

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670702

研究課題名(和文)血小板による新しい再上皮化誘導機構とその異常

研究課題名(英文)Platelet-induced re-epithelialization and its failure

研究代表者

藤原 浩 (FUJIWARA, HIROSHI)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：30252456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は「血小板から放出される因子によって子宮内膜上皮の遊走と再構築が誘導され、その機構の異常が婦人科疾患の発症と進展を誘導している」という新しい作業仮説のもとに計画された。その結果、血小板中のケモカインが子宮内膜上皮細胞と子宮体癌由来Ishikawa細胞を促進すること、その一方で血小板から放出される細胞膜小粒子は正常子宮内膜上皮細胞の遊走を反対に抑制し、さらに上皮の再構築を亢進する可能性が示された。細胞膜小粒子による作用は癌細胞株では観察されなかった。これらの成果は種々の婦人科疾患の発症や癌の進展に対する新しい治療法の開発に貢献する可能性があり、今後も解析すべき課題であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We designed this study based on the novel concept that platelet-derived factors induce endometrial epithelial cell migration and epithelial construction and its failure can cause onset and development of gynecological disorders. This study showed that the platelets promoted cell attachment of a human endometrial epithelial cell-derived immortalized cell line (EM-E6/E7/hTERT). Platelets inhibited, but the platelet-conditioned medium excluding the microparticle promoted EM-E6/E7/hTERT cell invasion. On the other hand, the platelet enhanced the human endometrial carcinoma-derived cell lines, Ishikawa cells and HEC-1 cells. These results indicate the possible involvement of platelets in endometrial epithelial regeneration and suggest differences in the responses to the re-epithelialization-inducing effects of platelet-derived microparticles between normal endometrial epithelial cells and cancer cells.

研究分野：生殖医学

キーワード：ケモカイン 細胞膜小粒子 血小板 子宮内膜 再生 癌浸潤

### 1. 研究開始当初の背景

子宮内での胎児発育を実現させるため、ヒトの子宮内膜は周期的な内膜の再生を行い、胚着床後の胎盤形成期にはヒトの絨毛外栄養膜細胞は母体血管に浸潤し血管内皮細胞に置換転化する。これらの上皮再生機構の異常は子宮内膜症や習慣流産などの発症に関与すると推察されるがその機序は不明のままである。本研究申請者らは血小板がこの機序に関与することを世界に先駆けて示してきたが、その後の検討で血小板から離脱する粒子成分が上皮化の最終段階である上皮細胞間の結合を誘導すること、一方で癌細胞においては誘導されないことを観察した。これらは生殖臓器における上皮再生機構のみならず癌の進展機構の解明に新たな局面を切り開く知見である。

### 2. 研究の目的

上記の背景から、本研究では「血小板から放出される因子によって子宮内膜上皮の遊走と上皮構造の再構築および EVT の遊走とその血管内皮化が誘導される」という新しい作業仮説に基づいて、「上皮再構築の誘導機構の異常が子宮内膜症をはじめとする婦人科疾患の発症を、またその機構からの逸脱が癌細胞の進展を誘導している」と概念を発展・展開を推進する目的で本研究を申請した。

### 3. 研究の方法

#### 平成 25 年度の実験計画

I) h-TERT 導入ヒト子宮内膜上皮不死化細胞に調整した血小板添加培養し、増殖能の変化、敷石状配列への形態の変化を検討する。さらに保存していた血小板の分離培養上清を charcoal 処理または熱処理を加えて同様の作用を検討する。一方で正常子宮内膜組織から分離した子宮内膜上皮細胞または間質細胞を細胞外基質を coating した dish にまき、血小板または血小板培養上清と共培養し、増殖能および接着能の変化を評価する。II) h-TERT 導入子宮内膜上皮細胞を血小板また

は血小板の分離培養上清分画あるいは microparticle 分画の存在下で 48 時間培養後、flow cytometry 法を用いて各 integrin 分子やこれらの機能関連分子である CD9, ALCAM, および Eph A1 と ephrin A1 の発現変化を比較し、細胞接着関連分子の発現誘導に対する血小板の作用を検討する。また同様の条件下に matrigel invasion assay を施行すし zymography にて matrix metalloprotease (MMP-2, MMP-9) の分泌と活性化状態を検索する。一方で microarray 法で発現変化している遺伝子群をスクリーニングし、今後の解析に参考となる情報を得る。さらに細胞間結合の間隙形成作用を数量化して、細胞間隙の透過性に対する作用を検討する。III) EVT 由来の Swan71 細胞と絨毛癌由来細胞株である BeWo と JEG-3 細胞を用いて上記の I) と II) と同様の実験をおこなう。血管内皮への分化誘導の評価には血管内皮細胞のマーカーである CD31 および CD34 の発現誘導の有無を追加検討する。

