

機関番号：15101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591915

研究課題名 (和文) 子宮内膜症の増殖進展機構における細胞死の役割とその治療への応用に関する研究

研究課題名 (英文) The role of apoptosis in growth and survival of endometriotic cells: its implication for treatment of endometriosis

研究代表者

原田 省 (HARADA TASUKU)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：40218649

研究成果の概要 (和文) : 子宮内膜症は疼痛と不妊の原因となり現代女性のリプロダクティブヘルスを損なう疾患である。本研究では、子宮内膜細胞が子宮以外の場所で増殖し、生存していく上での細胞死の役割を検討した。子宮内膜と子宮内膜症細胞に対して薬剤を用いて細胞死(アポトーシス)を誘導すると、子宮内膜症細胞では、子宮内膜細胞に比して細胞死が起こりにくかった。その際には、細胞死に影響する遺伝子である IAP family の中でも Survivin が子宮内膜細胞の異所性生存に関与することが判明した。

研究成果の概要 (英文) : Decreased susceptibility of endometrial tissue to apoptosis may contribute to the pathogenesis of endometriosis. Endometriotic stromal cells showed resistance to drug-induced apoptosis compared with eutopic endometrial cells. Survivin gene and protein expression was enhanced in endometriotic cells and tissues. Survivin may play a critical role in susceptibility of endometriosis to apoptosis. The data also suggest that survivin inhibitor may be effective as a therapeutic agent for endometriosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮内膜症、アポトーシス、survivin

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は生殖年齢女性のおよそ 10% に発生し、疼痛と不妊を引き起こし現代女性のリプロダクティブヘルスを損なう疾患である。本研究では、私どもが進めてきたサイトカインによる増殖進展機構の更なる解明と異所性に子宮内膜細胞が生存していく上での細胞死(アポトーシス)の役割を検討した。類腫瘍性格を有する本症の進展機構を明

らかにすることで、本症の病態の理解と新しい治療戦略の確立につながるものと考えられる。

私どもは、子宮内膜症患者の腹水中には Interleukin-6(IL-6), IL-8, Tumor necrosis factor α (TNF α)等のサイトカイン濃度が上昇していることを明らかとした。IL-6 はマウス初期胚発育、ヒト精子の運動能および卵巣顆粒膜細胞のエストロゲン産生を抑制す

ることから、子宮内膜症患者の妊孕能低下に関与することを示唆した。IL-8は子宮内膜症由来の間質細胞の増殖を促進することで子宮内膜症の進展に関与することが示された。TNF α は子宮内膜症由来の間質細胞からのIL-6およびIL-8遺伝子の発現と蛋白産生を濃度ならびに時間依存性にup-regulateすること、この作用は転写因子であるNF κ Bを介することを明らかとした。さらに、エストロゲンはNF κ B活性を促進すること、プロゲステロンはNF κ B活性を抑制してTNF α によるIL-8産生を低下させることを示した。以上の結果からIL-8は子宮内膜症細胞においてオートクリンファクターとして増殖進展のキープクターとなること、子宮内膜症の治療薬はNF κ B活性を抑制することが作用機序の一端であると考えられた。

一方、異所性に発育する子宮内膜症細胞は、正所性の子宮内膜細胞に比較して増殖能が高く、アポトーシス感受性が低いことが報告されている。私どもも、スタウロスポリンによる薬剤誘導性のアポトーシスに対して、子宮内膜症細胞は正所性の内膜細胞に比して抵抗性を有することを明らかとした。本症の多くは骨盤内であるが、栄養血管や支持細胞などが欠如する異所性に細胞が生存していくことは一般に困難であるといえる。すなわち、癌細胞の転移に類似した性質を有する子宮内膜症細胞は異所性に増殖・生存・進展するための合目的な細胞機能を獲得していることが予想される。

2. 研究の目的

本研究では、子宮内膜症細胞のサイトカインによる増殖促進機序について詳細に検討するとともに、内膜症細胞のアポトーシス抵抗性について検討し、内膜症細胞の増殖コントロールとアポトーシス誘導による新しい治療の可能性に関する基礎的な検討を行う。

3. 研究の方法

患者の同意を得て、手術時に採取した正常子宮内膜、子宮筋腫を有する患者の正所性子宮内膜、卵巣チョコレート嚢胞を有する患者の正所性子宮内膜および卵巣チョコレート嚢胞から組織を採取し、Real time RT-PCRと免疫染色を行った。細胞培養実験には各組織より間質細胞を分離した。

4. 研究成果

(1) 子宮内膜および子宮内膜症から分離した間質細胞を用いた実験成績

炎症反応惹起あるいはアポトーシス誘導モデルとしてLPS(lipopolysaccharide)とStaurosporin(SS)を培養液中に添加した。SS添加によるアポトーシス誘導後の生細胞数は、子宮内膜細胞に比較して子宮内膜症細

胞で多くアポトーシス感受性の低下がみられた。子宮内膜細胞では、SS添加によりCaspase-3および-7蛋白の強い活性化がみられたが、子宮内膜症細胞ではみられなかった。アポトーシス関連遺伝子であるIAP familyの遺伝子発現量をRT-PCRで検討すると、IAP familyの遺伝子の中では、BIRC-5(Survivin)の発現がSS添加により増強したが、BIRC-2、-3、-4に関しては発現に変化はみられなかった。子宮内膜症細胞への、Survivin siRNA導入による遺伝子発現抑制により、アポトーシス細胞比率の増加と、Caspase-3および-7蛋白活性の増強が認められ、子宮内膜症細胞のアポトーシス抵抗性にはSurvivinが関与していることが示唆された。

(2) 手術摘出組織を用いた実験成績

BIRC-2、-3、-4、-5(Survivin)遺伝子の発現は、卵巣チョコレート嚢胞(OCC)、OCCを有する患者の正所性子宮内膜、子宮筋腫の子宮内膜、正常内膜の順で高かった。免疫染色では、SurvivinはOCCの上皮・間質ともに正所性子宮内膜に比して強発現を認めた。

以上の培養細胞と組織を用いた実験成績から、子宮内膜症細胞のアポトーシス抵抗性にはSurvivinが重要な役割を果たすことが明らかとなった。今後はSurvivinを始めとするIAP familyを分子標的とする子宮内膜症治療の可能性が示唆された。

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11件)

① Takenaka Y, Taniguchi F, Miyakoda H, Takai E, Terakawa N, Harada T

Lipopolysaccharide promoted proliferation and invasion of endometriotic stromal cells via induction of cyclooxygenase-2 expression. Fertil.Steril.93(1), 325-327, 2010, 査読有

② Harada T, Taniguchi F Dienogest: a new therapeutic agent for the treatment of endometriosis. Women's Health 6(1), 27-35, 2010, 査読有

③ Momoeda M, Harada T, Terakawa N, Aso T, Fukunaga M, Hagino H, Taketani Y Long-term use of dienogest for the treatment of endometriosis. J.Obstet.Gynaecol. Res. 35(6), 1069-1076, 2009, 査読有

④ Watanabe A, Taniguchi F, Izawa M, Suou K, Uegaki T, Takai E, Terakawa N, Harada T The role of survivin in the resistance

of endometriotic stromal cells to drug-induced apoptosis. Human Reprod. 24(12), 3172-3179, 2009, 査読有

⑤ Harada T, Momoeda M, Taketani Y, Aso T, Fukunaga M, Hagino H, Terakawa N Dienogest is as effective as intranasal buserelin acetate for the relief of pain symptoms associated with endometriosis—a randomized, double-blind, multicenter, controlled trial. Fertil. Steril. 91(3), 675-681, 2009, 査読有

⑥ Taniguchi F, Harada T, Miyakoda H, Iwabe T, Deura I, Tagashira Y, Miyamoto A, Watanabe A, Suou K, Uegaki T, Terakawa N TAK1 activation for cytokine synthesis and proliferation of endometriotic cells. Mol Cell Endocrinol. 307(1-2), 196-204, 2009, 査読有

⑦ Miyamoto A, Taniguchi F, Tagashira Y, Watanabe A, Harada T, Terakawa N TNF α gene silencing reduced lipopoly saccharide-promoted proliferation of endometriotic stromal cells. Am. J. Reprod. Immunol. 61(4), 277-285, 2009, 査読有

⑧ Tagashira Y, Taniguchi F, Harada T, Ikeda A, Watanabe A, Terakawa N Interleukin-10 attenuates TNF- α -induced interleukin-6 production in endometriotic stromal cells. Fertil. Steril. 91(5), 2185-2192, 2009, 査読有

⑨ Harada T, Momoeda M, Taketani Y, Hoshiai H, Terakawa N Low-dose oral contraceptive pill for dysmenorrhea associated with endometriosis: a placebo-controlled, double-blind, randomized trial. Fertil. Steril. 90(5), 1583-1588, 2008, 査読有

⑩ Ohata Y, Harada T, Miyakoda H, Taniguchi F, Iwabe T, Terakawa N Serum interleukin-8 levels are elevated in patients with ovarian endometrioma. Fertil. Steril. 90(4), 994-999, 2008, 査読有

⑪ Izawa M, Harada T, Taniguchi F, Ohama Y, Takenaka Y, Terakawa N An epigenetic disorder may cause aberrant expression of aromatase gene in endometriotic stromal cells. Fertil. Steril. 89(3), 1390-1396, 2008, 査読有

[学会発表] (計 19 件)

① 東 幸弘、出浦伊万里、伊藤雅之、谷口文紀、岩部富夫、原田 省、深部子宮内膜症に対する仙骨子宮靱帯切除の意義、第 32 回日本エンドメトリオーシス学会、2011. 1. 22-23、都市センターホテル (東京都)

② 出浦伊万里、伊藤雅之、谷口文紀、岩部富夫、原田 省、子宮内膜症が全腹腔鏡下子宮全摘術の手術手技および成績に及ぼす影響について、第 32 回日本エンドメトリオーシス学会、2011. 1. 22-23、都市センターホテル (東京都)

③ 谷口文紀、都田博子、高井絵理、上垣 崇、周防加奈、出浦伊万里、伊藤雅之、岩部富夫、寺川直樹、原田 省、ジェノゲストによる子宮内膜症間質細胞の増殖抑制作用とその機序、第 55 回日本生殖医学会・学術講演会、2010. 11. 11-12、あわぎんホール (徳島市)

④ 上垣 崇、谷口文紀、高井絵理、周防加奈、出浦伊万里、伊藤雅之、岩部富夫、寺川直樹、原田 省、正所性子宮内膜および子宮内膜症組織における IAP family 発現の差異、第 55 回日本生殖医学会・学術講演会、2010. 11. 11-12、あわぎんホール (徳島市)

⑤ 高井絵理、出浦伊万里、上垣 崇、木山智義、周防加奈、原田 省、伊藤雅之、谷口文紀、岩部富夫、原田 省、再発を繰り返した 15 年間に計 5 回の腹腔鏡下手術を施行した子宮内膜症の 1 例、第 50 回日本産科婦人科内視鏡学会学術講演会、2010. 7. 29-31、京王プラザホテル (東京都)

⑥ 谷口文紀、渡邊彩子、上垣 崇、高井絵理、周防加奈、出浦伊万里、伊藤雅之、岩部富夫、寺川直樹、原田 省、子宮内膜症細胞のアポトーシス抵抗性における Survivin の関与、第 62 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会、2010. 4. 23-25、東京国際フォーラム (東京都)

⑦ 周防加奈、谷口文紀、田頭由紀子、上垣 崇、高井絵理、出浦伊万里、伊藤雅之、岩部富夫、寺川直樹、原田 省、Apigenin による子宮内膜症間質細胞の増殖および PGE2 産生の抑制、第 62 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会、2010. 4. 23-25、東京国際フォーラム (東京都)

⑧ 原田 省、百枝幹雄、星合 昊、武谷雄二、寺川直樹、LEP (Low dose Estrogen Progestin) 配合剤の機能性月経困難症に対する臨床試験成績 —多施設共同プラセボ

対照二重盲検群間比較試験一、第 62 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会、2010. 4. 23-25、東京国際フォーラム（東京都）

⑨ 出浦伊万里、伊藤雅之、谷口文紀、岩部富夫、原田 省、金尾祐之、安藤正明、[ミニシンポジウム]深部子宮内膜症に対する腹腔鏡下手術～術式の標準化は可能か？～、第 31 回日本エンドメトリオーシス学会、2010. 1. 16-17、京都東急ホテル（京都市）

⑩ 谷口文紀、渡邊彩子、伊澤正郎、岩部富夫、原田 省、子宮内膜症細胞のアポトーシス抵抗性における survivin の役割、第 14 回日本生殖内分泌学会、2009. 11. 28、砂防会館（東京都）

⑪ 原田 省、谷口文紀、岩部富夫、伊澤正郎、寺川直樹、子宮内膜症細胞のアロマターゼ発現には DNA のメチル化が関与する、第 61 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会、2009. 4. 3-5、国立京都国際会館（京都市）

⑫ 竹中泰子、周防加奈、宮本綾子、田頭由紀子、渡邊彩子、谷口文紀、岩部富夫、原田 省、寺川直樹、LPS による子宮内膜症細胞の PGE 2 産生誘導と細胞増殖および浸潤作用、第 61 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会、2009. 4. 3-5、国立京都国際会館（京都市）

⑬ 谷口文紀、池田綾子、渡邊彩子、田頭由紀子、周防加奈、岩部富夫、原田 省、寺川直樹、パスウェイ特異的アレイを用いた子宮内膜症細胞のアポトーシス抵抗性の解明、第 30 回日本エンドメトリオーシス学会、2009. 1. 17-18、仙台国際センター（仙台市）

⑭ 都田博子、渡邊彩子、田頭由紀子、池田綾子、出浦伊万里、片桐千恵子、谷口文紀、岩部富夫、原田 省、寺川直樹、子宮内膜症細胞における IL-8 産生に対する GnRH agonist および antagonist の効果、第 53 回日本生殖医学会総会・学術講演会、2008. 10. 23-24、神戸国際会議場（神戸市）

⑮ 原田 省、[シンポジウム] 子宮内膜症の診断・治療における腹腔鏡の意義、第 48 回日本産科婦人科内視鏡学会学術講演会、2008. 7. 31-8. 2、パンパシフィック横浜ベイホテル東急（横浜市）

⑯ 谷口文紀、原田 省、岩部富夫、田頭由紀子、渡邊彩子、片桐千恵子、出浦伊万里、寺川直樹、DNA マイクロアレイを用いた子宮内膜症細胞における遺伝子解析—子宮内膜症細胞の増殖におけるシグナル分子 TAK1 の役割—、第 81 回日本内分泌学会学術総会、

2008. 5. 16-18、青森市文化会館（青森市）

⑰ 池田綾子、谷口文紀、田頭由紀子、渡邊彩子、竹中泰子、出浦伊万里、堀江さや子、光成匡博、片桐千恵子、岩部富夫、原田 省、寺川直樹、TNF α に対する siRNA による子宮内膜症細胞の増殖抑制、第 60 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会、2008. 4. 12-15、パシフィコ横浜（横浜市）

⑱ 渡邊彩子、谷口文紀、池田綾子、田頭由紀子、竹中泰子、片桐千恵子、岩部富夫、原田 省、寺川直樹、伊澤正郎、正所性および異所性子宮内膜間質細胞におけるアポトーシス感受性、第 60 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会、2008. 4. 12-15、パシフィコ横浜（横浜市）

⑲ 田頭由紀子、谷口文紀、池田綾子、渡邊彩子、竹中泰子、岩部富夫、原田 省、寺川直樹、子宮内膜症細胞のサイトカイン産生に対する IL-10 の影響と細胞内シグナル伝達、第 60 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会、2008. 4. 12-15、パシフィコ横浜（横浜市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 省 (HARADA TASUKU)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：40218649

(2) 研究分担者

寺川 直樹 (TERAKAWA NAOKI)

鳥取大学・名誉教授

研究者番号：90163906

谷口 文紀 (TANIGUCHI FUMINORI)

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40322218