

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791805

研究課題名(和文) 局所におけるエストロゲン産生が子宮内膜組織の発育に及ぼす影響の解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of growth of endometriotic tissue affected by local estrogen production

研究代表者

徳永 英樹 (TOKUNAGA, HIDEKI)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30595559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症間質細胞内ではSF-1がステロイドホルモン産生の鍵とである。正所子宮内膜間質細胞にSF-1遺伝子を導入し、StARのみが発現の誘導を受けることはわかったが、ほかの遺伝子の発現は誘導されなかった。これらの結果から、転写因子であるSF-1以外の要因が加わらないと、ステロイドホルモン産生をコントロールする遺伝子群の発現は惹起されないということがわかった。

研究成果の概要(英文)：Steroidogenic factor-1 plays a key-role for local estrogen synthesis in endometriotic stromal cells. Induction of SF-1 gene in endometrial stromal cells increased expression of StAR mRNA and protein but not other targets of SF-1. These results suggest that gene group that regulates estrogen synthesis needs not only SF-1 gene expression but other factors.

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：SF-1 子宮内膜症 エストロゲン アロマトラーゼ StAR 正常子宮内膜

## 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症組織における E2 産生については、代謝経路の最終段階であるアロマターゼを中心に Bulun らのグループとの共同研究を行ってきた。SF-1 は性ステロイドホルモン代謝の最上流に位置し、子宮内膜症におけるステロイドジェニックファクター-1 (以下 SF-1) の働きについてはこれまでに 10 編も論文はなく、そのうち 5 編が Bulun らと我々の報告である。

正所子宮内膜と子宮内膜症とで比較したとき、アロマターゼのほか StAR、P450scc の発現レベルが子宮内膜症において高く、これら性ステロイド産生のキーとなる要素が SF-1 のコントロール下にあることがわかってきた。そこで SF-1 を子宮内膜間質細胞に導入することによって、E2 産生を誘導できるのではないかと考えた。さらに通常、性ステロイドホルモンを産生しない正所子宮内膜間質細胞に E2 産生能を付与することにより、それらをマウスに移植することによって、局所における E2 の働きを解明するための新しいモデルになるであろうと考えた。

近年、乳癌や子宮体癌といった E2 依存性がある悪性疾患について外的な E2 のみならず、疾病組織そのものあるいはその周囲支持組織における局所的な E2 による影響が無視できないものとして注目されている。

正所子宮内膜と子宮内膜組織における SF-1 の mRNA 発現レベルの差は数千から数万倍あり、両組織における性ステロイドホルモン産生能の有無を決定づける要素と考えられる。本研究では Tet-off システムを用いて、SF-1 の発現を調節可能な細胞を作り出すことに特色がある。このシステムは vivo にも応用可能であり、マウスに移植した SF-1 遺伝子導入細胞内の SF-1 の発現を飼料内にテトラサイクリンを混入することにより調節しうる。これにより生体内に近い環境で局所における E2 の作用が子宮内膜組織の生着や発育にどのような寄与をするか検討できるものと考ええる。

## 2. 研究の目的

子宮内膜症間質細胞は性ステロイド産生能を有し、SF-1 はコレステロールからプロジェステロン (以下 P4)、エストロゲン (以下 E2) へとつながる代謝経路において重要な役割を果たしている。本研究ではレトロウイルスを用いてヒト由来の子宮内膜間質細胞に SF-1 を導入し、その結果、性ステロイドホルモン産生を誘導しうるか、遺伝子発現プロファイルが子宮内膜症間質細胞に近づくかを検討する。さらに、本研究で作出される SF-1 遺伝子強制発現子宮内膜間質細胞と非導入間質細胞をそれぞれ SCID マウスに移植し、着床及び増殖に局所的な性ステロイドホルモンの寄与を解析することを最終目的とする。

る。

## 3. 研究の方法

研究計画 1 . レトロウイルスを用いて Tet-off による遺伝子発現が調節可能な方法で子宮内膜間質細胞に SF-1 を導入。対照として Lac-Z を導入した細胞の作成。

研究計画 2 . 1 . で作成した細胞より RNA およびタンパクを抽出し、Realtime-PCR および Western blotting による、遺伝子発現プロファイルの比較。

