

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K20169

研究課題名(和文)血管新生と低酸素誘導因子HIF-1に着目した子宮内膜症の新規治療戦略

研究課題名(英文)A novel therapeutic strategy for endometriosis focusing on angiogenesis and the hypoxia-inducible factor:HIF-1

研究代表者

都築 朋子(TSUZUKI, Tomoko)

関西医科大学・医学部・嘱託医員

研究者番号：00465642

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)：子宮内膜症病変の進展にはHIF-1を介した血管新生が関与していると考えられており、本研究では血管新生因子の調節機構を明らかにすることを目的とした。異所性子宮内膜細胞(eESC)では正所性子宮内膜に比してVEGF分泌が高く、低酸素でVEGF分泌が上昇、VEGF転写因子のHIF-1の発現が増加した。また低酸素で誘導されたVEGF分泌はHIF-1阻害剤のエキノマイシン(EM)で抑制された。子宮内膜症治療薬のプロゲステロン製剤がVEGF分泌に影響を与えないことを明らかにし、EMはこれまでのホルモン製剤とは異なる機序でeESCの増殖を抑制することを解明した。またEMによりeESCのアポトーシスが誘導された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜症病変の進展に重要と思われる血管新生因子の発現とその調節機構の一部を解明することができた。またHIF-1阻害剤のEMはこれまでのホルモン製剤とは全く異なる機序で異所性子宮内膜細胞の増殖を抑制し、子宮内膜症の治療薬となる可能性を持っている。またEMは子宮内膜症への作用として血管新生因子の阻害のみならずアポトーシス効果も期待できる薬剤であることがわかった。本研究により子宮内膜症における血管新生の新たな制御機構を解明し、さらに血管新生因子やHIF-1をターゲットとした新規治療戦略として、実地診療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Recent evidence points to a possible role for HIF-1 in the development of endometriosis. The objectives of this study were to investigate the critical role of HIF-1 in endometriosis and the effect of the HIF-1 inhibitor echinomycin on human ectopic endometriotic stromal cells (eESCs). Hypoxic stress induced expression of HIF-1 α protein and VEGF production in eESCs, and VEGF production was significantly suppressed by treatment of echinomycin without causing cell toxicity. Synthetic progestins, including MPA and DNG, are used to treat endometriosis. In the present study, we were unable to demonstrate the inhibitory effects of MPA and DNG on VEGF production in eESCs. Therefore, echinomycin might be more useful than progestins as an inhibitor of VEGF production to regulate the angiogenesis of endometriosis. Moreover, echinomycin inhibited cell proliferation and induced apoptotic cell death of the eESCs, and significantly inhibited expression of the anti-apoptotic proteins.

研究分野：産婦人科

キーワード：異所性子宮内膜 VEGF HIF-1 エキノマイシン アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は、良性の疾患でありながら、悪性腫瘍と同様に転移・播種・再発を起こす特徴から、類腫瘍病変と位置付けられている。その病因・病態についてはいまだ不明な点が多いが、病変が増大していく過程において細胞の増殖と血管新生は必須の条件である。血管内皮増殖因子 (VEGF) を代表とする、血管新生を誘導あるいは促進する各種因子の発見とその産生・分泌制御機構の研究が各種臓器で急速に進み、これらに関連する分子を標的とした抗腫瘍薬は臨床応用されるまでになっている。子宮内膜症において VEGF は、病変進展の鍵となることが示唆されるが、局所におけるその制御機構については解明されていない。現在、子宮内膜症に対する薬物療法として、プロゲスチン、低用量ピル、GnRH アゴニストなどのホルモン薬剤が主流である。これらの薬剤は効果的ではあるが、長期投与による副作用や高い再発率が問題であり、新しい薬物療法の開発が求められている。本研究において、血管新生因子や HIF-1 が子宮内膜症の発症・進展に中心的な役割を担っていることが解明されれば、血管新生因子や HIF-1 をターゲットとした新規治療戦略として、実地診療への応用が期待される。

報告者らはこれまで正所性子宮内膜において、月経期の虚血 (低酸素環境)、性ステロイドホルモンの制御下にある子宮内膜の月経周期 (増殖期と分泌期) に着目して、さまざまな血管新生因子とこれらの調節機構について研究を行ってきた (Tsuzuki et al, Hum Reprod. 2012; Tsuzuki et al, Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2013)。正所性子宮内膜における血管新生はさまざまな促進および抑制因子のバランスによって調整されると考えられている。正所性子宮内膜において月経期から増殖期初期での低酸素環境下で、VEGF 産生は低酸素誘導因子 (Hypoxia inducible factor; HIF)-1 シグナル経路を介して促進されるという、局所における血管新生の制御機構を解明した。しかしながら、血管新生因子や HIF-1 が子宮内膜症の細胞レベルでどのように制御されて、機能しているのか全く分かっていない。子宮内膜症 (異所性子宮内膜) と正所性子宮内膜における血管新生には共通点や相違点があると考えられ、本研究では子宮内膜症における血管新生因子の発現とその調節機構を解明し、病態進展のメカニズムを解明することによって、血管新生因子や転写因子 HIF-1 を標的とした治療戦略の開発を目指した。

2. 研究の目的

前述の背景およびこれまでの研究成果をもとに、子宮内膜症における血管新生因子の解明されていない基礎研究を完成し、血管新生因子を利用した新しい診断方法や治療法への臨床応用に展開するための基盤となる研究を行った。研究期間内に以下のことを明らかとすることを目的とした。

(1) 異所性子宮内膜と正所性子宮内膜における血管新生因子の発現動態を明らかとする

異所性および正所性の培養ヒト子宮内膜細胞を用いて、血管新生因子である VEGF の分泌能の変化を明らかとする。

(2) 低酸素誘導因子 (HIF) -1 の発現とその阻害剤による血管新生因子への影響

VEGF の転写を促進する転写因子として知られている HIF-1 の発現変化を同定し、その阻害剤による血管新生因子の分泌能への影響を検討する。

(3) 子宮内膜症治療薬であるプロゲスチンによる子宮内膜症細胞への影響

子宮内膜症治療薬として用いられているプロゲスチンが、子宮内膜症細胞で血管新生因子を調節しているのかを解明する。さらにプロゲスチンと HIF-1 阻害薬との効果の比較や相互作用を検討する。

(4) 細胞増殖能やアポトーシスへのHIF-1阻害薬による効果

異所性子宮内膜細胞を用いて、HIF-1阻害薬による細胞増殖抑制効果やアポトーシスへの影響を解析することにより、HIF-1の機能を明らかとする。

3. 研究の方法

(1) 研究材料組織と細胞培養

研究材料は、患者の同意のもとに関西医科大学附属病院および関連施設において、各種良性病変に対して行われる子宮摘出手術、子宮内膜症性嚢胞摘出術などで得られた組織を採取した。本研究における検体採取に関して学内倫理委員会で承認済みである。分子生物学的機能解析のために、採取組織を機械的およびコラゲナーゼを用いて酵素的に融解して、ヒト子宮内膜間質細胞の分離培養を行い、子宮内膜症組織から得られた細胞を異所性子宮内膜症細胞として用いた。

(2) 薬剤による低酸素刺激

塩化コバルトは20%酸素下で低酸素状態を作り出すことができるため、低酸素刺激による血管新生因子の変化が確認できる。培養細胞に添加する塩化コバルトによる薬剤性の直接的な細胞障害を除外するために、LDHアッセイを用いて定量して、塩化コバルトの至適濃度を同定した。

(3) VEGF分泌能の解析

培養液中のVEGF濃度をELISA法にて測定してそれらの分泌能を比較検討した。

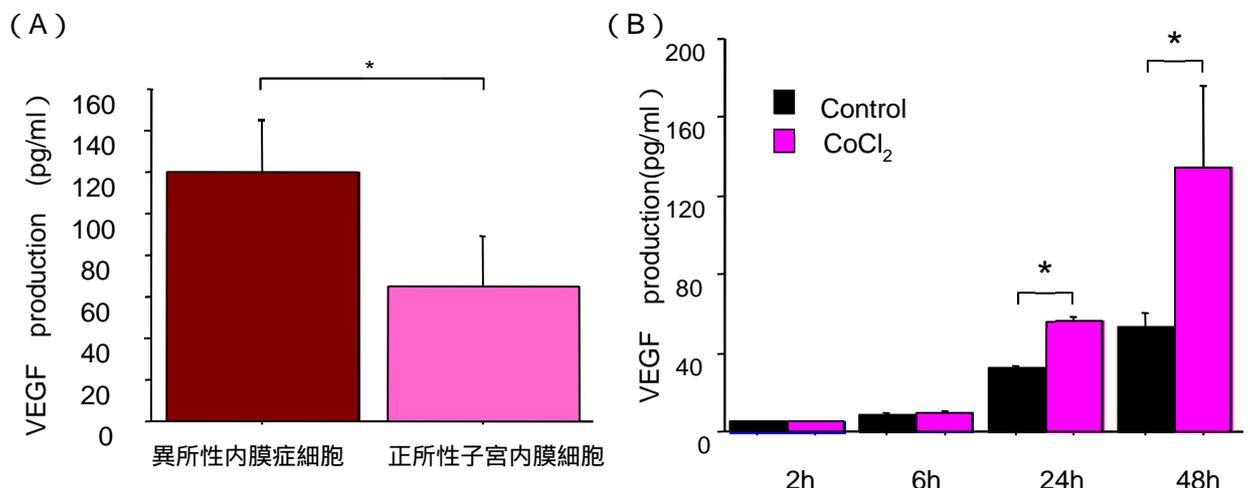
(4) HIF-1、Bcl-xL、Bcl-2発現の解析

細胞から蛋白を抽出して、それぞれのモノクローナル抗体を用いてウエスタンブロット法にてバンドを確認した。

4. 研究成果

(1) 異所性子宮内膜と正所性子宮内膜における血管新生因子の発現動態

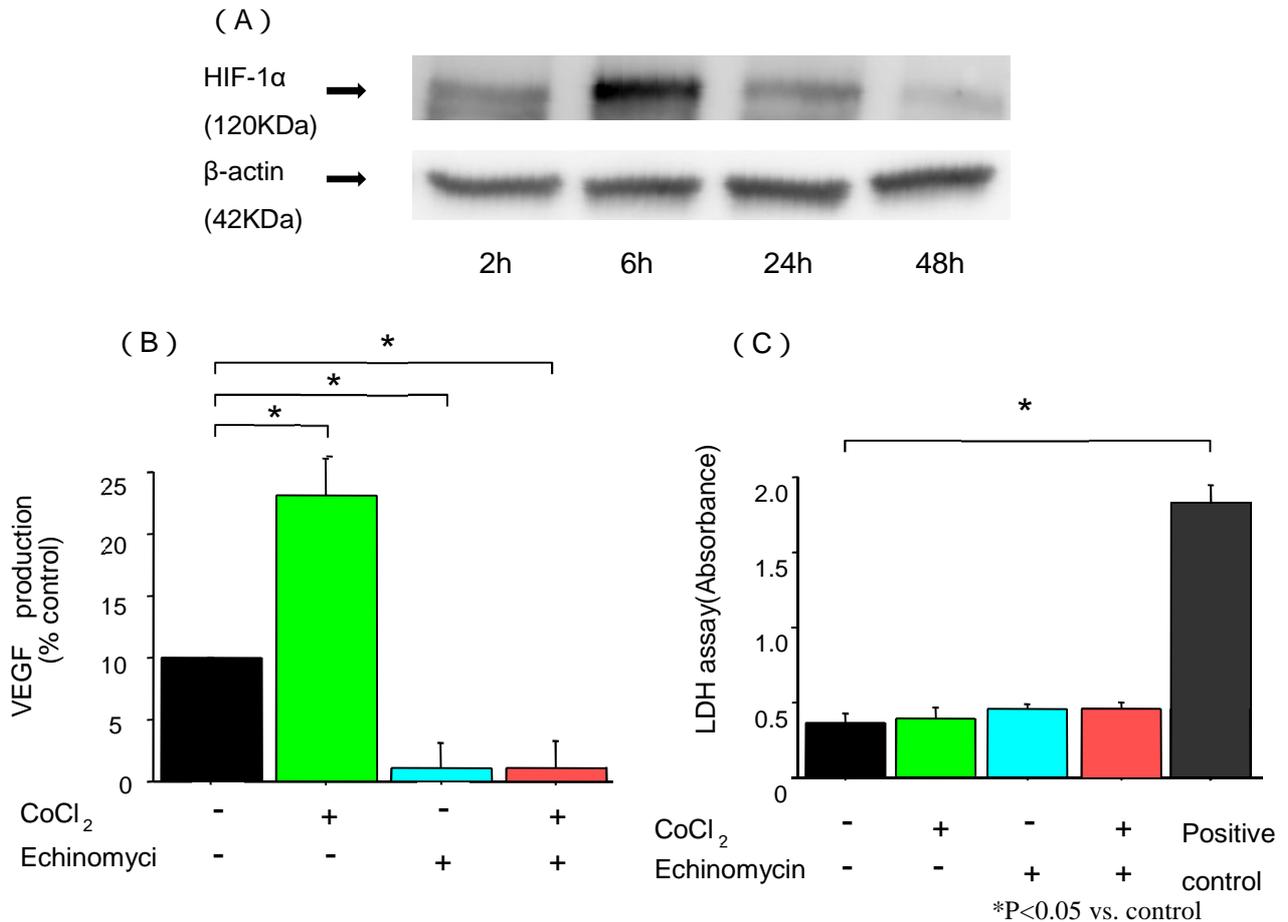
異所性および正所性の培養ヒト子宮内膜細胞を用いて、通常酸素濃度における血管新生因子であるVEGFの分泌能の変化を検討したところ、異所性内膜症細胞は正所性子宮内膜細胞より有意にVEGF分泌量が高かった(A)。また塩化コバルトでの低酸素環境模倣環境において時間依存的にVEGF分泌量が増加することを確認した(B)。



*P<0.05 vs. control

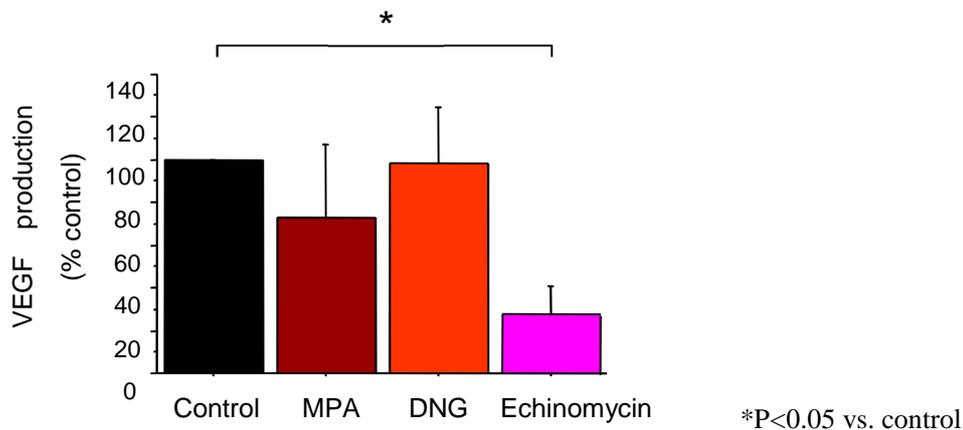
(2) HIF-1の発現とその阻害剤：エキノマイシンによる血管新生因子への影響

異所性子宮内膜におけるHIF-1の発現を調べた。塩化コバルトを添加培養した子宮内膜症細胞から抽出した蛋白を用いてウエスタンブロット法にてHIF-1の発現を確認し、HIF-1の発現ピークが培養6時間後であることを明らかにした(A)。また塩化コバルトによって増加したVEGF分泌がエキノマイシン100nMで抑制され(B)、エキノマイシンによる細胞障害性がないことをLDHアッセイで確認した(C)。



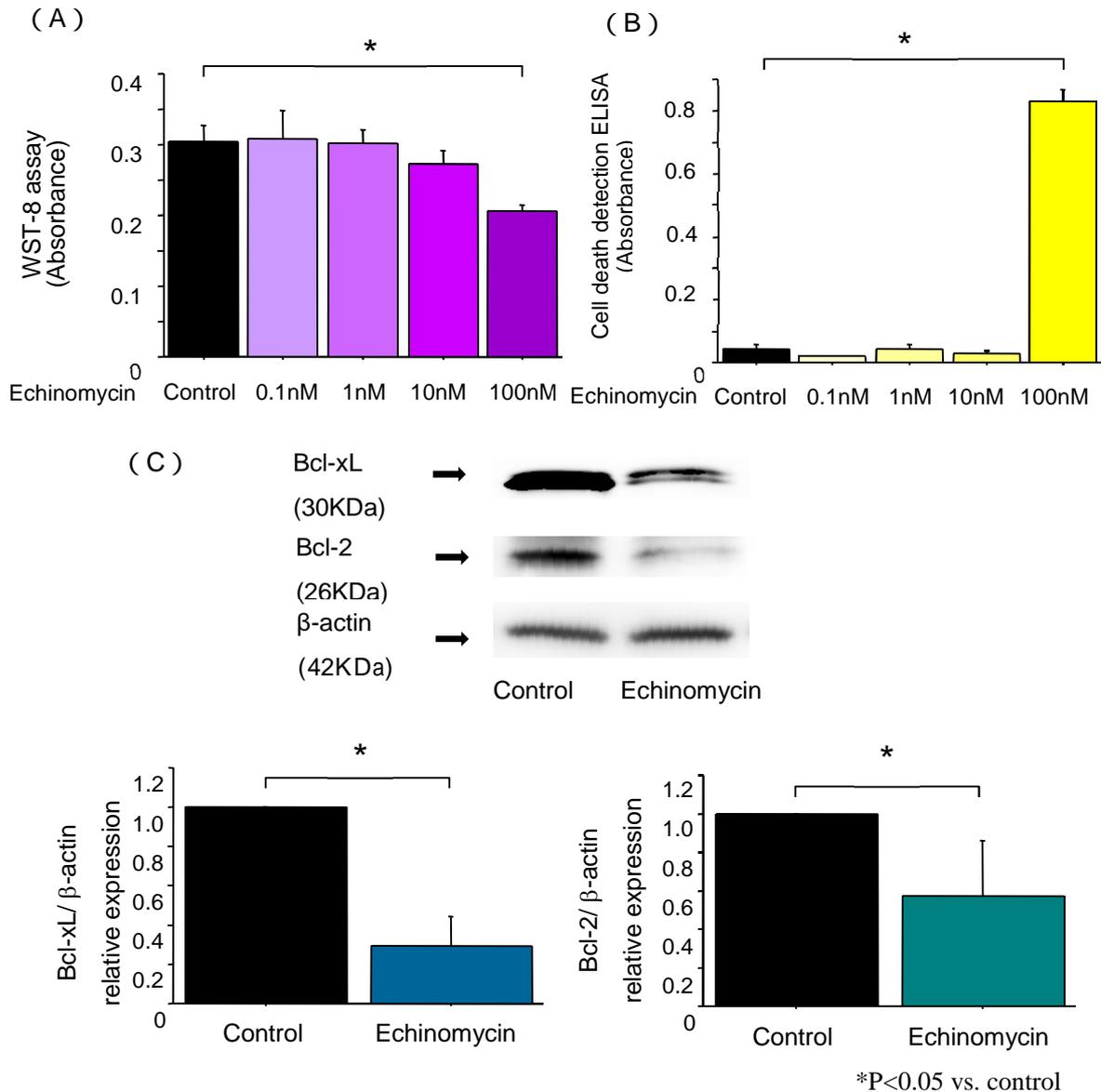
(3) 子宮内膜症治療薬であるプロゲステンによる子宮内膜症細胞への影響

現在、子宮内膜症治療の薬物療法としては低用量ピルやプロゲステン製剤などの内分泌療法が主流である。プロゲステンとHIF-1阻害剤による血管新生因子の分泌能への影響を検討したところ、治療域のメドロキシプロゲステロン(MPA)やジェノゲスト(DNG)などのプロゲステン製剤を異所性子宮内膜細胞に添加してもVEGF分泌は抑制されず、エキノマイシンのみVEGF分泌抑制作用があることがわかった。



(4) 細胞増殖能やアポトーシスへのHIF-1阻害薬による効果

HIF-1阻害薬は癌細胞のアポトーシスを誘導するという報告があるが、子宮内膜症細胞においてその作用はまだ不明である。子宮内膜症細胞にHIF-1阻害剤を添加培養して(A)細胞増殖能、(B)アポトーシス効果、(C)アポトーシス促進および抑制因子への影響について検討した。WST-8アッセイにて細胞増殖能を検討し、エキノマイシンによる細胞増殖能への影響がないことを確認した(A)。断片化したDNAを測定するCell death detection ELISAにてアポトーシス効果を検討したところ、エキノマイシン100nMでアポトーシス効果を認めた(B)。エキノマイシンによるアポトーシス効果のシグナル経路を検討するため、代表的なアポトーシス抑制因子のBcl-xL、Bcl-2の発現をウエスタンブロット法にて解析すると、エキノマイシン群でBcl-xL、Bcl-2蛋白発現の低下を認めた(C)。



以上の結果よりエキノマイシンはこれまでのホルモン製剤とは全く異なる機序で異所性子宮内膜細胞の増殖を抑制し、子宮内膜症の治療薬となる可能性を持っている。またエキノマイシンは子宮内膜症への作用として血管新生因子の阻害のみならずアポトーシス効果も期待できる薬剤であることがわかった。本研究により子宮内膜症における血管新生の新たな制御機構を解明し、さらに血管新生因子やHIF-1をターゲットとした新規治療戦略として、実地診療への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuzuki T, Okada H, Shindoh H, Shimoi K, Nishigaki A, Kanzaki H	4. 巻 4
2. 論文標題 Effects of the hypoxia-inducible factor-1 inhibitor echinomycin on vascular endothelial growth factor production and apoptosis in human ectopic endometriotic stromal cells.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Gynecological Endocrinology	6. 最初と最後の頁 323-328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3109/09513590.2015.1121225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomoko Tsuzuki
2. 発表標題 Effects of the hypoxia-inducible factor-1 inhibitor echinomycin on vascular endothelial growth factor production in human ectopic endometriotic stromal cells
3. 学会等名 Asian Conference on Endometriosis (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 都築朋子 高畑暁 村田紘未 小野淑子 岡田園子 吉村智雄 好村正博 下井華代 岡田英孝
2. 発表標題 妊孕性温存の受精卵凍結から妊娠・分娩まで管理できた乳癌の1症例
3. 学会等名 第33回日本受精着床学会学術講演会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 木田尚子 都築朋子 木戸健陽 小林真以子 岡野友美、小野 淑子、岡田 園子、村田紘未 岡田英孝
2. 発表標題 当院における妊孕性温存の現状とその展望
3. 学会等名 第69回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naoko Kida, Tomoko Tuzuki, Mio Matsumoto, Takeharu Kido, Maiko Kobayashi, Yoji Hisamatsu, Hiromi Murata, Yoshiko Ono, Sonoko Okada, Hidetaka Okada
2. 発表標題 Two cases of the fertility preservation for ovarian malignant tumor to reconfirm the importance of the oncofertility network
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 好村正博 中尾朋子 下井華代 馬場真有美 木田尚子 岡田園子 小野淑子 岡田英孝
2. 発表標題 当院における若年女性がん患者に対する未受精卵子凍結の現状
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中尾朋子 木田尚子 黒田優美 吉田彩 村田紘未 小野淑子 岡田園子 岡田英孝
2. 発表標題 当院における妊孕性温存の現状とその展望
3. 学会等名 第71 回日本産科婦人科学会学術講演
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 都築朋子、吉村智雄、岡田英孝	4. 発行年 2016年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 390
3. 書名 不妊・不育症診療パーフェクトガイド	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----