

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16775

研究課題名（和文）ヘプシジンとPGC-1 のクロストークに基づく子宮内膜症治療の分子基盤の確立

研究課題名（英文）Establishment of the molecular basis for the treatment of endometriosis based on the crosstalk between hepcidin and PGC1a

研究代表者

片岡 恒（KATAOKA, HISASHI）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・学内講師

研究者番号：90849027

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：子宮内膜症患者の月経血中に高濃度のhepcidinが存在し、hepcidinが鉄を細胞内から細胞外へ排出する唯一の輸送体であるferroportinの膜分布濃度の低下を引き起こし、細胞内の鉄貯留を促進させることを明らかにした。さらに、過剰な細胞内鉄貯留はROSの産生促進からNAD量の相対的な低下を来し、正常子宮内膜間質細胞だけでなく子宮内膜症病巣の間質細胞にも炎症性変化をもたらすことから、子宮内膜症の発症や病態進展に深く関わっている可能性を見出した。また細菌性エンドトキシンであるLPSがその発症や病態形成に重要な役割を果たしており、抗酸化剤の投与によって抑制されることも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜症の治療は専ら外科的治療とホルモン治療が行われてきたが、妊孕性の温存や副作用の回避のために新たな治療戦略の確立が望まれている。われわれは鉄代謝と酸化ストレスの観点から子宮内膜症の発症と病態進展に新たな知見を見出した。特に子宮内膜症を引き起こす細胞内に過剰の鉄が貯留することにより、細胞内の酸化ストレスが上昇、その細胞に炎症性変化を引き起こすことが明らかとなった。これらの分子学的機構については新たな治療ターゲットとして有用であると考えられ、さらなる研究を継続している。

研究成果の概要（英文）：It was revealed that a high concentration of hepcidin is present in the menstrual blood of patients with endometriosis. Hepcidin causes a decrease in the membrane distribution concentration of ferroportin, the only transporter that expels iron from cells to the extracellular space, promoting intracellular iron concentration. Furthermore, excessive intracellular iron concentration leads to a relative decrease in NAD levels due to the promotion of ROS production, causing inflammatory changes not only in normal endometrial stromal cells but also in the stromal cells of endometriotic lesions. This suggests a deep involvement in the onset and progression of endometriosis. It was also found that bacterial endotoxin LPS plays an important role in the onset and pathogenesis, which can be suppressed by the administration of antioxidants.

研究分野：産婦人科、子宮内膜症

キーワード：ヘプシジン 酸化ストレス 子宮内膜症

## 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は子宮内膜様組織が卵巣や腹膜、骨盤深部などで異所性に増殖することによって生じる。生殖年齢女性の6-10%が罹患し、骨盤痛や不妊の原因となり生活のQOLを著しく低下させる。子宮内膜症の詳細な病因は明らかではないが、Sampsonの唱えた逆流説が広く受け入れられている。月経血に含まれる子宮内膜細胞が腹膜や卵巣表面に生着、増殖することで発症すると考えられているが、子宮内膜症細胞と子宮内膜細胞は増殖能やエストロゲン感受性、炎症の発現やアポトーシス抵抗性など様々な点で異なっており、子宮内膜症の発症には月経血などにより変化を受けた子宮内膜細胞が重要であると考えられる。研究代表者らは月経血中には高濃度の遊離鉄が存在することを明らかにし、正常な子宮内膜細胞は過剰な遊離鉄により様々な修飾を受けている可能性を見出した。しかしながら健康者と子宮内膜症患者では月経血中の鉄濃度に違いは認めず、発症メカニズムには鉄代謝に関わる因子が重要であると考えられている。Hepcidinはペプチドホルモンの一種であり、体内の鉄の恒常性の維持に非常に重要な役割を担っている。生体の唯一の鉄輸送膜蛋白であるferroportinに結合し、その膜分布密度を低下させることにより血清鉄濃度の調整を行っている。またferroportinの膜分布密度の低下は細胞内に過剰な鉄貯留を引き起こし、酸化ストレス、細胞増殖、炎症など、子宮内膜症の発症に関与する幅広い機序に影響を与えると考えられている。

