

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～ 2011

課題番号：22791537

研究課題名（和文） 新たな子宮内膜症治療薬の検討

研究課題名（英文） The development of new drugs for endometriosis

## 研究代表者

西田 正和 (MASAKAZU NISHID)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：90404384

## 研究成果の概要（和文）：

我々の研究室では、長年にわたり子宮内膜症の病態解明、新薬の開発についての研究を行ってきている。今回の検討では、子宮内膜症細胞に Bufarin、 $\beta$ -HIVS、BAY 11-7085 (BAY) の各々を作用させ、関連するアポトーシス関連蛋白を同定したことに加え、細胞周期にも着眼した。Bufarin、 $\beta$ -HIVS、BAY について、細胞周期を停止させる作用を持つことを発見した。これら 3 つの薬剤作用後の細胞周期関連蛋白については、ある程度の差異はあるものの、その全てにおいて G0 期で細胞周期の停止が認められた。

また、今回新たに、semaphorin(神経軸索の方向性を決定する神経軸索誘導調節因子)についても、新たな候補薬の一つとして検討したところ、上記 3 剤と同様なアポトーシス誘導作用を認めた。

## 研究成果の概要（英文）：

We have been worked about the elucidation of the pathogenesis of endometriosis and the development of new drugs for this disease. This time, we detected that Bufarin,  $\beta$ -HIVS, and, BAY had the function to stop the cell cycle of endometriotic cells. The patterns of arrest of the cell cycle were G0-G1.

In addition, we focused on the new agents, semaphorin which is the anti-factor for neuron cells, and we detected that this agents also induced apoptosis for the endometriotic cells as well as Bufarin,  $\beta$ -HIVS, and BAY.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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

キーワード：生殖医学

### 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は、現在でもその病因は不明で、新たな薬剤が開発されつつあるものの、手術による根治治療に比べ、限界があるのが現状である。我々は、長年子宮内膜症の病態解明および治療薬の開発に取り組んでいる。我々は、子宮内膜症細胞では、アポトーシス抑制蛋白である Bcl-2、Bcl-XL 蛋白の発現が増強しており、interferon (INF)  $\gamma$  により惹起されるアポトーシスが、正常子宮内膜間質細胞と比較すると起こりにくいこと報告し、また、生薬である Bufalin と beta-Hydroxyisovalerylshikonin (beta-HIVS, 紫根) や NF $\kappa$ -B の阻害剤である BAY には、アポトーシス誘導作用があり、子宮内膜症細胞においてアポトーシスを惹起することを我々は以前報告した。これらの研究をさらに進めていき、研究課題となっている子宮内膜症の新たな薬剤についての可能性を検討している。

### 2. 研究の目的

上記に示した Bufalin、 $\beta$ -HIVS、BAY は、本来アポトーシスに耐性を持つ子宮内膜症に対し、apoptosis 抑制蛋白である Bcl-2 や Bcl-XL の発現を減少させることで、アポトーシスを引き起こしている。今回の研究で、このアポトーシス誘導に関する他の蛋白、遺伝子レベルでの解明を目的とし、さらに進めていく。

また、現在の *in vivo* への研究へと発展させるべく、子宮内膜症モデルのマウスにこれらの薬剤を用いてその効果について検討し、*in vivo* での検討を行ない、実際に将来臨床応用できるように研究を進めていくことを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 培養細胞の分離ならびに純度の確認

・手術によって得られた子宮内膜症細胞、正常子宮内膜間質細胞の2種類の細胞をコラーゼゲナーゼにより処理。(インフォームドコンセント取得)

・150 $\mu$ m と 70 $\mu$ m のフィルターを用い、各々の内膜間質成分を分離し細胞を継代培養。

・ビメンチン、ケラチン、ファクターエイト、leukocyte common antigen で免疫染色し内膜腺上皮と内膜間質細胞の純度を確認し、これにより得られた純粋な細胞を種々の薬剤で刺激し、各種実験を行う。

