

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20200

研究課題名(和文) miRNAが制御する子宮内膜症間質細胞の脱着膜化機構の解明と診断・治療への応用

研究課題名(英文) MicroRNA promotes the decidualization of eutopic and ectopic endometrium.

研究代表者

甲斐 健太郎 (KAI, Kentaro)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：90457622

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)：正常子宮内膜間質細胞および卵巣子宮内膜間質細胞を分離・培養し、dibutyl cyclic-AMPとdienogestを用いて脱着膜化を誘導した。miRNA microarrayおよびgene expression microarrayを用い、脱着膜化正常子宮内膜間質細胞と脱着膜化卵巣子宮内膜間質細胞の遺伝子発現解析およびネットワーク解析を行った。miR-30 familyの発現増強は、脱着膜化正常子宮内膜間質細胞と脱着膜化卵巣子宮内膜間質細胞とに共通して認められた。しかし、miR-210の発現増強は、脱着膜化卵巣子宮内膜間質細胞のみに認められた。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to elucidate the molecular pathways of decidualization in eutopic and ectopic endometrium. We isolated normal endometrial stromal cells (NESCs) and endometriotic cyst stromal cells (ECSCs) and cultured them with dibutyl cyclic-AMP and dienogest for 12 days. We analyzed the expression patterns of microRNA (miRNA) and mRNA by microarray and an ingenuity pathway analysis. Enhanced expression of miR-30 family members was observed in both decidualized NESCs and decidualized ECSCs, whereas miR-210 was upregulated in decidualized ECSCs only. We found three candidate pathways involved in the decidualization. Our results revealed that aberrantly expressed miRNA is involved in decidualization. We suggested that the miR-30 family members are novel signaling molecules conserved in both NESCs and ECSCs, and that the miR-210 family is conserved in only ECSCs.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮内膜症 マイクロRNA 脱着膜化 ジエノゲスト エピジェネティクス ネットワーク解析 マイクロアレイ プロゲステロン

1. 研究開始当初の背景

脱落膜化は、妊卵の着床・妊娠の維持に不可欠な子宮内膜の形態学的及び生化学的変化である。この子宮内膜の脱落膜化には、プロゲステロンの作用が必須である。人工的に合成されたジエノゲスト (dienogest) は、プロゲステロン作用を持ち、子宮内膜細胞の増殖抑制作用と子宮内膜の脱落膜化誘導能を有することから、おもに異所性子宮内膜組織を有する卵巣子宮内膜症性嚢胞患者に対する内分泌療法に用いられる。脱落膜化機構は、mRNA やタンパク質発現において、そのネットワーク経路が解明されつつあるが、転写後修飾、特に miRNA (マイクロ RNA) の働きに関しては未知の部分が多い。また実臨床において、子宮内膜症患者の中で最多を占める卵巣子宮内膜症性嚢胞患者の中には、ジエノゲストに抵抗性を示す集団が存在し (プロゲステン抵抗性)、時に同剤による保存的治療を断念せざるを得ない。しかしその一方で、子宮内膜症に対する手術療法は、卵巣予備能の低下を招くことが不可避であり、生殖年齢の女性には極力避けなければならないという二律背反がある。すなわち、脱落膜化機構およびプロゲステロン抵抗性の解明は、現行の子宮内膜症に対する内分泌療法における unmet medical needs である。

2. 研究の目的

本研究は、マイクロ RNA (miRNA) によって制御されるジエノゲストの脱落膜化機構の解明を目的とする。具体的には、in vitro 脱落膜化実験モデルの構築、脱落膜化刺激下の mRNA 及び miRNA の発現解析、パスウェイ解析によるシグナル伝達経路の探索、を行う。この研究で得られる成果は、標的となる miRNA の機能を調整できる新たな治療薬開発へと応用可能である。

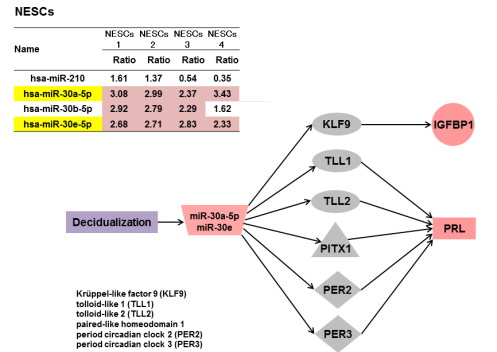
3. 研究の方法

正常子宮内膜 (以下、正常細胞) 及び卵巣子宮内膜症間質細胞 (以下、内膜症細胞) の in vitro 脱落膜化実験モデルを構築する。脱落膜化刺激を行った培養細胞から miRNA と mRNA を抽出し、miRNA microarray と gene expression microarray を行い、発現変化を調べる。パスウェイ解析を用いて、miRNA が制御する脱落膜化ネットワーク経路を検索する。抽出されたネットワーク経路の再現性を検証する。

4. 研究成果

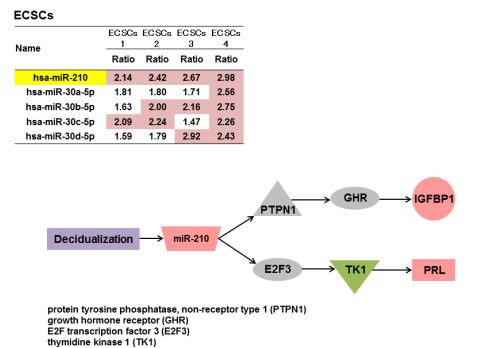
microarray の結果、正常細胞において約 3000 のプローベの中から脱落膜化によって発現変動の大きい miRNA は、miR30a と miR30e だった。この結果をもとに IPA でパスウェイ解析を行うと以下のネットワーク図が得られた。

miRNA and gene expression microarray, and IPA analysis



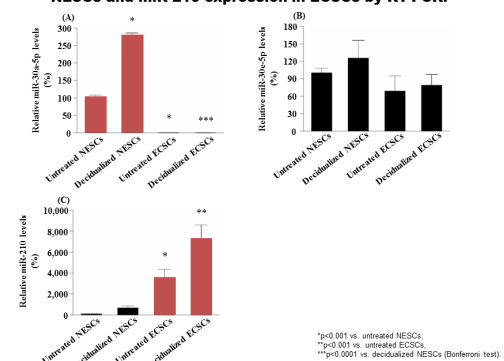
同様に内膜症細胞において脱落膜化によって発現変動の大きい miRNA は、miR210 で、IPA により以下のネットワーク図が得られた。

miRNA and gene expression microarray, and IPA analysis



抽出された miRNA について RT-PCR を行った。miR30a の発現は、内膜症細胞に比べて正常細胞で有意に増強したが、miR30e の発現は不変だった。miR210 の発現は、正常細胞に比べて内膜症細胞で有意に増強した。

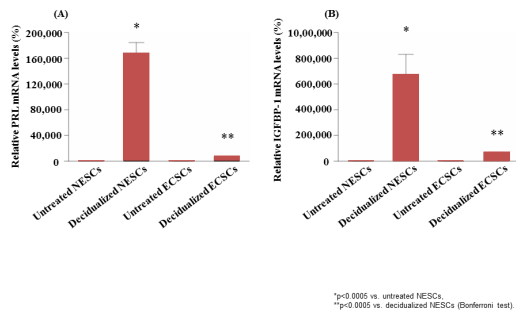
In vitro decidualization enhanced the miR-30a-5p expression in NESCs and miR-210 expression in ECSCs by RT-PCR.



