

平成 21 年 3 月 16 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間 2007～2008
 課題番号：19791149
 研究課題名 (和文) SPRM の子宮筋腫細胞と正常子宮平滑筋細胞における作用機序の差の解析
 研究課題名 (英文) Comparative effects of SPRM for cultured uterine leiomyoma cells and normal myometrial cells.

研究代表者

松岡 正造 (SHOZO MATSUOKA)
 神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員
 研究者番号：70437466

研究成果の概要：

selective progesterone receptor modulator (SPRM) は子宮筋腫発育に対して抑制的に働く可能性が推察され、この度、提供を受けた progesterone antagonist 作用を有する CDB-2914 と mixed agonist/antagonist 作用を有する J867 (asoprisnil) を子宮筋腫細胞の無血清培地培養系に種々の濃度で添加し、48 時間後の各種タンパク発現について Panorama Ab Microarray XP 725 を用いて解析をおこなった。無血清培養系で CDB-2914 と J867 は子宮筋腫細胞の増殖能を抑制し、TRAIL による apoptosis にかかわる DR4 の発現を誘導する一方、Caspase を介した apoptosis pathway には影響を与えず、DRAK-1 や Zip-kinase を抑制することがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	330,000	3,130,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・婦人科腫瘍学

キーワード：細胞・組織、シグナル伝達、生理活性、薬剤反応

1. 研究開始当初の背景

子宮筋腫は性成熟期に好発する良性腫瘍であるが、過多月経や月経困難症のため子宮摘出術を余儀なくされることが多い。当教室は米国 The Population Council との共同研究で、本邦にて認可が予定されている levonorgestrel 徐放型 IUD (LNg-IUD) の子宮腔内挿入により、子宮内膜の増殖抑制とアポトーシス誘導によって子宮内膜が菲薄化し過多月経が改善

して、粘膜下筋腫以外例では子宮摘出術を回避できることを認めた。LNg-IUD 使用中、過多月経の著明な改善にかかわらず 1/3 例で筋腫サイズが増大することを認めた。そこで、子宮筋腫細胞培養系を確立し、progesterone (P4) の直接作用を調べたところ、P4 は筋腫細胞での epidermal growth factor (EGF) 産生を増強するが (Shimomura et al., JCEM, 1998)、一方 insulin-like growth factor (IGF-I) 産生を抑制

し(Yamada et al., Hum Reprod, 2004)、二面的な作用を持つが、子宮筋腫細胞の増殖を刺激し、アポトーシスを抑制して筋腫発育に対して促進的に働く作用が主体であることを認めた。

そのため、selective progesterone receptor modulator (SPRM)は子宮筋腫発育に対して抑制的に働く可能性が推察され、この度、NIH (NICHD)の開発による progesterone antagonist 作用を有する CDB-2914 と米国で子宮筋腫患者に対する臨床試験中の mixed agonist/antagonist 作用を有する J867 (asoprisnil)の提供を受けた。今までの研究では、無血清培養系で CDB-2914 と J867 は、1) 子宮筋腫細胞の増殖能を抑制し、アポトーシスを誘導すること (Xu, et al., JCEM, 2005)、2) 子宮筋腫細胞の発育に対して重要な役割を果たしていると考えられている局所成長因子である EGF (Shimomura et al., JCEM, 1998)、IGF-I (Gao et al., JCEM, 2001)および transforming growth factor beta3 (TGF beta3) (Lee and Nowak, JCEM, 2001)の mRNA および蛋白発現を抑制すること (未発表)、3) 血管新生関連因子である vascular endothelial growth factor (VEGF)-1、VEGF-2 とその受容体である VEGF receptor-1、VEGF receptor-2、adrenomedullin および adrenomedullin receptor 蛋白発現を抑制することを認めている (未発表)。一方、CDB-2914 と J867 は正常子宮平滑筋細胞の増殖ならびに局所成長因子と血管新生関連因子の発現には影響を及ぼさないことを明らかにしている。しかし、これらの薬剤の作用が培養子宮筋腫細胞と正常子宮平滑筋細胞で異なる機序については不明である。

核受容体である progesterone receptor (PR)には PR-A と PR-B の isoform が存在し、PR-B は P4-responsive genes の transcription activator として働くが、PR-A は PR-B の作用に拮抗することが知られている。子宮筋腫では PR-A と PR-B 発現が正常子宮平滑筋組織と比べて亢進しているが(Nissole et al., Hum Reprod, 1999)、SPRM が子宮筋腫細胞と正常子宮平滑筋細胞における PR 発現に及ぼす影響は不明である。PR に P4 agonist が結合すると PR の conformational change が生じて P4 response elements に結合し、ついで coactivator が動員され、最終的に P4 target genes の transcription が亢進するが、一方 PR に P4 antagonist が結合すると corepressor が動員され、P4 target genes の transcription が抑制される ((Smith and O'Malley, Endocr Rev, 2004; Leonhardt et al., Steroids, 2003)。J867 のような mixed

agonist/antagonist 作用を有する PR modulator は細胞特異的な作用を及ぼすといわれている。しかし、SPRM が子宮筋腫細胞と正常子宮平滑筋細胞における coactivator と corepressor 発現に及ぼす作用の違いや P4-regulated early genes に及ぼす作用の違いは不明である。

2. 研究の目的

SPRM が培養子宮筋腫細胞と正常子宮平滑筋細胞において異なる作用を及ぼす機序を解明する。

① CDB-2914 と J867 添加に伴う培養子宮筋腫細胞と正常子宮平滑筋細胞における PR 発現をウェスタンブロット法にて PR-A と PR-B 蛋白発現動態として調べ、PR-A/PR-B 比の推移を比較検討する。

② P4、CDB-2914 あるいは J867 添加に伴う培養子宮筋腫細胞と正常子宮平滑筋細胞における coactivator と corepressor 蛋白発現に及ぼす影響を解明する。本研究では、coactivator の発現動態は steroid receptor coactivator (SRC)-1、SRC-2、SRC-3 の蛋白発現から、一方 corepressor の発現動態は Nuclear receptor corepressor (NCoR)と silencing mediator and thyroid hormone receptor (SMRT)の蛋白発現から解明する。

③ P4、CDB-2914 あるいは J867 添加に伴う培養子宮筋腫細胞と正常子宮平滑筋細胞における P4-regulated early genes である c-myc、c-fos、c-jun の mRNA 発現量の推移を定量的 RT-PCR 法を用いて調べる。

④ P4、CDB-2914 あるいは J867 添加に伴う培養子宮筋腫細胞と正常子宮平滑筋細胞における細胞周期抑制因子 (p53、Rb、pRb)、細胞周期促進因子 (cyclin D1、cyclinG1、cyclinA)、cdk と cdc および p21、p27 の発現動態を調べる。

子宮筋腫発育はエストロゲン依存性である

と従来から捉えられていたが、当教室では P4 と estradiol (E2)が補完的、協調的に働き、EGF/EGF receptor 系を介して子宮筋腫発育に関わること (Shimomura et al., JCEM, 1998)、また正常子宮平滑筋細胞に比して子宮筋腫細胞で豊富な Bcl-2 蛋白発現が P4 により増強すること (Matsuo et al., JCEM, 1997)、それに符合して子宮筋腫細胞での tumor necrosis factor (TNF) alpha 発現は P4 により抑制されること (Kurachi et al., JCEM, 2001)、しかし p53 発現は P4 ではなく E2 により抑制されること (Gao et al., JCEM, 2002)を明らかにし、P4 が PR を介して子宮筋腫発育に対して促進的に働くことを示した。今回の研究は、当教室での世界に先駆けて発表してきた子宮筋腫細胞における P4 に関わる一連の研究結果が基盤となって初めて着想に至ったものであり、極めて独創的である。

本研究は P4 antagonist 作用を有する CDB-2914 と mixed agonist/antagonist 作用を有する J867 を用いて、これら異なる作用を有する薬剤の影響をヒト子宮筋腫細胞と正常子宮平滑筋細胞系での核蛋白とその調節因子、P4-regulated gene 発現、細胞周期調節因子発現、局所成長因子との関連も併せて解析する点が特色である。予測される結果に関しては、CDB-2914 と J867 により培養子宮筋腫細胞では培養正常子宮平滑筋細胞と比較して、1) PR-B 発現が減少するが、PR-A 発現が増加し、結果として PR-A/PR-B 比が亢進する、2) coactivator 発現が抑制され、一方 corepressor 発現が増加する、3) P4-regulated gene の発現が抑制される、4) 細胞周期抑制因子の発現が増加する。これらの予想される結果は、SPRM の子宮筋腫と正常子宮平滑筋に及ぼす分子機構を明らかにし、その解明は子宮筋腫の新しい長期的管理法の確立へと繋がると考えられ、本研究の臨床的意義は大きく深い。

3. 研究の方法

1) 検体の収集

2) 検体からの蛋白とRNAの抽出

3) Selective progesterone receptor modulatorの子宮筋腫細胞と正常子宮平滑筋細胞における Progesterone receptor蛋白発現に及ぼす影響の解析

子宮筋腫細胞と正常子宮平滑筋細胞の無血清培地培養系に種々の濃度の CDB-2914 と J867 を添加し、上記培養細胞における PR-A と PR-B の蛋白発現を経時的にウエスタンブロット法により調べ、PR-A/PR-B 発現量の比の推移も併せて調べる。

4) Selective progesterone receptor modulatorの子宮筋腫細胞と正常子宮平滑筋細胞における coactivator と corepressor蛋白発現に及ぼす影響の解析

子宮筋腫細胞と正常子宮筋細胞の無血清培地培養系に種々の濃度の CDB-2914 と J867 を添加し、coactivator と corepressor の蛋白発現を経時的に調べる。coactivator として SRC-1、SRC-2、SRC-3 蛋白発現を調べ、一方 corepressor として NCoR と SMRT 蛋白発現を調べる。

5) Selective progesterone receptor modulatorの子宮筋腫細胞と正常子宮平滑筋細胞における P4-regulated gene mRNA 発現に及ぼす影響の解析

子宮筋腫細胞と正常子宮筋細胞の無血清培地培養系に種々の濃度の P4 (50 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml) を添加し、P4-regulated genes である c-myc、c-fos、c-jun の mRNA 発現量の推移を定量的 RT-PCR 法を用いて経時的に調べる (添加前、添加後 6 時間、添加後 12 時間、添加後 24 時間)。子宮筋腫細胞と正常子宮平滑筋細胞の無血清培地培養系に種々の濃度の CDB-2914 と J867

を添加し (10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} M、 10^{-5} M)、上記培養細胞におけるc-myc、c-fos、c-junの mRNA発現量の推移を同様に調べる。さらに、子宮筋腫細胞と正常子宮平滑筋細胞の無血清培地培養系にP4 とCDB-2914 あるいはJ867 を同時添加し、これらの薬剤がP4 の early gene mRNA発現効果に拮抗的に働くか否かを検討する。

4. 研究成果

selective progesterone receptor modulator (SPRM) は子宮筋腫発育に対して抑制的に働く可能性が推察され、この度、提供を受けた progesterone antagonist 作用を有する CDB-2914 と mixed agonist/antagonist 作用を有する J867 (asoprisnil) を子宮筋腫細胞の無血清培地培養系に種々の濃度で添加し、48 時間後の各種タンパク発現について Panorama Ab Microarray XP 725 を用いて解析をおこなった。種々の統計学的解析を行ったところ、それぞれのデータに有意差は認められなかったものの、無血清培養系で CDB-2914 と J867 は子宮筋腫細胞の増殖能を抑制し、TRAIL による apoptosis にかかわる DR4 の発現を誘導する一方、Caspase を介した apoptosis pathway には影響を与えず、DRAK-1 や Zip-kinase を抑制することが傾向があることが解明された。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 正造 (SHOZO MATSUOKA)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号：70437466

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者