(2) ELISA 法、DNA ladder 法を用いた子宮内膜症細胞の Apoptosis の評価

・上記方法に従い、得られた各種培養細胞に Bufarin、 $\beta$ -HIVS を添加し、細胞上清を採取する。また、同時に plate に接着した細胞もトリプシンを用いて剥離し、PBS で洗浄の後、回収する。

・採取した各種培養細胞を ELISA 法を用いて apoptosis の有無を評価する。

・同様な方法で採取した各種細胞を DNA ladder 法を用いて apoptosis の誘導を確認する。

(1) ウェスタン法による、培養した各々の細胞における apoptosis 関連蛋白、細胞周期関連蛋白の発現確認

・培養した子宮内膜症細胞より蛋白を採取。

・測定予定の各種蛋白をウェスタン法を用いて確認する。

(4) WST-1 Cell Proliferation Assay System、BrdU cell incorporation

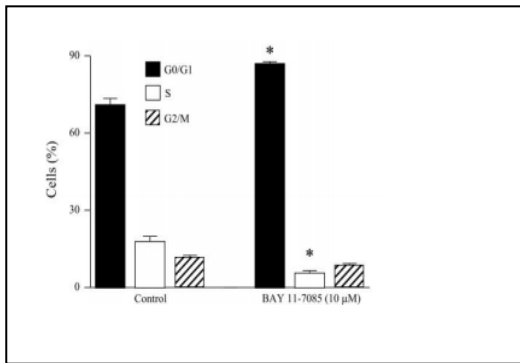
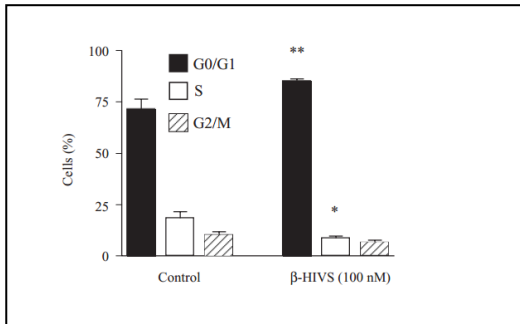
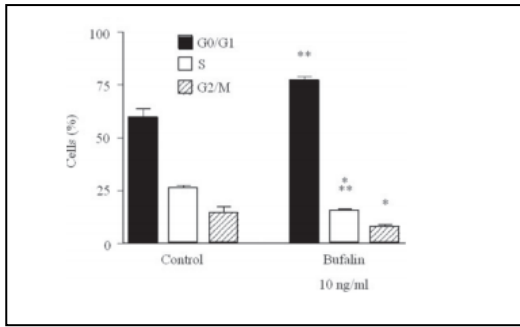
immunoassay を使用し、Bufarin、 $\beta$ -HIVS、BAY で作用させた、子宮内膜症細胞、正常子宮内膜間質細胞の増殖抑制効果を検討

・96-well plate に培養させた子宮内膜症細胞、正常子宮内膜間質細胞に Bufarin、 $\beta$ -HIVS を添加し、上記 assay 系を用いて細胞増殖の抑制を検討。

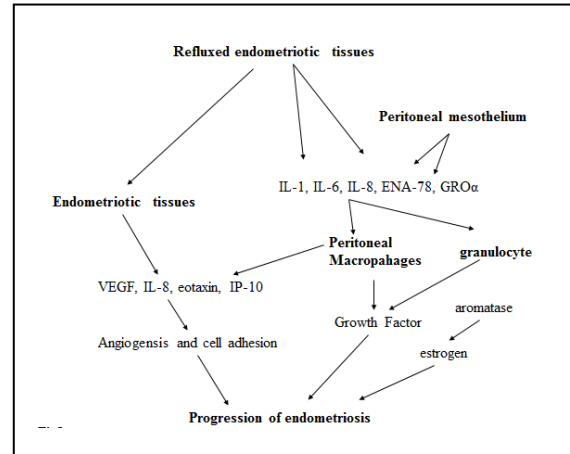
### 4. 研究成果

・子宮内膜症の病態の解明のため、関連するアポトーシス関連因子についての検討に加え、Bufarin、 $\beta$ -HIVS、BAY のもつ細胞周期にも着眼し、子宮内膜症細胞の細胞周期を停止させる作用 (G0-G1 arrest) を持つことを発見した。

