

論文の内容の要旨

論文題目 子宮内膜症における上皮間葉転換関連分子の発現及び機能解析

氏名：福田晋也

1) 背景

子宮内膜症は、子宮内膜類似組織が子宮外に発生する良性疾患であり、組織学的には子宮内膜様の上皮細胞、間質細胞によって特徴づけられる。生殖可能年齢の女性の 6-10%が罹患しているともいわれ、月経困難症・慢性骨盤痛等の疼痛を引き起こし、不妊症を合併する。良性疾患であるが増殖・浸潤をし、好発部位である卵巣・骨盤腹膜以外に、腸管・尿路・肺など稀少部位子宮内膜症といわれる遠隔臓器への発症も認められる。悪性転化することでも知られており、生殖可能年齢から閉経後まで、女性の全ライフスパンにおいて QOL を低下させる疾患である。しかしその病態は未だ解明されていない。

子宮内膜症は慢性炎症性疾患であり、免疫応答や炎症性反応がその病態形成において重要な役割を果たし、炎症性サイトカイン、ケモカイン、プロテアーゼ、プロスタグランジン、ホルモンレセプター、血管新生因子等の様々な物質が関係していると言われている。炎症性サイトカインの内、tumor necrosis factor α (TNF α)、tumor transforming factor β (TGF β)、IL -6, -8, -17 等の内膜症との関連が言及されている中、今回私たちは TGF β と、内膜症の病態に特徴的な浸潤や線維化などの一因と言われている、上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition, EMT) に着目した。

TGF β は遺伝子発現、細胞の運動性、形態変化、細胞増殖、アポトーシス、分化、免疫応答や腫瘍増殖などに関わる。膜貫通型受容体の TGF- β II 型受容体と TGF- β I 型受容体を介して細胞質内 Smad 複合体のリン酸化を介してシグナルを核内に伝達する。

TGF β は子宮内において着床前期胚との相互作用も報告されているだけでなく、逆流する月経血中に含まれる TGF β 1 が、月経血中の子宮内膜細胞の腹腔内での、細胞運動・収縮、免疫抑制、細胞生存に関わっていると言われており、腹膜への細胞接着、浸潤につながり、内膜症の病態形成・維持に関わっていると考えられている。実際、内膜症患者では TGF β 1 が腹水中で高濃度に分泌されていると言われている。また、子宮内膜症の発生に深く関わる腹膜中皮細胞においても TGF β 1 発現が上昇しており、腫瘍増殖、上皮間葉転換など TGF β によって誘導される smad pathway の活性化が報告されている。

TGF β は上皮間葉転換 (EMT) の主要な誘導因子であり、線維化や癒着形成に見られるように、EMT は内膜症において臨床的にも関連が示唆される。子宮内膜症は正所性内膜に比して、上皮

マーカーの発現低下を認める一方、間質マーカーや EMT 関連転写因子の発現が上昇していると言われている。また子宮内膜症間質細胞が TGF β 1 刺激により EMT が引き起こされ、細胞遊走・浸潤や線維化が促進されるといった報告もある。

このように内膜症の病態には TGF β と EMT 関与が報告されており、我々は特に子宮内膜症上皮細胞において、TGF β 1 の役割と EMT について検討した。

2) 目的

本研究において

1. 子宮内膜症上皮細胞と子宮内膜上皮細胞の RNA sequence 結果の IPA 解析
2. 子宮内膜症上皮細胞における TGF β の機能解析
3. 子宮内膜症上皮細胞における上皮間葉変換関連因子（主に snail）の発現及び機能解析
4. 子宮内膜症上皮細胞における NRP2 の発現及び機能解析

を行うことによって、子宮内膜症における上皮間葉転換関連分子の機能解析を目的とした。

3) 方法

当科 Nakazawa らが作成した子宮内膜症上皮細胞と子宮内膜上皮細胞の RNA sequenced-データベースをもとに IPA 解析手法を使って、上流制御因子の活性化状態を予測した。

In vivo 実験の検体として、卵巣子宮内膜症嚢胞、正所性子宮内膜の、東京大学医学附属病院での手術組織標本を使用した。卵巣子宮内膜症嚢胞検体は、腹腔鏡下卵巣嚢胞切除術、腹腔鏡下子宮付属器切除術を施行した患者検体を、正所性子宮内膜組織検体は子宮頸癌もしくは子宮筋腫の診断で子宮全摘術を受け、病理学的に正常な子宮内膜組織を用いた。

In vitro 実験として、当研究室では、初期培養した子宮内膜症性卵巣嚢胞上皮細胞の不死化 (Im-EmoEC) に成功しており、子宮内膜症の病態解明に使用するに適するものであると考えた。Snail, NRP2 の強制発現に際しては Tetracycline 発現誘導システムを用いた。Im-EmoEC に plenti-CMV-rtTA3 レンチウイルスベクターから作成したレンチウイルスを感染させ、rtTA3 発現細胞を作成した。これに、snail, NRP2 の ORF を pLent-CMV-TRE3G DEST ベクターに組み込み作成したエクспRESSIONベクターから抽出したレンチウイルスを感染させ、doxycycline の添加により snail, NRP2 の発現調節が可能な Im-EMoEC-CMV-rtTA3-TRE3G-Snail, Im-EMoEC-CMV-rtTA3-TRE3G-NRP2 細胞を完成させた。Snail, NRP2 の発現低下に関しては、si-RNA を購入し、Lipofectamine 下に細胞内に導入した。

mRNA 抽出は Nucleospin RNA キットを、quantitative PCR は SYBER Green Master を使いプロトコール通りに行った。

タンパク抽出は lysis buffer にて行い、western blotting は SDS-PAGE 法にてタンパクを電気泳動、転写後、一次・二次抗体を反応させ Amersham ECL Prime にてタンパクの信号を得た。

免疫組織染色 EnVisionKit (Dako, California, USA) にてプロトコール通り行った。

細胞上清中タンパク測定（Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay：ELISA）も Human IL-8/CXCL8 Quantikine ELISA Kit 通り行った。

Migration Assay は Cell Culture Wound Closure Assay を採用した。Invasion Assay は BioCoat Matrigel Invasion Chamber を使用した。

4) 結果と考察

IPA 解析より子宮内膜症上皮細胞と子宮内膜上皮細胞の遺伝子発現の差異に、TNF α 、TGF β 1、エストラジオール、PDGFB、Versican が関与をしている可能性がわかった。そこで、TGF β 1 に着目し、子宮内膜症上皮細胞を TGF β 1 で刺激したところ、浸潤能が亢進するとともに、EMT マーカーの上昇と snail と ZEB1 といった EMT 関連の転写因子の発現上昇が確認された。さらに、TGF β 1 による浸潤能亢進は snail の活性化を介することを示し、snail を強制発現することで、MMP2, MMP9 の発現とともに子宮内膜症上皮細胞の浸潤能も亢進することが分かった。そのみならず、snail を強制発現させることで、子宮内膜症上皮細胞の炎症性サイトカインの分泌を亢進させ、TNF α の存在下にさらに炎症状態を亢進させることが分かった。これらのことから、子宮内膜症上皮と子宮内膜上皮における遺伝子発現パターンの差異より、TGF β 1 の経路の重要性が示されるとともに、TGF β 1 によって活性化される snail の発現が、子宮内膜症の浸潤、TNF α の存在下に相乗的な炎症状態の惹起を引き起こし、子宮内膜症の増悪、進展に関与することが示された。

また、NRP2 は子宮内膜症上皮細胞に強く発現しており EMT との関係を解析した所、TGF β 1 刺激により発現増強し、TGF β 1 により亢進した細胞遊走能は NRP2 を介していること、さらに NRP2 単独でも細胞遊走能を亢進させることが分かった。NRP2 が子宮内膜症の進展に関与することが示唆された。

TGF β 1 が子宮内膜症の病態形成・維持に関わっていることを示唆する報告は数多くあるものの、本研究のように TGF β 1 により子宮内膜症細胞の浸潤能獲得や EMT 関連マーカーの上昇を示している報告はいずれも子宮内膜間質細胞を使用しており、子宮内膜上皮細胞の形態変化をはじめ、上皮細胞の間葉系細胞様形質の獲得や浸潤能に言及した報告は初めてである。TGF β 1 が子宮内膜上皮細胞、間質細胞両方において、その病態発生と進展に関わっていると推察される。

本研究の不死化子宮内膜症上皮細胞においては、EMT 関連の主要な転写因子である snail, slug, twist, zeb1, zeb2 の内、TGF β 1 による誘導が snail において最も顕著であったため snail に着目したが、既報では ZEB1 が強く子宮内膜症の浸潤に関わっており浸潤性の指標になると示唆する報告もある。本研究においても、ZEB1 は不死化子宮内膜症嚢胞上皮細胞への TGF β 1 刺激にて発現上昇を認めており、その役割を今後検討していく価値があると考ええる。

Snail は胎生期の発生に重要な役割を渡すと同時に、引き起こす EMT が様々な良性疾患の進展・線維化、悪性腫瘍の浸潤・転移に深く関わっていると言われている。本研究は子宮内膜上

皮細胞において、 $TGF\beta 1$ により獲得された浸潤能が *snail* を介することを初めて確認したが、 $TGF\beta 1$ によって誘導された EMT 関連分子は *snail* の抑制のみでは発現変化はしなかった。

一方 *snail* の強制発現により、子宮内膜症上皮細胞において炎症性サイトカインが誘導され、 $TNF\alpha$ の存在下に相乗的な炎症状態の惹起を引き起こすことを示した。他疾患においても、*snail* が $TNF\alpha$, $NF\kappa B$, $CCL2$, $CCL5$ といった炎症性サイトカインの誘導に関係するといった報告があるが、そのメカニズムは明らかにされておらず、子宮内膜症においても炎症誘導・促進分子機構の解明が今後必要であると考ええる。

NRP は血管、リンパ管、神経等様々な細胞に発現し、SEMA3、VEGF、 $TGF\beta 1$ をリガンドとする細胞膜共受容体である。血管新生、神経ガイダンス、に加え EMT や免疫応答にも関与していると言われている。種々の悪性腫瘍で発現が亢進しており、NRP-2 が予後不良因子であることや、 $TGF\beta 1$ 誘導性 EMT を促進するという報告がある。

子宮内膜症と NRP に関しては、子宮内膜症で高発現であるといった報告があるが、その機能は明らかになっていない。我々は、子宮内膜症上皮細胞において高発現している NRP2 が、 $TGF\beta 1$ 刺激により発現増加すること、 $TGF\beta 1$ 誘導性細胞遊走能の亢進に関わる共受容体であること、さらに NRP2 単独でも細胞遊走能を亢進させることを示し、他の疾患同様、内膜症の病態進展においても重要な分子であることが分かった。

5) まとめ

上皮間葉転換 (EMT) は上皮細胞を間葉系細胞様に形質変化させ、浸潤・転移を可能にし、内膜症の進展にも関わると報告されている。本研究では、子宮内膜症性嚢胞上皮細胞に対して、EMT 関連分子の発現及び機能解析を行った。

Snail は子宮内膜症上皮細胞に強く発現しており、 $TGF\beta 1$ により誘導される EMT や浸潤能の獲得における主要な転写因子であった。さらに *snail* が慢性炎症疾患である内膜症の炎症の誘導・促進に関わることを示した。

NRP2 もまた子宮内膜症上皮細胞に発現する細胞膜受容体であり、 $TGF\beta 1$ 誘導性の細胞遊走能の獲得は NRP2 を介していることが分かった。

これらの結果は *snail* や NRP2 が子宮内膜症の進展に関与し、治療ターゲットになりうることを示唆している。