

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20180

研究課題名(和文)子宮内膜症由来不死化細胞への性ホルモン受容体の遺伝子導入による病態解析

研究課題名(英文) Pathological analysis of immortalized endometriotic cells by introducing sex hormone receptor genes

研究代表者

保野 由紀子 (BONO, YUKIKO)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：80565416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：文書により同意を得た患者の手術検体から得た卵巣チョコレート嚢胞壁から間質細胞を分離し、レンチウイルスベクターシステムにて CDK4/TERTまたは、TERTのみを遺伝子導入して安定的に継代可能な不死化細胞株を樹立した。この細胞株にMPAを投与し、細胞増殖を確認したところ、内膜症組織に特有の有為な細胞増殖抑制効果を確認した。以上より、子宮内膜症病巣由来の不死化子宮内膜間質細胞株を樹立し、以前より作成している不死化上皮細胞とともに子宮内膜症の病態を解明する培養実験系を確立した。

研究成果の概要(英文)：Purified stromal cells isolated from ovarian endometriomas were successfully immortalised by combinatorial transfection of human cdk4 and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) genes or hTERT genes. These cells expressed progesterone receptor B and showed significant growth inhibition by progestin. We generated immortalised epithelial and stromal cells from ovarian endometrioma that retained sex steroid responsiveness. These cells are invaluable tools not only for the consistent in vitro work but also for the study of molecular pathogenesis of endometriosis.

研究分野：産婦人科

キーワード：子宮内膜症 不死化細胞

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は子宮内膜類似組織が、主として子宮外の骨盤内で発育・増殖する疾患であり、周期的な出血をきたす子宮内膜症性嚢胞や骨盤臓器間に浸潤する深部子宮内膜症など表現型の異なる病態が存在する。いずれもエストロゲン依存性の疾患であり、月経に伴い病態が進展すると考えられ、月経困難症や不妊の原因となる。

子宮内膜症へのホルモン療法としては低用量ピル、Gn-RH アナログ、合成プロゲステロン製剤などが実用化されているが、Gn-RH アナログは有効な治療薬である反面、同時にエストロゲンの低下による様々な更年期と同様の問題を引き起こすため、長期的な使用に制限がある。一方でステロイドホルモン剤は比較的長期投与が可能であるが、血栓症などの副作用も問題となり、その使用においては詳細な機序の解明による、より選択的な治療法の提言が望まれる。

これらの背景をもとに本研究申請者は卵巣チョコレート嚢胞上皮細胞を手術検体から分離・純化し、cyclinD1/cdk4/TERT の遺伝子導入にて不死化細胞株を樹立し (Bono et. al. Br J Cancer. 2012)、この細胞に各種のステロイドホルモン受容体を遺伝子導入して低用量ピルの子宮内膜症に対する作用の分子メカニズムを解析し、エストロゲンがその受容体依存的にプロゲステロン受容体を誘導することで、プロゲステロンの効果を増強することを報告してきた (Bono et. al. Fertil Steril. 2014)。

その解析中に我々は多発性に発症した adenomyotic cyst 症例を経験した。この症例では子宮筋層内への子宮内膜組織の浸潤像に加えて脱落膜化などステロイドホルモンに対する反応、血管の増生と破綻が観察された。また子宮筋の外層では互いに融合する嚢胞を形成するとともに子宮腔内と交通して

いること、すなわち正所性子宮内膜との連続性も確認された。これらの所見から総合的にこの症例の病態の全体像を推察すると、基底層の子宮内膜組織が筋層内に浸潤し、子宮筋の外層で機能層様の分化をきたし、ステロイドホルモンへの反応性を獲得して出血巣を形成した、すなわち子宮内腔から連続した状態で子宮内膜症様の病態が子宮筋層内に発症した病態と推論された。

これらの推論を裏付ける所見として病変部の子宮内膜間質細胞にはプロゲステロンリセプターの強い発現と VEGF の産生が観察された。以上の知見から、この症例は卵巣子宮内膜症性嚢胞および深部子宮内膜症などの様々な子宮内膜症の病態の特徴を併せ持つ病変であり、正所性子宮内膜から子宮内膜症病変への連続的な変化の過程の一端を示唆していると位置付けられる。

現在、子宮内膜症性嚢胞と深部子宮内膜症は別の病態であるとの考えもあるが、この特殊な症例の臨床像から帰納的に考察すると、「子宮内膜症性嚢胞と深部子宮内膜症はともに基底層の細胞に由来し、病態の違いは、その表現型の相違である」との概念を支持するものであり、さらに「子宮内膜症の病態の相違は発現誘導されるステロイドホルモン受容体の組合わせに依存しており、その表現型の選択は浸潤した部位により強い影響を受ける」のでは、と発想するに至った。

これらの概念を整理すると以下のようなになる。

再生能を有する基底層の子宮内膜組織がステロイドホルモンに対する反応性を潜在的に保ったまま浸潤し、遠位部で機能層様の子宮内膜に分化して周期的な出血と炎症を繰り返す。

表現型を決めるのはそれぞれ子宮内膜上皮細胞と子宮内膜間質細胞、さらに血管内皮細胞に発現する性ステロイドホルモン受容体の組み合わせである。

表現型を制御する因子は子宮内膜間質細胞が接する組織である。

表現型を顕正化する因子は血管新生（分裂と遊走）とその機能異常、間質細胞の浸潤性であり、性ホルモン影響下にこれらを媒介する因子として VEGF や chemokine などが挙げられる。

以上の背景のもと、上記の概念を支持する知見を実験的に得る目的で本研究を計画した。

2. 研究の目的

子宮内膜症病変には様々なステロイドホルモン受容体が発現していることは報告されている。そこで本研究では、ステロイドホルモン受容体タイプの発現の相違により、子宮内膜症由来細胞に形態的および機能的に異なる表現型が誘導されること、また血管内皮に対する作用が変化すること、などを明らかにする目的で、2年の研究期間で下記の3項目の課題を遂行する。

子宮内膜症病巣由来の不死化子宮内膜間質細胞株を樹立し、以前より作成している不死化上皮細胞とともに各種ステロイドホルモン受容体を遺伝子導入し、培養実験系を確立する。

各種のステロイドホルモン受容体遺伝子導入不死化細胞株と血管内皮細胞（HUVEC）との共培養系を用いてステロイドホルモン影響下での血管作動性因子の産生能、浸潤能および増殖能などの機能解析、さらに環境因子に対する遺伝子発現変化の解析を行なう。

上記の から得た知見を検討して、追加実験を施行するとともに、その結果に基づいて子宮内膜症の新しい進展機構を推察する。さらに手術標本で本研究から推定された受容体の発現様式と病理学的所見との整合性を確認して、新規の予防法あるいは治療法の開発に繋がるアプローチを提言する。

3. 研究の方法

子宮内膜症病巣由来の不死化子宮内膜間質細胞株の樹立

文書により同意を得た患者の手術検体から得た卵巣チョコレート嚢胞壁からsingle cellを分離し、CD10陽性細胞をflow cytometry法でsortingして子宮内膜症病変由来の内膜間質細胞を純化した後、この培養系にCDK4/TERTを遺伝子導入して不死化細胞株を作成する。

不死化細胞への各種性ステロイドホルモン受容体の遺伝子導入

で樹立した細胞株群においてER、ER、PRB遺伝子発現をRT-PCR法およびwestern blot法で確認する。ERまたはPRもしくは双方の発現が欠損している細胞株を親株として、これらの遺伝子を導入し、それぞれER単独、ER単独、もしくはERとER両方を発現する細胞株を作成する。それぞれのパターンに対してさらにPRB遺伝子も導入してPRBの有無についても各細胞株を準備する。

受容体遺伝子導入上皮細胞に対するエストロゲンおよびプロゲステロン作用の解析

で各受容体遺伝子を導入した不死化上皮細胞にエストロゲンまたはプロゲステロン、もしくは両ホルモンを添加培養してE-cadherin、integrin 1発現およびFAKのリン酸化の変化を免疫染色法およびwestern blot法で観察し、上皮細胞としての極性および接着性機能に対する作用を評価する。また増殖能に対する作用をproliferation assayで検討し、さらに培養液中のグリコーゲンを定量して腺分泌能に対する性ステロイドホルモンの作用を調べる。

受容体遺伝子導入間質細胞に対するエストロゲンおよびプロゲステロン作用の解析

で作成した受容体遺伝子間質細胞にエストロゲンまたはプロゲステロン、もしくは両

ホルモンを添加培養して脱落膜化様の形態変化の有無、IGF-1とProlactinの産生変化を定量的RT-PCR法、western blot法および培養液の測定で脱落膜化に対する作用の差異を検討する。また同様にVEGFの産生能の変化についても観察する。さらに増殖能に対する作用をproliferation assayで、浸潤の変化をinvasion assay法で評価する。また各種のケモカインおよびTNF- α 、TGF- β 、IFN- γ などの炎症関連サイトカインの産生能の変化についてRT-PCR法にてスクリーニングする。

受容体遺伝子導入上皮および間質細胞で発現変化する遺伝子群のスクリーニング

と の実験条件において発現変化する遺伝子群をマイクロアレイ法にて検索する。発現変化が観察された遺伝子については定量RT-PCR法にて確認する。

不死化上皮と間質細胞の共培養系に対するエストロゲンおよびプロゲステロン作用の解析

受容体発現の組み合わせを考慮しつつ不死化上皮細胞と間質細胞をトランスウェルを用いて各性ステロイドホルモン存在下に共培養して両細胞の増殖能とVEGFの産生能を検討し、また上皮細胞においてはグリコーゲンの産生能、間質細胞においては浸潤能の変化について観察する。さらにそれぞれの細胞において発現変化する遺伝子群をマイクロアレイ法にてスクリーニングする。

不死化間質細胞とHUVECの共培養系に対するエストロゲンおよびプロゲステロン作用の解析

血管内皮細胞として臍帯静脈よりHUVEC細胞を分離して各種の不死化間質細胞と各性ステロイドホルモン存在下に共培養する。また、共培養下にHUVECのtubal formation assayを施行し、血管内皮構造の安定性に対する作用を検討する。

各細胞培養系に対する合成ステロイド作用の解析

上記の検討でエストロゲンおよびプロゲステロンに反応して治療効果を推察する上で有効と考えられた受容体発現様式の培養系については、現在子宮内膜症の治療に用いられている合成ステロイド剤であるジェノゲスト、低用量ピルに含有されているエチニルエストラジオールと各種の合成プロゲステンを用いて同様の検討をし、治療効果の機序についての新しい知見を得る。

子宮内膜症検体を用いた解析

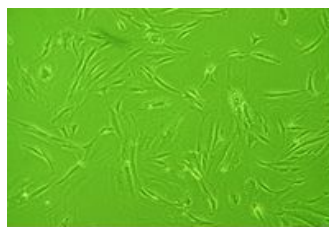
文書により同意を得た患者の手術検体から子宮内膜症病巣を摘出し、本研究で明らかとなった各ステロイドホルモン受容体発現様式および各種の因子について、RT-PCR法、western blot法および免疫染色法にて確認する。

新しい治療法の探索

本研究で得られた知見を総合的に解析し、子宮内膜症の新しい進展機構を考察する。

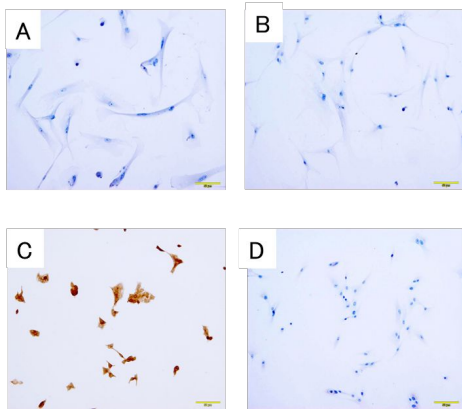
4. 研究成果

文書により同意を得た患者の手術検体から得た卵巣チョコレート嚢胞壁から間質細胞を分離し、レンチウイルスベクターシステムにてCDK4/TERTまたは、TERTのみを遺伝子導入して安定的に継代可能な不死化細胞株を樹立した。(図：不死化間質細胞)

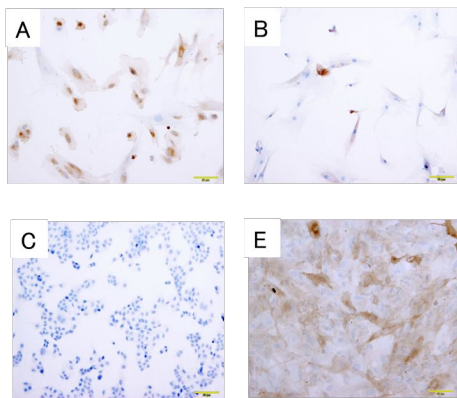


上皮細胞マーカーとしてサイトケラチンを、間質細胞マーカーとしてCD10をRT-PCRおよび免疫細胞染色にて確認したところ、どちらの不死化細胞株も間質由来であることを確認した。(図：細胞免疫染色)

Pan cytokeratin



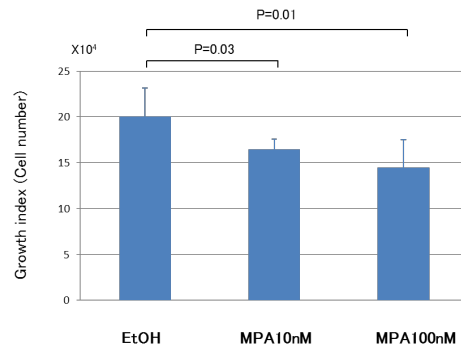
CD10



- A: 不死化間質細胞 (CDK4/TERT)
- B: 不死化間質細胞 (TERT)
- C: Ishikawa cells
- D: BJ cells
- E: 正常子宮内膜間質細胞

次に、子宮内膜症の進展発育に大きな影響を与える性ステロイドホルモンの受容体を解析した。RT-PCR および Western blot による解析では ER、PRB 陽性であったが、PRA の発現は認められなかった。この細胞株にプロゲスチン製剤である MPA を投与し、細胞増殖能を確認したところ、有意な細胞増殖抑制効果を確認した。

(図: 不死化間質細胞(CDK4/TERT)に MPA を投与した際の細胞増殖能)

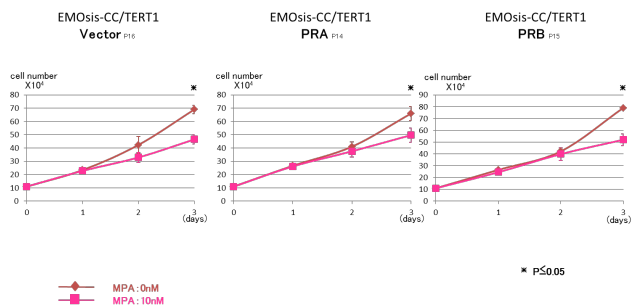


以上より、子宮内膜症病巣由来の不死化子宮内膜間質細胞株を樹立し、以前より作成している不死化上皮細胞とともに子宮内膜症の病態を解明する培養実験系を確立した。

次に不死化細胞へ各種性ステロイドホルモン受容体の遺伝子導入を行った。

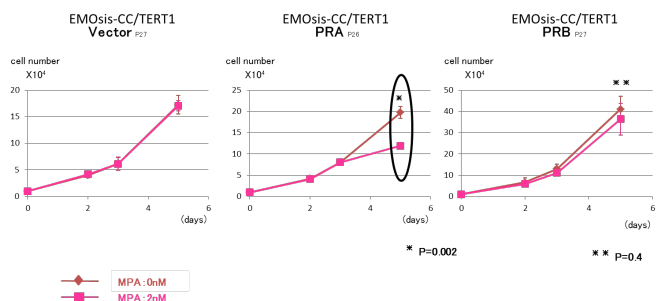
不死化上皮細胞に PRA、PRB を導入し MPA による細胞増殖能を確認したところ、MPA10nM では、導入遺伝子に関わらず、有意な細胞増殖抑制効果を確認した。

(図: 不死化上皮細胞に MPA10nM を投与した際の細胞増殖能)



しかし、MPA2nM では、PRA の遺伝子導入した細胞株のみに有意な細胞増殖抑制効果を確認した。

(図: 不死化上皮細胞に MPA2nM を投与した際の細胞増殖能)



正常子宮内膜上皮不死化細胞株では PRB 遺伝

子導入細胞株でプロゲスチンによる有意な細胞増殖抑制効果を認め(Nakamura et. al. Cancer Lett. 2013)、子宮内膜症由来の不死化細胞株は、プロゲスチンによる増殖抑制メカニズムが正常子宮内膜上皮細胞と違う可能性が示唆された。

また、各受容体遺伝子を導入した不死化上皮細胞にエストロゲンまたはプロゲステロン、もしくは両ホルモンを添加培養して E-cadherin 発現を western blot 法で観察したが、発現変化を認めなかった。同様に、各受容体遺伝子を導入した間質細胞にエストロゲンまたはプロゲステロン、もしくは両ホルモンを添加培養して VEGF の産生能の変化を western blot 法で観察したが、発現変化を認めなかった。

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0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

保野 由紀子 (Bono Yukiko)
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号：80565416

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし