

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09766

研究課題名(和文) 酸素・エネルギー代謝解析によるHIF-1を機軸とした子宮内膜炎症応答の解明

研究課題名(英文) Inflammatory cytokines-induced HIF-1 activation confers the epithelial-to-mesenchymal cell differentiation in endometrial epithelial cells

研究代表者

中尾 朋子 (NAKAO, Tomoko)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：00465642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜は月経周期による酸素分圧の変化が大きく、低酸素誘導性因子：HIFが重要な役割を担うが、さらに低酸素と増殖因子や炎症性サイトカインとのクロストークが知られている。近年、慢性子宮内膜炎と着床障害との関係が注目されており、着床において上皮間葉転換：EMTが関与すると考えられている。本研究では子宮内酸素環境-HIF-1-炎症の相互関係に着目し、子宮内膜の分化・機能に与える影響への検討を行った。その結果、炎症性サイトカインおよび低酸素症がHIFおよびEMT因子を誘導することを発見し、このことから慢性子宮内膜炎により誘発されるHIFおよびEMT因子が着床機能に影響を与える可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性子宮内膜炎は不妊症の原因になると考えられている。細菌感染や種々の要因による反応性過程と考えられているが、画一された診断基準がなく、病態についても解明されていない点が多い。治療として抗菌薬やプロバイオティクスの投与が行われているが、明確な効果判定法もなく、その後の不妊治療成績への寄与も不明である。今回我々は子宮内酸素環境-HIF-1-炎症の相互関係に着目し、炎症性サイトカインおよび低酸素症に誘導されるHIFおよびEMT因子が着床機能に影響を与える可能性を示すことにより、慢性子宮内膜炎の病態解明につなげることができた。

研究成果の概要(英文)：The partial pressure of oxygen in the endometrium is highly variable, thus mandating the investigation of the involvement of hypoxia-inducible factors (HIFs) in endometrial tissue. On the other hand, there are various phenomena that cannot be explained by the classical dogma that "HIF activation = hypoxia," and one of the key words is inflammation. The purpose of this study is to demonstrate the interrelationship between intrauterine oxygenation, HIF, and inflammation, and to analyze their effects on the differentiation and function of endometrial cells. Recently, the focus has been on the relationship between chronic endometritis and implantation disorders, and epithelial-mesenchymal transition(EMT) is thought to play an important role during implantation. In this study, we found that HIF and EMT-inducing factors were induced by inflammatory cytokines and hypoxia. This result suggests that HIF and EMT-inducing factors induced by chronic endometritis may affect implantation function.

