

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791168

研究課題名(和文)

月経関連遺伝子産物の機能解析と子宮内膜症の発症・進展に果たす役割

研究課題名(英文)

The functional analysis of the menstruation-related genes and its role in the onset and the progression of the endometriosis.

研究代表者

小田 英之 (ODA HIDEYUKI)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：50445235

研究成果の概要(和文):

当研究室においては、月経を模倣したヒト子宮内膜細胞の培養法を用いて、月経に関連して変化する遺伝子、月経関連遺伝子の候補を保持しており、その中で sarcoglycan-delta の上昇が、microarray だけでなく、RT-PCR 法および組織免疫染色にて確認された。次に、この遺伝子の子宮内膜症発症における影響を調べるために、磁力を用いた新規子宮内膜症モデルマウスの開発を行っており、現在磁力の強化を行っている。

研究成果の概要(英文):

We have already had the candidate genes of the menstruation-related genes which expression alters according to the menstrual period. And we found that the expression of the sarcoglycan delta increased not only by the microarray but also by RT-PCR and immunohistochemistry. And to analyze its effect in the endometriosis we try to develop the novel endometriosis model mouse using the magnetic power and improve the magnet and magnetic materials.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：月経関連遺伝子、子宮内膜症、sarcoglycan-delta、磁力、子宮内膜症モデルマウス、microarray

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は生殖可能年齢の女性に発症する疾患であり、月経困難症や不妊症の原因となる。さらに、近年その一部が癌化するとの報告がなされている。一方、子宮内膜症の発症・伸展機序に関しては、月経に関連が深いということは多くの報告から明らかであるが、その細胞生物学的な点を含め、不明な点が多く、新規薬物開発の遅れにつながって

る。

2. 研究の目的

月経周期に合わせて体内のホルモン動態が変化すると、子宮内膜における遺伝子発現も変化する。子宮内膜症において、この月経周期に関連して変化する遺伝子である月経関連遺伝子の異常が疾患の発症・伸展に関与していると考え、以下の研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 月経関連遺伝子の探索

当研究室において、ヒト子宮内膜細胞を *in vitro* にて培養し、月経関連ホルモンの変化を加えることで、ヒト体内での月経を模倣したモデルを構築し、それを用いた cDNA microarray のデータを所有している。その中で、候補遺伝子を増殖期、分泌期、月経期のいずれに発現上昇を認めるかで3群に分け、月経期に上昇する候補遺伝子に関して RT-PCR および Western blotting、組織免疫染色法にて遺伝子およびタンパク発現を検討した。

(2) 月経関連遺伝子の *in vivo* での子宮内膜症発症および伸展における影響を検討するために、新規子宮内膜症モデルマウスの開発を行った。具体的には、磁力を用いて細胞を局所に集積させる手法のため、磁性体が付着した抗体を用いて細胞をソーティングするシステムである、Milteny 社の MACS 法®を応用した。同社より販売されている、LNGFR (LNGFR の細胞内ドメインを欠失したものを)保持したベクター、pMACS LNGFR -IRES® に crickbeatle luciferase (CBR Luc) を挿入し、発現効率上昇のため、IRES 部分を 2A peptide の配列に交換した。

(3) 前述のベクター pMACS CBR Luc -2A - LNGFR から、PCR による Gateway 法を用いて、Invitrogen 社の pLenti7.3/V5 DEST GATEWAY vector® に CBR Luc -2A - LNGFR を移行した。このベクターを用いて、CBR Luc -2A - LNGFR および EmGFP を発現させるレンチウイルスを作成した。

(4) 正常ヒト子宮内膜細胞より増殖能、接着能が強いと考えられる Ishikawa 細胞を使用して、磁力により細胞が局所に集積するかを検討した。また、Ishikawa 細胞は月経関連ホルモンの影響を受けるため、マウスは細胞投与より以前に両側卵巣を切除し、Ishikawa 細胞の増殖を促すために、エストロゲン徐放製剤をマウス皮下に埋め込んだ。具体的には、Ishikawa 細胞を 70% confluency になるまで培養し、レンチウイルスを感染させ、導入した遺伝子が発現するまで培養した。その後、抗 LNGFR 抗体を用いて、Milteny 社のプロトコールに従って、auto MACS® possel d mode にてソーティングした。その細胞を重度免疫不全マウスである NOD/shi scid, IL-2R KO マウス (NOG マウス®) 腹腔内に投与し、同部位に磁石 (0.3T) を留置して集積の有無を見た。なお、コントロール群は、磁性体が付着していない抗体を使用して、同様の処理をした。

4. 研究成果

(1) RT-PCR にて発現上昇を認めた候補遺伝子は sarcoglycan delta であった。Western blotting でタンパク発現を定量評価したところ、RT-PCR と同様に月経期において発現の上昇を認めた。そこで、ヒト子宮内膜検体を用いて、組織免疫染色を施行したところ、同タンパクは子宮筋においては月経周期に関係なく恒常的に発現していた。一方、子宮内膜においては、高温期腺上皮に発現を認める一方、間質細胞においては、増殖期、分泌期に発現を認めず、月経期においてもごく一部の細胞にのみ発現を認めるのみだった。このことから、高温期子宮内膜腺細胞において、本来筋細胞特異的に発現が認められる sarcoglycan delta の発現が認められており、今後は子宮内膜癌細胞において、その発現がどう変化しているかを探求していくことで、新たな子宮内膜の癌化の指標となる可能性を有している。また、Umezawa らにより、ヒト月経血より、骨格筋細胞および心筋細胞への誘導・分化に成功したという報告 (Mol Biol Cell. 18(5):1586-1594, 2007; Stem Cells Vol. 26 No. 7 July 2008, pp. 1695-1704) における、細胞生物学的機序の解明の足掛かりとなる可能性がある。

(2) IRES の代わりに 2A を挿入し、CBR Luc -2A - LNGFR を CMV promoter にて発現するレンチウイルスを作成した。これにより、CBR Luc の導入された細胞の)90%超を回収することができるようになった。これは、既存のベクターにおいては、その大部分を回収できなかったことから、ヒト子宮内膜細胞などの希少性の高い細胞を使用した研究において、非常に重要な意味を持つてくる。

(3) 同ウイルスを使用し、Ishikawa 細胞をソーティング後、NOG マウス腹腔内に投与した。

当初、卵巣切除と同時に細胞を投与し、投与部位皮下に磁石を埋め込んでいたところ、腹壁および切除断端に細胞集積を認めた。そのため、炎症反応が細胞接着促進的に働いている可能性が考えられたため、卵巣切除から7日後に細胞を投与し、同部位皮膚に磁石を留置することとした。また、磁石の留置時間は24時間まで留置すると、それ以後と差異がないことを確認した。その結果、細胞数を $1 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$ PBS に懸濁し、投与してもマウス腹壁に細胞が生着していることを確認できた。一方、磁性体付き抗体を使用しても、細胞数が多い場合やコントロール群では、マウス子宮表面へ必ず生着をしていた。このことから、エストロゲン存在下の子宮からは、ヒト Ishikawa 細胞を誘引する何らかのケモカインが発生しており、そのために子宮へ生

着しやすく、腹壁のみに単一生着部位を形成するためには、さらに強力な磁力を要することが判明した。この知見は、増殖期のマウス子宮では、子宮内腔のみならず腹腔内にもそのサイトカインが分泌されており、ヒトでも同様の現象が発生している可能性がある。今までの子宮内膜症の発症機序として、月経血が腹腔内に逆流して生着する逆流説が多くの研究結果および研究者により支持されているが、今回の子宮から腹腔内へのサイトカイン分泌という現象は、その仮説をさらに支持するとともに、子宮での遺伝子発現を変化させることで、腹腔内病変である子宮内膜症の新規発症および進展を制御できる可能性を示唆するものであり、今後の研究において新たな可能性を示唆したものである。

