

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 4 月 16 日現在

機関番号：13901
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2011
 課題番号：20591912
 研究課題名（和文）NEPとPTENの相互作用に着目した子宮内膜症発症機序の解明と新規治療法の開発
 研究課題名（英文）Development of new strategy for treatment of endometriosis with focus on the interaction of NEP and PTEN
 研究代表者
 岩瀬 明 (IWASE AKIRA)
 名古屋大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：20362246

研究成果の概要（和文）：正所性子宮内膜間質細胞および子宮内膜症間質細胞で、Neutral endopeptidase (NEP), CD44(hyaluronan receptor), PTENが発現していること、NEP発現がプロゲステロン依存性に増強することを見出した。NEPとPTENは細胞内で結合していることが確認されたが、この結合によるPI3K-Akt経路への影響はなかった。一方、CD44依存性のヒアルロン酸への細胞接着が、NEP発現の増強によって減弱すること、この効果はNEPがCD44と細胞内骨格Ezrin/Radixin/Moesin(ERM)との結合を競合的に阻害することに起因することを見出した。NEP発現の増強による子宮内膜症治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We found the expression of neutral endopeptidase (NEP), CD44(hyaluronan receptor) and PTEN in human endometrial stromal cells and endometriotic stromal cells. We also found that NEP is induced with progesterone. While the interaction of NEP and PTEN did not affect the signaling pathway of PI3K-Akt, NEP suppressed the CD44-dependent cell adhesion due to the inhibition of the interaction between CD44 and Ezrin/Radixin/Moesin(ERM) by NEP. The induction of NEP expression might lead to the development of the novel therapy of endometriosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：生殖医学、子宮内膜症

1. 研究開始当初の背景

生殖年齢の女性の約 10-15%に発症するといわれる子宮内膜症は、近年増加しており、月経痛、性交痛といった疼痛症状を引き起こし女性の Quality of Life を低下せしめるだけでなく、腹膜病変による癒着や卵巣子宮内膜症性嚢胞の存在により不妊症の一因になると

考えられている。子宮内膜症治療のうち、病変を直接切除・焼灼する外科的治療は妊孕性改善に一定の効果があることが確認されているものの、妊孕性温存手術後の再発率が高く、卵巣病変に対する手術侵襲により卵巣機能低下がおこる可能性がある。また中心的薬物療法である GnRH アナログは、疼痛症状緩

和には効果が高いものの、妊孕性改善効果は乏しく、また副作用の面から長期継続使用が困難であり、治療中止後の再発率が高い。また同薬剤はエストロゲン依存性の内膜症細胞増殖を抑制することを目的とし、低エストロゲン状態をもたらすことで効果を発揮するため、治療期間中は妊娠できないといった問題点がある。

2. 研究の目的

子宮内膜症と不妊症に対する治療を両立するためには、低エストロゲンであることに依存しない治療法を確立する必要がある。未だ不明な点が多い子宮内膜症の発症・進展機序を解明し、これらをターゲットとした新規治療法を開発することは、子宮内膜症治療のブレイクスルーとなる可能性がある。本研究は、子宮内膜症細胞および子宮内膜症の発生源地と考えられている子宮内膜細胞のホルモン依存性変化、特に Neutral endopeptidase (NEP) の発現と細胞増殖抑制因子である Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) やその他物質との interaction に着目し、子宮内膜症発症・進展機序の解明を目的とし、同分子を標的とした新規治療法の開発をめざすものである。

3. 研究の方法

(1) 細胞の取得

当院倫理委員会の承認のもと研究を開始した。患者へのインフォームドコンセントのもと子宮内膜症手術患者(n = 12)から正所性子宮内膜間質細胞 (endometriosis-patient endometrial stromal cells; eESC) と子宮内膜症組織から子宮内膜症間質細胞 (endometriotic cyst stromal cells; CSC) を、非子宮内膜症手術患者(n = 16)から正所性子宮内膜間質細胞(endometrial stromal cells; ESC)を分離培養した。

(2) 発現確認とプロゲステロンによる誘導
上記細胞からタンパクを抽出し、ウェスタンブロッティングにて NEP, CD44, PTEN の発現を確認した。子宮内膜・内膜症間質細胞は性ステロイドに反応して脱落膜化と呼ばれる変化を起こすことが知られており、この時の NEP, CD44, PTEN の発現の変化を調べた。具体的には上記細胞を、17 β -estradiol, medroxyprogesterone acetate (MPA), dibutyryl cAMP にて刺激を行い、紡錘形から多角形の脱落膜化変化を確認したのち、タンパクを抽出し、NEP, CD44, PTEN の発現ウェスタンブロッティングで確認した。

