

科学研究費助成事業 研究成果報告書

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：23592426

研究課題名(和文)低酸素・内分泌環境における子宮内膜の血管新生因子の発現調整

研究課題名(英文)Regulation of angiogenic factors by hypoxia and female sex steroids in human endometrium

研究代表者

神崎 秀陽(KANZAKI, Hideharu)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：80135566

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)：月経周期で急速に変化する子宮内膜は、生体内で最も顕著な血管新生の場となっています。低酸素刺激は、血管新生因子VEGF発現を誘導しましたが、ケモカインのSDF-1発現を抑制しました。性ステロイドホルモンのエストロゲンは、低酸素刺激によるVEGF産生における相乗作用を認めませんでした。低酸素刺激によるVEGF増加は、低酸素誘導因子(HIF)-1 結合阻害薬であるエキノマイシンで著明に抑制されました。月経期の低酸素環境において、子宮内膜再生の重要な血管新生因子であるVEGFがHIF-1 シグナル経路を介して促進される制御機構が明らかとなりました。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the effects of hypoxic stress on the regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), and the potential role of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in the endometrium. Hypoxia simultaneously induced expression of mRNA and production of VEGF and attenuated the expression and production of SDF-1 in a time-dependent manner. With regard to the interaction of estradiol and hypoxia, estradiol did not affect the regulation of VEGF under hypoxic conditions. Echinomycin, a small-molecule inhibitor of HIF-1 activity, inhibited hypoxia-induced VEGF production. Hypoxia simultaneously acts to increase VEGF via HIF-1. These results indicate a potential mechanism for the action of hypoxic conditions that could influence angiogenesis in the human endometrium.

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 血管新生因子 低酸素

1. 研究開始当初の背景

生体機能の制御や各種病態の発生・進展の要が、局所における血管新生であることは周知されている。生殖生理の領域で短期間に急速な血管新生を伴う変化として、子宮内膜では月経周期に伴い規則的な月経、増殖、分化という連の過程があり、生体内で最も顕著な血管新生の場となっている。

月経周期の過程において子宮内膜機能調節の要となるのは血管新生であり、これを制御する血管新生因子の調節機構や役割を解明する必要がある。血管新生因子として血管新生の中心的な役割を担っている血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、VEGF と共に重要な血管新生因子として、ケモカインである stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) が知られている。SDF-1 は、臓器特異的な血管形成に必須であり、VEGF と共に骨髄に由来する血管内皮前駆細胞を動員して血管形成を促している。

子宮内膜における血管新生の調節機構を解明するためにそのプロセスの時間軸に着目して、月経期の虚血(低酸素環境)、性ステロイドホルモン環境で検討する必要がある。このように内膜機能調節機構の解明には、ヒト子宮内膜における低酸素刺激および性ステロイドホルモンによって制御される血管新生因子の解析が何より重要である。

2. 研究の目的

生殖現象でのヒト子宮内膜の研究は、実験動物では月経周期に伴う変化が異なり、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、そのアプローチに大きな困難がある。

サルやマウスの実験動物に VEGF 阻害剤を投与すると子宮内膜上皮の再生や血管新生が抑制されていることから、血管新生因子が子宮内膜機能調節に関与することを十分に支持するものであるが、多くの知見は動物実験により得られたものである。本研究では、ヒト子宮内膜培養細胞を用いて、血管新生因子の研究に取り組んだ。

ヒト子宮内膜における低酸素環境や性ステロイドホルモンによる血管新生因子の調節機構を解明して、血管新生因子を利用した新しい診断方法や治療法への臨床応用に展開するための研究基盤を確立するのを目指すとする。

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。間質細胞を異なる酸素条件下(低酸素の2%、通常酸素の20%)で48時間培養した後に、細胞からRNAを抽出・精製し、cDNAを作成してリアルタイムPCR法を行った。

低酸素と通常酸素下で2、6、24、48時間培養して回収した培養液中のVEGFとSDF-1をELISAで測定して、時間依存的な血管新生因子の分泌動態を検討した。

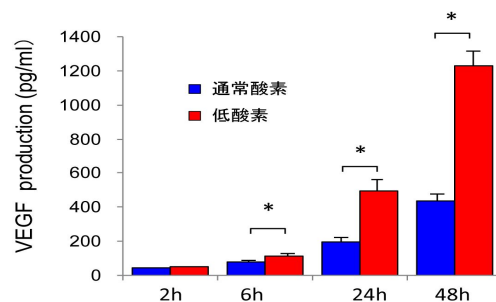
低酸素状態を模倣する塩化コバルト、低酸素誘導因子(hypoxia inducible factor; HIF)-1 結合阻害薬であるエキノマイシンの添加実験により、低酸素応答のマスター制御転写因子であるHIF-1の発現変化と血管新生因子の分泌能を検討した。

VEGF 発現調節における性ステロイドホルモンのエストロゲンと低酸素刺激の相互作用を検討した。

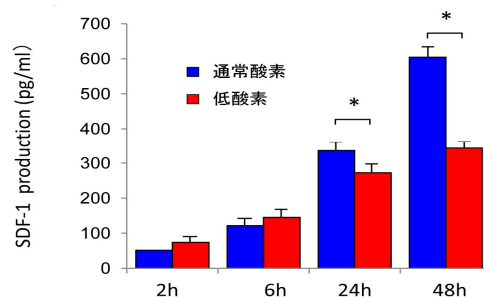
4. 研究成果

低酸素刺激は、VEGF mRNA 発現を誘導したが、SDF-1 mRNA 発現を抑制することが判明した。さらに低酸素と通常酸素下で2、6、24、48時間培養して回収した培養液中のVEGFとSDF-1の分泌動態を検討すると、低酸素刺激はVEGF分泌能を亢進し、SDF-1分泌能を抑制することが明らかとなった。

低酸素刺激による VEGF 分泌能の亢進



低酸素刺激による SDF-1 分泌能の抑制



塩化コバルトの添加培養により、濃度依存的に間質細胞からの VEGF 産生が亢進し、SDF-1 産生が低下した。これらの結果は、低酸素環境と同様の結果であることが確認できた。塩化コバルトによる HIF-1 蛋白誘導能を確認すると、その発現ピークを培養 6 時間後に認めた。

塩化コバルトにより誘導された VEGF はエキノマイシンで抑制され ($P < 0.01$) この効果はエキノマイシンによる細胞毒性や HIF-1 蛋白レベルの変化に由来しないことを確認した。一方、塩化コバルトにより抑制された SDF-1 は、エキノマイシンで変化しなかった。

低酸素状態およびエストロゲン刺激は、VEGF 産生を増加させた ($P < 0.01$)。しかしながら、低酸素環境でエストロゲンによる VEGF 産生における相乗作用を認めなかった。

月経期の低酸素環境において、子宮内膜再生の重要な血管新生因子である VEGF が HIF-1 シグナル経路を介して促進される制御機構が明らかとなった。

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 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 およびプロゲステロンの関与について 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=mekoe>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
神崎 秀陽 (KANZAKI, Hideharu)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：80135566

(2) 研究分担者
無し ()
研究者番号：

(3) 連携研究者
安田 勝彦 (YASUDA, Katsuhiko)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90174507

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

中嶋 達也 (NAKAJIMA, Tatsuya)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：70288827