

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592425

研究課題名(和文)細胞外基質 Fibulin-1 の解析による着床障害の病態解明

研究課題名(英文) Evaluation of an extracellular matrix protein fibulin-1 in pathophysiology of human endometrial function

研究代表者

岡田 英孝 (OKADA, Hidetaka)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80330182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜機能調節を理解するためには、性ステロイドホルモンで制御される分子の解析が重要です。ヒト子宮内膜の培養細胞を用いた実験結果より、フィブリン 1 という細胞外基質タンパクが妊娠維持に必要なホルモンであるプロゲステロンにより、早期に誘導されることがわかりました。フィブリン 1 の発現を検討することにより、子宮内膜機能を質的に評価できるものと期待されています。実際に、不妊症患者さんからの子宮内膜で、フィブリン 1 発現が低下することがわかりました。我々が見出した新しい知見は、将来の生殖医療の発展に大きく寄与すると考えています。

研究成果の概要(英文)：Progesterone is a key factor in establishment and maintenance of pregnancy in the human endometrium. The fibulin-1 mRNA levels were significantly increased in human endometrial stromal cells stimulated with progesterone after 3 days of culture. These results suggest that fibulin-1 is an important molecule that mediates progesterone action in human endometrial differentiation towards implantation. The levels of fibulin-1 mRNA were significantly decreased in the endometrium of infertile patients. Our findings contribute not only on the insight into mechanisms of key reproductive processes such as decidualization and the establishment and maintenance of early pregnancy, but also on future clinical applications for implantation failure.

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：生殖医学 子宮内膜 脱落膜化 性ステロイドホルモン

1. 研究開始当初の背景

着床障害(子宮内膜機能異常)の病態は依然として不明であり、妊娠率向上のためにその病態解明や診断の確立は、少子高齢化社会における重要な課題である。近年の生殖補助医療における凍結融解胚移植周期治療の経験から、時宜を得たエストロゲンおよびプロゲステンの補充が着床率の向上に重要であることが示されている。このような背景のもと、子宮内膜機能調節を理解するためには、性ステロイドホルモンに制御される標的遺伝子の解析が重要となる。

マイクロアレイ法を用いてヒト子宮内膜細胞でプロゲステンにより制御される遺伝子の発現動態を網羅的に検討した。その成果として、Fibulin-1 という細胞外基質タンパクがプロゲステンで誘導されることを見出した。Fibulin-1 はマウスの血管系あるいは線虫の生殖巣の形態形成や構造維持に必須であり進化的に保存された細胞外基質である。

2. 研究の目的

生殖現象でのヒト子宮内膜の研究は、実験動物では着床の様式と形態が異なり、また株化された内膜癌細胞では正常細胞と機能が異なるために、そのアプローチには大きな困難がある。細胞外基質タンパクであるFibulin-1 が子宮内膜においてプロゲステンで誘導される分子であることを見出した。しかしまだまだ未解明の問題が多く残され、ヒト子宮内膜でのFibulin-1の調節機構やその役割の解明が必要である。

本研究では、ヒト子宮内膜組織およびその培養細胞を用いたFibulin-1の解析により、Fibulin-1が子宮内膜機能に寄与する分子メカニズムを明らかにする。さらに不妊症における子宮内膜でのFibulin-1発現変化を詳細に解析して、新しい診断方法や治療戦略へと展開するための研究基盤を確立するのを目指す。

3. 研究の方法

研究材料は、患者の同意のもとに関西医科大学附属病院および関連施設において、各種良性病変に対して行われる子宮摘出手術、不妊検査の一環として行う子宮内膜組織(日付)診、子宮内容掻爬術などで得られた組織を採取した。

ヒト子宮内膜組織を機械的および酵素的に融解して、培養ヒト子宮内膜間質細胞を分離培養し分子生物学的機能解析を行った。これらの細胞に性ステロイドホルモンあるいは子宮内膜調節因子を単独あるいは同時に添加した。培養後の細胞からRNAを抽出・精製し、リアルタイムPCR法を用いFibulin-1の発現変化を時間的・空間的に検討した。培

養細胞より蛋白を抽出し、Western blot法を用いFibulin-1の発現動態の検討を行った。

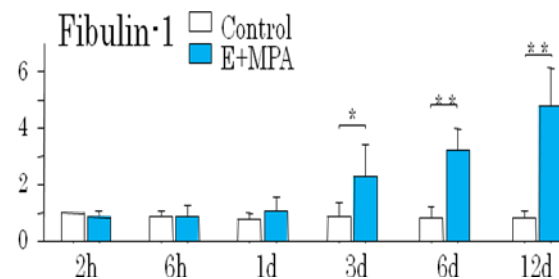
細胞外基質タンパクであるFibulin-1は、血管新生、増殖、分化など多くの役割を果たしていると考えられている。ヒト子宮内膜培養細胞の増殖能、分化能への影響について、Fibulin-1をsiRNAにて発現抑制した細胞にて機能解析を行った。

WST-8アッセイにて増殖能を検討した。分化能については、細胞の形態的变化と脱着膜化マーカーであるプロラクチン分泌能を検討した。さらに、Fibulin-1の臨床的意義を検討するため、不妊症例から子宮内膜を採取してFibulin-1の発現解析を行った。

4. 研究成果

培養ヒト子宮内膜間質細胞におけるFibulin-1 mRNA発現は、プロゲステンの時間依存的に誘導されており、添加培養3日目には既に有意な増加をみとめた。

プロゲステンによるFibulin-1の誘導



RU-486(プロゲステロンレセプター拮抗剤)の同時添加によりその効果が消失した。Western blot法にてFibulin-1蛋白がプロゲステンにより増加していることを確認した。一方、エストロゲン添加では全く変化がみられなかった。

子宮内膜間質細胞にプロゲステンあるいは子宮内膜を調節する重要な血管新生因子であるVEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)、SDF-1(stromal cell-derived factor 1)を単独あるいは同時に添加した。培養後の細胞からRNAを抽出・精製し、cDNAを作成してリアルタイムPCR法を用いFibulin-1の発現変化の時間的・空間的に検討した。プロゲステンによるFibulin-1誘導効果に、これら局所因子の影響を認めなかった。

プロゲステンで誘導されるFibulin-1をsiRNAにて強制的に抑制した細胞を作成して、VEGFとSDF-1の発現変化を検討した。培養後の細胞からRNAを抽出・精製し、cDNAを作成してリアルタイムPCR法を用いこれら因子の発現変化の時間的・空間的に検討した。プロ

ゲステロンで誘導される Fibulin-1 は、局所因子である VEGF と SDF-1 発現変化に影響を認めなかった。

さらに、Fibulin-1 を強制的に抑制した細胞で、増殖能と分化能を検討したところ、有意な変化を認めなかった。

Fibulin-1 は、早期にプロゲステンで誘導されるために、その発現を検討することにより、脱落膜化機能を早期から質的に評価できるものと期待される。不妊症例から子宮内膜を採取して Fibulin-1 の発現解析を行った結果、不妊症例で Fibulin-1 の発現低下することを見出した。

今回の検討により、Fibulin-1 の発現異常が子宮内膜機能に影響する可能性が示唆された。今後、子宮内膜局所因子の発現解析と形態学的評価の組み合わせにより、診断に苦慮している子宮内膜機能障害に新たな展望を開くことが期待される。我々が見出した新知見は、将来の生殖医療の発展に大きく寄与すると考える。

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 7 件)

1. Tsuzuki T, Okada H, Cho H, Shimoi K, Miyashiro H, Yasuda K, Kanzaki H. Divergent regulation of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and vascular endothelial growth factor by hypoxia and female sex steroids in human endometrial stromal cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013 May;168(1):95-101. doi: 10.1016/j.ejogrb.2012.12.040. Epub 2013 Jan 25. PubMed PMID: 23352606.
2. Nishigaki A, Okada H, Okamoto R, Shimoi K, Miyashiro H, Yasuda K, Kanzaki H. The concentration of human follicular fluid stromal cell-derived factor-1 is correlated with luteinization in follicles. *Gynecol Endocrinol.* 2013 Mar;29(3):230-4. doi: 10.3109/09513590.2012.736551. Epub 2012 Nov 30. PubMed PMID: 23193972.
3. Cho H, Okada H, Tsuzuki T, Nishigaki A, Yasuda K, Kanzaki H. Progesterin-induced heart and neural crest derivatives expressed transcript 2 is associated with fibulin-1 expression in human endometrial stromal cells. *Fertil Steril.* 2013 Jan;99(1):248-55. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.08.056. Epub 2012 Oct 1. PubMed PMID: 23036802.
4. Tsuji S, Yasuda K, Sumi G, Cho H, Tsuzuki T,

Okada H, Kanzaki H. Shakuyaku-kanzo-to inhibits smooth muscle contractions of human pregnant uterine tissue in vitro. *J Obstet Gynaecol Res.* 2012 Jul;38(7):1004-10. doi: 10.1111/j.1447-0756.2011.01827.x. Epub 2012 May 8. PubMed PMID: 22568684.

- 5: Yamashita E, Okada H, Yorioka H, Fujita S, Nishi K, Komiyama Y, Kanzaki H. Successful management of pregnancy-associated thrombotic thrombocytopenic purpura by monitoring ADAMTS13 activity. *J Obstet Gynaecol Res.* 2012 Mar;38(3):567-9. doi: 10.1111/j.1447-0756.2011.01742.x. Epub 2012 Feb 16. PubMed PMID: 22381108.
 - 6: Tsuzuki T, Okada H, Cho H, Tsuji S, Nishigaki A, Yasuda K, Kanzaki H. Hypoxic stress simultaneously stimulates vascular endothelial growth factor via hypoxia-inducible factor-1 α and inhibits stromal cell-derived factor-1 in human endometrial stromal cells. *Hum Reprod.* 2012 Feb;27(2):523-30. doi: 10.1093/humrep/der405. Epub 2011 Nov 28. PubMed PMID: 22128293.
 - 7: Nishigaki A, Okada H, Tsuzuki T, Cho H, Yasuda K, Kanzaki H. Angiopoietin 1 and angiopoietin 2 in follicular fluid of women undergoing a long protocol. *Fertil Steril.* 2011 Dec;96(6):1378-83. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.09.031. Epub 2011 Oct 13. PubMed PMID: 22000910.
- [学会発表](計 10 件)
1. 神道寿勇、岡田英孝、都築朋子、西垣明実、安田勝彦、神崎秀陽 ヒト子宮内膜で脱落膜化により誘導される Hand2 は Fibulin-1 を制御する 第 58 回日本生殖医学会 2013/11/15 神戸 神戸国際会議場
 2. 都築朋子、岡田英孝、曹寿勇、西垣明実、下井華代、宮城博恵、神崎秀陽 ヒト子宮内膜における低酸素刺激と性ステロイドホルモンによる angiopoietin と VEGF の発現調節機構 第 31 回日本受精着床学会 2013/8/8 大分 別府国際コンベンションセンター
 3. 岡田英孝、都築朋子、曹寿勇、木戸健陽、高畑暁、安田勝彦、神崎秀陽 性ステロイドホルモンによるヒト子宮内膜間質細胞の SDF-1 発現制御 第 65 回日本産科婦人科学会学術集会 2013/5/10 札幌 ロイトン札幌
 4. 曹寿勇、岡田英孝、都築朋子、安田勝彦、神崎秀陽 ヒト子宮内膜間質細胞でプロゲ

ステロンにより誘導される Hand2 と fibulin-1 との関連について 第 65 回日本産科婦人科学会学術集会 2013/5/10 札幌 ロイトン 札幌

5 . 都築朋子、岡田英孝、曹寿勇、辻祥子、角玄一郎、安田勝彦、神崎秀陽 低酸素環境がヒト子宮内膜における VEGF と SDF-1 の発現に与える影響と HIF-1 の関与についての検討 第 65 回日本産科婦人科学会学術集会 2013/5/10 札幌 ロイトン札幌

6 . 岡田英孝 ヒト子宮内膜の増殖・分化と血管新生の制御機構 第 65 回日本産科婦人科学会学術集会 2013/5/10 札幌 ロイトン札幌

7 . 都築朋子、岡田英孝、曹寿勇、西垣明実、下井華代、宮城博恵、安田勝彦、神崎秀陽 低酸素環境のヒト子宮内膜における SDF-1 と HIF-1 の検討 第 57 回日本生殖医学会 2012/11/9 長崎 長崎ブリックホール

8 . Hidetaka Okada, Tomoko Tsuzuki, Hisayuu Cho, Akemi Nishigaki, Katsuhiko Yasuda, and Hideharu Kanzaki Estrogen and progestins regulate stromal cell-derived factor 1 (SDF-1/CXCL12) in human endometrium 4th Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction(ASPIRE 2012) 2012/9/2 大阪 グランキューブ大阪

9 . 岡田英孝、都築朋子、曹寿勇、辻祥子、中嶋達也、安田勝彦、神崎秀陽 ヒト子宮内膜の血管内皮増殖因子(VEGF)発現調節における SERM およびプロゲステンの関与について 第 64 回日本産科婦人科学会学術集会 2012/4/13 神戸 神戸国際展示場

10 . 都築朋子、岡田英孝、曹寿勇、小野淑子、岡田園子、松原高史、安田勝彦、神崎秀陽 性ステロイドホルモンで制御されるケモカイン SDF-1 は子宮内膜上皮 間質相互作用を有する 第 56 回日本生殖医学会 2011/12/9 横浜 パシフィコ横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://research.kmu.ac.jp/kmuhp/KgApp?kyoinId=beokg>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡田 英孝 (OKADA, Hidetaka)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80330182

(2)研究分担者

無し ()

研究者番号：

(3)連携研究者

神崎 秀陽 (KANZAKI, Hideharu)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：80135566

中嶋 達也 (NAKAJIMA, Tatsuya)

関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：70288827