*p<0.001 vs. unreated NESCs,
**p<0.001 vs. unreated ECSCs,
***p<0.0001 vs. decidualized NESCs (Bonferroni test)

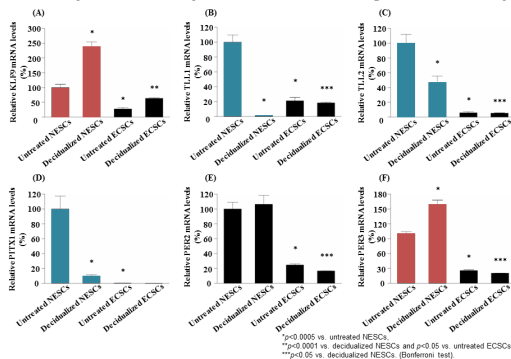
脱落膜化の指標である PRL、IGFBP1 については、脱落膜化により正常細胞および内膜症細胞それぞれで発現が増強した。とくに mRNA レベルは正常細胞で有意に発現が増強し、内膜症細胞におけるプロゲスチン抵抗性が示された。

In vitro decidualization induced the expression of PRL and IGFBP-1 in NESCs and ECSCs by PCR.



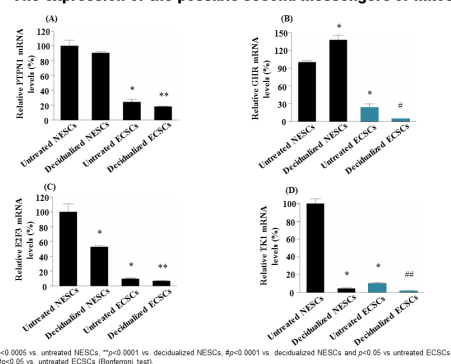
miR30a パスウェイ中の分子については、正常細胞において、KLF9 と PER3 が脱落膜化によって有意に増強し、他の分子は減弱した。PER2 は脱落膜化による有意な変化を認めなかった。

The expression of the possible second messengers of miR-30a-5p



miR210 に関連したパスウェイ中の分子である PTPN1、GHR、E2F3、TK1 の発現は正常細胞コントロール群に比べ内膜症細胞コントロール群で減弱した。また内膜症細胞において、GHR と TK1 が脱落膜化によって有意に減弱した。

The expression of the possible second messengers of miR-210



以上から、miR30a が正常細胞の脱落膜化を制御していますが、内膜症細胞では miR30a の

機能が脱落し、miR210 による脱落膜化の制御機構を獲得していることが示唆され、これらの miRNA が子宮内膜症の脱落膜化不全や治療抵抗性に関与する可能性が示された。

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4件)

Endometriosis Epigenetics. Kentaro Kai, Kaei Nasu, Yoko Aoyagi, Hisashi Narahara. *Curr Womens Health Rev.* 2018; 14(2): 154-163.

<https://doi.org/10.2174/1573404813666170109142640>. (査読有)

【子宮腺筋症と希少部位子宮内膜症の最新の取り扱い】膀胱・尿管子宮内膜症 甲斐 健太郎、青柳 陽子、榎原 久司 産と婦 2017; 84(11): 1347-1354. 医中誌 2018006564. (査読無)

Decidualization Differently Regulates microRNA Expression in Eutopic and Ectopic Endometrial Stromal Cells. Yoko Aoyagi, Kaei Nasu, Kentaro Kai, Tomoko Hirakawa, Mamiko Okamoto, Yasushi Kawano, Wakana Abe, Yoshiyuki Tsukamoto, Masatugu Moriyama, Hisashi Narahara. *Reprod Sci.* 2017; 24(3): 445-455. doi: 10.1177/1933719116657894. (査読有)

miR-503, a microRNA epigenetically repressed in endometriosis, induces apoptosis and cell-cycle arrest and inhibits cell proliferation, angiogenesis, and contractility of human ovarian endometriotic stromal cells. Tomoko Hirakawa, Kaei Nasu, Wakana Abe, Yoko Aoyagi, Mamiko Okamoto, Kentaro Kai, Kanetoshi Takebayashi, Hisashi Narahara. *Hum Reprod.* 2016; 31(11): 2587-2597. PMID: 27619772. (査読有)

〔学会発表〕(計12件)

第62回日本生殖医学会学術講演会 山口県下関市・海峡メッセ下関、ドリームシップ 2017年11月16-17日 miR-132はAkt1を介して子宮内膜症の病態形成に関与する 青柳 陽子、奈須 家栄、甲斐 健太郎、平川 東望子、竹林 兼利、榎原 久司

日本人類遺伝学会 第62回大会 兵庫県・神戸市・神戸国際会議場 2017年11月15-18日 Enhanced miR-132 expression promotes the pathogenesis of endometriosis through the activation of AKT serine/threonine kinase 1. Kentaro Kai, Yoko Aoyagi, Kaei Nasu, Tomoko Hirakawa, Kanetoshi

Takebayashi, Hisashi Narahara
第22回日本生殖内分泌学会学術集会 沖縄県宜野湾市・沖縄コンベンションセンター 2017年9月30日 miRNAを介した正常子宮内膜における脱落膜化機構の解明と異所性子宮内膜におけるその異常 青柳 陽子, 奈須 家栄, 甲斐 健太郎, 平川 東望子, 竹林 兼利, 榎原 久司

第69回日本産科婦人科学会学術講演会 広島県広島市・広島グリーンアリーナ、リーガロイヤルホテル広島、NTTクレドホール 2017年4月13日-16日

Enhanced miR-132 expression promotes the pathogenesis of endometriosis through the activation of AKT serine/threonine kinase 1. Yoko Aoyagi, Kaei Nasu, Kentaro Kai, Tomoko Hirakawa, Kanetoshi Takebayashi, Hisashi Narahara.

第38回日本エンドメトリーシス学会 東京都中央区・東京コンベンションホール 2017年1月21-22日 子宮内膜症におけるmiRNAの関与-miR-132はAkt1を介して子宮内膜症の病態形成に関与する- 青柳 陽子, 甲斐 健太郎, 奈須 家栄, 平川 東望子, 竹林 兼利, 榎原 久司

5th Asian Conference on Endometriosis (ACE 2016). Sep 22-24, 2016, Osaka, Japan. Decidualization differentially regulates microRNA expression in eutopic and ectopic endometrial stromal cells. Yoko Aoyagi, Kaei Nasu, Kentaro Kai, Tomoko Hirakawa, Kanetoshi Takebayashi, Hisashi Narahara.

第34回日本授精着床学学術講演会 長野県北佐久郡軽井沢町・軽井沢プリンスホテルウエスト 2016年9月15-16日 Decidualization differentially regulates microRNA expression in eutopic and ectopic endometrial stromal cells. Yoko Aoyagi, Kaei Nasu, Kentaro Kai, Tomoko Hirakawa, Kanetoshi Takebayashi, Hisashi Narahara.

神澤医学研究振興財団 第18回講演会 東京都港区・ホテルオークラ東京 2016年6月3日 子宮内膜症におけるmiRNAを介した脱落膜化機構の異常 甲斐 健太郎

第68回日本参加婦人科学会学術講演会 東京都千代田区・東京国際フォーラム 2016年4月21日-24日 Decidualization differentially regulates microRNA expression in eutopic and ectopic endometrial stromal cells. Yoko Aoyagi, Kaei Nasu, Kentaro Kai, Tomoko Hirakawa, Kanetoshi Takebayashi, and

Hisashi Narahara.

The 13th International Congress of Human Genetics. Apr 3-7, 2016, Kyoto, Japan. Kyoto International Conference Center (ICCKyoto), Kyoto, Japan. MicroRNA promotes the decidualization of eutopic and ectopic endometrial stromal cells. Kentaro Kai, Yoko Aoyagi, Kaei Nasu, Tomoko Hirakawa, Kanetoshi Takebayashi, Hisashi Narahara.

第5回プロゲスチン研究会 東京都文京区・ホテル椿山荘東京 2016年2月6日 子宮内膜症におけるmiRNAを介した脱落膜化機構の異常 青柳 陽子, 奈須 家栄, 甲斐 健太郎, 平川 東望子, 竹林 兼利, 榎原 久司

第37回日本エンドメトリーシス学会 熊本県熊本市・ホテル日航熊本 2016年1月23-24日 子宮内膜症におけるmiRNAを介した脱落膜化機構の異常 青柳 陽子, 甲斐 健太郎, 奈須 家栄, 平川 東望子, 竹林 兼利, 榎原 久司

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲斐 健太郎 (KAI Kentaro)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：90454622