

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592490

研究課題名(和文) Urocortin 2の子宮内膜症における発現と病態への関与の解析

研究課題名(英文) The role of Urocortin2 in the regulatory mechanisms of endometriosis

研究代表者

明樂 重夫 (Akira, Shigeo)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：40231849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Urocortin 2(Ucn 2)の子宮内膜症の増殖における役割を検討する目的で、ラットおよび子宮内膜症患者において、子宮および子宮内膜症性嚢胞におけるUcn2の発現と末梢血および腹水中のUcn2濃度を検討した。ラットUcnは子宮内膜腺管上皮に多く発現し、そのmRNA発現量はエストロゲンによって抑制された。一方、ヒトでもUcn 2 mRNAは子宮内膜症組織で発現していた。I期およびIII期以上の子宮内膜症患者と対照においてUcn 2濃度は血中では有意差はなかったが、腹水中ではIII期以上で有意に上昇していた。以上よりUcn 2は子宮内膜症の病態に何らかの関与をしている事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To determine the physiological significance of Urocortin2 (Ucn2) in the regulatory mechanisms of endometriosis, we examined the expression of Ucn2 mRNA in rat uterus and the tissue of endometrial cyst, and measured Ucn2 concentration in plasma and peritoneal fluid from patients with and without endometriosis by EIA.

Ucn2 like immunoreactivity was detected in the endometrial gland epithelial cells of the rat uterus. The expression level of Ucn2 mRNA was reduced by estradiol. Human Ucn2 mRNA was detected in the tissue of endometrial cyst. Plasma Ucn2 levels were not statistically different between patients of stage I, II, III endometriosis and myoma uteri. By contrast, Ucn2 concentrations in the peritoneal fluid of stage I, II, III endometriosis were significantly elevated compared to stage I, II endometriosis and myoma uteri. Thus, Ucn2 may play a role in the regulatory mechanisms of proliferation of endometriosis.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮内膜症 ウロコルチン2 病態生理 発現調節 診断ツール

1. 研究開始当初の背景

Corticotropin-releasing factor (CRF) は41個のアミノ酸からなる神経ペプチドで、ストレスに対する視床下部-下垂体-副腎系の調整において中心的な役割を果たしている。近年、CRFファミリーとして Urcortin (Ucn)1、2、3が同定され、CRF1型、2型受容体(CRF-R1, CRF-R2)の内因性リガンドであることが証明された。Ucn 1、2ともにCRF-R2と高い親和性を示すが、特にUcn 2は、CRF-R2のみを介してその生理作用を発現させている。

子宮内膜にはCRF、Ucn 1、CRF-R1、CRF-R2の発現が証明されており、CRFファミリーの子宮内膜における様々な生理作用が想定されている。近年、Ucn 2も子宮内膜で発現が証明された (Florio P, et al.) . Ucn 2は増殖期初期の上皮細胞と間質細胞で発現が多いとされるが、その生理的意義は未だ不明である。

子宮内膜症は子宮内膜の腺管および間質が子宮内腔以外で生着・増殖する疾患で、生殖年齢にある女性に月経痛、慢性骨盤痛、妊孕性低下などを引き起こす。最近、血中Ucn 1レベルが卵巣チョコレート嚢胞を有する患者において、非チョコレート嚢胞を有する患者よりも有意に上昇していることが報告された。また同時に免疫染色によりUcn 1が卵巣子宮内膜症性嚢胞の腺および間質にて発現していることが証明され

(Florio P, et al.) Ucn 1が子宮内膜症の増殖・進展に何らかの関与をしていることが想定されている。前述のように、Ucn 2も正常ヒト子宮内膜組織での発現が証明されたが、我々もこれまでラットにおけるUcn 2の中枢、末梢組織、血中における局在・濃度やその生理的意義を Semi-quantitative RT-PCR、In situ hybridization、Immunohistochemistry、RIAの手法を用いて検討し、(Yamauchi N,

Otagiri A, Nemoto T, et al , Nemoto et al.) 子宮におけるUcn 2の強い発現や末梢血におけるストレス反応に対する濃度変化を見だし、報告してきた。

従って、Ucn 2もUcn 1と同様に子宮内膜症の病態に関与している可能性があり、その解析が子宮内膜症の病態の解明や新しい診断法、治療の予後判定法の開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

Ucn 2が子宮内膜症の増殖・進展に関与しているかどうか、そして血中Ucn 2測定が子宮内膜症の診断や予後判定のバイオマーカーに結びつく可能性があるかを検討することを本研究の目的とした。そのため、以下の研究を企画した。

- (1) Ucn 2の子宮における発現様式とその調節機構の基礎的検討を行うため、ラットを用いて検討する。
- (2) 子宮内膜症患者から同意を得て、手術中に採取した正所性子宮内膜と子宮内膜症性嚢胞組織におけるUcn 2の発現を検討する。
- (2) 子宮内膜症患者および対照の子宮筋腫患者から同意を得て採取した末梢血および腹水中のUcn 2濃度をEIA法にて測定し、子宮内膜症の臨床進行期との関連を検討する。

以上の解析を行い、Ucn 2の子宮内膜症の病因における意義やその新規診断・治療効果判定ツールとしての可能性について検討した。

3. 研究の方法

- (1) ラットにおけるUcn 2の子宮における発現様式とその調節機構の基礎的検討
実験にはウイスター系メスラットを用いた。毎朝性周期をチェックし、実験時には血中エストラジオール濃度をEIAキットにて測定した。2週齢より17週齢までのラッ

トから子宮を摘出、ホモジェネートし、ラット Ucn 2EIA キットにて組織含量を測定した。また、子宮の総 RNA 量を測定した後、ラット Ucn2 に対する特異的プライマーにて PCR を行い、Ucn2mRNA の発現量を検討した。さらに Ucn 2 発現の子宮における局在を検討する目的で、ペントバルビタール麻酔下でラット心臓内にカニューレを挿入、PBS とパラフォルムアルデヒドにて還流した後子宮を摘出し、10 μm の凍結切片を作成して Ucn 2 の免疫組織化学染色を行った。Ucn 2 抗体は以前我々が作製したものを使用した。

(2) 正所性子宮内膜と子宮内膜症性嚢胞組織における Ucn 2 の発現の検討

インフォームドコンセントを得て、子宮内膜症の手術時に卵巣子宮内膜症性嚢胞の嚢腫壁を採取した。子宮内膜症組織は液体窒素にて瞬間冷凍させ、アッセイまで-80 にて凍結保存した。各検体の総 RNA 量を測定した後、ヒト Ucn2 に対する特異的プライマーにて PCR を行い、Ucn2mRNA の発現量を検討した。

(3) 子宮内膜症患者における末梢血および腹水中の Ucn 2 濃度

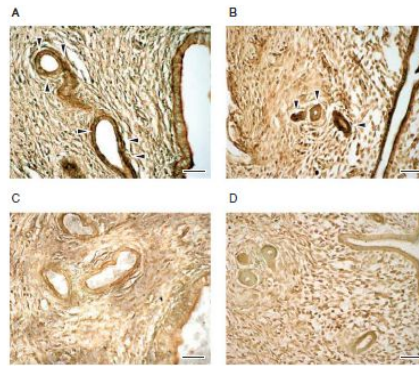
インフォームドコンセントを得て、子宮内膜症および対照の子宮筋腫の患者より手術時に血清、腹水を採取、アッセイまで-80 にて凍結保存した。各検体はヒト Ucn2 に対する EIA キットにて Ucn2 濃度を検討した。

4. 研究成果

(1) ラットにおける Ucn 2 の子宮における発現様式とその調節機構の基礎的検討

免疫組織化学による検討で、ラットの Ucn 2 は子宮内膜の腺管上皮に多く発現することが証明された(図 1)。

図 1



子宮における Ucn 2 mRNA 発現量および組織含量は血中エストロゲンレベルが増加する発情前期で低く、エストロゲンレベルが低い発情休止期で高かった(図 2)。また、未成熟ラットや加齢ラットでは成熟発情前期ラットに比べ子宮での Ucn 2 mRNA 発現量と組織含量が高かった(図 3)。

図 2

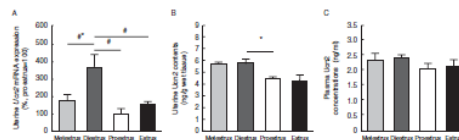
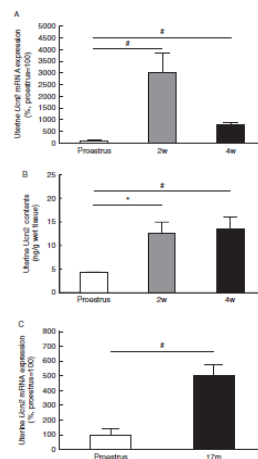
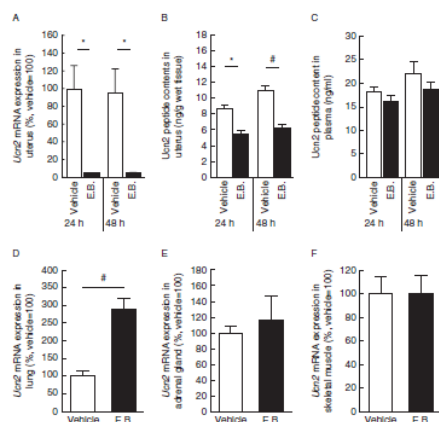


図 3



さらに、卵巣摘除ラットへのエストロゲンの補充により子宮での Ucn 2 mRNA 発現量と組織含量が低下した(図 4)。

図 4



以上の結果より、子宮の Ucn 2 mRNA 発現量と組織含量はエストロゲンによって抑制されることが明らかになった。一方、血中 Ucn 2 濃度を上記の各ラットで比較したが、いずれの群間でも差は見られなかった。これまでの報告でグルココルチコイドによる Ucn 2 の発現調節には組織特異性が見られることが報告されており、我々の検討で、肺の Ucn 2 mRNA 発現量はエストロゲンにより増加することが明らかになった。これらの結果から、血中における Ucn 2 濃度はそれぞれ発現調節の異なる組織に由来するため変化をとらえにくい可能性も考えられた。

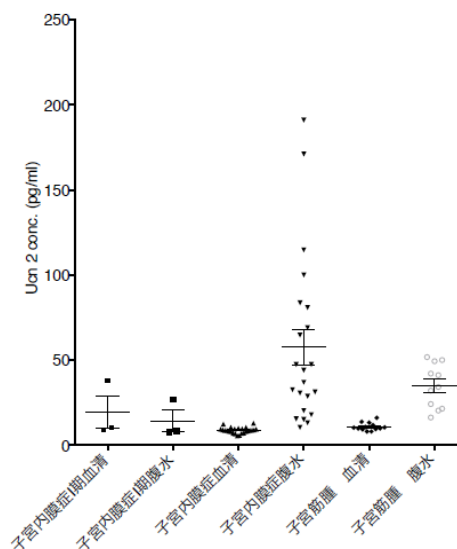
(2) 正所性子宮内膜と子宮内膜症性嚢胞組織における Ucn 2 の発現の検討

子宮内膜症 期における患者から採取した子宮内膜症性嚢胞組織において、Ucn2mRNA の発現がみとめられた。この発現量は同一患者の正所性子宮内膜における発現よりやや少ない傾向があったが、有意差はなかった。

(3) 子宮内膜症患者における末梢血および腹水中の Ucn 2 濃度

血中 Ucn 2 濃度は子宮筋腫患者(13例)、I 期の子宮内膜症患者(3例)、III 期以上の子宮内膜症患者(25例)でいずれの群間でも統計学的な差は、見られなかった。一

方、腹水中の Ucn 2 濃度は I 期の子宮内膜症患者(3例)では 14.2 ± 6.3 pg/ml (mean \pm sem) であったのに対し、III 期以上の子宮内膜症患者(22例)では 57.54 ± 10.6 pg/ml と高く、子宮筋腫患者(11例)の 34.75 ± 3.9 pg/ml と比べても高かった。I 期子宮内膜症や子宮筋腫患者では血中と腹水中での Ucn 2 の濃度に差は見られなかったが、III 期以上の子宮内膜症患者では、全症例において腹水中の濃度が血中に比べ平均で 6.7 ± 1.3 倍と有意に高かった(図 5)。(図 5)



以上より、腹水中の Ucn 2 の測定は子宮内膜症の病期に関連し高くなる可能性が示唆された。

(4) 成果まとめ

Ucn 2 はラット及びヒトにて、子宮内膜にて産生されていることが明らかとなった。その産生はエストロゲンによって抑制されており、Ucn 2 は性周期における子宮内膜の機能変化に影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、Ucn 2 は正所性子宮内膜のみならず子宮内膜症組織でも産生されていること、腹水中の Ucn 2 量が臨床進行期が進むにつれて増加していることから、Ucn 2 は子宮内膜症の増殖・進展に何らか

の関与をしている可能性が示唆された。一方血中 Ucn 2 濃度は、ラットにおける検討で血中エストロゲンレベルとは相関がなく、ヒトにおける検討でも子宮内膜症の病期と血中 Ucn 2 濃度に相関は認められなかった。これらのことから、血中 Ucn 2 測定は子宮内膜症の早期診断ツールとなる可能性は低いと考えられた。

<引用文献>

Florio P, et al. Human endometrium expresses urocortin and messenger RNA and peptides. Fertil Steril 2006;86:1766-1770.

Florio P, et al. Plasma urocortin levels in the diagnosis of ovarian endometriosis. Obstet Gynecol 2007;110:594-600.

Yamauchi N, Otagiri A, Nemoto T, et al Distribution of urocortin 2 in various tissues of the rat. J Neuroendocrinol 2005;17:656-663

Nemoto et al. Regulation of the expression and secretion of urocortin 2 in rat pituitary. J Endocrinol 2007;192:443-452.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Watanabe K, Nemoto T, Akira S, et al. Estrogens downregulate urocortin 2 expression in rat uterus. J Endocrinol 2013;219:269-278.

DOI: 10.1530/JOE-13-0228

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

明樂 重夫 (Akira, Shigeo)
日本医科大学 医学部 教授
研究者番号：40231849

(2)研究分担者

根本 崇宏 (Nemoto, Takahiro)
日本医科大学 医学部 准教授
研究者番号：40366654