(3) CD44 依存性細胞接着と siRNA による NEP 発現抑制

CD44 は細胞外マトリックスのひとつであるヒアルロン酸のレセプターであるが、子宮内膜・内膜症間質細胞に発現し、腹膜への接着

に關与しているとする報告がある。ヒアルロン酸への接着を調べるため、上記細胞を蛍光細胞マーカーである CFDASE で標識をし、ヒアルロン酸コートディッシュへ接着して残った細胞を蛍光マイクロプレートリーダーにて定量した。本接着が CD44 依存性かどうかを検証するため CD44 中和抗体を添加した実験を行った。またこの CD44 依存性のヒアルロン酸への接着が NEP 発現で影響を受けるかどうかを検証するため NEP siRNA を各種間質細胞に導入し、ヒアルロン酸への接着がどのように変化するか検証した。

(4) NEP と ERM タンパクの結合

NEP と CD44 は細胞内ドメインで細胞骨格とのリンカープロテイン Ezrin/Radixin/Moesin(ERM) に結合するとする報告がある。NEP と ERM, CD44 と ERM との結合を免疫沈降法にて確認し、NEP の発現変化で影響を受けるかどうか確認した。

(5) デキサメサゾンによる NEP 発現誘導と細胞接着能の変化

NEP はプロゲステロンで発現誘導を受けるが、合成プロゲステン (プロゲスチン) はすでに子宮内膜症の治療薬として用いられている。本治療薬は性ホルモン製剤であるため治療中は妊娠できない。NEP を誘導し、排卵を抑制しない物質が妊娠待機と子宮内膜症治療を両立する治療薬となりうる可能性がある。そのような物質の候補として NEP のプロモーターのうち androgen responsive element に結合するデキサメサゾンによる NEP 発現誘導と接着能の変化を検証した。

4. 研究成果

(1) NEP と CD44 の発現と脱落膜化時の発現変化

NEP, CD44, PTEN は、eESC, ESC, CSC ともに発現していた。NEP はプロゲステロン存在下で発現が増強したが、CD44 にはそのような変化はみとめられなかった。代表的なウェスタンブロッティングを図 1 に示す。

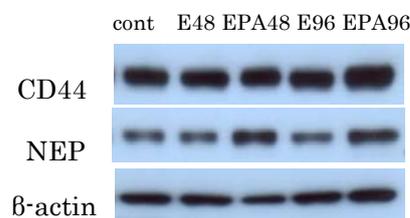


図 1 ウェスタンブロッティング

E (17 β -estradiol 添加)、EPA (17 β -estradiol, MPA, cAMP 添加)、48, 96 はそれぞれ添加時間をあらわす。

eESC, CSC (それぞれ n = 12), ESC (n = 16) について同様の実験を行い、デンストメトリ

一で定量を行った。

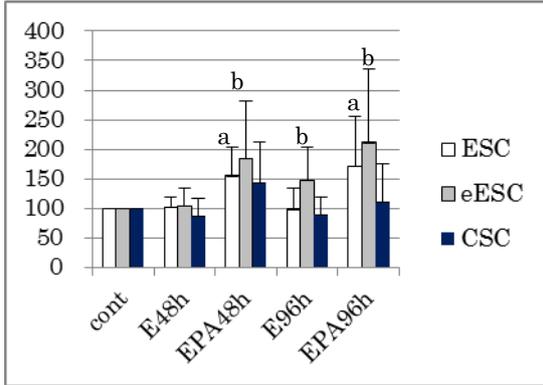
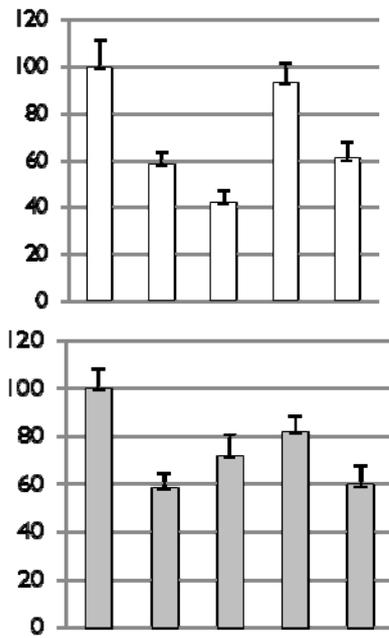


