1 刺激をおこなったところ、濃度依存性に有意に増強しました (2- to 2.5-fold compared with vehicle.)。一方、子宮内膜症では MMP2 mRNA と MMP9 mRNA どちらも有意に減弱したのを確認しました (*P<0.05 compared with vehicle.) (図 1)。



*P < 0.05 compared with vehicle.

Maximal effects were observed at TGFβ1 (5ng/ml) and 48 h (not shown).

図 1. TGF 1 の子宮内膜症における MMP2 および MMP9 への影響

(3) さらに、この TGF 1 がどのシグナル伝達系を介しているかを検討していきました。正常子宮内膜と子宮内膜症ともに、Smad を介したシグナル伝達で MMP2, MMP9 を誘導

していることを Western blot 法で確認しました。それぞれの細胞質内および細胞核内においてその存在を確認し、Smad を介した伝達であることが明らかとなりました (図 2)。

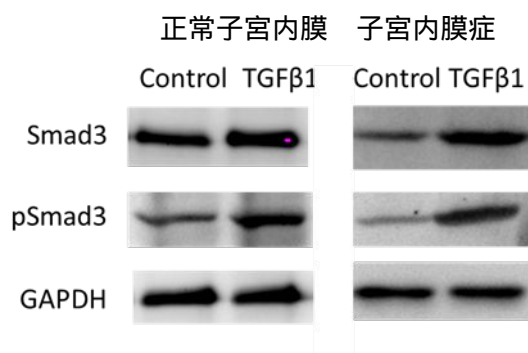
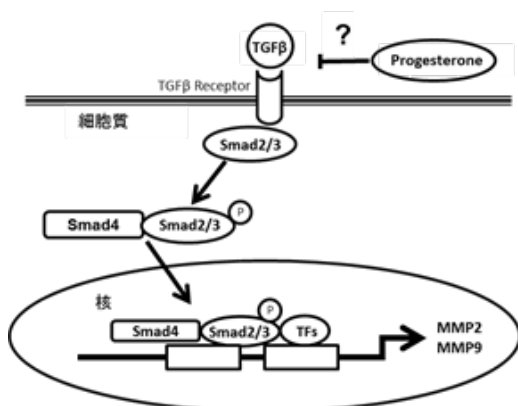
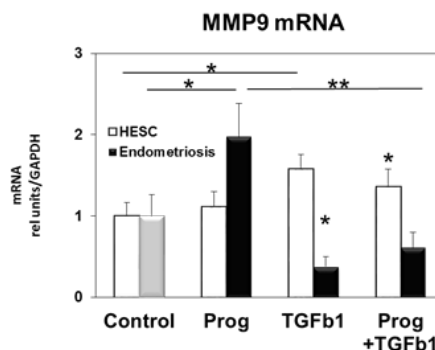


図 2. 正常子宮内膜と子宮内膜症における TGF 1 の SMAD を介した MMP への影響

(3) 正常子宮内膜と子宮内膜症におけるプロゲステロンと TGF 1 との MMPs への影響を検討しました。

正常子宮内膜(図中 HESC)において TGF 1 刺激により有意に増強した MMP9 mRNA は、プロゲステロンを加えることでその反応が抑制されました。一方、子宮内膜症(図中 Endometriosis)では、TGF 1 刺激により MMP9 mRNA は有意に減弱し、プロゲステロン刺激では有意に増強しました。また TGF 1 にプロゲステロンを加えることでその効果は抑えられました(図 3)。

また、この mRNA の結果は zymography によって検討し同様の結果を確認しました。正常子宮内膜でのプロゲステロンと TGF 1 との相互作用と同様、子宮内膜症における両者は互いにその作用を抑制していることが確認されました。このことから、子宮内膜症でのプロゲステロンと TGF 1 とは互いの関与で MMP の分泌を増減させていることが明らかとなりました。



Cells were treated with vehicle (CTL), progesterone (1 nM), TGFβ1 (5 ng/ml), or progesterone + TGFβ1 for 48 h.

* P < 0.01 compared with control.

** P < 0.01.

図 3. 正常子宮内膜と子宮内膜症におけるプロゲステロンと TGF 1 の MMP9 への影響

(4) 正常子宮内膜では TGF 1 とプロゲステロンとがマトリックス統合性の調節という重要な役割を担っていることを報告しましたが(J Clin Endocrinol Metab. 2012 Jun; 97(6): E888-E897.)⁽¹⁾、子宮内膜症ではプロゲステロンによってその働きを調節しているのではないかという仮説のもと検討をおこなってきました。子宮内膜症における MMPs の発現を検討することで、正常子宮内膜とは異なる性質を引き出し子宮内膜症のメカニズム解明に加え治療につながる候補を模索しました。今回の知見から、プロゲステロンと TGF 1 との相互作用が明らかとなり、現在子宮内膜症の治療の一つとして確立されたプロゲステロンの働きを強化できるようひきつづき検討をおこなっていきたいと考えています。

文献

(1) Itoh H, Kishore AH, Word RA. Transforming Growth Factor 1 (TGF 1) and Progesterone Regulate Matrix Metalloproteinases (MMP) in Human Endometrial Stromal Cells. J Clin Endocrinol Metab. 2012 Jun; 97(6): E888-E897.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

第 23 回日本生殖内分泌学会学術集会：子宮内膜症におけるプロゲステロンの

Matrix metalloproteinases(MMPs)調節機構
/ 伊東裕子、宮本新吾

〔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

伊東 裕子 (ITOH Hiroko)
福岡大学・医学部産婦人科・講師
研究者番号：30632161

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()