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha (PGC-1)は飢餓や運動といった外的刺激に反応してRetinoid X receptor alpha (RXR)やPeroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR)などのさまざまな核内受容体と共役し、ステロイドホルモン産生や糖代謝、ミトコンドリア合成といった働きを司る転写共役因子である。PGC-1は乳癌や子宮内膜癌などのエストロゲン依存性疾患において発現がみられるが同じエストロゲン依存性疾患である子宮内膜症における発現や働きは明らかでなかった。われわれはこれまでに子宮内膜症組織においてPGC-1が高発現していること、また核内受容体であるsteroidogenic factor-1 (SF-1)の発現を誘導し、さらにアロマターゼ酵素を活性化し局所のエストロゲン産生にも寄与することを明らかにした。またPGC-1がステロイドホルモン産生制御だけでなく、子宮内膜症間質細胞の増殖促進や局所の炎症、アポトーシス抵抗性の獲得を誘導し、その結果惹起されたサイトカイン等が再びPGC-1を誘導させるといった子宮内膜症の病態形成・進展におけるmaster geneである可能性を見出した。さらにhepcidinは細胞内の鉄貯留を介してPGC-1の発現促進にも深く関わり、hepcidinとPGC-1のクロストークの存在を示し、病態形成・促進にも重要な役割を担っていることを明らかにした。以上より、hepcidinは子宮内膜症の発症だけでなく、病態形成にも中心的な働きを示し、hepcidinの調節因子の同定とその調節機構の制御を明らかにすることで、子宮内膜症の治療と予防の両側面からアプローチする新たな治療戦略の分子基盤の確立が期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はhepcidinを制御する因子やその調節機構の詳細な理解のもと、子宮内膜症の新たなバイオマーカーとしての可能性とhepcidinをターゲットとした子宮内膜症治療・発症予防効果を検討することである。本研究の特徴は子宮内膜症の「hepcidinを中心とした子宮内膜症発症論」を提唱するものであり、hepcidinをターゲットにした治療・予防戦略の可能性を探索することである。

本研究グループはこれまでに子宮内膜症について古くより研究を進め、国内外のグループと共同してその発生機序の解明、治療法の開発などに関わってきた。われわれはこれまでにエストロゲン依存性疾患の一つである乳癌や子宮内膜癌に発現がみられる転写共役因子のPGC-1が、同じエストロゲン依存性疾患である子宮内膜症において強発現していることや、アロマターゼを介して局所のエストロゲン合成に寄与していること、さらには子宮内膜症間質細胞の増殖促進や局所の炎症、抗アポトーシス関連蛋白の発現制御など、子宮内膜症の病態形成において中心的な役割を果たすmaster geneである可能性を見出した。さらにhepcidinはPGC-1の発現を促進することにより子宮内膜症の病態形成に重要な役割を果たしていることも明らかにし、hepcidinとPGC-1の関連性を明らかにした。以上より、本研究によって得られるhepcidinの発現調節因子の同定と調節経路の詳細な解明や、またhepcidinの発現調節によるPGC-1を介した病態形成への影響、そしてhepcidinをターゲットとした子宮内膜症発症予防に対する効果を解明することで、治療と予防の両側面からアプローチすることで、子宮内膜症治療への新たな分子基盤を確立させる。

## 3. 研究の方法

Hepcidinの発現調節因子の同定とその調節経路の解明

1. Hepcidinの発現促進・抑制因子を同定する。Hepcidinの発現変化をリアルタイムPCRやウェスタンブロット法、免疫染色で検討する。発現制御因子の候補としては他の疾患で既に報告されている因子の中から、特に子宮内膜症の病態形成と関わっていると考えられる炎症性サイトカ

- インや Lipopolysaccharide (LPS)、小胞体ストレスなどの因子を検討する。
2. Hecpidin の発現変化について、転写プロモーター活性の評価を行う。評価方法としてはレポーター遺伝子アッセイ、メチル化などのエピジェネティクスな変化も検討する。
  3. 子宮内膜症における同定された調節制御因子の調節経路の解析を行う。調節制御因子を強発現/抑制した際に変動する遺伝子や伝達経路の解明には DNA microarray を用い、また伝達経路にかかわる蛋白の阻害剤を用いて下流遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR またはウェスタンブロット法で調べる。