図2 各種細胞での NEP 発現誘導の変化

図2からわかるように ESC, eESC ではプロゲステロン添加時に NEP 発現は増加するが、CSC ではその傾向が弱いことは明らかとなった(a, bはそれぞれのコントロールに対し $P < 0.05$)。

(2) ヒアルロン酸コートディッシュへの接着と NEP 発現変化による影響
CFDASE 標識 ESC, eESC, CSC を用いヒアルロン酸への接着を定量した。



EPA	-	-	+	+	+
siNEP	-	-	-	+	+
α -CD44	-	+	-	-	+

図3 eESC(上段), CSC(下段)の細胞接着率の変化

図3 上段 eESC、下段 CSC とも CD44 中和抗体添加 (カラム左から 2 番目) で接着が約 50%低下しており、これが CD44 依存性の接

着であると考えられた。上段 eESC では EPA 処理で、接着が抑制された (カラム左から 3 番目) が、NEP の siRNA 導入でこの抑制は解除されており (カラム左から 4 番目)、CD44 依存性の細胞接着が、NEP 発現の増加・減少に影響を受けていることが示唆された。下段の CSC では、この変化は弱く、先のプロゲステロンによる NEP 発現誘導が弱いことが関係していると考えられた。

(3) CD44 と ERM の結合

続いて、CD44 と ERM の結合を免疫沈降で確認した。ERM は CD44 と共沈し、細胞内で何らかの結合があることが示された。プロゲステロンによる NEP の誘導は、CD44 と共沈する ERM の減少をもたらし、siRNA による NEP 発現の抑制は、CD44 と共沈する ERM の増加をもたらした。以上の結果より、NEP の CD44 依存性細胞接着阻害作用は、CD44-ERM との結合への影響により生じている可能性が示唆された。

(4) デキサメサゾンによる NEP 発現誘導と、細胞接着抑制

NEP 遺伝子のプロモーター領域には、androgen responsive element が存在し、プロゲステロン、テストステロン、デキサメサゾンにより転写が促進されることが、他の細胞を用いた実験で明らかとなっている。非性ステロイド治療薬開発の可能性を考え、デキサメサゾンによる NEP 誘導と細胞接着の抑制を検証した。デキサメサゾンによる NEP 発現誘導、CD44 依存性細胞接着抑制はプロゲステロンより弱く、約 50%であることが確認された。

(5) まとめ

我々は、プロゲステロン依存性に誘導される子宮内膜間質細胞の NEP が、CD44 依存性の細胞接着を抑制することを見出した。合成プロゲステロン (プロゲスチン) はすでに子宮内膜症治療薬として用いられているが、その作用機序の一翼を担っていると考えられた。またデキサメサゾンにて、プロゲステロンより弱いものの、NEP 誘導と細胞接着抑制が生じることは、デキサメサゾンが子宮内膜症治療薬となりうることを示唆するものである。

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 2 件)

1. 岩瀬 明、永友良成、巴雅蘇拉、中村智子、廣川和加奈、中原辰夫、滝川幸子、小林浩治、真鍋修一、後藤真紀、吉川史隆、プロゲステロン依存性 CD10 発現の変化が CD44 依存性細胞接着に影響を及ぼす、日本エンドメトリオーシス学会

誌、査読無、2011、32 卷、84-87

2. Manabe S, Iwase A, Goto M, Kobayashi H, Takikawa S, Nagatomo Y, Nakahara T, Bayasula, Nakamura T, Hirokawa W, Kikkawa F Expression and localization of CXCL16 and CXCR6 in ovarian endometriotic tissues. Arch Gynecol Obstet 査読有、2011, in press

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 岩瀬 明、永友良成、巴雅蘇拉、中村智子、廣川和加奈、中原辰夫、滝川幸子、小林浩治、真鍋修一、後藤真紀、吉川史隆、【ワークショップ】子宮内膜症の成因に関する基礎的研究 プロゲステロン依存性 CD10 発現の変化が、CD44 依存性細胞接着に影響を及ぼす 第 32 回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会 2011 年 1 月 22 日、東京
2. 岩瀬 明、後藤真紀、真鍋修一、中村智子、廣川和加奈、中原辰夫、小林浩治、滝川幸子、吉川史隆、子宮内膜症間質細胞において neutral endopeptidase はプロゲステロンにより誘導され、細胞骨格-CD44 結合を阻害し、細胞外マトリックスであるヒアルロン酸への接着を阻害する 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会 2011 年 8 月 30 日 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩瀬 明 (IWASE AKIRA)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20362246

(2) 研究分担者

後藤 真紀 (GOTO MAKI)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90378125

(3) 連携研究者 なし