研究計画 3 . ELISA 法による P4、E1、E2 分泌量の測定。性ステロイドホルモン産生能の比較。

研究計画 4 . 作成した細胞と不死化子宮内膜上皮細胞をコラーゼンジェルをつなぎとしてペレット状に混成し、マウス腎被膜下に移植。

研究計画 1 . レトロウイルスを用いて Tet-off による遺伝子発現が調節可能な方法で子宮内膜間質細胞に SF-1 を導入。対照として Lac-Z を導入した細胞の作成。

Bulun らより SF-1 および Lac-Z が組み込まれた pRevTRE ベクターおよび調節因子が組み込まれている pRevTet-off ベクターの供与を受け、これらをパッケージング細胞である PT 67 細胞にリポフェクタミンを用いてトランスフェクションし、培養液より得られたレトロウイルスを目的とする初代培養の子宮内膜間質細胞に感染させる。ウイルス感染後、抗生剤による選別を行いテトラサイクリンによる発現調節可能な細胞を得ることができる。

研究計画 2 . 1 . で作成した細胞より RNA およびタンパクを抽出し、Realtime-PCR 法および Western blotting 法による、遺伝子発現プロファイルの比較。

SF-1 導入後、テトラサイクリン存在もしくは非存在下に SF-1 及びその標的遺伝子である、StAR、P450scc、P450c17、3 HSD I、3 HSD II、アロマターゼの発現量を比較検討する。研究計画 3 . ELISA 法による P4、E1、E2 分泌量の測定。性ステロイドホルモン産生能の比較。

作成した細胞を血清存在下に培養したのち、無血清培養液に変更して翌日にプロスタグランジン E2 を加え 48 時間後に細胞培養液を回収。有機溶媒によりステロイドホルモンを抽出し ELISA 法により P4、E1、E2 を測定する。

研究計画 4 . 作成した細胞と不死化子宮内膜上皮細胞をマウス由来の型コラーゼンジェルをつなぎとしてペレット状に混成し、マウス腎被膜下に移植。

一定数の上皮および間質細胞を混ぜてコラーゼンジェルを用いてペレット状 (およそ直径 2 から 3 mm) にして腎被膜下に一侧に 2 から 3 個のペレットを移植 (Kurita et

al Differentiation 2005) を行い、局所における E2 産生が移植細胞の生着及び組織再構成、発育に及ぼす影響を明らかにする。この方法は腎被膜下という血流の豊富な空間に移植することで生着しやすいというメリットと移植する際に上皮および間質細胞の数と割合を一定にそろえることにより生着及び発育の評価がしやすいというメリットがある。マウスは NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic のメスで生後 6 週から 8 週のものを用いる。飼料としてテトラサイクリンを与える群と与えない群とに分け、それぞれ卵巣を切除または切除しないものと分けて計 4 グループとし、移植 8 週間後に腎臓を摘出し、移植片の評価をする。

また、遺伝子導入していない、正常子宮内膜の初代培養間質細胞と上記の不死化上皮細胞、子宮内膜症の初代培養間質細胞と不死化上皮細胞という組み合わせも検討する。これらのグループにおいても卵巣切除群と非切除群とに分けて検討する。

移植片はホルマリンで固定後、パラフィン包埋標本作製する。HE 染色で形態学的変化を解析した後、SF-1 及びその標的遺伝子である、StAR, P450scc, P450c17, 3 HSD I, 3 HSD II、アロマターゼ蛋白発現を比較検討する。

#### 4. 研究成果

ヒト由来の子宮内膜症病変から初期培養した間質細胞に SF-1 の発現を抑制する siRNA を導入することにより、SF-1 の標的である、

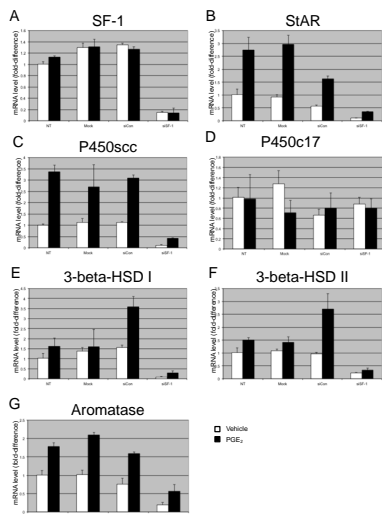


図 1 RNA 定量

各種酵素の発現が抑制されることがわかった (図 1)。

また、タンパクの発現も抑制されることを Western blotting と免疫染色で確認した (図 2)。

正所子宮内膜間質細胞に SF-1 を導入した

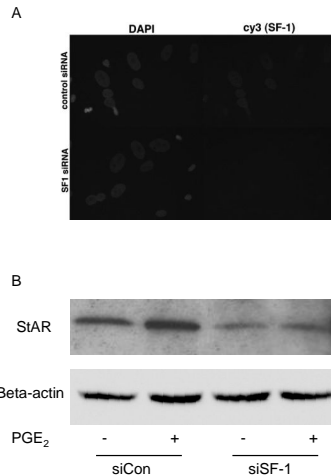


図 2 SF-1 遺伝子導入と発現の抑制

ところ、SF-1 は RNA もタンパクも強制発現させることに成功した (図 3、4)。

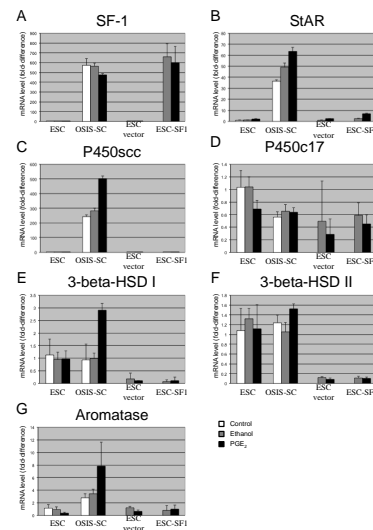


図 3 SF-1 導入後のホルモン合成酵素の発現プロファイル

ところが、SF-1 導入によって標的遺伝子の中では、StAR のみが発現の誘導を受けることはわかったが、ほかの遺伝子の発現は誘導されなかった。

これらの結果から、転写因子である SF-1 以外の要因が加わらないと、ステロイドホルモン産生をコントロールする遺伝子群の発現は惹起されないということがわかった。

本研究では、さらにテトラサイクリンによる SF-1 発現調節、マウスへの細胞移植、細胞培養液内のホルモン測定まで計画していたが、研究期間内に得た実験結果は以上である。

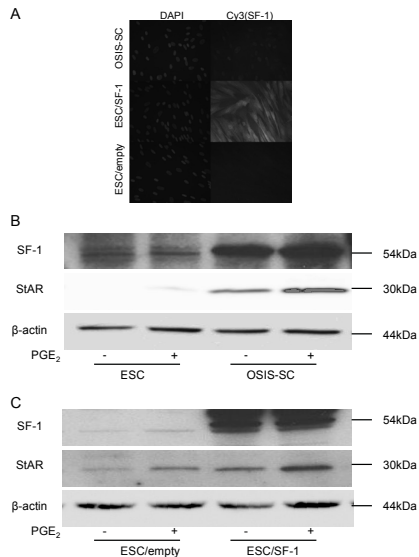


図4 SF-1導入後のホルモン合成酵素の発現プロファイル

## 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1件)

Role of estrogen receptor- in endometriosis.  
 Bulun SE, Monsavais D, Pavone ME, Dyson M, Xue Q, Attar E, Tokunaga H, Su EJ.  
 Semin Reprod Med. (査読有) 2012 Jan;30(1):39-45.  
 doi: 10.1055/s-0031-1299596.

〔学会発表〕(計2件)

西本光男、宇都宮裕貴、志賀尚美、辻圭太、海法道子、鈴木史彦、徳永英樹、伊藤潔、八重樫伸生  
 子宮内膜癌における Steroid sulfatase 阻害剤の有効性に関する検討  
 第 65 回日本産科婦人科学会、2013 年 5 月 11 日、札幌

西本光男、宇都宮裕貴、志賀尚美、山下泰恒、辻圭太、海法道子、鈴木史彦、徳永英樹、伊藤潔、八重樫伸生  
 子宮内膜癌における Steroid Sulfatase 阻害剤の有用性に関する検討  
 第 25 回日本内分泌学会東北地方会、2012 年 11 月 17 日、秋田

〔その他〕なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

徳永 英樹 (TOKUNAGA, HIDEKI)  
 東北大学・大学病院・助教  
 研究者番号：30595559