上段より Bufarin、 $\beta$ -HIVS、BAY。各々において G0-G1 arrest を惹起していることを発見した。



また、下記の図は、子宮内膜症の病態について、当教室のこれまでの研究成果をレビューとしてまとめたものである。最も支持されている説である子宮内膜逆流節を基にして作成した図で、腹腔内に逆流した子宮内膜症細胞のうち、アポトーシスに耐性を持ったもののみが、腹腔内に生着し、子宮内膜症としての病態を形成する。その病態の形成の際には、種々のサイトカインや成長因子が関与しており、下記に示すように IL-1、IL-6、IL-8、ENA78、GRO $\alpha$  などが深く関与することを現在までに示してきた。



・今回新たに、semaphorin(神経軸索の方向性を決定する神経軸索誘導調節因子)についても、新たな候補薬の一つとして検討した。semaphorinには種々の sub-family をもち、今回研究したのは soluble form をもつ 3 型に着眼し、そのレセプターである neuropilin とともに子宮内膜症細胞における発現を認めた。まだ、pilot study 的なところもあるが、上記の Bufarin、 $\beta$ -HIVS、BAY と同様なアポトーシス誘導作用を認めた。

## 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 5 件)

①Role of chemokines in the pathogenesis of endometriosis.

Nishida M, Nasu K, Narahara H  
Front Biosci 2011 1(3):1196-204.

②The role of apoptosis in the pathogenesis of endometriosis.

Nishida M, Nasu K, Narahara H  
Curr Res In Immunology 2011; 5: 1-18

③The role of the IL-1 system in reproductive biology.

Nishida M, Nasu K, Narahara H  
Current Trends in Endocrinology 2011; 5: 67-73

④Aberrant expression of apoptosis-related molecules in

endometriosis: a possible mechanism underlying the pathogenesis of endometriosis.

Nasu K, **Nishida M**, Kawano Y, Tsuno A, Abe W, Yuge A, Takai N, Narahara H. *Reprod Sci.* 2011 Mar;18(3):206-18.

⑤Decidualization attenuates the contractility of eutopic and ectopic endometrial stromal cells: implications for hormone therapy of endometriosis. Tsuno A, Nasu K, Yuge A, Matsumoto H, **Nishida M**, Narahara H. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Jul;94(7):2516-23.

〔学会発表〕(計2件)

①第56回日本生殖医学会学術講演会・総会  
横浜市・パシフィコ横浜  
2011年12月8-9日

Bufalinにより引き起こされる子宮内膜症細胞のアポトーシスの検討

**西田 正和**, 奈須 家栄, 河野 康志,  
楢原 久司

②第55回日本生殖医学会総会・学術講演会  
徳島市・徳島郷土文化会館,  
ホテルクレメント徳島  
2010年11月11日-12日

子宮内膜症細胞における interferon  $\gamma$  により惹起されるアポトーシスの検討

**西田正和**, 奈須家栄, 古川雄一, 津野晃寿,  
楢原久司

〔図書〕(計1件)

①【子宮内膜症合併不妊の治療法】 妊孕性向上のための内膜症治療 ジェノゲスト(解説/特集)

**西田正和**, 楢原久司  
産科と婦人科 77 巻 7 号 Page 828-832  
2010

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

西田 正和 (MASAKAZU NISHID)

大分大学・医学部・助教

研究者番号: 90404384

(2)研究分担者 ( )

研究者番号:

(3)連携研究者 ( )

研究者番号: