

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670725

研究課題名(和文)細胞間情報伝達機構に焦点をあてた子宮内膜症発症のメカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of the pathogenesis of endometriosis focusing on intracellular communications.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症の克服は現代女性の生活の質(QOL)に必須である。今回、子宮内膜細胞が腹腔内に逆流する際に卵管上皮や腹膜中皮細胞と接触する過程で、これらの細胞よりの情報伝達を受けて、いわゆる“子宮内膜症細胞”に進化すると考え、その情報伝達の鍵としてエクソソームに焦点を当てた。第一段階として安定して抽出が可能ながん細胞よりエクソソームを抽出し、初代培養した腹膜中皮細胞への添加実験を行った。エクソソームは腹膜中皮細胞へ取り込まれた。網羅的な解析を加え、エクソソームにCD44が含まれること、腹膜中皮細胞にそのCD44が伝達されることを確認し、エクソソームが細胞間の情報伝達の鍵となる一つの事象を解明した。

研究成果の概要(英文)：The overcome of endometriosis is a critical issue to improve quality of life of women. As a pathogenesis, it is well accepted that endometriosis is a process produced by menstrual debris including endometrial tissue that escapes retrograde through fallopian tubes into pelvis. Thus, we hypothesized endometrial cells evolve to “endometriosis cells” during retrograde menstruation by receiving some information from cells located at fallopian tubes or peritoneal walls. Herein, we focused on exosomes produced from cells as an intracellular communication tool and intended to analyze the role of exosomes. As an initial step, exosomes were isolated from ovarian cancer cells. Exosomes were co-cultured with human peritoneal mesothelial cells (HPMCs) which internalized the exosomes. CD44, which was enriched in exosomes, transferred to HPMCs upon internalization, leading to high levels of CD44 in HPMCs membrane. We showed one possible role of exosomes as an intracellular communication tool.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮内膜症 エクソソーム 腹膜中皮細胞 CD44 細胞間情報伝達

### 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は生殖年齢女性の約 10% に発生する Common disease であり、その克服は女性の生活の質 (QOL) に留まらず、少子高齢化に悩む我が国の社会に重大な意義をもつ。厚生労働省研究班は 2002 年に、「月経困難症による社会全体の労働損失は年間約 3780 億円であり、月経困難症のうち、26.7% が子宮内膜症であった」と報告している。医療費を含む社会損失はもっと膨らむと考えられ、我々が子宮内膜症を克服できれば、1000 億円に近い社会負担を軽減できる。現在の治療は病巣に対する外科切除とホルモン感受性に焦点を当てたホルモン治療からなる。これらの治療は有効ではあるが、いわば対症療法であり、奏功したとしても産婦人科学会の報告によると約 2 年で 60% の患者が再発してしまう。一般論として、病気の根絶には病態の解明と病因の除去が必要であり、子宮内膜症の病因の分子レベルでの解明が新規治療につながるのではないかと考える。子宮内膜症は 1860 年の Rokistanski の報告以来、成因について数多くの学説が提唱されている。その中で今なお広く支持されているのは 1927 年に Sampson が提唱した単純な「逆流月経血が腹膜を刺激して移植が起こる」という移植説である。しかしながら、月経血はそもそも子宮壁から黄体ホルモンの影響で脱落したいわゆる脱落膜である。「なぜ子宮内膜から脱落したものが腹腔内で生着してしまうのか？」に対する解答はまだまだ不明な点が多い。子宮内膜細胞が卵管を逆流して腹腔内に到達するまでの過程で直接接するのは、卵管上皮細胞であり、腹腔内の腹膜中皮細胞である。従来、細胞間の情報伝達はサイトカインやケモカインなどの分泌蛋白質によって行われると考えられていたが、近年は細胞が分泌するエクソソームに蛋白質、mRNA, non-coding RNA などが豊富に含まれており、それらが細胞間の情報伝達の Key Player ではないかと考えられている。そこで今回我々は、月経血が逆流する過程において、卵管上皮あるいは腹膜中皮細胞からエクソソームを伝達され、含まれる情報により、内膜細胞

がいわゆる“内膜症細胞”に進化するのではないかとの仮説(図1)を立案した。

### 2. 研究の目的

今回の研究は、子宮内膜症の発症原因を月経血に含まれる子宮内膜細胞が卵管を通過する際に何らかの情報伝達を受けて“子宮内膜症細胞”になるという仮説の実証である。その情報伝達機構の機構として、細胞が分泌するエクソソームに焦点を当てて解析する。それらの研究を通じて、いまだ完全には解明されていない子宮内膜症のメカニズムを解明する。さらに情報伝達機構の阻害により内膜症の進展が予防できることが証明できれば、子宮内膜症の病因に迫る新規治療の可能性を提示することができると考えている。前述したように子宮内膜症を克服できれば、労働損失、医療費の観点から女性のヘルスケアに重大な貢献することができる。また、子宮内膜症は月経の回数が増えれば増えるほどその発症リスクが増すため、女性の晩婚化が進む我が国においては、発生頻度は増加の一途である。そして、患者の約半数が不妊症を併発しており、少子化の重大な一因にもなっている。従って、この疾患を制御することができれば、少子化対策にも直結できる。その意味でも、我々の研究が成功すれば、社会的な大きな成果につながる可能性がある。

### 3. 研究の方法

(1) 子宮内膜間質細胞 (hESC) の初代培養  
当科では年間約 500 件の婦人科手術を行っている。そこで、子宮筋腫など良性疾患で摘出した子宮より hESC を採取し初代培養する。手術検体の使用については倫理委員会に申請し、承認を得ている。また、手術前に必ず患者に文書による同意を取った上で行う。具体的には、Ferreira らが報告した方法 (Mol. Hum. Repro. 2008; 14: 301-7) を参考に、手術にて摘出した子宮内膜を無菌下に細切し、コラゲナーゼ type1 と DNase にて処理し、重力沈降により間質細胞豊富な上層と、上皮細胞豊富な下層に分離する。さらに間質細胞の接着能が高いことを利用して培養フラスコに短時間で接着する細胞を選択し、hESC として用いる。

#### (2) 腹膜中皮細胞の初代培養

卵管上皮細胞は卵管内に僅かに存在するだけであり、その初代培養は不可能である。そこで卵管上皮細胞の Origin でもある腹膜中皮細胞の初代培養を行う。卵巣癌手術には腹膜中皮細胞を豊富に含む大網の合併切除が必須であり、同手術で摘出した大網の一部を実験に用いる。具体的には事前に同意を得た卵巣癌患者より手術の際に 10 センチ平方程度の大網を摘出、はさみで細切し、コラゲナーゼ処理を行うことにより腹膜中皮細胞で採取する。

(3) 腹膜中皮細胞よりエクソソームの抽出  
エクソソームの回収方法は試行錯誤の結果、

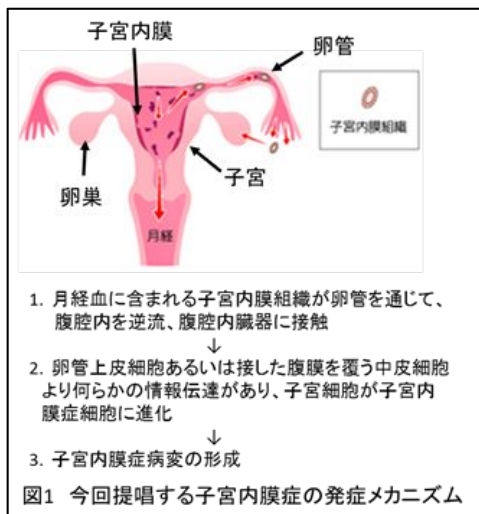


図 2 のような超遠心法による手技を確立した。この方法により、 $1 \times 10^8$  個の細胞より、おおよそ 50 ~ 100  $\mu\text{g}$  のエクソソームが回収できる。Agilent 2100 でこのエクソソームに含まれる RNA の多くが、500bp 以下の small RNA であることを確認する。



図2 エクソソーム抽出のプロトコール

(4) 腹膜中皮細胞由来のエクソソームの子宮内膜間質細胞への添加実験

上記(3)で抽出した腹膜中皮細胞が分泌するエクソソームを蛍光色素 PKH67 (Sigma) で標識したうえで初代培養した子宮内膜間質細胞に添加し、その取り込みを共焦点蛍光顕微鏡で確認する。

(5) 子宮内膜間質細胞が腹膜中皮細胞由来のエクソソームにより、“子宮内膜症細胞”になるかの検討

(1) で作成した初代培養子宮内膜間質細胞に(3)で作成した腹膜中皮細胞由来のエクソソームを添加する。それにより、子宮内膜間質細胞が腫瘍形成能をもつか、接着能、浸潤能、増殖能が亢進するかの検討を In vitro の実験系で行う。

#### 4. 研究成果

(1) 子宮内膜間質細胞 (hESC) の初代培養  
実際に採取した子宮内膜間質細胞を図 3 に示す。採取した子宮内膜間質細胞は cyclic AMP と黄体ホルモン製剤である MPA の投与によって、脱落膜化され、子宮内膜細胞の性質を保持している。

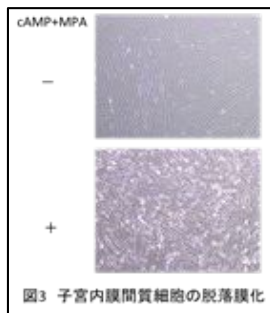


図3 子宮内膜間質細胞の脱落膜化

(2) 腹膜中皮細胞の初代培養

図 4 に示すように、敷石上の均一な腹膜中皮細胞が採取できている。



図4 腹膜中皮細胞 (大網から採取)

(3) エクソソームの抽出  
研究計画通り、超遠心法で初代培養した腹膜中皮細胞でのエクソソームの抽出を行ったが、細胞数の問題もあり、初代培養からの安定した抽出は困難であった。そこで、まずはがん細胞からの安定したエクソソームの抽出に切り替えて、漿液性卵巣癌細胞株 HeyA-8 および TYK-nu そしてコントロールとして不死化した正常卵巣上皮細胞 (IOSE) を用いてエクソソームを抽出した。超遠心法により、 $1 \times 10^8$  個の卵巣癌細胞

から、50  $\mu\text{g}$  程度のエクソソームを抽出することができた (図 5)。

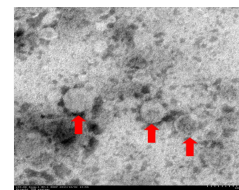


図5 卵巣癌細胞株HeyA-8より抽出したエクソソームの電顕写真(リンタングステン酸によるnegative染色)

(4) エクソソームの細胞への取り込み実験  
それを行うために、卵巣がん細胞由来のエクソソームを PKH67 (Sigma) で蛍光標識し、腹膜中皮細胞 (HOMC) へ添加、腹膜中皮細胞への取り込みを確認した。図 6 に示す通り、エクソソームは腹膜中皮細胞に取り込まれた。

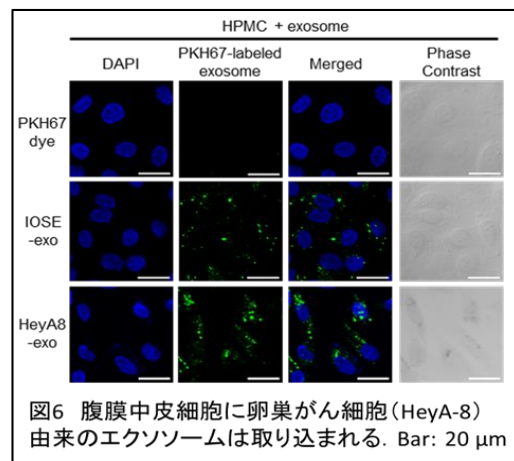


図6 腹膜中皮細胞に卵巣がん細胞 (HeyA-8) 由来のエクソソームは取り込まれる。Bar: 20  $\mu\text{m}$

(5) 卵巣がん細胞由来エクソソームの細胞への取り込み実験

それを行うために、卵巣がん細胞由来のエクソソームの形態を観察したところ、もともと敷石上の腹膜中皮細胞が、紡錘状に変化していた。そこで、上皮間葉移行が腹膜中皮細胞に起きているのではないかと考え、詳細な解析を加え、エクソソームに CD44 が含まれること (図 7 A)、腹膜中皮細胞にその CD44 が伝達されること、それにより、腹膜中皮細胞の上皮間葉移行が起こっていることを確認した (図 7 B)。すなわち、エクソソームが細胞間の情報伝達の鍵となっているその一つのメカニズムを解明した。

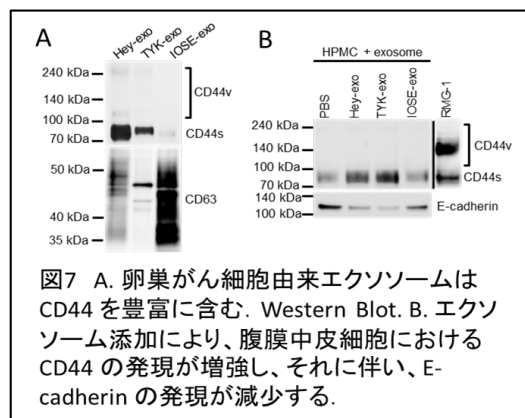


図7 A. 卵巣がん細胞由来エクソソームは CD44 を豊富に含む。Western Blot. B. エクソソーム添加により、腹膜中皮細胞における CD44 の発現が増強し、それに伴い、E-cadherin の発現が減少する。

## 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 5 件)

1. Sawada I, Hashimoto K, Sawada K, Kinose Y, Nakamura K, Toda A, Nakatsuka E, Yoshimura A, Mabuchi S, Fujikawa T, Itai A, Kimura T. The Novel I B Kinase Inhibitor, IMD-0560, Has Potent Therapeutic Efficacy in Ovarian Cancer Xenograft Model Mice. *Int J Gynecol Cancer*. 2016 May;26(4):610-8.
2. Toda A, Sawada K, Fujikawa T, Wakabayashi A, Nakamura K, Sawada I, Yoshimura A, Nakatsuka E, Kinose Y, Hashimoto K, Mabuchi S, Tokuhira A, Nakayama M, Itai A, Kurachi H, Kimura T. Targeting Inhibitor of B Kinase Prevents Inflammation-Induced Preterm Delivery by Inhibiting IL-6 Production from Amniotic Cells. *Am J Pathol*. 2016 Mar;186(3):616-29.
3. Nakamura K, Sawada K, Yoshimura A, Kinose Y, Nakatsuka E, Kimura T. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in ovarian cancer. *Mol Cancer*. 2016 Jun 24;15(1):48.
4. Yoshimura A, Sawada K, Kimura T. Is the exosome a potential target for cancer immunotherapy? *Ann Transl Med*. 2017 Mar;5(5):117.
5. Nakamura K, Sawada K, Kinose Y, Yoshimura A, Toda A, Nakatsuka E, Hashimoto K, Mabuchi S, Morishige KI, Kurachi H, Lengyel E, Kimura T. Exosomes Promote Ovarian Cancer Cell Invasion through Transfer of CD44 to Peritoneal Mesothelial Cells. *Mol Cancer Res*. 2017 Jan;15(1):78-92.

[学会発表](計 17 件)

[2014 年度]

1. Nakamura, K. Sawada, K. Kinose, Y. Hashimoto, K. Mabuchi, S. Kimura, T. Identification of microRNA which regulates paclitaxel resistance of ovarian cancer cells - a potential of miR-194 by attenuating paclitaxel resistance through the down-regulation of oncogene BMI-1. 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research San Diego, U.S.A. 4.5-9/, 2014.
2. Nakamura, K. Sawada, K. Sugiyama, M. Mabuchi, S. Hisamatsu, T. Nishio, Y. Ito, K. Kimura, T. Kamiura, S.

Morishige, K. The effect of raloxifene hydrochloride for the prevention of health care problems of patients who underwent surgeries for endometrial cancer:A multicenter clinical trial. 50th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology Chicago, U.S.A. 5.30-6.3, 2014.

3. Sawada, I. Hashimoto, K. Sawada, K. Fujikawa, T. Itai, A. Kimura, T. Targeting inhibitor of NF- b kinase beta (IKK ) may represent a possible novel treatment for endometriosis. Endocrine Society's 96th Annual Meeting and Expo Chicago, U.S.A. 6.21-24, 2014.

4. 中村幸司 澤田健二郎 杉山三知代 馬淵誠士 久松武志 西尾幸浩 伊藤公彦 森重健一郎 木村正 上浦祥司. <ミニワークショップ 女性ヘルスケア>子宮体癌術後のヘルスケアに関する多施設共同非盲検ランダム化比較試験-ラロキシフェンは骨密度を上昇させ、コレステロール値を低下させる. 第66回日本産科婦人科学会, 東京, 4.18-20, 2014.

5. 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, 東京, 4.18-20, 2014.

6. 中村幸司 澤田健二郎 木瀬康人 橋本香映 木村正. 卵巣癌において miR-194 は BMI-1 を制御することでパクリタキセル耐性を減弱させる. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜, 9.25-27, 2014.

[2015 年度]

7. Nakamura, K. Sawada, K. Kinose, Y. Yoshimura, A. Nakatsuka, E. Mabuchi, S. Kimura, T. Exosome transfer from ovarian cancer cells to mesothelial cells promotes cell invasion by upregulating MMP-9 secretion and increasing clearance of mesothelial cells (poster section). The 106th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research Philadelphia, U.S.A. 4.18-22, 2015.

8. 中村幸司 澤田健二郎 木瀬康人 吉村明彦 中塚えりか 戸田有朱香 橋本香映 馬淵誠士 木村正. 卵巣癌細胞由来 exosome の腹膜中皮細胞への情報伝達機構の解明 癌細胞由来 CD44 は exosome により中皮細胞に移行し, 腹膜中皮の MMP 9 分泌促進, Ecadherin 発現抑制を誘導

し腹膜播種を促進する. 第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会, 横浜, 4.9-12, 2015.

9. 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, 横浜, 4.9-12, 2015.
10. Nakamura, K. Sawada, K. Kinose, Y. Yoshimura, A. Nakatsuka, E. Mabuchi, S. Kimura, T. <English Oral session> Ovarian cancer exosomes promote invasion by affecting mesothelial cells through the upregulation of MMP9 secretion and mesothelial cell barrier. 第 57 回日本婦人科腫瘍学会, 盛岡, 8.7-9, 2015
11. 澤田育子 橋本香映 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 26 回 近畿エンドメトリオーシス研究会, 大阪, 8.22, 2015.
12. Nakamura, K. Sawada, K. Kinose, Y. Nakatsuka, E. Yoshimura, A. Mabuchi, S. Kimura, T. Ovarian cancer cells promote cancer invasion by transferring CD44 to mesothelial cells via exosomes. 第 74 回 日本癌学会学術総会(English Oral session), 名古屋, 10.8-10, 2015.

[2016 年度]

13. Yoshimura, A. Sawada, K. Nakamura, K. Kinose, Y. Nakatsuka, E. Mabuchi, S. Kimura, T. Elevated level of circulating microRNA-99a is correlated with serous epithelial ovarian cancer and can be used as a potential biomarker. AACR Annual Meeting 2016 New Orleans, Louisiana, U S A 4.16-20, 2016.
14. Yoshimura, A. Sawada, K. Nakamura, K. Kinose, Y. Nakatsuka, E. Mabuchi, S. Kimura, T. Elevated level of circulating microRNA-99a correlates with serous epithelial ovarian cancer and can be used as a potential biomarker. 第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 4.21-24, 2016.
15. Yoshimura, A. Sawada, K. Nakamura, K. Kinose, Y. Nakatsuka, E. Mabuchi, S. Kimura, T. Elevated level of serum miR-99a is correlated with serous epithelial ovarian cancer and can be

a potential biomarker. 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 10.6-8, 2016.

16. 吉村明彦 澤田健二郎 笹野智之 小笹勝巳 黒田浩正 中塚えりか 中村幸司 木瀬康人 木村正. 婦人科悪性腫瘍治療後の卵巣機能喪失により生じる不定愁訴に対する漢方薬治療の可能性の検討. 第 31 回日本女性医学学会学術集会, 京都, 11.5-6, 2016.
17. 吉村明彦 澤田健二郎 中村幸司 木瀬康人 中塚えりか 馬淵誠士 木村正. 血清 miR-99a の卵巣癌バイオマーカーとしての可能性の検討. 第 5 回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会, 大阪, 2.25, 2017.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者: なし

(3)連携研究者: なし

(4)研究協力者

中村 幸司 (Nakamura Koji)

澤田 育子 (Sawada Ikuko)

吉村 明彦 (Yoshimura Akihiko)