

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11095

研究課題名(和文) Semaphorin-Neuropilin系の視点からの子宮内膜症の病態解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of endometriosis associated with Semaphorin-Neuropilin pathway

研究代表者

西田 正和(Nishida, Masakazu)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：90404384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症においてsemaphorin 3Bおよびそのレセプターであるneuropilin2の発現異常を確認し、更にその下流であるPI3kinase-Akt系に伝達の異常があり、Aktのリン酸化の異常があることを発見した。子宮内膜症細胞において、この細胞伝達系の異常から、子宮内膜症細胞はアポトーシス耐性があり、生体内に生着・分散し、病状が進行していくことが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜症は様々な病因があり、その発症には諸説あるものの、現在でもその本質的な原因は不明のままである。今回、我々は、semaphorin-neuropilin系、更にその下流にあるPI3-kinase-Akt系に異常があると考え研究を進めていった。その結果、子宮内膜症細胞においてはsemaphorin3Bの発現異常、Aktのリン酸化の異常が認められ、この現象が子宮内膜症の病因の一つになりえるのではないかと考えている。現在、抗がん剤の領域でもAkt阻害剤関連の研究が進んでおり、子宮内膜症の領域においても同様に治療薬の候補となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We elucidated that the expression of semaphorin 3B and neuropilin 2 in endometriotic cells compared with normal endometrial cells. Moreover, we found the abnormal expression of PI3kinase and dis-phosphorylation of Akt in endometriotic cells. This disorder of the signal pass way might associate with the pathogenesis of endometriosis

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：endometriosis semaphorin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の研究室では、長年子宮内膜症の病因を解明し、将来的な治療薬としての応用を目的として研究を進めている。

私は以前、2008年～2009年 UCSF の Dr. Fisher の研究室で重症妊娠高血圧症候群では、semaphorin (SEMA) 3B 過剰発による PI3k-akt 系のシグナル伝達異常のためアポトーシスが促進していることを発見し、JCI へ報告した (Zhou et al., JCI, 2013)。

SEMA: 神経細胞の再生に関与するタンパク群として発見されたが、近年、癌細胞の転移の調整因子など幅広い機能を持つことが判明してきている。

NRP: 細胞外領域と PDZ ドメインを含む細胞内領域を有する膜 1 回貫通型レセプターで、SEMA や VEGF がリガンドとなり軸索誘導や血管新生制御を行う。

子宮内膜症細胞に認められる SEM3B の発現異常があることはすでに発見しており、neuropilin (NRP) は SEMA のレセプターであるが、PI3k-AKT の経路に細胞伝達が伝わることは知られている。今回、この伝達の異常を調査し、さらにこの現象がジェネテックレベルでの異常なのか、あるいは何らかのエピジェネティックな異常があるのか、より詳細な検討を行っていく。更に、SEMA のリガンドである VEGF を子宮内膜症細胞に作用することで、この伝達異常の改善が認められるか検討し、将来の治療薬の開発に役立てる予定である。

2. 研究の目的

子宮内膜症の病因は月経血の逆流説、体腔上皮化生説など緒説あるが、その根本的な病因は不明である。我々は、長年子宮内膜症の病態解明および治療薬の開発に取り組み、日々研究を進めている。

今回、上述した通り子宮内膜症細胞の病因について、SEMA3B とそのレセプターである NRP2 の発現異常が PI3k-akt 系のシグナル伝達に影響すると仮説を立てて、実験を進めていく。

今回の研究では、

- (1) この SEMA 3B の関与した伝達異常についてについて、mRNA レベルでも解析を行い、ジェネティックあるいはエピジェネティックな要因により引き起こされるのか検討
- (2) NRP2 のリガントでもある VEGF を子宮内膜症細胞に作用させることで PI3k-akt 系のシグナル伝達経路が正常化するのか、という疑問に対しても機能的解析を行う。

子宮内膜症の病態に SEMA 3B-NRP2 系を介した PI3k-akt 系のシグナル伝達異常に関与することについて、報告はされていない。更に、今回検討するシグナル伝達系に着眼した子宮内膜症治療薬の開発について、その可能性が見いだせると思われる。

3. 研究の方法

・ SEMA3B、NRP2 の mRNA 発現の検討 培養した子宮内膜症細胞より total RNA を抽出 (RNeasy Kit、QIAGEN 使用) Primer design (Kim WH et al., 2009 より)

Forward: 5'-GTGGTTCATCTTGACCTTGT-3 Reverse: 5'-ATTCTTCTTCTGCAACCTCA-3

これを用いて、下記の条件で PCR を施行 (PCR easy kit, invitrogen) し、NRP2、SEMA3B の mRNA の発現の変化を検討し、下記の実験へと進んでいく。

子宮内膜症細胞において、SEMA3B が mRNA レベルでも発現減少を認めた場合

・SEMA3B の強制発現後の細胞特性の変化について検討 SEMA3B mRNA をトランスフェクションした後の、子宮内膜症細胞の特性の変化を検討（シグナル伝達、細胞増殖・細胞周期・アポトーシス等）(トランスフェクションは Lipofection RNAiMAX を使用)

SEMA3B の mRNA は通常発現であった場合

この場合、SEMA3B の発現異常がエピジェネティックな調整異常による可能性を考え、メチル化、脱アセチル化の異常の有無についての検討を進める

SEMA 3B mRNA をトランスフェクションし機能解析ジェネティック異常、エピジェネティック異常 DNA のメチル化、脱アセチル化異常の検討

(1) 脱アセチル化の異常の検討 子宮内膜症細胞より採取した DNA から、アセチル化したヒストンを採取し、一時抗体 および protein A beads を反応させ免疫沈降を行い、アセチル化したヒストンで装飾された DNA (SEMA3B の promoter 領域を含む) に対し PCR をおこなう (免疫沈降/PCR で検討)。
・メチル化の異常の検討 子宮内膜間質細胞より採取したゲノム DNA をバイサルファイト処理し、バイサルファイト処理後、DNA 中の非メチル化シトシンをターゲットとして、PCR で増幅後、シーケンス解析、制限酵素処理で DNA のメチル化解析を行う。

(2) VEGF で作用後の各種シグナル伝達異常の変化を検討

SEMA-NRP 系における VEGF の関与について検討 SEMA3B と VEGF は共に NRP のリガンドとなっている。正常子宮内膜間質細胞では、SEMA3B と VEGF が適切なバランスをとっているが、子宮内膜症細胞では、そのバランス が崩れることで、病態が進展していくと類推している。そこで、子宮内膜症細胞に VEGF を作用させた際に PI3k-akt 系のシグナル伝達異常が改善し、正常子宮内膜間質細胞に近いものとなるか検討する

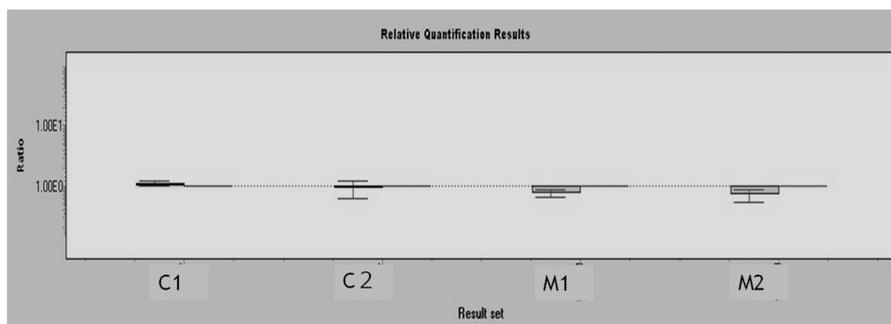
(3) PI3k-akt 系の下流の因子の検討

PI3k-akt 系のシグナルに關与するアポトーシスや細胞周期の調節に關与するもの (GSK3、 β -catenin、CyclinD など) について検討し、VEGF の作用でこれらのタンパクの発現の変化について検討することで、元々子宮内膜症細胞の持つ細胞増殖の異常、アポトーシスの耐性の誘因となる因子について検討する。

4. 研究成果

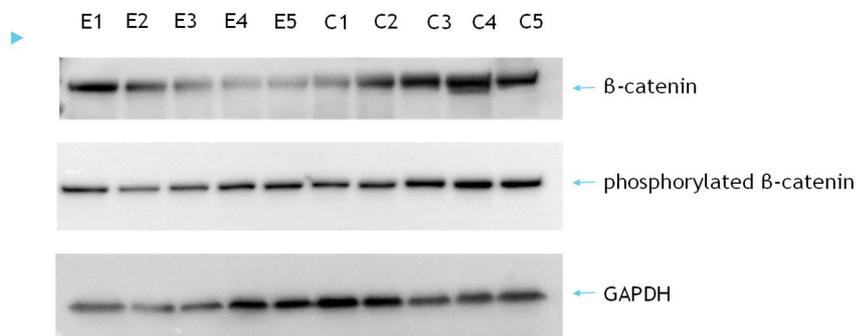
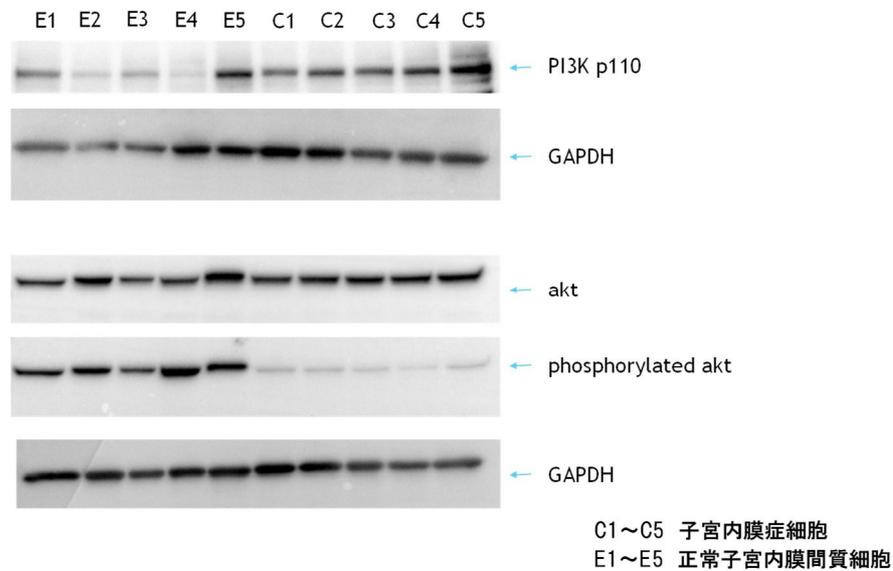
Real time PCR

SEMA3B/GAPDH



C1~C2 子宮内膜症細胞

E1~E2 正常子宮内膜間質細胞



- ・ 正常子宮内膜間質細胞と比較し、子宮内膜症細胞では、semaphorin3B の mRNA、蛋白の発現量は増加傾向にあった。
- ・ 同様に前述したプライマーで行った RT-PCR において、子宮内膜症細胞では、semaphorin3B および neuropilin2 の mRNA の発現上昇が認められた。
- ・ 子宮内膜症細胞では、正常子宮内膜間質細胞と比較すると、PI3K p110 の発現が増加し、これに伴い akt のリン酸化の抑制が認められた。
- ・ 上述した PI3k - akt 系の細胞伝達異常により、beta-catenin のリン酸化の促進が認められた。

子宮内膜症細胞では、semaphorin3B と neuropilin の発現が上昇し、その結果、semaphorin3B から伝達する PI3K - akt 系に異常が生じ、その結果 beta-catenin の発現、リン酸化に異常が生じる結果となった。beta-catenin は細胞接着にも関与し、細胞接着が進むことで、子宮内膜症の病態が悪化する可能性が示唆され、子宮内膜症の病因の一因であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西田正和, 河野 康志, 奈須 家栄, 榎原 久司
2. 発表標題 子宮内膜症細胞における semaphorin3B の過剰発現について
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 西田 正和, 河野 康志, 奈須 家栄, 榎原 久司
2. 発表標題 子宮内膜症細胞における semaphorin3F の発現について
3. 学会等名 第63回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西田正和, 河野 康志, 奈須 家栄, 榎原 久司
2. 発表標題 子宮内膜症細胞における semaphorin3B の発現について
3. 学会等名 第63回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西田正和, 河野 康志, 奈須 家栄, 榎原 久司
2. 発表標題 子宮内膜症細胞における semaphorin3B の過剰発現について
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

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担 者	奈須 家栄 (Nasu Kaei) (30274757)	大分大学・医学部・教授 (17501)	