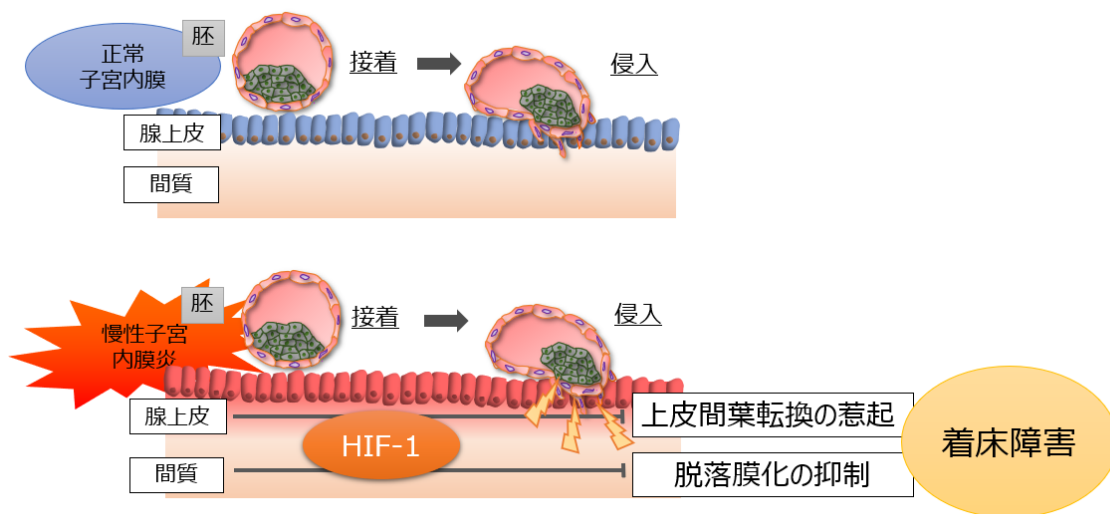
研究分野：子宮内膜

キーワード：子宮内膜環境 HIF-1 低酸素 炎症 着床

1. 研究開始当初の背景

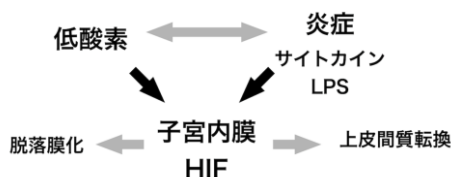
子宮内膜は月経周期に伴い増殖と剥脱を反復する組織である。組織の酸素分圧の変化も大きく、それゆえ低酸素誘導性因子 (hypoxia-inducible factor : HIF) の関与が追究されてきた。しかし、一方で”HIF 活性化=低酸素”という古典的なドグマでは説明し得ない様々な現象の存在が明らかになってきており、そのキーワードの一つが炎症である。プロスタグランジン及び腫瘍壊死因子 α などの炎症性メディエーターによる 20%酸素条件下における HIF-1 α 蛋白質の発現誘導報告があり、HIF の活性調節に多様性を与えている。つまり HIF は低酸素を含む細胞の酸素代謝の変調により活性化する因子として捉えることができる。

また、近年生殖医療の分野では慢性子宮内膜炎と着床障害との関係が注目されている。慢性子宮内膜炎は細菌感染や種々の要因による反応性過程と考えられており、不妊女性の 2.8-56.8% に認められると報告されている。このように慢性子宮内膜炎の頻度に大きな幅があるのは、病態について解明されていない点が多く、画一された診断基準がないためである。我々はこれまでの研究で、着床には内膜間質細胞の脱落膜化が重要であり、子宮内膜の炎症によって脱落膜化が抑制されることを報告している。一方、着床に関する子宮内膜上皮細胞に関する研究は少ない。これまでに子宮内膜症病変で HIF-1 の誘導と上皮間葉転換 (EMT) の誘導が報告されており、炎症によって腺上皮での不必要な EMT が惹起されることが着床障害の原因になるのではないかと考えた。



2. 研究の目的

前述の背景をもとに本研究では子宮内酸素環境-HIF-炎症の相互関係を証明し、その連関が子宮内膜上皮細胞の分化・機能に与える影響を検討することを目的とした。



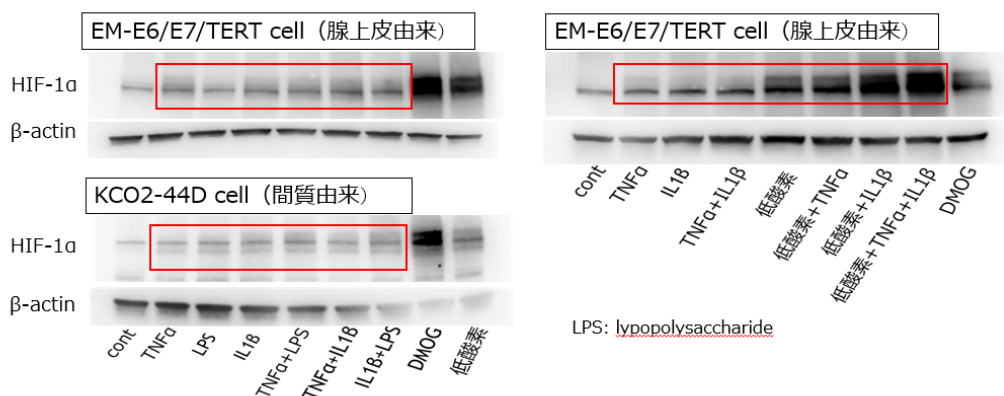
3. 研究の方法

培養系の実験において子宮内膜上皮細胞の機能を解析するためには間質細胞の除去が不可欠であるが、通常の血清を用いた培養法では血清が間質細胞の増殖を促進してしまう。また子宮内膜上皮細胞は1-2週間で増殖を停止し、継代が不可能となるため実験が困難であった。以上よりすでに確立されている不死化子宮内膜上皮細胞 (EM-E6/E7/TERT cell)を用いて研究を行うことにした。不死化子宮内膜上皮細胞において炎症性サイトカイン (TNF α 及び IL-1 β)、LPS、低酸素状態が HIF 活性化にあたる影響を検討した。

炎症性サイトカインと低酸素 (1%O₂ 条件) の影響を調べるために、NGS を用いた RNA-Seq によりゲノム全体の遺伝子発現パターンを評価した。2つの遺伝子リストの交点の遺伝子セットエンリッチメント解析 (GSEA) を用いて、低酸素状態および炎症性サイトカイン曝露下で発現比率が有意に変化した遺伝子を比較し、その差異を明らかにした。その後、共通の遺伝子リストに対して、再度 GSEA を行った。

4. 研究成果

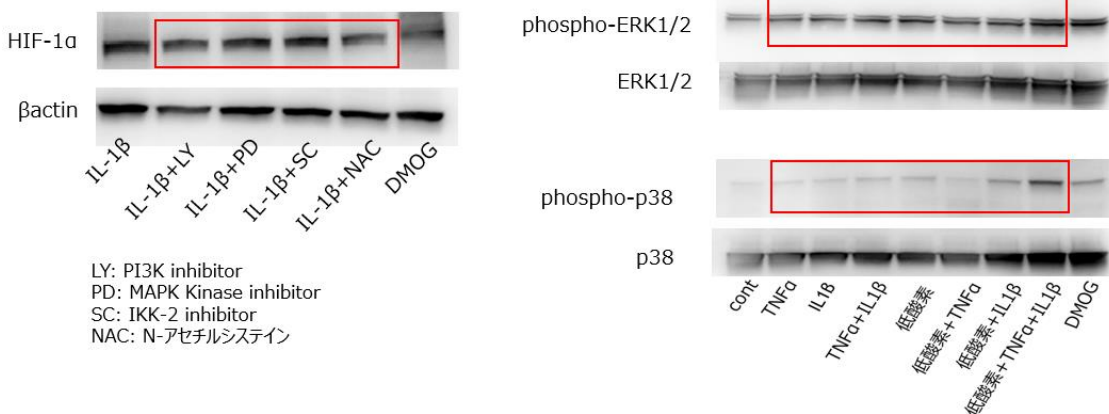
① 炎症性サイトカイン、LPS、低酸素による HIF-1 α の誘導



- 炎症性サイトカイン、LPS、低酸素状態により、腺上皮・間質細胞においてHIF-1 α が誘導された。
- 低酸素状態にサイトカインを加えることにより、HIF-1 α の誘導は増強した。

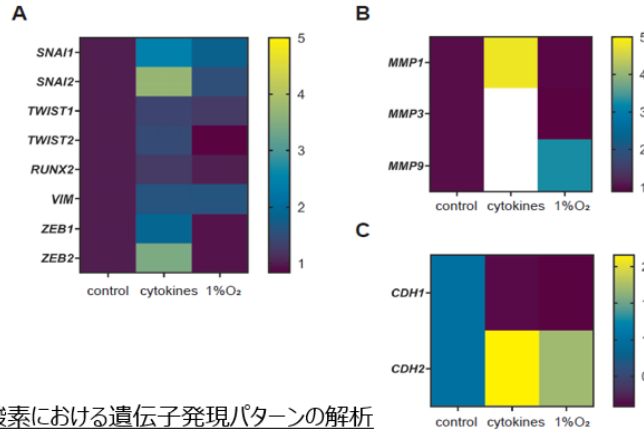
7

② HIF-1 α 活性経路の検討



- IL-1 β により発現を認めたHIF-1 α はKinase inhibitor添加により抑制された。
- 炎症性サイトカインと低酸素によってERK1/2、p38 MAPキナーゼの活性化が認められた。