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. Masuda H, Oda H, Yoshimura Y, Maruyama T, (計13人7番目)、Stem Cell Like Properties of the Endometrial Side Population: Implication in Endometrial Regeneration. PLoS ONE、査読有、volume 5(4)、2010年、e10387
2. Ono M, Oda H, Yoshimura Y, Maruyama T(計10人5番目)、OCT4 expression in human uterine myometrial stem/progenitor cells. Hum Reprod 査読有、volume25(8)、2010年、2059-2067
3. Uchida H, Maruyama T, Oda H(計8人4番目), Epigenetic Treatment in Assisted Human Embryo Implantation. J. Mamm. Ova Res. 査読有、volume26、2009年、116-121
4. Arase T, Oda H, Maruyama T(計13人6番目) The UDP-glucose receptor P2RY14 triggers innate mucosal immunity in the female reproductive tract by inducing IL-8. J Immunol. 査読有、volume182、2009年、7074-7084
5. Nagashima T, Maruyama T, Oda H (計12人7番目), Activation of SRC kinase and phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 5 are required for decidual transformation of human endometrial stromal cells. Endocrinology、査読有、volume149、2008年、1227-1234
6. Ohta K, Maruyama T, Oda H(計10人8番目), Glycodelin blocks progression to S phase and inhibits cell growth: a possible progesterone-induced regulator for endometrial epithelial cell growth. Molecular human reproduction、査読有、volume14、2008年、17-22
7. 丸山哲夫, 小田英之, 西川明花, 各務真紀, 内田 浩, 吉村泰典、【思春期の諸問題】 排卵障害、産科と婦人科、査読有、75巻、2008年、529-536
8. 丸山哲夫, 小田英之, 吉村泰典(計8人3番目) 【産婦人科ホルモン療法マニュアル】 生殖内分泌・不妊 無月経、産科と婦人科、査読有、75巻、2008年、8-14
9. 内田 浩, 小田英之, 吉村泰典(計8人5番目) 【ホルモン療法 最近の話題】 月経異常を伴う内分泌疾患、産婦人科治療、査読有、96巻、2008年、163-168
10. 小野政徳, 丸山哲夫, 小田英之, 吉村泰典(計16人7番目) 妊娠子宮における子宮筋 Side Population 細胞の役割、日本生殖内分泌学会雑誌、査読有、13巻、2008年、25-19
11. 梶谷 宇, 丸山哲夫, 小田英之, 吉村泰典(計9人6番目)、子宮内膜症・腺筋症由来疼痛に関連する遺伝子の発現解析、エンドメトリオーグス研究会会誌、査読有、29巻、2008年、91-93

〔学会発表〕(計10件)

1. Tetsuo Maruyama, Possible involvement of endometrial stem/progenitor cells in the pathogenesis of endometriosis. The First Asian Conference on Endometriosis(ACE).2010年10月23~27日、Denver, USA
2. Masanori Ono, Prospective isolation and functional analysis of stem/progenitor cells from the human uterine myometrium. 8th International Society for Stem Cell Research(ISSCR)、2010年6月16~19日、San Francisco, CA USA

3. Takashi Kajitani, Up -regulation of 5 - and 15 -lipoxygenases in endometriosis. 25th European Society of Human Reproduction and Embryology(ESHRE). 2009年6月26日~7月1日、Amsterdam, Netherlands
4. Toru Arase, UDP -glucose and its receptor P2RY14 as a novel innate immunity in the female reproductive tract. 29th American Society for Reproductive Immunology(ASRI) 2009年6月5日~9日、Orlando, Florida
5. Ono M, The role of uterine smooth muscle stem cells, isolated based on cell surface markers, in myometrial remodeling in the pregnant uterus. 56th Society for Gynecologic Investigation 2009年3月17日~21日、Glasgow, Scotland
6. 小野政徳、表面抗原を用いたヒト子宮平滑筋幹細胞の新しい分離法の開発とその妊娠至急リモデリングにおける役割、第8回 日本再生医療学会、2009年3月5日~6日、東京都千代田区
7. 梶谷 宇、子宮内膜症組織におけるリポキシゲナーゼ経路関連遺伝子の発現解析、第30回 日本エンドメトリオーシス学会、2009年1月17日~18日、宮城県仙台市
8. 荒瀬 透、子宮内膜における P2RY14 を介した新たな粘膜防御機構、第23回 日本生殖免疫学会、2008年12月6日~7日、富山県富山市
9. 西川明花、Chemical abortionの既往を有する反復流産患者の病院および妊娠転帰に関する検討、第53回 日本生殖医学会、2008年10月23日~24日、神戸市中央区
10. 小野政徳、子宮平滑筋幹細胞の新しい分離法とその機能解析、第81回 日本内分泌学会学術総会、2008年5月16日~18日、青森県弘前市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小田 英之(Oda Hideyuki)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号: 50445235

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし