

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462592

研究課題名(和文) 子宮内膜症を制御する新規接着因子の解明-iTRAQ法による網羅的解析を通じて

研究課題名(英文) Investigate the adhesion molecules that control the progression of endometriosis.

## 研究代表者

橋本 香映 (Hashimoto, Kae)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90612078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症間質細胞の膜タンパクのiTRAQ法による網羅的解析にて、子宮内膜症検体において正常子宮内膜と比べ高発現な物質の一つとしてVCAM-1が同定された。子宮内膜間質細胞におけるVCAM-1の発現はNF- $\kappa$ Bにより調節されておりVCAM-1中和抗体およびIKK阻害剤によるNF- $\kappa$ B活性化阻害により子宮内膜症間質細胞の腹膜上皮細胞への接着が減少することから、内膜症病変形成および進展にVCAM-1が接着因子の一つとして作用していることが示唆された。VCAM-1が子宮内膜症治療における新たな治療標的となり、VCAM-1中和抗体やIKK阻害剤が子宮内膜症の進展を抑制する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：iTRAQ-based proteomics demonstrated that VCAM-1 was one of the increased membrane proteins of endometrial stromal cell of ovarian endometrial cyst (eESC) in comparison of normal eutopic endometrial stromal cells. Immunohistochemistry of endometriotic cyst and normal uterus showed comparative result. At eESC, VCAM-1 was regulated by nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B). Adhesion of endometrial cell to peritoneal wall is one of the favored mechanisms of arising endometriosis. VCAM-1 neutralizing antibody and IKK inhibitor, which inhibits NF- $\kappa$ B activation, decreased adhesive activity of eESC to human peritoneal mesothelial cells (HPMC). In conclusion, VCAM-1 is the novel therapeutic target of endometriosis, and VCAM-1 neutralizing antibody and IKK inhibitor is potent therapeutic drug of endometriosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：子宮内膜症 接着因子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 子宮内膜症は生殖期女性の約 10%に存在する良性腫瘍性疾患であるが、月経困難症、性交痛、慢性骨盤痛、不妊などの原因となり、患者の QOL を著しく損なうことのある疾患である。治療法は手術療法、ホルモン療法が主であるが、いずれも再発・無効例が少なからず存在し、新規治療の開発が望まれる。子宮内膜症はその病因、成因について数多くの研究がなされているが諸説あるが、1927 年に Sampson が提唱した「逆流月経血が腹膜を刺激して移植が起こる」という移植説が有力である。しかしながら、逆流月経血中に存在する子宮内膜細胞が異所である健全な骨盤腹膜に接着し生着するメカニズムはわかっていない。我々はこれまで卵巣癌の腹膜播種に着目し、癌細胞の細胞外マトリックスへの接着、間質への浸潤に焦点をあてて研究を行ってきた (Hashimoto K, et al. Cancer 2005; 103: 1529-36, Hashimoto K, et al. Cancer Res 2005; 65: 540-45, Sawada K, et al. Cancer Res. 2007; 67: 1670-9)。卵巣癌においても腫瘍周囲の炎症反応・腹水中マクロファージなどの影響が腫瘍進展に重要であるが、その際、癌細胞の腹膜への接着という現象がこれらの相互作用に重要な役割を担っており接着因子が予後因子として作用している (Sawada K, et al. Cancer Res. 2008; 68: 2329-39)。よって我々は子宮内膜症においても接着因子が病変進展に重要な役割を担っているのではないかと考え、今までの我々の知見を活かして、子宮内膜症細胞の形成における Key になる接着因子を同定する今回の実験計画を立案した。

## 2. 研究の目的

子宮内膜症病変形成のメカニズムを追及することが内膜症の新治療につながると考え、子宮内膜症病変の間質細胞を初代培養の上、iTRAQ 法による膜蛋白の網羅的解析を行い、正常子宮内膜間質細胞に比べ発現が増加している接着因子を同定し、その接着因子が内膜症間質細胞の接着、運動、増殖に与える影響を解析する。さらにその接着因子が何故、内膜症で亢進しているのか、正常子宮内膜細胞を、腹膜中皮細胞などの周辺環境細胞と共培養実験を行うことにより検討する。以上の検討を行うことにより、接着因子に焦点をあてた子宮内膜症発生機序の解明を行い、将来的な子宮内膜症の新規分子標的治療につながる基礎データを創出することを目的とする

## 3. 研究の方法

### (1) iTRAQ 法を用いた内膜症腹膜病変形成に関わるタンパク質の網羅的解析

手術時に採取した正常子宮内膜と卵巣子宮内膜症検体を用いて、内膜間質細胞を分離培養し、膜タンパクを回収して、当大学共同研の高島成二准教授の協力のもと、iTRAQ 法にて網羅的解析・比較を行い、内膜症病変において共通して発現が増強、または減弱している蛋白を同定、正常子宮内膜検体より 2 倍以上の増加を認める蛋白のうち、接着に関連のあるものをピックアップして以降の検討に用いた。

### (2) 子宮内膜間質細胞の腹膜中皮細胞に対する接着能を用いた検討

標的タンパクのうち、中和抗体が入手できたものについて、内膜症間質細胞の腹膜中皮細胞に対する接着能の変化を用いて検討した。中和抗体投与により接着能が抑制されるものを今後の検討対象とした。中和抗体が入手できなかったものについては siRNA を導入することを試みたが、導入効率が不良であり、導入した細胞を維持することも困難で接着能の検討に用いるに充分量の細胞を得ることが困難であったため、中和抗体が入手可能であったもののみを検討対象とした。

### (3) 臨床検体を用いた標的タンパクの局在の解析

上記検討にて絞り込んだ標的タンパクの局在を、当院に保存されている子宮内膜症症例のパラフィン包埋検体を用いて、標的タンパクが内膜症病変においてどこに局在しているのかを検討した。しかしながら、臨床検体では発現が明らかでないものもあり、先の接着能・遊走能に変化があり、かつ間質に発現が確認された VCAM-1 について以降の検討を行うこととした。

### (4) 臨床応用を視野にいたした中和抗体以外の薬剤の効果の検討

中和抗体以外に標的タンパクの発現経路に作用する薬剤などがいないか検討した結果、以前より卵巣癌細胞株で使用経験のある IKK 阻害剤 (IMD0560) を使用し、接着能について検討した。

## 4. 研究成果

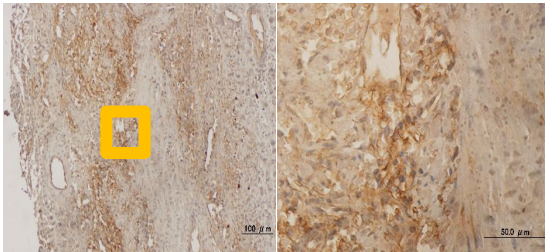
### (1) 子宮内膜症病変形成に関わる可能性のある接着因子として VCAM-1 および ICAM-1 が同定された。

iTRAQ 法で正常子宮内膜間質細胞より内膜症

内膜間質細胞で2倍以上の増加のあった膜タンパクのうち接着にかかわるタンパクのうち、中和抗体が入手可能であったのは VCAM-1 および ICAM-1 であった。

(2) VCAM-1 は卵巣子宮内膜症病変間質に発現していた。

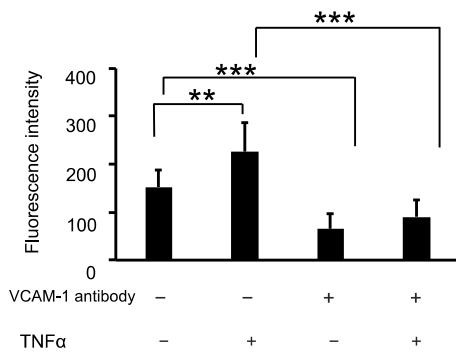
子宮内膜症例のパラフィン包埋検体を用いて免疫染色をしたところ、8検体中5検体において子宮内膜症病変の間質部分に VCAM-1 の発現が確認できた(図1)。また同一検体を用いた検討にて5検体中4検体において VCAM-1 発現部位と同部位に pIKK / の発現を認め、VCAM-1 と NF-κB の活性化に関連があることが示された。



**図1 子宮内膜症組織における VCAM-1 の発現**

(3) VCAM-1 中和抗体は子宮内膜間質細胞の腹膜中皮細胞への接着を抑制した。

婦人科手術時に摘出した大網より腹膜中皮細胞を分離し、数日間培養して腹膜中皮層を再現、蛍光色素 CMFDA で標識した子宮内膜症間質細胞を腹膜中皮細胞常に播種し、1時間後に洗浄し接着した細胞数を蛍光強度にて測定した。VCAM-1 中和抗体添加により有為に子宮内膜間質細胞の接着能が低下した(図2)



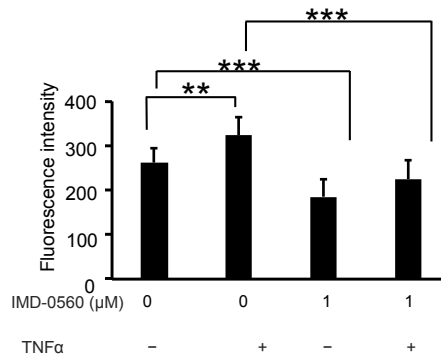
**図2 VCAM-1 中和抗体は子宮内膜間質細胞の腹膜中皮細胞への接着を抑制する**

(3) IKK 阻害剤 (IMD-0560) は子宮内膜間質細胞の腹膜中皮細胞への接着を抑制した。

(2) で行った免疫染色の結果より VCAM-1 の

発現調節に NF-κB が関与していることが示唆された。子宮内膜症の病変進展に子宮内膜症の病変進展に NF-κB が関与していることもすでに多くの報告がある。VCAM-1 のプロモーター領域に NF-κB 結合部位があることは既知であり、VCAM-1 経路を阻害する中和抗体以外の薬剤として、我々が卵巣癌細胞株においてすでに使用経験のある IKK 阻害剤 (IMD-0560) を用いて NF-κB の活性化を抑制し、接着能にどのような影響があるかを検討した。IMD-0560 は VCAM-1 中和抗体と同様に子宮内膜症間質細胞の腹膜中皮細胞への接着を抑制した(図3)

**図3 IMD-0560 は子宮内膜間質細胞の腹膜中**



**皮細胞への接着を抑制する**

これらのことより、子宮内膜症病変形成において、逆流子宮内膜が正常腹膜に接着し、生着するメカニズムの一つとして子宮内膜間質細胞における VCAM-1 の発現が関与していることが示唆された。

また VCAM-1 が子宮内膜症治療の新たなターゲットとなりうる可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(0件)

(学会発表)(計3件)

Sawada, I. Hashimoto, K. Sawada, K. Fujikawa, T. Itai, A. Kimura, T. Targeting inhibitor of NF-κB kinase beta (IKK) may represent a possible novel treatment for endometriosis. Endocrine Society's 96th Annual Meeting and Expo. Jun 21-24 2014 (Chicago, U.S.A.)

澤田育子 橋本香映 木瀬康人 戸田有朱  
香 中村幸司 澤田健二郎 木村 正。子宮  
内膜症に対する新規低分子 IKK 阻害剤  
(IMD-0560)の効果の検討。第66回日本産科婦  
人科学会。2014年4月18~20日(東京)。

澤田育子 橋本香映 中村幸司 戸田有朱  
香 中塚えりか 木瀬康人 澤田健二郎  
木村正。子宮内膜症病変形成における VCAM-1  
の関与の検討。第67回日本産科婦人科学会  
学術講演会。2015年4月9~12日(横浜)。

(図書)(0件)

(産業財産権)(0件)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者 橋本 香映  
(Hashimoto Kae)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：90612078

(2)研究分担者 澤田 健二郎  
(Sawada Kenjiro)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：00452392

研究分担者 馬淵 誠士  
(Mabuchi Seiji)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：00452441

研究分担者 磯部 晶  
(Isobe Aki)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：60397619