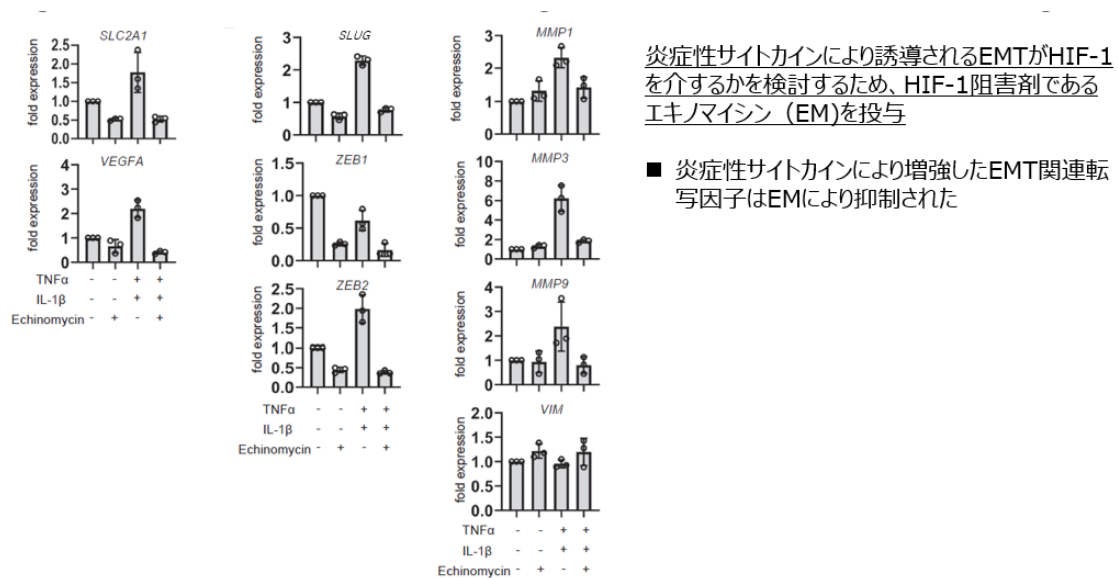
③ RNA-seq による遺伝子発現解析



炎症性サイトカインと低酸素における遺伝子発現パターンの解析

- A,B: HIF1A, SNAI1, TWIST2, SP1, RUNX2, TWIST1, MMP1, MMP3, およびMMP9を含むEMT関連転写因子の遺伝子を特定
 C: サイトカイン刺激はCDH1 (E-カドヘリン) の発現を減少、CDH2 (N-カドヘリン) の発現を増加、いわゆるサイトカイン刺激誘発性カドヘリンスイッチを示した

④ HIF-1 阻害剤による EMT 活性経路の検討



- 子宮内膜上皮・間質由来細胞において炎症性サイトカインにより HIF-1 α が誘導され、低酸素によりその効果が増強した
- 炎症性サイトカインは PI3K、MAPK、NF- κ B などのシグナル経路を介して HIF-1 α 翻訳亢進をもたらした
- 子宮内膜間質細胞は炎症性サイトカインによって脱落膜化が抑制された
- 炎症性サイトカインと低酸素により、上皮間葉転換関連遺伝子の発現量の増加を認めた
- 上皮間葉転換関連遺伝子発現は HIF-1 により調節されることを示した

結論

- ◆ 炎症性サイトカインにより EMT 関連経路が活性化され、さらにこれらの遺伝子発現は HIF-1 活性化をもたらす低酸素環境で増強されることを示した
- ◆ 子宮内酸素環境と炎症が、EMT を駆動するクロストークを調節することを解明し、慢性子宮内膜炎における着床障害に EMT が関与している可能性が示唆された

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中尾 朋子
2. 発表標題 低酸素誘導性因子の活性調節に 着目した子宮内膜機能制御機構
3. 学会等名 第66回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2021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	岡田 英孝 (OKADA Hidetaka) (80330182)	関西医科大学・医学部・教授 (34417)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------