

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10681

研究課題名(和文)子宮内膜症のエストロゲン関連受容体を介した増殖機構解明と新規分子標的治療の提案

研究課題名(英文)Cell proliferation mechanism via estrogen-related receptors in endometriosis

研究代表者

北脇 城 (Kitawaki, Jo)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00204925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症はestrogen依存性疾患の1つであり、その組織では古典的なestrogen受容体(ER)の発現よりもERの発現量の方が高く、さらにestrogen-related receptor(ERR)、
膜貫通型受容体GPER1の発現がある。

本研究では、子宮内膜症由来初代培養細胞系とマウス子宮内膜症モデルを用い、GPER1アゴニストであるG1が非ゲノミック作用によってアポトーシスを誘導することを明らかにした。さらに、弱いエストロゲン作用を持つアグリコン型イソフラボンが、ER-NF κ B経路を介して細胞および嚢胞の増殖を抑制し、炎症因子を阻害することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Endometriosis is one of estrogen-dependent diseases. In endometriosis tissue, the expression level of estrogen receptor (ER) is higher than that of ER. Endometriosis also expresses estrogen-related receptor (ERR), and a transmembrane receptor GPER1. Using primary cultured cell line derived from endometriosis and mouse endometriosis model, we demonstrated that G1, a GPER1 agonist, induces apoptosis by non-genomic action. Furthermore, we demonstrated that AglyMAX, an aglycone-type isoflavone with weak estrogen action, suppresses proliferation of endometriotic cells and cystic lesion of mouse model via the ER-NF κ B pathway. AglyMAX inhibits various inflammatory factors.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮内膜症 エストロゲン関連受容体 GPER1 アグリコン型イソフラボン

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は、子宮内膜様の組織が子宮腔の以外の異所性に存在する疾患であり、主として卵巣および腹膜に発生する。生殖年齢女子宮内膜症は、子宮内膜様の病変が子宮以外の主として骨盤内に発生する病態であり、その有病率は性成熟期女性の約10%、有病者数は国内で130万人、受療者数は12.8万人と推定され、晩婚・晩産・少子・少産化に伴って増加傾向にある。月経痛、慢性骨盤痛、性交痛などの疼痛および不妊をもたらすことによって、女性の quality of life を著しく損ねる慢性疾患である。良性疾患ではあるが、現在克服すべき重要な疾患の1つである。

子宮内膜症は、主として10歳代後半から性成熟期にかけて発生し、閉経や卵巣摘出によりその多くが退縮することから、エストロゲン依存性に増殖することには異論がない。一般に、体循環のエストロゲンは標的細胞内に入り、核内のERと結合、この複合体がゲノム上の標的遺伝子上流プロモーターの estrogen response element (ERE) に直接結合することによって下流の mRNA 転写を促進する。実際、エストロゲン依存性腫瘍である乳癌では主として ER α が発現し、この機序によって増殖を促進する。正所性子宮内膜にももっぱら ER α が発現しており、エストロゲン作用が率直に発揮される。

しかしながら、子宮内膜症組織の増殖はこのような単純な古典的経路によらないことが下記のように次第に明らかになってきた。

(1) 子宮内膜症組織では正所性子宮内膜と異なり ER β が ER α より多く発現する。過剰発現した ER β が ER α と共通の結合部位である ERE を占拠することによって ER α の作用を阻害する¹⁾。

(2) リガンド未知のオーファン核内受容体として発見された ERR は ER と非常に類似した構造を有するが、その作用は未だ十分に明らかにされていない。ERR は ER と同様に ERE やその half site である ERRE を認識するが、ER の ERE を介した作用に対して促進/抑制的に働くことでエストロゲン応答を修飾する。ERR には α 、 β 、 γ の3種のサブタイプがある。我々は、子宮体癌において ERR α が ER α を介するエストロゲン応答を抑制すること²⁾、子宮頸癌において ERR γ がエストロゲン非依存性に VEGF の転写や発現を制御することを示してきた³⁾。また ERR γ が子宮体癌の予後不良因子であることを明らかにし、ERR γ をターゲットとした治療が新たな内分泌療法となりうる可能性について世界に先駆けて示してきた⁴⁾。子宮内膜症組織においても ERR が発現することを我々は予備実験で確認している。

(3) 子宮内膜症組織にはエストロゲン生合成酵素アロマターゼが過剰発現しており、病変自らが局所でエストロゲンを産生しその濃度を高めていることを、我々は初めて明らかにした⁵⁾。そしてごく最近、ERR α の代表

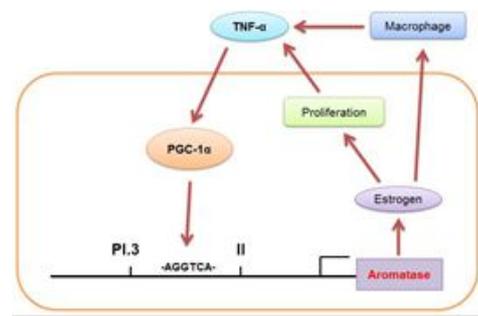


図1 PGC-1 α とアロマターゼによる子宮内膜症増殖の悪循環

的共役因子である PGC-1 α が子宮内膜症性卵巣嚢胞においてアロマターゼ発現を亢進させ局所エストロゲン濃度を上昇させていることを明らかにし(図1)⁶⁾、アロマターゼを阻害する治療薬の効果を示してきた^{7,8)}。

(4) さらに、細胞膜貫通型の G 蛋白共役受容体である GPER1 が非ゲノミック作用による速いエストロゲン応答を担っている⁹⁾。しかし、その作用は未だ十分に明らかにされていない。子宮内膜症組織においても GPER1 が発現することを我々は予備実験で確認している。

このように、我々は約21年間子宮内膜症とホルモン依存性について研究を続けてきた。平成10年度からは世界に先駆けて子宮内膜症の遺伝子多型の解析に着手し、ホルモン関連遺伝子をはじめとするさまざまな遺伝子多型が子宮内膜症の発生リスクに関連することを一流英文誌に発表してきた(H13-14、H15-16、H19-20 科研費)¹⁰⁻¹²⁾。また、子宮内膜症性卵巣嚢胞の悪性転化に関与する loss of heterozygosity の情報に基づく癌関連遺伝子近傍の遺伝子変異を明らかにしてきた(H21-23、H24-26 科研費)¹³⁾。そして、国内外のグループと共同して子宮内膜症の発生機序の解明、治療法の開発、臨床試験の多くに関わってきた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、子宮内膜症組織あるいは子宮内膜症性卵巣嚢胞由来の初代培養細胞系を用いて、(1) ER β 、GPER1、および ERR α -PGC-1 α を介した異常なエストロゲン代謝とシグナル伝達経路の分子制御機構を検討し、そして(2)子宮内膜症の新たな分子標的治療の基礎的な戦略を提案した。

3. 研究の方法

(1) 子宮内膜症組織

京都府立医科大学医学倫理審査委員会の承認および患者の同意を得て、子宮内膜症性卵巣嚢胞の手術時に採取する子宮内膜症組織、および対照として同じ患者および非子宮内膜症患者の正所性子宮内膜を用いた初代細胞培養系を使用した。

(2) 子宮内膜症間質細胞の細胞増殖抑制は WST-8 アッセイ、コロニーフォーメーションアッセイで測定、IL-6、IL-8、アロマトラーゼおよび COX-2 の遺伝子発現をリアルタイム PCR で測定、プロスタグランジン (PG) E₂ のタンパクレベルを ELISA で、アロマトラーゼ酵素活性をトリチウム水法で測定した。アロマトラーゼの免疫染色には、我々が新規に開発した感度特異度の高い抗体を使用した。ベクターや siRNA を用いて遺伝子導入させた。NF-κB 関連タンパクレベルはウェスタンプロットおよび蛍光免疫染色で測定した。

(3) 子宮内膜症モデルマウス

BALB/c マウスに同種マウスの細切した子宮組織を腹腔内に移植したものをを用いた。腹腔内に形成される嚢胞の個数や重量を計測する。Ki67 免疫染色で増殖能を、炎症関連分子の発現は免疫染色で評価した。

4. 研究成果

(1) GPER1 アゴニストである G-1

GPER1 が子宮内膜症において高発現を示すことはすでに報告されているが、どのように子宮内膜症進展に関与するかは明らかではなかった。そのため、GPER1 のアゴニストとして知られる G-1 を用いてその作用を検証した。

その結果、G-1 は ESC 増殖を濃度依存的に抑制したが、GPER1 が阻害された場合、阻害効果は阻害されなかった。GPER1 自体を含むシグナル伝達経路は阻害された。G-1 は、サブ G1 期の細胞周期停止および蓄積を誘導した。さらに、免疫蛍光分析により G-1 が有糸分裂段階で微小管集合を中断することを示した。

これらのことから、G-1 は子宮内膜症間質細胞培養系において GPER1 非依存的に働き、有意な細胞傷害性を伴わずにカスパーゼ 3 依存性アポトーシスを誘導することが示された。正常子宮内膜においても増殖抑制効果を示すなど、今後創薬を実現させるためにはいまだ課題はあるが、本化合物の作用機序を解明する意義は高い (Mori T et al, Fertil Steril 2015; 論文) (図 2)。

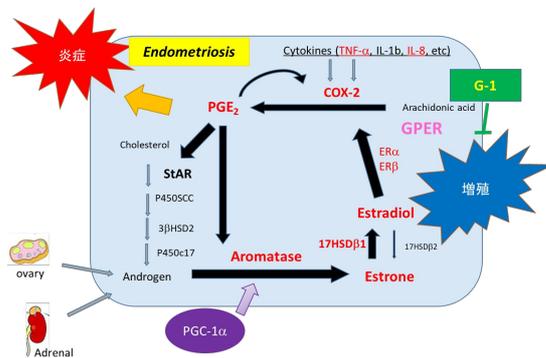


図 2 子宮内膜症組織における GPER1 の増殖抑制作用

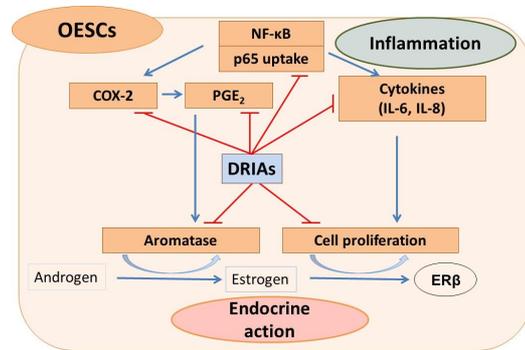


図 3 子宮内膜症の病態におけるアグリコン型イソフラボンの作用

(2) Daidzein-Rich Isoflavone Aglycone (DRIAs)

ERRα のアゴニスト候補として genistein や daidzein など植物エストロゲンが知られている。これらは同時に ER 類似作用を有している。そこで我々は、アグリコン型イソフラボンである DRIAs のヒト子宮内膜症間質細胞および子宮内膜症モデルマウスにおける薬剤効果を、グリコシド型イソフラボンであるイソフラボン 40 と比較しつつ、検討した。

DRIAs は濃度依存性に子宮内膜症間質細胞の増殖を抑制したが、正常子宮内膜の増殖抑制はしなかった。イソフラボン 40 は子宮内膜症、正常子宮内膜ともに増殖抑制はしなかった。DRIAs は IL-6、IL-8、アロマトラーゼおよび COX-2 の遺伝子発現、さらに PGE₂、アロマトラーゼ酵素活性を抑制した。DRIAs は子宮内膜症間質細胞において、TNF-α によって促進される IκB のリン酸化を抑制し、蛍光免疫染色で p65 の核内取り込みを阻害した。エストロゲンレセプター (ER) β アンタゴニストの PHTPP は DRIAs の増殖抑制効果を抑制した。DRIAs は ERβ を介して SGK1 を抑制し、それが NF-κB を抑制した。DRIAs は子宮内膜症モデルマウスの嚢胞形成を抑制したが、イソフラボン 40 は抑制効果を示さなかった。

以上より、DRIAs は ERβ-NF-κB 経路を介して子宮内膜症の細胞増殖を抑制し、子宮内膜症モデルマウスの病変形成を抑制した (Takaoka O, et al. J Steroid Biochem Mol Biol, in press) (図 3)。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 12 件)

Tanaka Y, Mori T, Ito F, Koshiba A, Takaoka O, Kataoka H, Maeda E, Okimura H, Mori T, Kitawaki J. Exacerbation of endometriosis due to regulatory T cell dysfunction. J Clin Endocrinol Metab 102(9):3206-3217, 2017 査読有

doi: 10.1210/jc.2017-00052

Kanomata N, Matsuura S, Nomura T, Kurebayashi J, Mori T, Kitawaki J, Moriya T. Preparation of a novel antiserum to aromatase with high affinity and specificity: Its clinicopathological significance on breast cancer tissue. *PLoS One* 12(5):e0177439, 2017 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0177439

Waratani M, Mori T, Ito F, Tanaka Y, Koshihara A, Takahata A, Kitawaki J. Increased ipsilateral uterine artery vascular resistance in women with ovarian endometrioma. *J Obstet Gynaecol Res* 43(4):736-743, 2017 査読有
doi: 10.1111/jog.13266

Koshihara A, Mori T, Ito F, Tanaka Y, Takaoka O, Takahata A, Kitawaki J. Enlarged uterine corpus volume in women with endometriosis: Assessment using three-dimensional reconstruction of pelvic magnetic resonance images. *J Obstet Gynaecol Res* 43(1):157-163, 2017 査読有
doi: 10.1111/jog.13153

Tanaka Y, Mori T, Ito F, Koshihara A, Kusuki I, Kitawaki J. Effects of low-dose combined drospirenone-ethinylestradiol on perimenstrual symptoms experienced by women with endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 135(2):135-139, 2016 査読有
doi: 10.1016/j.ijgo.2016.05.004

Khan KN, Fujishita A, Kitajima M, Masuzaki H, Nakashima M, Kitawaki J. Biological differences between functionalis and basalis endometria in women with and without adenomyosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 203:49-55, 2016 査読有
doi: 10.1016/j.ejogrb.2016.05.012

Ito F, Mori T, Takaoka O, Tanaka Y, Koshihara A, Tatsumi H, Iwasa K, Kitawaki J. Effects of drospirenone on adhesion molecule expression and monocyte adherence in human endothelial cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 201:113-117, 2016 査読有
doi: 10.1016/j.ejogrb.2016.03.044

Khan KN, Fujishita A, Masumoto H, Muto H, Kitajima M, Masuzaki H, Kitawaki J. Molecular detection of intrauterine microbial colonization in women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 199:69-75, 2016 査読有
doi: 10.1016/j.ejogrb.2016.01.040

Tarumi Y, Mori T, Kusuki I, Ito F, Kitawaki J. Endometrioid

adenocarcinoma arising from deep infiltrating endometriosis involving the bladder: A case report and review of the literature. *Gynecol Oncol Rep* 13: 68-70, 2015 査読有

doi: 10.1016/j.gore.2015.07.003

Mori T, Ito F, Matsushima H, Takaoka O, Koshihara A, Tanaka Y, Kusuki I, Kitawaki J. Dienogest reduces HSD17 β 1 expression and activity in endometriosis. *J Endocrinol* 225:69-76, 2015 査読有

doi: 10.1530/JOE-15-0052

Mori T, Ito F, Matsushima H, Takaoka O, Tanaka Y, Koshihara A, Kusuki I, Kitawaki J. G protein-coupled estrogen receptor 1 agonist G-1 induces cell cycle arrest in the mitotic phase, leading to apoptosis in endometriosis. *Fertil Steril* 103:1228-35, 2015 査読有

doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.01.026

Yamamoto T, Mori T, Sawada M, Matsushima H, Ito F, Akiyama M, Kitawaki J. Loss of AF-6/afadin induces cell invasion, suppresses the formation of glandular structures and might be a predictive marker of resistance to chemotherapy in endometrial cancer. *BMC Cancer* 15:275-284, 2015 査読有

doi: 10.1186/s12885-015-1286-x

[学会発表](計10件)

北脇 城. 女性医学からみる子宮内膜症. 学会賞受賞講演. 第32回日本女性医学学会2017.11.5, 大阪.

北脇 城. 会長講演 女性医学における子宮内膜症. 第31回日本女性医学学会. 2016.11.5, 京都.

Kitawaki J. Endometriosis in women's health care. The 8th Globe Conference of Chronic Pelvic Pain and Endometriosis. 2017 June 30; Beijing, Republic of China.

Kitawaki J. Long-term management of endometriosis-associated pelvic pain. 5th Asian Conference on Endometriosis 2016 September 22-24; Osaka.

Kitawaki J. Hormonal treatment in endometriosis. Golden Jubilee Ramathibodi OB-Gyn Congress, 2016 August 11; Bangkok, Thailand.

Kitawaki J. Long-term medical treatment of endometriosis-associated pelvic pain. 2016 Diphereline Summit on Endometriosis. 2016 March 19; Foshang, Republic of China.

Kitawaki J. Current management of endometriosis-associated infertility. 10th Biennial Meeting of Pacific Society for Reproductive Medicine (PSRM 2015).

2015 November 29; Seoul, Korea.

Kitawaki J. Long-term medical treatment of endometriosis-associated pelvic pain. 6th Globe Conference of Chronic Pelvic Pain and Minimal Invasive Surgery. 2015 August 21; Beijing, Republic of China.

Kitawaki J. Long-term management of endometriosis-associated pelvic pain. 2nd Japan China Medical Exchange Forum. 2015 May 13; Tokyo.

Kitawaki J. Impact of ovarian endometrioma per se and surgery on ovarian reserve and pregnancy rate in in vitro fertilization cycles. 1st congress or the society of endometriosis and uterine disorders. 2015 May 7-9; Paris, France.

〔図書〕(計1件)

北脇 城 . 21 . 産婦人科疾患 . 子宮内膜症 . 今日の診断指針 第7版 . 金澤一郎、永井良三 総編集 . 医学書院 , 東京 : pp 1799-1800, 2015

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称 : 子宮内膜症改善用素剤の製造方法

発明者 : 天海智博、重廣宗一郎、北脇 城、高岡 宰

権利者 : 二チモウ株式会社、京都府公立大学法人

種類 : 特許

番号 : 国際出願 PCT/JP2018/007328

出願年月日 : 平成30年2月27日

国内外の別 : 国内、国外

取得状況 (計1件)

名称 : 卵巣癌の検出方法、並びに、キット

発明者 : 中田 博、秋田 薫、池原 譲、成松 久、中西速夫、北脇 城

権利者 : 学校法人京都産業大学、独立行政法人産業技術総合研究所、京都府公立大学法人

種類 : 特許

番号 : 5686431

出願年月日 : 平成23年1月28日

取得年月日 : 平成27年1月30日

国内外の別 : 国内

〔その他〕

ホームページ等

京都府立医科大学産婦人科学教室

<https://obgy-kpum.com>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

北脇 城 (KITAWAKI, Jo)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号 : 00204925