#### Hecpidin による PGC-1 発現調節機構とその治療効果の検討

1. Hecpidin の強発現/抑制による PGC-1 の転写プロモーター活性の評価を行う。評価方法としてはレポーター遺伝子アッセイ、メチル化などのエピジェネティクスな変化も検討する。
2. で同定された hecpidin 調節制御因子を用い、PGC-1 の転写抑制を介した子宮内膜症組織への治療効果を検討する。子宮内膜症モデルマウスに制御因子の阻害剤を投与し、子宮内膜様組織の細胞増殖抑制効果を検討する。
3. 子宮内膜症モデルマウスに制御因子の阻害剤を投与し、マウスの体重変動や脂肪組織量の変化、血糖値の変化などの副作用を評価する。

#### Hecpidin 調節因子による発症予防効果の検討

1. Hecpidin 調節制御因子による正常子宮内膜間質細胞への影響を検討する。制御因子の強発現/抑制による子宮内膜間質細胞の接着能の変化を細胞接着アッセイで検討する。また子宮内膜症間質細胞で特異的に発現しているアロマトラーゼやエストロゲン受容体などの発現をリアルタイム PCR やウェスタンブロット法、免疫染色で検討する。
2. 子宮内膜症モデルマウスを用い、制御因子の抑制下での子宮内膜様組織の個数や重量などの変化を検討する。

## 4. 研究成果

われわれの研究により、子宮内膜症患者の月経血中に高濃度の hecpidin が存在すること、子宮内膜症組織にも正常子宮内膜と比して hecpidin の発現が促進していること、さらに hecpidin が唯一の鉄を細胞内から細胞外へ排出する輸送体である ferroportin の膜分布濃度の低下を引き起こし、その結果、細胞内の鉄貯留を促進させることを明らかにした。さらに、過剰な細胞内鉄貯留は Reactive oxygen species (ROS) の産生促進から NAD 量の相対的な低下を来し、正常子宮内膜間質細胞だけでなく子宮内膜症病巣の間質細胞にも炎症性変化をもたらすことから、子宮内膜症の発症や病態進展に深く関わっている可能性を見出した。

子宮内膜症患者においては、腔内細菌叢の変化、特に細菌性エンドトキシンである Lipopolysaccharide (LPS) がその発症や病態形成に重要な役割を果たしていることから、LPS に注目した。LPS や炎症性サイトカインである IL-6 の添加により hecpidin の発現は有意に上昇することを確認した。これらの反応は、MMF のような抗酸化剤の投与によって抑制されることも明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shimura Koki, Tarumi Yosuke, Fujii Maya, Ogawa Kanae, Maeda Eiko, Tanaka Yukiko, Okimura Hiroyuki, Kataoka Hisashi, Takaoka Osamu, Ito Fumitake, Koshiba Akemi, Khan Khaleque N., Kusuki Izumi, Kitawaki Jo, Mori Taisuke	4. 巻 30
2. 論文標題 Low-Nutrient Environment-Induced Changes in Inflammation, Cell Proliferation, and PGC-1 Expression in Stromal Cells with Ovarian Endometriosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproductive Sciences	6. 最初と最後の頁 1094 ~ 1102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s43032-022-01089-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Izumi Yuko, Kataoka Hisashi, Koshiba Akemi, Ito Fumitake, Tanaka Yukiko, Takaoka Osamu, Maeda Eiko, Okimura Hiroyuki, Sugahara Takuya, Tarumi Yosuke, Shimura Koki, Khan Khaleque N., Kusuki Izumi, Mori Taisuke	4. 巻 209
2. 論文標題 Hepcidin as a key regulator of iron homeostasis triggers inflammatory features in the normal endometrium	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 191 ~ 201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2023.10.402	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔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 和泉祐子、片岡 恒、森 泰輔
2. 発表標題 Hepcidinは細胞内鉄蓄積を介して 子宮内膜細胞の炎症性変化を誘発する
3. 学会等名 第23回日本抗加齢学会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------