#### 平成 26 年度の実験計画

I) 婦人科良性手術時に患者の同意のもとに採取した子宮内膜組織より子宮内膜上皮細胞および間質細胞を分離し、これを平成 25 年度で施行予定の培養実験に供する。さらに EphA、ephrinA、EphB、ephrinB、semaphorin およびその受容体である neuropilin-1、2、L1-CAM の発現を RT-PCR、免疫組織染色および flow cytometry 法で検討する。また recombinant Eph-ephrin、semaphorin の binding、および固層化した dish 上で細胞接着の有無と細胞凝集の有無を観察し、細胞間結合に対する作用を検討する。一方で初期絨毛の器官培養から EVT を分離し、これを継代培養して cytokeratin-7 の発現をもとに EVT を cloning する。得られた子宮内膜上皮細胞および間質細胞または EVT を血小板の存在下で invasion assay、adhesion assay、permeability assay に供し

てその浸潤に対する作用を検討する。さらに血小板の EVT に対する血管内皮様の形態変化誘導作用を特に microparticle 分画について検討する。これらの実験で EVT において発現変化した遺伝子群を microarray 法にて検索し、発現変化が確認された遺伝子群に関しては shRNA の遺伝子導入してその関与を検索する。II) 子宮内膜症病変および癌浸潤部位の組織標本での血小板の分布および活性状態の有無を CD41, CD61 または CD62P の免疫組織染色にて観察する。一方で習慣流産または PIH 患者の胎盤における血小板の発現の様式も検索する。これらの組織で上記の検討で得られた血小板由来因子の受容体などにあたる分子の血小板の周囲での発現を観察する。また同時に子宮内膜症患者の正所性子宮内膜および異所性の子宮内膜症病変部から分離した細胞に対する血小板の作用やさらに不育症や担癌患者の血小板の上皮細胞に対する作用などについて解析し、病巣の進展に対する血小板の関与の可能性について分析する。

#### 4 . 研究成果

本研究の結果、血小板中の chemokine が子宮内膜上皮細胞と子宮体癌由来 Ishikawa 細胞および EVT と絨毛癌由来 JEG-3 細胞遊走を促進すること、その一方で血小板の活性化に伴い剥離・放出される細胞膜表面の機能分子を含んだ細胞膜小粒子 (microparticle) は正常子宮内膜上皮細胞と EVT の遊走を反対に抑制し、さらに上皮の再構築を亢進する可能性が示された。興味深いことに細胞膜小粒子による作用は癌細胞株では観察されず、これらから血小板は局所で chemokine などからなる広い範囲に至る活性因子と細胞膜小粒子からなる比較的狭い範囲に至る 2 つの gradient を形成し、上皮細胞の遊走と上皮化を誘導すること、さらにそれら dual な作用に対する反応異常が疾患の原

因になるとの新しい概念を提示するに至った。これらの成果は種々の婦人科疾患の発症や癌の進展に対する新しい治療法の開発に貢献する可能性があり、今後も解析すべき課題であると考えられる。

#### 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)

Ahasan MM, Wakae K, Wang Z, Kitamura K, Liu G, Koura M, Imayasu M, Sakamoto N, Hanaoka K, Nakamura M, Kyo S, Kondo S, Fujiwara H, Yoshizaki T, Mori S, Kukimoto I, Muramatsu M. APOBEC3A and 3C decrease human papillomavirus 16 pseudovirion infectivity. **Biochem Biophys Res Commun.** 457:295-9, 2015. 査読有

Bono Y, Kyo S, Kiyono T, Mizumoto Y, Nakamura M, Maida Y, Takakura M, Fujiwara H. Concurrent estrogen action was essential for maximal progestin effect in oral contraceptives. **Fertil Steril.** 101:1337-43, 2014. 査読有

Bai R, Bai H, Kuse M, Ideta A, Aoyagi Y, Fujiwara H, Okuda K, Imakawa K, Sakurai T. Involvement of VCAM1 in the bovine conceptus adhesion to the uterine endometrium. **Reproduction.** 148:119-27, 2014. 査読有

Takahashi H, Takizawa T, Matsubara S, Ohkuchi A, Kuwata T, Usui R, Matsumoto H, Sato Y, Fujiwara H, Okamoto A, Suzuki M, Takizawa T. Extravillous trophoblast cell invasion is promoted by the CD44-hyaluronic acid interaction. **Placenta.** 35:163-70, 2014. 査読有

Zhang X, Kyo S, Nakamura M, Mizumoto Y, Maida Y, Bono Y, Takakura M, Fujiwara H. Imatinib sensitizes endometrial cancer cells to cisplatin by targeting CD117-positive growth-competent cells. **Cancer Lett.** 345:106-14, 2014. 査読有

Fujiwara H, Nishioka Y, Matsumoto H, Suginami K, Horie A, Tani H, Matsumura N, Baba T, Sato Y, Araki Y, Konishi I. Eph-ephrin A system regulates human choriocarcinoma-derived JEG-3 cell invasion. **Int J Gynecol Cancer.** 23:576-582, 2013. 査読有

Yoshitake H, Yokoi H, Ishikawa H, Maruyama

M, Endo S, Nojima M, Yoshida K, Yoshikawa H, Suzuki F, Takamori K, Fujiwara H, Araki Y: Overexpression of TEX101, a potential novel cancer marker, in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Biomarkers**. 2:141-8. 2012-2013. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

Fujiwara H.

Positive contribution of immune cells to endometrial receptivity and embryo implantation. *International Congress On "Embryo Implantation: Intricacies and Strategies for its Success"* organized by National Institute of Immunology, New Delhi, India, 9-11 March, 2015.

藤原 浩

第 6 回統合産婦人科学研究合同シンポジウム 2015.3.3. 東北大学大学院医学系研究科附属創生応用医学研究センター(宮城県仙台市)

「婦人科腫瘍学と生殖医学の接点 - 胚着床に対応する生殖臓器の機能再建を目指して -」

(特別講演)

藤原 浩

第 217 回熊本産科婦人科学術講演会 2014.10.19. 熊本地域医療センター(熊本県熊本市)

「胚着床に対応する生殖臓器の機能を考慮した再建術を目指して」

(特別講演)

藤原 浩

第 22 回日本胎盤学会 2014.10.4. 京都大学医学部構内芝欄会館(京都府京都市)胎盤ワークショップ

「絨毛外トロホプラスト(EVT)の基礎と臨床」

(ワークショップ)

藤原 浩:

第 58 回日本生殖医学会学術講演会 2013.11.16 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

シンポジウム 8 Modern ART 不成功例不妊カップルに対するトータルケア

「着床障害への対応」

(シンポジウム)

藤原 浩:

関東連合産科婦人科学会総会・学術集会

2013.10.27 アクトシティ浜松(静岡県浜松市)

ワークショップ 2

「生殖医療: ペットサイド・ベンチサイド」基礎から臨床への応用 -内分泌・免疫・神経系ネットワークによる胚着床誘導機構- (ワークショップ)

藤原 浩:

第 65 回日本産科婦人科学会学術講演 2013.5.10 ロイトン札幌(北海道札幌) クリニカルカンファレンス 2 (生殖) 難治性不妊と治療 1) 生理学的見地から

〔図書〕(計 1 件)

Fujiwara H, Araki Y, Saito S, Imakawa K, Kyo S, Shigeta M, Shiotani M, Horie A, Mori T. A novel concept of fundus-ovary-salpinx-para-aorta implantation promoting unit during human embryo implantation. In **Embryology**, ed. Bin Wu, *InTech*, ISBN 978-953-51-4214-0. in press.

〔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:

出願年月日:

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

藤原 浩 (FUJIWARA, Hiroshi)

金沢大学・医学系

教授

研究者番号: 30252456

(2) 研究分担者

佐藤 幸保 (SATO, Yukiyasu)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)

助教

研究者番号: 00508236

堀江 昭史 (HORIE, Akihito)  
京都大学・医学(系)研究科(研究院)  
助教  
研究者番号: 30535836

荒木 慶彦 (ARAKI, Yoshihiko)  
順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)  
准教授  
研究者番号: 70250933

西尾 健資 (NISHIO, Takeshi)  
京都大学・医学(系)研究科(研究院)  
助教  
研究者番号: 70303790

(3)連携研究者

( )

研究者番号: