

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16832

研究課題名（和文）子宮内膜微小環境に着目した子宮内膜症の病態解明と抜本的新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel treatment for endometriosis by focusing on the endometrial microenvironment.

研究代表者

村岡 彩子（MURAOKA, AYAKO）

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40930269

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：子宮内膜症の発症原因を探索するため、子宮内膜症患者の正所性子宮内膜に高発現するtransgelin(TAGLN)に着目して子宮内膜症の病態解明及び抜本的新規治療法の開発を目指した。TAGLNの発現誘導因子としてTGFを見出し、詳細な機能解析の結果ミオカインとしてのIL-6の関与に着目し、並びに内膜症モデルマウスを用いて生体内での検討を行うことでTAGLNの子宮内膜線維芽細胞での発現を抑制し、子宮内膜症発症を減弱させる治療方法を模索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜症の病態解明に迫り、子宮内膜内の線維芽細胞に高発現するTAGLNに着目し、その上流の分子動態機構を明らかにすることで子宮内膜症への子宮内膜内細菌の関与を見出したことは、妊娠を希望する子宮内膜症患者にとって手術や偽閉経療法を回避できる新規治療戦略を打ち出す緒となったと考えられる。社会的にも罹患率の高い子宮内膜症について新規治療戦略が望めれば少子化対策など社会貢献となる価値があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In order to investigate the pathogenesis of endometriosis, we focused on transgelin (TAGLN), which is highly expressed in the eutopic endometrium of patients with endometriosis, and aimed to elucidate the pathogenesis of endometriosis and develop a novel treatment for endometriosis. We also investigated the involvement of IL-6 as a myokine in the pathogenesis of endometriosis. In vivo model, using mouse models of endometriosis, we sought a treatment method to suppress the expression of TAGLN in endometrial fibroblasts and to attenuate the onset of endometriosis.

研究分野：子宮内膜症

キーワード：子宮内膜症 子宮内膜線維芽細胞 子宮内細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症の成因としては月経中に含まれる子宮内膜組織が卵管を通過して逆流し、腹膜や卵巣表面に異所性に子宮内膜組織が生着・増殖するという説が有力であるが詳細は明らかになっておらず、世界中で多くの研究者が子宮内膜症の病因について研究をしている。子宮内膜症成立のための未知なる発症メカニズムの解明を目的に、本研究では病変の主座となる線維芽細胞に着目して、子宮内膜症の原因分子を探索することを目指した。研究開始当初の背景として、これまでに我々が作成した、子宮内膜細胞としての特性を維持し、子宮内膜症発症メカニズムの探究に応用可能な子宮内膜上皮細胞・線維芽細胞を用いることを検討済みであった。さらに、子宮内膜症を模倣するマウスモデルは確立されており、研究に応用できる状態であった。そこで、臨床サンプルから子宮内膜症の病態に直結する遺伝子発現変化を検証するため、正常子宮内膜線維芽細胞と内膜症病変部の線維芽細胞をそれぞれ網羅的遺伝子発現解析により比較検討し、内膜症病変部の線維芽細胞に優位に発現が増強しているトランスジェリン (TAGLN) を同定した。この遺伝子の発現変動を引き起こす因子を含め検証しようと試みることにした。

2. 研究の目的

子宮内膜症成立の発症メカニズムを解明するため、子宮内膜線維芽細胞に着目して、子宮内膜症の原因分子としての TAGLN の役割及びその誘導因子を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) 発現誘導因子の検討
 - 2) 子宮内膜細胞内での詳細な機能解析
 - 3) 内膜症マウスモデルでの検討
- の3点に分けて研究を行った。

1) TAGLN の発現誘導因子の検討

1-1) TGF シグナルと TAGLN の発現誘導の検討

- ・手術標本の臨床検体で内膜症病変部の TGF の免疫組織化学染色。
- ・子宮内膜線維芽細胞 (TAGLN は低発現) に対して TGF を添加することで TAGLN の発現が誘導されるか Western blotting による発現変化検証。
- ・TGF シグナル下流の SMAD シグナル阻害剤 (SB431542) を添加することで TAGLN の発現が抑制されるか Western blotting による発現変化検証。

1-2) TGF シグナルによる TAGLN のエピジェネティックな発現誘導の検討

- ・TAGLN のエンハンサー領域について TGF 添加によりヒストンのアセチル化 (H3K27Ac : 転写活性が亢進していることを示す) が増加するか Chip-PCR 法を用いて検証。
- ・SMAD シグナル阻害剤 (SB431542) 添加により同領域のアセチル化が減少するか Chip-PCR 法を用いて検証。

1-3) TGF シグナルと子宮内膜環境についての検討

- ・子宮内膜環境において TGF シグナルが増加する原因検索。
- ・子宮内膜環境での炎症関連遺伝子発現変動を RNA シークエンスにて網羅的解析。
- ・子宮内細菌叢の網羅的 16S シークエンス解析

2) TAGLN の子宮内膜細胞内での詳細な機能解析

2-1) 液性因子の探究

- ・子宮内膜線維芽細胞 (TAGLN は低発現) に対して形質転換ベクターを用いて TAGLN 強制発現株を作成。
- ・内膜症病変の線維芽細胞 (TAGLN は高発現) に対して si-RNA を用いて TAGLN 発現抑制株を作成。
- ・上記それぞれの細胞株について培養上清中の液性因子をサイトカインアレイにて網羅的に比較検討。

2-2) 液性因子の機能解析

- ・TAGLN の CLIK ドメイン (アクチンと結合して細胞収縮に関与する部位) 欠損変異ベクターを作成。
- ・変異ベクターを形質転換した線維芽細胞 (細胞収縮力を欠く) では標的液性因子の発現・分泌が減少するかどうか細胞免疫染色で検証。
- ・標的液性因子を *in vitro* の系で子宮内膜線維芽細胞に添加することで増殖促進作用が認められるか MTT assay で検証。

3) 内膜症マウスモデルでの検証

3-1) TAGLN の内膜症マウスモデルでの機能解析

- ・マウス TAGLN 強制発現ベクターの作成。
- ・エレクトロポレーション法によるマウス子宮への TAGLN 強制発現。
- ・内膜症マウスモデルにて TAGLN 強制発現した子宮組織の腹腔内移植で病変の形成数や重量に変化があるか検証。

4. 研究成果

まず、研究方法(1)より TAGLN の発現誘導因子として TGF-β1 に着目し、内膜症病変部にて TGF-β1 並びにその受容体が強発現していることを免疫組織化学染色で確認し、TGF-β1 添加実験によるその下流での SMAD 経路の活性化をヒストンのアセチル化にて確認した(図1)。

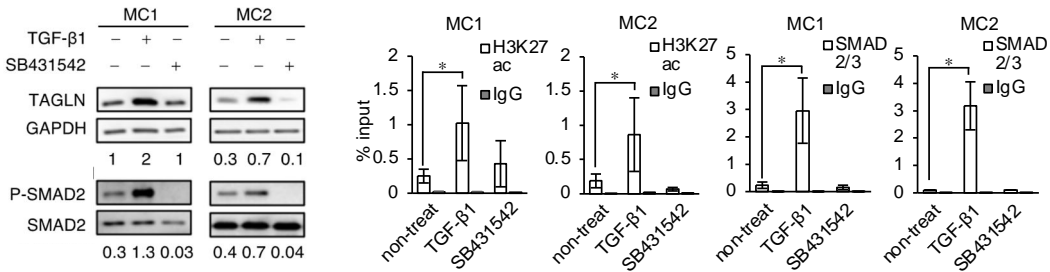


図1 子宮内膜線維芽細胞 (MC1,MC2) に対する TGF-β1 及び阻害剤 (SB431542) の添加実験、並びに ChIP-PCR によるエンハンサー、プロモーター領域の活性化の検討

次に、研究方法(2)より、TAGLN の機能解析としてサイトカインアレイにより重要な液性因子として IL-6 を同定し、IL-6 が TAGLN の特性である細胞収縮に關して分泌されるミオカインの一種と考え、その分泌によって子宮内膜線維芽細胞の増殖促進に働くことを実験的に示した(図2)。

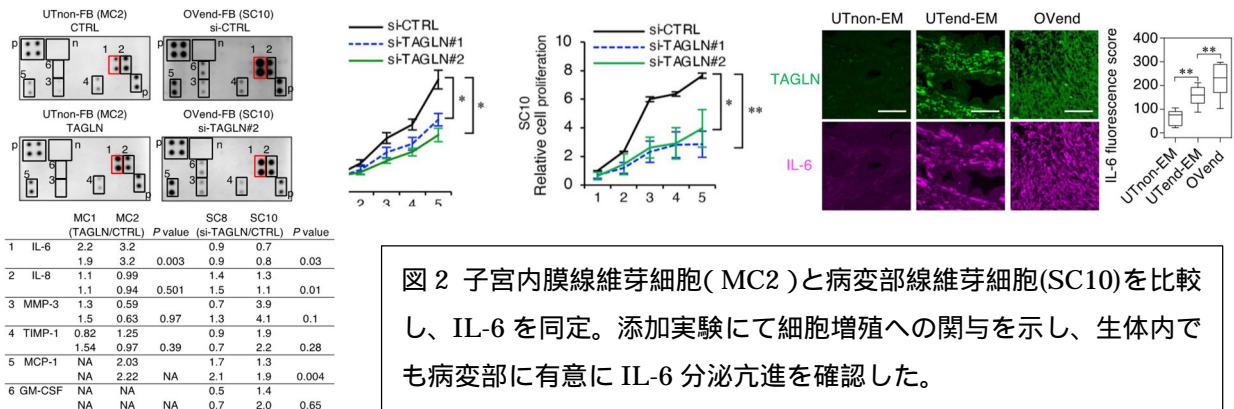


図2 子宮内膜線維芽細胞(MC2)と病変部線維芽細胞(SC10)を比較し、IL-6 を同定。添加実験にて細胞増殖への関与を示し、生体内でも病変部に有意に IL-6 分泌亢進を確認した。

最後に、研究方法(3)より、内膜症モデルマウスにおいて TAGLN が病変形成増悪に關することを実験的に示した(図3)。

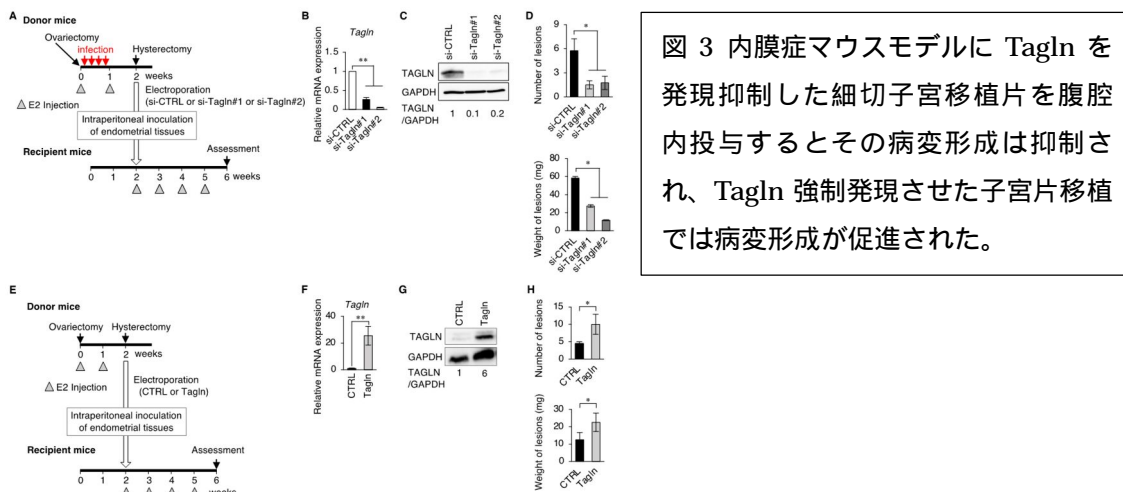


図3 内膜症マウスモデルに Tagln を発現抑制した細切子宮移植片を腹腔内投与するとその病変形成は抑制され、Tagln 強制発現させた子宮片移植では病変形成が促進された。

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 Muraoka Ayako, Suzuki Miho, Hamaguchi Tomonari, Watanabe Shinya, Iijima Kenta, Murofushi Yoshiteru, Shinjo Keiko, Osuka Satoko, Hariyama Yumi, Ito Mikako, Ohno Kinji, Kiyono Tohru, Kyo Satoru, Iwase Akira, Kikkawa Fumitaka, Kajiyama Hiroaki, Kondo Yutaka	4. 巻 15
2. 論文標題 Fusobacterium infection facilitates the development of endometriosis through the phenotypic transition of endometrial fibroblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 eadd1531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.add1531	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 Muraoka Ayako, Yokoi Akira, Kajiyama Hiroaki	4. 巻 27
2. 論文標題 Emerging bacterial factors for understanding pathogenesis of endometriosis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 108739 ~ 108739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.108739	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3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村岡彩子、竹田健彦、可世木聡、関友望、田中秀明、矢吹淳司、三宅菜月、曾根原玲菜、仲西菜月、中村智子、大須賀智子、梶山広明
2. 発表標題 子宮内膜微小環境及び子宮内膜線維芽細胞の表現系変化に着目した卵巣子宮内膜症の発症メカニズム解明
3. 学会等名 日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Muraoka A
2. 発表標題 Phenotypic transition of endometrial fibroblasts caused by Fusobacterium infection facilitates the development of endometriosis
3. 学会等名 8th Taiwan Endometriosis Society 2023 Annual Meeting TES-JSE Exchange Session (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村岡彩子
2. 発表標題 子宮内膜症発症に關与する子宮内微小環境についての検討
3. 学会等名 第45回 日本エンドメトリーオーシス学会學術講演会 ワークショップ2 (招待講演)
4. 発表年 2024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. 本研究に關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