

生殖腺におけるIGF低親和性結合蛋白質 IGF-Binding Protein-Related Protein 1 (IGFBP-7/mac25)の発現とその生理的意義について

田村 和広, 沓掛 真彦, 遠藤 愛樹, 向後 博司

東京薬科大学薬学部内分泌分子薬理学教室

はじめに

Insulin-like growth factor-I (IGF-I) 結合蛋白質 (IGFBP) は、体液中のIGFが高分子複合体として存在することからIGFに結合する蛋白質として同定された分子であり、IGFBP-1からIGFBP-6まで6種類のアイソフォームが存在する。IGFBPはIGFに結合することにより、IGFの代謝、分布、IGF受容体への結合性を修飾する。IGFBP間にはお互いに18個の相同なシステイン残基が存在し、このうち12個はN末端に偏在しており、IGFへの結合に関与する。IGFBPはIGFと同様に胞胚と子宮内膜において発現し（マウスではIGFBP-2~6、ラットはIGFBP-1, 3, 4, 5が発現）、オートクライン/パラクライン様式で作用することが示唆されている [1, 2]。卵巣においても、主席卵胞の選択にIGFBP-4, 5が関与しているという知見が報告されている [2, 3]。

近年、N末端領域におけるIGFBPに対するホモロジーは高いにもかかわらず、IGFBP-1~6のC末端領域とは相同性の低いIGF結合蛋白質関連蛋白質 (IGFBP related protein: IGFBP-rP) としてIGFBP-rP1~10が同定された (図1参照)。このIGFBP-rPファミリーは、概してIGFBPに比べて、IGF、インスリンに対する親和性が低いことが特徴で、IGF作用の調節以外の独自かつ多彩な生理活性があることが注目されている [4, 5]。このなかで、ヒト染色体の4q12-13に存在し、マウスと高いホモロジーを示すIGFBP-rP1は、髄膜腫と比べて正常髄膜細胞で高発現している遺伝子 (mac25) として見出されたIGF結合蛋白質である [6] が、ほぼ同年代に複数の研究者が独立して分離し、TAF (tumor adhesion factor), PSF (prostacyclin-stimulating factor) などと記述されていた。しかし、IGFBP-7と呼ばれるようになり、最近ではIGFBP-rP1と再分類され

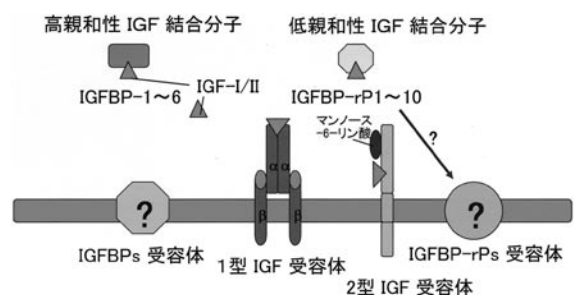


図1 IGF結合蛋白質関連蛋白質 (IGFBP) スーパーファミリーとIGFシステム

た [4]。

IGFBP-rP1の特徴は、IGFに対する親和性がIGFBP1~6の約1/100であるが、インスリンに対する親和性については他のIGFBPと比べて数百倍高い点があげられる。また、インスリン受容体に対するインスリン結合にも干渉する。

IGFBP-rP1はIGFやインスリンに対する結合性を有する点を含めて多様な作用が報告されているが、正常生理機能における役割はほとんど知られていない。筆者らは、IGFBP-rP1が、子宮内膜組織や卵巣顆粒膜細胞で細胞・時期特異的に発現し、その機能と密接に関連している結果を得ているので、本稿ではその概要を紹介する。

着床関連因子としてのIGFBP-rP1の同定

げっ歯類 (ラット) において、受精成立後、卵管内で桑実胚となった卵は、妊娠5日目までに胞胚を形成し、子宮は胞胚の受容と侵入を可能にする準備を整える。胚と子宮内膜は、増殖分化して着床の準備を整える。このような胞胚の受容能獲得と着床誘起に役割をもつ分子として卵巣ステロイドにより制御される母体 (子宮) 側の leukemia inhibitory factor (LIF), cyclooxygenase-2 (COX-2) 代謝産物などが同定されている [7]。IGFBP-rP1は、筆者らが着床機構の研究においてラットの着床成立時に特異的に発現が上昇する子宮因子としてサブトラクション法により単離した遺伝子の1つであ

連絡先：田村和広，東京薬科大学薬学部内分泌分子薬理学教室

〒192-0392 東京都八王子市堀之内1432-1

TEL: 0426-76-4536

FAX: 0426-76-4536

E-mail: hiro@ps.toyaku.ac.jp

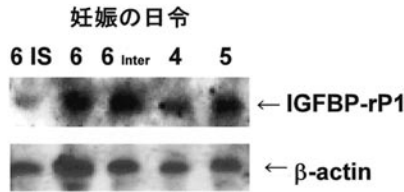


図2 妊娠初期の子宮内IGFBP-rP1発現 (Northern blot)
 腔内の精子の確認日を妊娠1日目とした。6 IS; 妊娠6日目の着床部位。6; 全子宮。6 Inter; 着床部位間の子宮組織 (文献9より一部改変)

る [8]. すなわち, ラット妊娠初期の6日目の着床が開始された子宮内膜で本遺伝子発現レベルは急増する. ノーザンプロットで解析すると, 妊娠5, 6日目で明瞭な1.1kbの単一バンドが認められる (図2). 非妊娠動物においてはそのレベルは低い. 下垂体摘出により着床遅延を誘起した着床遅延ラットでも, エストロゲン投与により着床を誘起すると増加する [9]. しかし, 興味深いことに, その発現レベルは着床部位ではなく非着床部位で高い. この局在性は着床部位において着床時に同様に発現が高進し, 脱落膜化組織に発現がみられる微小管不安定化因子であるスタスミンとは対照的である [8]. IGFBP-rP1は子宮筋層および腺上皮細胞ではなく, 非着床部位の子宮筋層に近い内膜間質細胞で強く発現している.

子宮におけるIGFBP-rP1の生理活性と意義

IGFとインスリンは構造的に関連のあるペプチドで栄養輸送, 代謝酵素の調節, 細胞増殖刺激を調節している. IGF-Iは, 骨由来細胞をはじめとする種々の細胞において増殖や分化を促進し, ヒトでは多量投与により血糖降下作用を示すが, 妊娠初期の子宮内で発現する主要なマイトゲンでもある. IGF-I 遺伝子欠損マウスでは, 子宮内での胎児の発育遅延がみられ, 出生時体重が正常の60%に抑制され, 生後も抑制され続け, 8週後の体重は正常の30%となる. 子宮を含めた生殖臓器は小さいうえに不妊であり, IGF-Iが子宮の発育と機能維持に不可欠であることは明らかである. IGF-IIの生理的意義は未だに不明な点が多いが, 遺伝子欠損マウスでは, IGF-Iの遺伝子欠損マウスと同程度の子宮内発育遅延がみられる. ラット子宮ではIGFが内膜をはじめ筋層, 胞胚で発現が確認されており, IGF-I受容体は子宮内膜に存在し, 筋層または胞胚には検出されない. 子宮でのIGF-I発現は着床周辺期で約50倍に増加することがブタで確認されており, ブタでは胞胚の形態変化に関与すると考えられ

ている.

ラット着床前日の子宮から調製した全子宮細胞の増殖におけるIGF-IとIGFBP-rP1の作用について検討を行うと, IGFBP-rP1はIGF-Iによる細胞増殖を抑制した. その際, 細胞周期G2/M期の細胞が減り, G1期に停滞がみられた [9]. IGFBP-rP1は子宮細胞の増殖においてIGF-I作用を抑制することにより妊娠初期の子宮機能の調節に関与している可能性が考えられる. IGFBP-rP1発現は正常なヒト子宮筋層に比べ, 子宮筋腫において減少しているとの報告 [10] もあるので, ヒトでも子宮構成細胞の増殖制御に関与していると考えられる.

さらに, 線維芽細胞で報告されているように, 培養ラット子宮筋細胞においてもIGFBP-rP1はプロスタサイクリン (PGI₂) 産生を促進した [9]. なお, 子宮筋細胞は, PGI₂の主要な子宮内産生部位である. IGFBP-rP1蛋白質を発現することが可能なIGFBP-rP1発現アデノウイルスベクター (Ad-mac) を構築して子宮内膜間質細胞にAd-mac処置を行うと, COX-2とmicrosomal prostaglandin E synthase (mPGES) の発現は上昇した. また, リコンビナントIGFBP-rP1を処置すると, COX-2発現の上昇とその代謝産物であるPGI₂産生は上昇した (投稿中). 種を越えて着床に必須と考えられているLIFの下流にある着床シグナルとしてheparin binding-epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF), Hoxa-10やCOX-2の重要性が示唆されている. COX-2発現は, 着床を開始した胞胚周囲の子宮内膜でみられ, LIF遺伝子欠損マウスが不妊であるのと同様にCOX-2遺伝子欠損マウスも不妊である. LIFは着床における管腔上皮の変化の誘導に役割をもち, COX-2とHoxa-10は間質の変化に役割をもつと報告されている. このCOX-2代謝産物であるPGI₂は核内レセプターのPPAR δ を介して着床に必須な遺伝子発現を起こすと考えられている [7]. PGI₂合成酵素の発現部位は, 着床日においては着床部位周辺の間質細胞と筋層であることから, IGFBP-rP1はオートクライン, パラクライン様に作用し, 着床誘起に必要なPGI₂の産生を上昇させて, より着床しやすい環境をつくるのが推察される. なお, 本研究過程で, IGFBP-rP1がヒトの着床の受容能獲得に関与する可能性を示唆する論文が発表されている [11]. この報告では, マイクロアレイ解析により受容期の内膜組織と非受容期間, ならびに, 接着能が高い内膜細胞株 (RL95-2) と接着能が低いHEC-1A株間で, 発現量が, それぞれ前者において著しく上昇している遺伝子として, いずれの場合もIGFBP-rP1 (各比較において同定された因子で第2番目に差があり) を検出している.

さらに、ヒト培養子宮内膜間質細胞もIGFBP-rP1を生成していることを確認しているが、最近、筆者らは、この内因性IGFBP-rP1産生をIGFBP-rP1のsiRNA処置によりノックダウンすると、脱落膜化が進行しないことを見出ししている [12]。このように、IGFBP-rP1は受容能ばかりでなく脱落膜化を含めた妊娠初期の子宮機能の維持に関与している可能性が示唆される。

卵巣におけるIGFBP-rP1の発現と卵巣機能との関わり

IGFBP-rP1の発現は、ブタ卵巣の洞卵胞の莢膜に隣接する顆粒膜細胞にみられる [13]。成熟分化した顆粒膜細胞で高度に合成・分泌されているエストラジオールは、LH作用により莢膜細胞内でコレステロールから産生されるアンドロゲンが顆粒膜細胞に供給され、FSH作用を受けた顆粒膜細胞で活性化したアロマターゼ (CYP19; p450arom) により生成される。筆者らは、ブタで報告がある顆粒膜細胞で発現するIGFBP-rP1について、その卵巣での生理的意義を探るため、ラット顆粒膜細胞における産生の有無とリコンビナントIGFBP-rP1のステロイド産生に対する生理活性を検討した。24日齢のWistar-今道系ラットに妊馬血清性ゴナドトロピン (eCG) を皮下投与し、48時間後に卵巣組織を摘出し、注射針で卵胞を穿刺して細胞を溢出させる方法で回収した顆粒膜細胞を用いて検討を行った。まず、培養顆粒膜細胞のライセートと培養上清中のIGFBP-rP1の検出を抗IGFBP-rP1抗体を用いた免疫沈降を行った後にウエスタンブロッティングを行い確認したところ、31kDaに単一のバンドを得た。また、卵胞液中の存在の有無についても顆粒膜細胞の回収過程で遊離する卵胞液を回収し、セントリコンで濃縮し、ウエスタンブロッティングで確認したところ、同様なバンドが得られた。このように、ラット顆粒膜細胞は、IGFBP-rP1を分泌し、卵胞液中にも本蛋白質が存在していることを確認した。次に、ステロイド産生に対するIGFBP-rP1の影響を調べるため、FSH存在下で刺激されるエストラジオール (17 β -エストラジオール) とプロゲステロン産生に対するリコンビナントIGFBP-rP1の作用を検討したところ、FSHによる両ホルモンの産生増加は、30ng/mL以上のIGFBP-rP1処置で有意に抑制された。

循環血中のアクチビンは、下垂体FSH分泌に対して促進的に、逆にインヒビンは抑制的に作用するが、卵巣レベルにおいては、顆粒膜細胞由来のアクチビンは、顆粒膜細胞の増殖、FSHとLH受容体のアップレギュレーション、アロマターゼ活性の高進、卵成熟の刺激作用をもつ。したがって、FSHと協調的に働き、卵胞発育を促進している。アクチビン、GDF、BMPを含めたTGF β スーパーファミリーは、原始卵胞から卵胞形成を制御する [14]。そこで、FSHとアクチビンの併用処置を行い、そのステロイド分泌に対するIGFBP-rP1の作用をみた。培養メディウム中のエストラジオール濃度はFSH単独処置と比べてアクチビン存在下では顕著に増加し、アロマターゼ遺伝子 (CYP19) mRNA発現も上昇したが、これらの上昇はIGFBP-rP1処置で阻害された (図3)。図には示していないが、培養メディウム中のプロゲステロン濃度はFSH単独とアクチビンとの併用処置群で差がみられなかった。IGFBP-rP1処置は、増加したプロゲステロン分泌およびコレステロールからステロイド前駆体であるプレグネノロンを生成するコレステロール側

ン、アロマターゼ活性の高進、卵成熟の刺激作用をもつ。したがって、FSHと協調的に働き、卵胞発育を促進している。アクチビン、GDF、BMPを含めたTGF β スーパーファミリーは、原始卵胞から卵胞形成を制御する [14]。そこで、FSHとアクチビンの併用処置を行い、そのステロイド分泌に対するIGFBP-rP1の作用をみた。培養メディウム中のエストラジオール濃度はFSH単独処置と比べてアクチビン存在下では顕著に増加し、アロマターゼ遺伝子 (CYP19) mRNA発現も上昇したが、これらの上昇はIGFBP-rP1処置で阻害された (図3)。図には示していないが、培養メディウム中のプロゲステロン濃度はFSH単独とアクチビンとの併用処置群で差がみられなかった。IGFBP-rP1処置は、増加したプロゲステロン分泌およびコレステロールからステロイド前駆体であるプレグネノロンを生成するコレステロール側

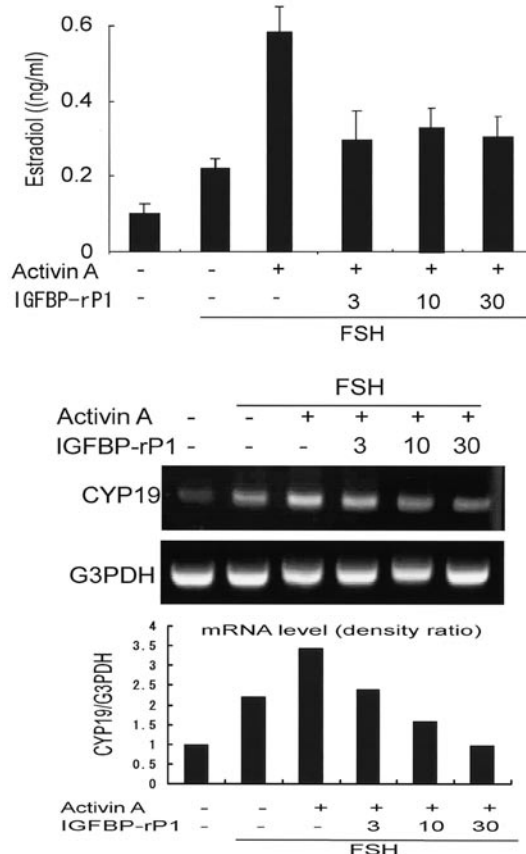


図3 FSHとアクチビン刺激下でのエストロゲン産生とアロマターゼ (CYP19) 発現に対するIGFBP-rP1の影響
FSH (25ng/mL) とアクチビン (Activin A: 25ng/mL) 存在下で各濃度のIGFBP-rP1 (ng/mL) を処置し、24時間インキュベートした。培養顆粒膜細胞の培養上清中17 β -エストラジオールを測定し (上段)、細胞はpoly (A)⁺RNAを抽出し、CYP19のRT-PCR解析を行った (中段: 代表的な1例。下段: デンシトメトリー解析結果をG3PDHに対する割合として無処置群を1として算出)。

鎖切断酵素 (p450_{sc} : CYP11A1) 発現を抑制したが、その影響はエストラジオールレベルとCYP19発現の変化と比べると少なかった。このように、IGFBP-rP1は、FSH刺激下の性ステロイド産生、とくにエストラジオール産生に対して抑制作用を有することが確認された。

興味深いことに、IGFBP-rP1は、アクチビンに結合するフォリスタチンと類似の構造を有しており、アクチビンと結合することが示唆されている[15]。したがって、もしこの作用が発揮され、アクチビン受容体との結合が阻害されるのであれば、図4に示すようにFSHとアクチビンの共存下でのエストラジオール抑制作用は、アクチビンとIGFBP-rP1の結合によるアクチビン作用の減弱効果によるものと考えられる。また、顆粒膜細胞は、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) を高度に産生していることが知られているが、IGFBP-rP1はHSPGと結合することも報告されているので [16]、産生・分泌されたIGFBP-rP1のほとんどはHSPGと結合して貯蔵された状態と考えられる。

次に、顆粒膜細胞での内因性IGFBP-rP1発現の役割を検討する目的で、siRNA処置により抑制した際のステロイド産生とステロイド代謝酵素のmRNA発現を解析した。なお、siRNA実験では約50%の単層培養顆粒膜細胞の培養系で、無血清D-MEMでIGFBP-rP1 siRNAを24時間処置し、その後、FSHを処置して24時間後にメディアムと細胞を回収した。その結果、IGFBP-rP1の発現抑制は、FSH誘導性CYP19発現レベルを上昇させることが分かった (投稿中)。以上の結果とIGFBP-rP1がブタ卵巣の排卵前成熟卵胞の顆粒膜細胞に高発現していることを合わせて考えると、IGFBP-rP1は卵胞のステロイド産生を抑制的に調節することにより排卵前の卵

胞ステロイド産生を調節しているものと推察できる。IGFBP-rP1はウシの黄体組織に高度に発現している遺伝子の1つであり、かつ退行期に増加することも発表されており [17]、黄体細胞の直接的な増殖抑制とIGF-I作用に対する抑制効果が推察されている。よって、IGFBP-rP1は顆粒膜細胞の増殖、分化にも直接影響しているかもしれない。

ヒトの生殖機能とIGFBP-rP1、他のIGFBP-rP1の生理活性

IGFBP-rP1は、ヒトでも黄体化した顆粒膜細胞で発現している [18]。子宮では、腺上皮細胞に発現が高い。免疫組織化学的な検討においては、生殖器以外では、とくに、癌組織の血管内皮細胞に強い染色がみられ、正常な血管内皮細胞でも染色される [19]。正常な肺小葉の上皮細胞、乳腺、神経支持細胞や多くの間質組織にも局在が観察されている。よって、IGFBP-rP1が腫瘍形成時の血管新生に何らかの関与があることが疑われている。侵襲性の高い乳癌において、IGFBP-rP1の発現が低いことを示した報告では、乳癌での腫瘍抑制活性を支持するデータを与えている [5]。IGFBP-rP1は多くの腫瘍で増殖抑制作用を示すが、細胞老化の誘導と関連したメカニズムで作用が発揮されているように思われる。

さらに、IGFBP-rP1は、リンパ組織の血管にも存在していて、なかでも絶えずリンパ球の血管外遊出が起きている高内皮静脈 (HEV) に発現していること、さらにSLC、IP-10、RANTESのような特異的ケモカインと結合することが示され、リンパ球のトラッキングの調節に関与している証拠が得られている [20]。HEVの基底膜に結合しているIGFBP-rP1は、これらケモカインの足場蛋白質として機能すると考えられる。

おわりに

上述したように、IGFBP-rP1は生殖臓器のみならず、多くの生理機能の調節分子として機能している。ごく最近、IGFBP-rP1欠損マウスが作成され、その動物では、卵巣 (とくに黄体)、筋肉組織、肝臓に異常を来たすことが、発表された[21]。これらの結果は、IGFBP-rP1が、顆粒膜細胞の分化、成熟、そして黄体機能に深く関係していることを示唆している。今後、このマウスの解析により、これらの臓器における生理的役割が明らかにされていくであろう。

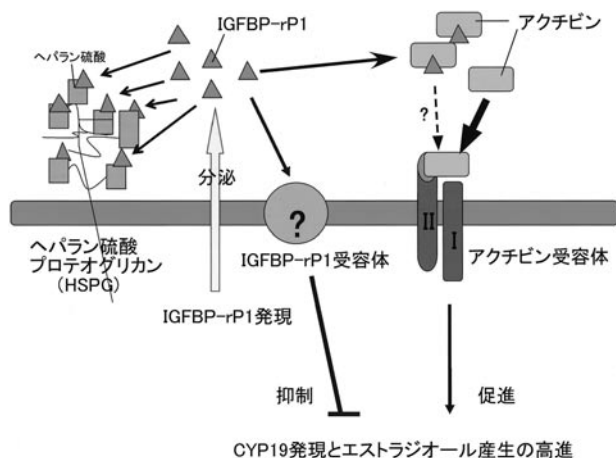


図4 顆粒膜細胞におけるIGFBP-rP1発現と他分子との相互作用

文 献

1. Nayak NR, Giudice LC (2003) Comparative biology of the IGF system in endometrium, decidua, and placenta, and clinical implications for foetal growth and implantation disorders. *Placenta* 24, 281-296.
2. Wang H-S, Chard T (1999) IGFs and IGF-binding proteins in the regulation of human ovarian and endometrial function. *J Endocrinol* 161, 1-13.
3. Fortune JE, Rivera GM, Yang MY (2004) Follicular development : the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci* 82-83, 109-126.
4. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG (1999) The insulin-like growth factor ?binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocrine Rev* 20, 761-787.
5. Burger AM, Leyland-Jones B, Banerjee K, Spyropoulos DD, Seth AK (2005) Essential roles of IGFBP-3 and IGFBP-rP1 in breast cancer. *Eur J Cancer* 41, 1515-1527.
6. Swisshelm K, Ryan K, Tsuchiya K, Sager R (1995) Enhanced expression of an insulin growth factor-like binding protein (mac25) in senescent human mammary epithelial cells and induced expression with retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 4472-4476.
7. Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK (2002) Deciphering the cross-talk of implantation : advances and challenges. *Science* 296, 2185-2188.
8. Tamura K, Hara T, Yoshie M, Irie S, Sobel A, Kogo H (2003) Enhanced expression of uterine stathmin during the process of implantation and decidualization in rats. *Endocrinology* 144, 1464-1473.
9. Tamura K, Hara T, Kutsukake M, Iwatsuki K, Yoshie M, Kogo H (2004) Expression and the biological activities of insulin-like growth factor-binding protein related protein 1 in rat uterus during the periimplantation period. *Endocrinology* 145, 5243-5251.
10. Kim JG, Kim MH, Kim IS, Moon SY, Kang SB, Lee HP, Lee JY (2000) Decreased expression of mac25 mRNA in uterine leiomyomata compared with adjacent myometrium. *Am J Reprod Immunol* 43, 53 - 57.
11. Dominguez F, Avila S, Cervero A, Martin J, Pellicer A, Castriello JL, Simon C (2003) A combined approach for gene discovery identifies insulin-like growth factor-binding protein-related protein 1 as a new gene implicated in human endometrial receptivity. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 1849-1857.
12. Tamura K, Kutsukake M, Yoshie M, Hara T, Nishi H, Isaka K, Kogo H (2006) Expression of human uterus and endometrial stromal cell. 39th Annual Meeting Society of the Study of Reproduction [Abstract # 414]
13. Wandji S-A, Gadsby JE, Barber JA, Hammond JM (2000) Messenger ribonucleic acids for MAC25 and connective tissue growth factor (CTGF) are inversely regulated during folliculogenesis and early luteogenesis. *Endocrinology* 141, 2648-2657.
14. Pangas SA, Matzuk MM (2004) Genetic models for transforming growth factor beta superfamily signaling in ovarian follicle development. *Mol Cell Endocrinol* 225, 83 - 91.
15. Kato MV (2000) A secreted tumor-suppressor, mac25, with activin-binding activity. *Mol Med* 6, 126 -135.
16. Sato J, Hasegawa S, Akaogi K, Yasumitsu H, Yamada S, Sugahara K, Miyazaki K (1999) Identification of cell-binding site of angiomodulin (AGM/TAF/Mac25) that interacts with heparan sulfates on cell surface. *J Cell Biochem* 75, 187-195.
17. Casey OM, Fitzpatrick R, McInerney JO, Morris DG, Powell R, Sreenan JM (2004) Analysis of gene expression in the bovine corpus luteum through generation and characterisation of 960 ESTs. *Biochim Biophys Acta* 1679, 10-17.
18. Phan B, Rakenius A, Pietrowski D, Bettendorf H, Keck C, Herr D (2006) hCG-dependent regulation of angiogenic factors in human granulosa lutein cells. *Mol Reprod Dev* 73, 878-884.
19. Lopez-Bermejo A, Khosravi J, Corless CL, Krishna RG, Diamandi A, Bodani U, Kofoed EM, Graham DL, Hwa V, Rosenfeld RG (2003) Generation of anti-insulin-like growth factor-binding protein-related protein 1 (IGFBP-rP1/MAC25) monoclonal antibodies and immunoassay : quantification of IGFBP-rP1 in human serum and distribution in human fluids and tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 3401-3408.
20. Nagakubo D, Murai T, Tanaka T, Usui T, Matsumoto M, Sekiguchi K, Miyasaka M (2003) A high endothelial venule secretory protein, mac25/angiomodulin, interacts with multiple high endothelial venule-associated molecules including chemokines. *J Immunol* 171, 553-561.
21. Burger AM, Spyropoulos DD, Kahn HJ et al. (2005) Development of an insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 knockout mouse. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 46, 1080.