

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861511

研究課題名(和文) 子宮内膜間質細胞の脱落膜化を制御するcAMPシグナル伝達ネットワークの解明

研究課題名(英文) Cyclic AMP signaling network in the decidualization of endometrial stromal cells

研究代表者

吉江 幹浩 (YOSHIE, MIKIHIRO)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：50434014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠の成立・維持に不可欠である子宮内膜間質細胞の脱落膜化(分化)と内膜腺の成熟化はcAMPシグナル伝達経路によって調節されている。我々は、古典的なプロテインキナーゼAを介したcAMPシグナル伝達経路とExchange protein directly activated by cAMP(Epac)を介したシグナル伝達経路の脱落膜化における協調的な機能とEpacシグナル関連因子の脱落膜化と内膜腺の成熟化における役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Decidualization (differentiation) of human endometrial stroma and gland development, which are indispensable for the establishment and maintenance of pregnancy are regulated by cyclic AMP-mediated signaling pathway. We demonstrated the cooperative function of canonical protein kinase A and Exchange protein directly activated by cAMP (Epac)-mediated cAMP signaling in decidualization. We also clarified the crucial role of Epac signaling associated factors in decidualization and maturation of endometrial glandular cells.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：脱落膜化 EPAC

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜間質細胞 (ESC) は、月経周期の分泌期に主に卵巣ステロイドの影響下で脱落膜細胞へと分化 (脱落膜化) する。脱落膜化は、子宮内膜間質細胞の分化であり、線維芽細胞様の形態から敷石状細胞への変化とインスリン様成長因子結合蛋白質 1 (IGFBP-1)、プロラクチン (PRL) などの産生・分泌により特徴づけられる。脱落膜は、胞胚の着床をサポートするだけでなく、胎児由来栄養膜の浸潤制御や胎児-母体間の免疫寛容の役目を果たすことが知られており、妊娠の成立・維持には不可欠である。cAMP 誘導体や cAMP 産生を促進する薬物をヒト ESC に処置することにより脱落膜マーカー (IGFBP-1、PRL) の発現を含む機能的分化と形態学的分化が惹起されることから、cAMP シグナル伝達経路の活性化が脱落膜化において中心的な役割を担っている。また、生理的な脱落膜化の誘導因子であるプロゲステロンも ESC の細胞内 cAMP 産生を促進することが明らかとなっている。

子宮内膜腺は、脱落膜化を促進するシクロオキシゲナーゼ 2 (COX2) によるプロスタグランジン (PG) E₂ の産生や着床誘起に関わる白血球抑制因子 (LIF) の発現亢進が起こる。これら COX2 と LIF の発現、さらに PGE₂ の産生過程において cAMP シグナルが促進的機能していることが知られている。

cAMP による細胞内シグナル伝達経路を仲介する因子としてプロテインキナーゼ A (PKA) が最も良く知られているが、1998 年に PKA とは異なる cAMP シグナル伝達仲介因子 Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) が報告されてからは、Epac を介した cAMP シグナル伝達経路の存在とその意義に関する研究が活発になされている。

本研究代表者らは、cAMP シグナルの活性化が中心的役割を担うヒト胎盤栄養膜細胞の分化に PKA シグナルだけでなく Epac シグナルが関わることを明らかにした (*Hum. Reprod.* 25:2229-38, 2010)。また、培養ヒト ESC に PKA 選択的アゴニスト、Epac 選択的アゴニスト、又はその両方を処置すると PKA シグナルの活性化による IGFBP-1 や PRL 産生が Epac シグナルの活性化によりさらに増強すること、Epac 及びその下流シグナル伝達因子 Rap1 の発現を抑制すると cAMP アナログによる脱落膜化が抑制されることから、脱落膜化機構における Epac シグナル伝達経路の関与について報告した (*Placenta*, 34:212-21, 2010)。そこで、脱落膜化における cAMP シグナル伝達ネットワークの役割を PKA と Epac の観点から解しようと思い、本研究の着想に至った。さらに、着床や脱落膜化に密接に係る腺上皮細胞の成熟過程における Epac と PKA を介した cAMP シグナル伝達機構やセカンドメッセンジャーとしての Ca²⁺ と cAMP との関係性についても解析した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、従来報告されてきた PKA を介した cAMP シグナル伝達経路に加えて Epac という新規 cAMP シグナル伝達経路に着目することにより妊娠成立・維持に不可欠な子宮内膜間質細胞の脱落膜化機構と子宮内膜腺細胞の成熟機構を解明することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト ESC の脱落膜化と内膜腺細胞の成熟における Epac と PKA を介した cAMP シグナル伝達経路の役割

初代培養ヒト ESC における Epac を介したシグナル伝達経路の役割を解析するため、ヒト ESC の Epac2 発現を抑制した際に発現量が変化するタンパク質を LC-MS/MS にて同定した。さらに、Epac2 と同定したタンパク質の発現を siRNA により抑制し、cAMP アナログまたは卵巣ステロイドによる脱落膜化マーカー (PRL、IGFBP-1) の発現と形態変化を評価した。また、ヒト内膜腺細胞株を用い、アデニル酸シクラーゼ活性化薬である Forskolin や cAMP アナログの処置による COX2、LIF 発現と PGE₂ 産生に対する Epac2 と同定したタンパク質のノックダウンの効果を調べた。さらに、ESC と内膜腺細胞株の老化に対する Epac2 及び同定因子の発現抑制効果を細胞老化マーカーである SA-β-Gal の活性と細胞老化関連因子 p53 と p21 の発現を指標に評価した。

上記細胞を用い、ESC の脱落膜化と腺上皮細胞株の成熟における cAMP シグナル伝達経路と細胞内 Ca²⁺ の関係について、カルシウム拮抗薬や Ca²⁺ イオノフォア等を用いて検討した。

また、PKA と EPAC シグナルを介した脱落膜化誘導機構を解明するため脱落膜化過程で発現が上昇する PRL と転写因子 CCAAT/Enhancer-Binding Protein (C/EBP) との関係性を脱落膜特異的 PRL プロモーターを用いたレポーターアッセイにて調べた。プロモーター上に存在する C/EBP 結合配列に変異を導入したレポーターアッセイベクターを作製した後、ESC にベクターをトランスフェクションした。その後、PKA アゴニスト及び Epac アゴニストを処置し、レポーター活性の変動を調べた。

(2) ラット妊娠子宮における Epac シグナル関連因子の役割

ヒト組織を用いた脱落膜化の解析は、倫理的かつ法的問題により培養細胞系に頼らざるを得ない。ヒトとラットでは妊娠過程の種差が存在するものの、脱落膜形成過程には種を超えて共通する点があるため、ラットを用いた検討も行った。

Wistar-今道系ラットの着床周辺期 (妊娠 3、5、7、9 日目) の子宮における CRT の発現を免疫組織染色とイムノプロットにて解析した。また、着床遅延モデルと人為的脱落膜化誘導モデルを用い、着床・脱落膜化時の子宮

内 CRT 発現を解析した。

ラット子宮から単離した間質細胞に Epac シグナル関連因子に対する特異的 siRNA を導入して、脱落膜化刺激(ジブチリル cAMP と酢酸メドロキシプロゲステロン)を加え、脱落膜化マーカー(PRL と脱落膜/栄養膜 PRL 関連タンパク質)の発現に対する Epac シグナル関連因子のノックダウン効果を調べた。また、CRT ノックダウン細胞では、ギャップジャンクション構成因子コネキシン 43 (Cx43) の発現についても解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト ESC の脱落膜化と内膜腺の成熟における Epac シグナル伝達経路の機能解析

脱落膜化と内膜腺の成熟過程における Epac2 を介したカルレチキュリン (CRT) 発現の生理的意義

Epac を介したシグナル伝達経路の役割を解析するため、ヒト ESC の Epac2 発現を抑制した際に発現量が減少する因子としてシャペロンタンパク質のカルレチキュリン (CRT) を同定した。また、ヒト ESC の CRT 発現をノックダウンすると cAMP アナログや卵巣ステロイドの処置による脱落膜マーカーの発現亢進と形態的分化が阻害された。また、内膜腺細胞株 (EM1) においても Epac2 のノックダウンにより CRT 発現が減少すること、Epac2 と CRT の発現抑制は、Forskolin や cAMP アナログによる COX2 と LIF の発現、PGE2 産生を阻害することを明らかにした。さらに、Epac2 や CRT の発現をノックダウンした ESC は、老化細胞様の特徴を示した。これらの結果から、ヒト ESC の機能的かつ形態的な脱落膜細胞への分化には Epac2 を介した CRT 発現が必須であること、また、Epac2 と CRT が細胞老化に関与することを示した。

さらに、cAMP シグナル伝達経路の活性化を介したヒト ESC の脱落膜化と内膜腺の成熟において細胞内 Ca²⁺ が抑制的に機能することも明らかにした。

Epac と PKA シグナル伝達による脱落膜 PRL の転写制御機構

脱落膜 PRL プロモーターを用いたレポーターアッセイにおいて、PKA 選択的 cAMP アナログの処置による PRL 転写活性の増加は、EPAC 選択的 cAMP アナログとの共処置によりさらに増強した。しかし、プロモーター上に存在する C/EBP 結合配列に変異を入れると EPAC 選択的 cAMP アナログ処置による転写促進効果は、消失した。

ヒト ESC において PKA 選択的 cAMP アナログ処置による C/EBP の発現増加は、Epac (特に Epac2) の発現抑制により減少した。これらの知見から、ヒト ESC において Epac は、PKA と協調的に C/EBP の発現を正に調節し、この PRL プロモーター領域への結合を促すことにより、PKA による PRL 発現を増強することが示唆された。

(2) ラット妊娠初期子宮における Epac シグナル関連因子の役割

着床週期のラットの妊娠子宮における Epac シグナル関連因子の発現調節

Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT は、胞胚着床部位の脱落膜細胞で強く発現していた。妊娠 9 日目の脱落膜組織では、Rap1 の活性化がみられた。着床遅延モデル、人為的脱落膜化誘導モデル等を用いた検討から、妊娠初期における Epac 関連因子の発現は、卵巣ステロイドによる直接的な調節を受けているのではなく、着床により誘導される脱落膜化に伴い上昇することを明らかにした。

ラット妊娠子宮の脱落膜化における Epac シグナル関連因子の役割

ラット子宮間質細胞を用いた *in vitro* 系において Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT の発現をノックダウンすると脱落膜化刺激による脱落膜マーカーの発現亢進が顕著に阻害された。さらに CRT のノックダウンは、脱落膜化刺激によるギャップジャンクションタンパク質のコネキシン 43 (Cx43) の発現誘導を抑制し、ギャップジャンクションの形成を示す細胞膜への Cx43 の斑点状集積が阻害された。このことから、着床後の子宮間質細胞で発現が亢進する Epac シグナル関連因子の脱落膜化における重要性が示唆された。

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 6 件)

Kusama K, Yoshie M, Tamura K, Nakayama T, Nishi H, Isaka K, Tachikawa E. The role of exchange protein directly activated by cyclic AMP 2-mediated calreticulin expression in the decidualization of human endometrial stromal cells. 査読有 *Endocrinology*, 155:240-248 (2014) DOI: 10.1210/en.2013-1478

Kusama K, Yoshie M, Tamura K, Daikoku T, Takarada T, Tachikawa E. Possible roles of the cAMP-mediators EPAC and RAP1 in decidualization of rat uterus. 査読有 *Reproduction*, 147:897-906 (2014) DOI: 10.1530/REP-13-0654

Kusama K, Yoshie M, Tamura K, Imakawa K, Tachikawa E. EPAC2-mediated calreticulin regulates LIF and COX2 expression in human endometrial glandular cells. 査読有 *J Mol Endocrinol.*, 54:17-24. (2015) DOI: 10.1530/JME-14-0162.

Kusama K, Yoshie M, Tamura K, Imakawa K, Isaka K, Tachikawa E.
Regulatory Action of Calcium Ion on Cyclic AMP-Enhanced Expression of Implantation-Related Factors in Human Endometrial Cells.
査読有 *PLoS One*, 10:e0132017 (2015)
DOI: 10.1371/journal.pone.0132017

Yoshie M, Kusama K, Tamura K
Molecular mechanisms of human endometrial decidualization activated by cyclic adenosine monophosphate signaling pathways.
査読有 *J Mamm Ova Res*, 32:95-102 (2015)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1274/jmor.32.95>

吉江 幹浩, 草間 和哉, 田村 和広, 山崎 梨沙香, 立川 英一
ラット子宮間質細胞の脱落膜化における Calreticulin の役割 査読無
日本生殖内分泌学会雑誌, 20:35-40 (2015)
http://seishoku.org/15_20kan/20-12fron1.pdf

〔学会発表〕(計 18 件)

草間 和哉, 吉江 幹浩, 中山 貴裕, 宝田 力, 田村 和広, 沓掛 真彦, 立川 英一, 西 洋孝, 井坂 恵一
ヒト子宮内膜細胞における cAMP シグナル仲介因子 EPAC2 を介したカルレチキュリン発現の役割
第 70 回 西東京内分泌代謝研究会,
2013 年 6 月 17 日, 東京医科大学 (東京)

中山 貴裕, 吉江 幹浩, 草間 和哉, 田村 和広, 沓掛 真彦, 立川 英一
子宮内膜腺の機能獲得における cAMP シグナル仲介因子 EPAC2 の役割
第 128 回 日本薬理学会関東部会,
2013 年 7 月 14 日, 早稲田大学 (東京)

草間 和哉, 吉江 幹浩, 田村 和広, 中山 貴裕, 沓掛 真彦, 立川 英一
ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化における Ca²⁺ の役割
第 128 回 日本薬理学会関東部会,
2013 年 7 月 14 日, 早稲田大学 (東京)

K. Kusama, M. Yoshie, K. Tamura, T. Nakayama, H. Nishi, K. Isaka, M. Kutsukake, and E. Tachikawa
The role of Epac2-mediated calreticulin expression in human endometrial stromal cells decidualization
International Federation of Placenta Associations Meeting 2013
2013 年 9 月 11 日 ウィスラー (カナダ)

M. Yoshie, K. Kusama, K. Ohishi, K. Tamura, H. Nishi, K. Isaka, M. Kutsukake, and E. Tachikawa

RAP1 functions as a mediator of EGF signaling pathway and a regulator of EGF receptor in extravillous trophoblast cells invasion
International Federation of Placenta Associations Meeting 2013
2013 年 9 月 11 日 ウィスラー (カナダ)

中山 貴裕, 吉江 幹浩, 草間 和哉, 田村 和広, 沓掛 真彦, 立川 英一
子宮内膜腺細胞の LIF, PGE2 産生機構における EPAC2 を介したカルレチキュリン発現の役割
第 106 回 日本繁殖生物学会大会,
2013 年 9 月 12 日, 東京農工大学 (東京)

草間 和哉, 吉江 幹浩, 田村 和広, 沓掛 真彦, 立川 英一
妊娠成立に向けた子宮内膜の成熟過程における cAMP と Ca²⁺ の関係
第 129 回 日本薬理学会関東部会,
2013 年 10 月 19 日, 順天堂大学 (東京)

吉江 幹浩, 草間 和哉, 田村 和広, 中山 貴裕, 宝田 力, 沓掛 真彦, 立川 英一
ラット妊娠子宮における Epac シグナル関連因子の発現と脱落膜化との関係
第 21 回 日本胎盤学会学術集会
2013 年 10 月 25 日, ウィンクあいち (名古屋)

草間 和哉, 吉江 幹浩, 田村 和広, 中山 貴裕, 沓掛 真彦, 立川 英一
ヒト子宮内膜腺細胞における cAMP シグナル仲介因子 EPAC2 の役割
第 18 回 日本生殖内分泌学会
2013 年 12 月 7 日 砂防会館 (東京)

寶田 力, 草間 和哉, 吉江 幹浩, 田村 和広, 桑原 直子, 立川 英一
ラット妊娠子宮の脱落膜化における Epac シグナル関連因子の役割
第 72 回 西東京内分泌代謝研究会
2014 年 6 月 9 日, 東京医科大学 (東京)

M. Yoshie, K. Kusama, K. Tamura, T. Daikoku, T. Takarada, and E. Tachikawa
Involvement of cAMP signaling mediators, Epac1, Epac2, and Rap1 in decidualization of rat uterus
The 16th International Congress of Endocrinology & The Endocrine Society's 96th Annual Meeting & Expo
2014 年 6 月 21 日, シカゴ (アメリカ)

吉江 幹浩
子宮内膜間質細胞の脱落膜化と腺の成熟における cAMP シグナル仲介因子 EPAC の役割
第 59 回 日本生殖医学会学術講演会・総会
2014 年 12 月 4 日 京王プラザホテル (東京)

吉江 幹造、田村 和広、草間 和哉、
寶田 力、桑原 直子、立川 英一
ラット妊娠初期子宮における Calreticulin
の発現と脱落膜化との関係
第 19 回 日本生殖内分泌学会
2015 年 1 月 10 日、千里ライフサイエンスセ
ンター（大阪）

田村 和広、吉江 幹造、草間 和哉、今川
和彦、桑原 直子、立川 英一
ヒト子宮内膜間質細胞での EPAC シグナルに
よる C/EBP を介したプロラクチンの発現上
昇
日本薬学会第 135 年会
2015 年 3 月 25 日、神戸学院大学他（神戸）

吉江 幹造、草間 和哉、田村 和広、寶田
力、山崎 梨沙香、桑原 直子、立川 英一
ラットの着床周辺期子宮におけるカルレチ
キュリンの発現と脱落膜化における役割
日本薬学会第 135 年会
2015 年 3 月 25 日、神戸学院大学他（神戸）

K. Tamura, M. Yoshie, K. Kusama, K.
Imakawa, T. Sakurai, H. Bai, H. Nishi, K
Isaka, N. Kuwabara, and E. Tachikawa Epac
signal enhances decidual prolactin
expression via C/EBP expression in human
endometrial stromal cells
International Federation of Placenta
Associations Meeting 2015
2015 年 9 月 8 日ブリスベン(オーストラリア)

M. Yoshie, R. Tamakoshi, K. Tamura, G.
Ishikawa, A. Nakai, T. Takeshita, N.
Kuwabara, and E. Tachikawa
Regulatory action of an intracellular Ca²⁺
in cAMP-induced functional and
morphological differentiation in
trophoblasts
International Federation of Placenta
Associations Meeting 2015
2015 年 9 月 8 日ブリスベン(オーストラリア)

吉江 幹造、田村 和広、草間 和哉、
今川 和彦、井坂 恵一、桑原 直子、立川
英一
ヒト子宮内膜間質細胞において EPAC シグナ
ルは C/EBP を介してプロラクチン発現を上
昇させる
第 20 回日本生殖内分泌学会
2016 年 1 月 9 日、神戸国際会議場（神戸）

〔図書〕(計 1 件)
田村 和広、吉江 幹造
絨毛細胞の分化機序
産婦人科の実際，胎盤 -生理から病態へ-，
62，1033 - 1039，金原出版，2013

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/shinkeiyakuri/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
吉江 幹造 (YOSHIE Mikihiro)
東京薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：50434014

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし