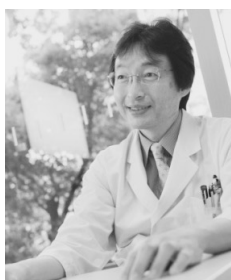


研究室紹介

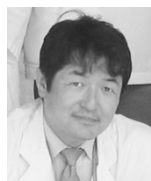
大阪医科大学産婦人科学教室

生殖内分泌研究チーム

主任教授 大道 正英



講師 奥田喜代司



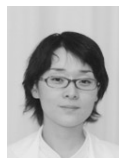
講師 山下能毅



講師 田辺晃子



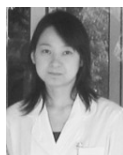
助教 佐々木 浩



院 生 刘田 正子



助教 林 篤史



助教 井川佳世恵



院 生 林 美佳



レジデント 吉田 陽子



レジデント 山本 輝

はじめに

大阪医科大学産婦人科学教室は、本学の前身である大阪高等医学専門学校に、1929年6月15日、初代教授 柚木祥三郎が着任したことより始まります。その後、小島秋教授、杉本 修教授、植木 實教授によって発展がなされ、2006年4月16日より大道正英が第5代の教授として教室を主宰しています。臨床・研究面においては、周産期、腫瘍、不妊、内視鏡および更年期女性内科学・排尿・骨盤再建を5本の柱と位置づけ、それぞれの研究を臨床に還元するトランスレーショナルリサーチをテーマに各種プロジェクトに着手しています。各分野の臨床・研究内容の詳細は当教室のホームページ (<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/gyn/index.htm>) でご覧になっていただければ幸いです。

本稿では、現在われわれの教室で行っている、生殖および内分泌関係の臨床および基礎研究を紹介いたします。

臨床研究

① 体外受精治療における GnRH アンタゴニスト投与下の recombinant FSH の有用性の検討

遺伝子組み換えヒト卵胞刺激ホルモン recombinant FSH (recFSH) は、原材料を尿に依存しないため、ヒト生体成分に由来する感染因子を回避できることと、均質で高純度な FSH 製剤であることから hMG 製剤に比較し卵胞発育に有用であるとされています。

私たちは、recFSH の効果を検討する目的で、子宮内膜症性不妊症の体外受精治療症例において、GnRH アンタゴニスト周期で recFSH の投与を行い、hMG 投与群との臨床成績の比較検討を行っています。また、recFSH 投与下の採卵時に得られた顆粒膜細胞におけるエストロゲンレセプター (ER)、FSH レセプターの遺伝子発現を、hMG 投与群と比較検討し、受精率や良好胚率に及ぼす影響について検討しています。

② 早産における Progesterone による子宮筋収縮抑制メカニズム

わが国の新生児救命率は世界最高水準にあり、周産期医療レベルは海外から高い評価を受けておりますが、早産児の予後改善には限界があり、早産をいかに予防するかはいまだに周産期医療上の大きな課題です。現在日本で認められている早産予防治療である子宮収縮抑制剤 (β刺激薬、硫酸マグネシウム) は妊娠を延長させる効果としては限定的であり、新生児の予後を改善しないことがわかってきました。つまりエビデンスレベルの高い治療法は存在せず、新たな治療法の確立が急務とされています。そのためには妊娠維持・陣痛のメカニズムを解明

することが重要ですが、動物種によりそのメカニズムが大きく異なるため、モデル動物での機序がヒトに応用できないのが解明を遅らせている原因と考えられています。

ラット、ウサギ、ヒツジなどにおいては、陣痛発来直前に母体血中のプロゲステロン濃度が急速に低下することにより陣痛の引き金になることがわかっています。また、プロゲステロン阻害薬の投与で人工流産・早産が発生することや、プロゲステロンは卵膜におけるPGF2 α 、PGE2の産生や子宮頸管の熟化を抑制することより、妊娠継続には必要なホルモンという認識が一般的です。しかしながらヒトにおいては、陣痛発来時の母体血中のプロゲステロン濃度は不変であるため、濃度自体に減少がみられなくても受容体の反応性の低下といったプロゲステロンの作用を抑制する機構（functional progesterone withdrawal）の存在が予測されています。

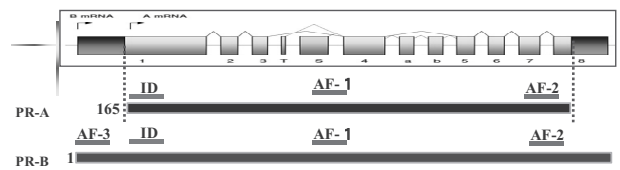
プロゲステロン受容体（PR）は核内受容体で、主にPR-AとPR-Bの2つのisoformが存在します。PR-AはPR-Bに存在する転写活性ドメインを欠如しているため、PR-Bの抑制受容体として考えられています（図1）。つまり妊娠中はPR-Bにより子宮収縮が抑制されますが、陣痛発来とともにPR-Aの発現が上昇し、PR-Bの抑制力が相対的に減弱することで子宮収縮が引き起こされることが予想されています。しかしながらPR-A上昇のメカニズムや、ましてやPRによるオキシトシン反応性、プロスタグランジン反応性に対する制御機構はいまだ明らかにされていません。そこでわれわれは、「早産におけるProgesteroneによる子宮平滑筋収縮抑制メカニズム」を研究対象にし、PR-A、PR-Bの発現の変化と、プロゲステロンによるオキシトシン感受性、プロスタグランジン感受性の変化に対する影響を分子生物学的に検討し、早産予防の新たな治療法としての可能性を探っております。

③ 子宮内膜症性嚢胞に対する嚢胞焼灼術と摘出術の臨床的予後の比較検討

臨床的には術後の月経痛などの疼痛を3年間追跡調査し、子宮内膜症に対する腹腔鏡下手術の評価も行っています。また、腹腔鏡下嚢胞内壁焼灼術は嚢胞摘出術に比べて卵巣機能への影響が少ないと考えられていますが、その有用性はまだまだ議論のあるところです。そこで、ランダム化比較試験によりこれらの手技の手術時間、原始卵胞の有無や血中FSH値等の形態学的・内分泌学的検討、さらには術後妊娠率の比較検討を行っています。

④ 婦人科悪性腫瘍の治療が動脈硬化と骨密度に与える影響

婦人科悪性腫瘍治療においてはとかく悪性腫瘍の予後



PR-Aは、inhibitory domain (ID)を有しており、ERやPR-Bの転写活性を抑制している。

PR-Bは、activating factor-3 (AF-3)によって、IDの機能を抑制することにより、プロゲステロン応答配列 (PRE)を有するプロモーターに対して、PR-Aより強い転写活性を示す。

Leonhardt et al. Steroid 68 2003 761-770.

図1 Progesterone receptor (PR) 11q22-23

ばかりが目され、手術・抗癌剤治療・放射線治療が健康障害に及ぼすスクリーニングや治療は、一般的には考慮されておられません。長期臥床、抗癌剤および併用されるステロイド、放射線治療、卵巣摘出による人工閉経は、動脈硬化や骨粗鬆症のハイリスクであり、われわれは各種婦人科悪性腫瘍の治療後女性に対し、術前と術後、抗癌剤治療前後、放射線治療前後に骨密度定量と、動脈硬化の指標としてPWV計測を行い、異常があれば治療を開始することで、癌克服後のヘルスケアを行っております。

基礎研究

① 黄体化顆粒膜細胞におけるプロゲステロンレセプターの発現

プロゲステロンは増殖した子宮内膜を分泌期化するが、中枢に作用してゴナドトロピン分泌を調節し、これ以外に子宮筋などの平滑筋のトーンスの低下などの作用を有しますが、卵巣内での役割はまだ不明な点が多く存在します。核内レセプターであるプロゲステロンレセプター (PR) は、染色体1q22-23に存在し、翻訳領域にはエクソン1から8があり、2種類の異なった転写開始点を有しています (PR-A, PR-B) (図1)。PR-Aは、inhibitory domain (ID)を有しており、ERやPR-Bの転写活性を抑制しており、一方、PR-Bは、activating factor-3 (AF-3)によって、IDの機能を抑制することにより、プロゲステロン応答配列 (PRE)を有するプロモーターに対して、PR-Aより強い転写活性を示すとされています。また、プロゲステロンは卵のpremature degenerationの防止に重要との指摘や、排卵早期のプロゲステロンの上昇は体外受精-胚移植における胚の質の低下を起こすことが報告されており、プロゲステロンと生殖生理との関係は今後さらに検討が必要であると考えられます。そこで、われわれは、体外受精治療において得られた顆粒膜細胞を用いて黄体化顆粒膜細胞におけるPR-A/B

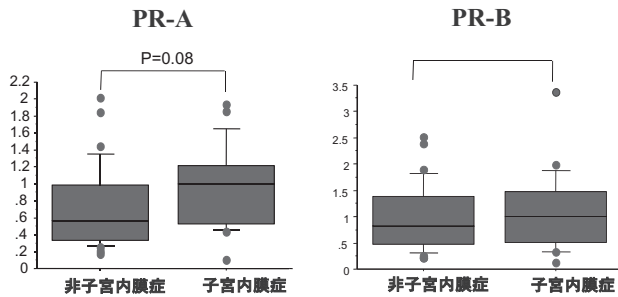


図2 PR-A, PR-B mRNA expression ratio の比較

mRNA expression ratio を real time PCR で測定し、卵胞内のプロゲステロン濃度および胚のグレードなどの臨床データとの相関の検討を行い、顆粒膜細胞における PR-A, PR-B の発現が卵および胚の発育への関与について研究しています。最近、子宮内膜症では、PR-A の高い発現が卵成熟および胚発育を阻害している可能性を報告しています (図2)。

② 子宮内膜症病変におけるプロゲステロンレセプターの発現はジェノゲストの治療効果に影響するか？

ジェノゲストはプロゲステロン受容体に対する選択的なアゴニスト作用を示し、卵巣機能抑制および子宮内膜細胞の増殖抑制により子宮内膜症に対する有効性を示す経口治療剤です。チョコレート嚢胞、腹膜病変などの各種子宮内膜症病変別の効果を検討する目的で、ジェノゲスト投与後の腹腔鏡手術で得られた各病変別の PR-A/B mRNA expression ratio を、real time PCR で測定し、PR-A, PR-B の発現量とジェノゲストの治療効果の相関性について検討しています。

③ アンドロゲンレセプター (AR) の CAG リピートが卵胞発育に及ぼす影響

AR は顆粒膜細胞に局在しており、遺伝子は Xq11.2-12 に存在し、8 つのエクソンからなり、N-terminal activation domain は、エクソン 1 のコドン 58 を開始点とする多型性の CAG リピートを有しています。そのリピート数と AR の機能が負の相関を示すことは、男性において数多く報告されています。また、雄性個体において女性ホルモンが生殖機能や脂質代謝などさまざまな生理機能に重要であることが明らかになりつつありますが、雌性における男性ホルモンの重要性に関しては多くの謎が存在します。

現在、われわれは不妊症例の顆粒膜細胞における AR の発現を real time PCR で測定すると同時に、患者リンパ球から得られた DNA に対してダイレクトシーケンシングを行い、CAG リピート数と卵胞発育や受精率などの臨床データとの相関性について検討しています。

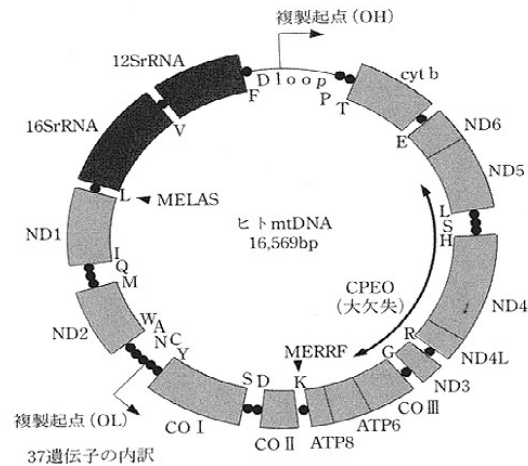


図3

④ 顆粒膜細胞におけるミトコンドリア DNA の発現および欠損が、卵胞発育異常や、卵の受精能低下を引き起こすメカニズムの解明

35 歳以上の高齢不妊患者における顆粒膜細胞の mtDNA の点変異や欠損が報告されており、ミトコンドリア異常と不妊症との関連性が注目されつつあります。mtDNA は、1 細胞あたり、100~2,000 個ぐらい存在し、固有の DNA、リボソーム、tRNA が存在し半独立の増殖系をなしています。16569 塩基対から成り、約 1 kb の非翻訳領域を除くと、その大部分が 13 種類のタンパク質とその翻訳に必要な 2 種類のリボソーム RNA と 22 種類の転移 RNA の遺伝子をコードとする領域となっています (図3)。顆粒膜細胞における mtDNA の発現を検討したところ、子宮内膜症患者において、顆粒膜細胞における mtDNA 発現は、非子宮内膜症患者に比べて高かったが、受精率、良好胚率が低いことから、子宮内膜症下では、代償性に顆粒膜細胞に mtDNA が発現する可能性を報告しました (Fertil Steril 88:1703-1705, 2007)。さらに、顆粒膜細胞における mtDNA 発現が、体外受精治療の臨床成績にどのような影響を及ぼすかを検討したところ、LH を含有する hMG 投与周期において、LH を含有しない recombinant FSH (recFSH) 投与周期に比較し mtDNA 発現が高かったことから、LH が mtDNA の発現を惹起している可能性が示唆されました。加齢による mtDNA の発現低下は明らかではなかったことから、顆粒膜細胞における mtDNA 発現と、卵成熟および胚発育にどのように関与するかはいまだ不明な点が多く存在します。そこで、各年齢層の体外受精治療時に採取した顆粒膜細胞における mtDNA の発現について、Real time PCR 法で定量し、mtDNA の発現が加齢により影響を受けるか、また、卵胞発育および胚発育にどのよう

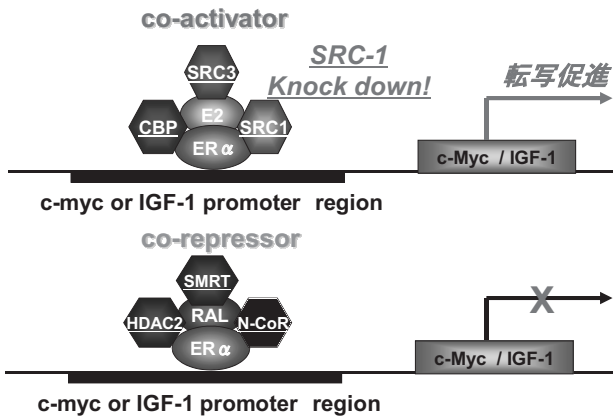


図 4

に参与するかを検討しています。また、ミトコンドリア病の原因として、全長の約3分の1に相当する4,696塩基対の欠失が報告されていますが、この欠失が高齢不妊症において胚の発育を阻害するかについて、ミトコンドリア DNA (mtDNA4677) を導入したミトコンドリア遺伝子疾患モデルマウス (Mito-Mice) を作製することで検討を行う予定です。

⑤ エストロゲンとラロキシフェンの分子制御機構

ラロキシフェンはSERM (選択的エストロゲン受容体モジュレーター) として、エストロゲン受容体を介して組織選択的に作用し、骨や心血管系に対しては促進的に、子宮や乳房に対しては抑制的働きます。ですから骨に対してはエストロゲン様に作用し骨吸収抑制作用をもつ骨粗鬆症治療薬であります。われわれは、ラロキシフェン投与はエストロゲンの様に卵巣癌の発症が助長されない meta analysis の結果に着目し、ラロキシフェンが組織選択的に作用をするメカニズムを研究しています。ヒト卵巣癌細胞株を用い c-Myc および IGF-1 の遺伝子発現の分子機構について検討しました。その結果、卵巣癌細胞にエストロゲンを添加すると c-Myc, IGF-1 の mRNA が増加しますが、その機序はそれぞれのプロモーター領域に ER とともに co-activator である SRC-1 がリクルートされることによるものであり、またラロキシフェンによって標的遺伝子が増加しないのは co-repressor がリクルートされるためであることを報告しました (Oncogene 27 : 2737-2745, 2008) (図 4)。

最近、膜貫通型レセプターである GPR30 (G protein-coupled receptor 30) が発見され、さらにこの GPR30 を介してエストロゲンにより Akt がリン酸化するといった報告があります。私たちは、この GPR30 が卵巣癌細胞株に発現していることを確認しており、今後の研究においても標的遺伝子の発現調節に関しても関与している

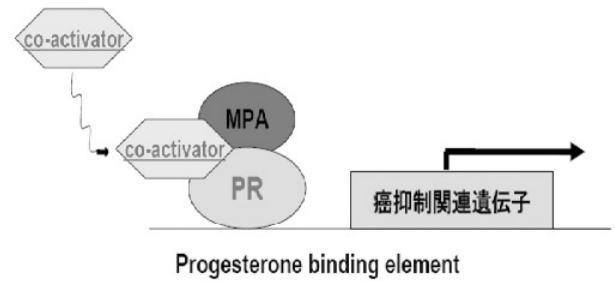


図 5

可能性があり現在研究を行っています。

⑥ ホルモン治療薬 medroxyprogesterone acetate (MPA) の古典的作用から受容体を介した組織特異的な転写調節機構の解明

私たちは、以前、乳癌細胞に MPA を添加すると PI3K/Akt/NFκB を介して cyclinD1 の発現が上昇し、細胞増殖作用を示すことを報告し、この作用には、PR-A ではなく、PR-B が関わっていることを解明しましたが、(Saitoh M, Ohmichi M, et al. Endocrinology 146 : 4917, 2005), 子宮内膜癌における MPA の PR を介した抗腫瘍作用メカニズムはわかっていません。MPA に対する標的遺伝子を解明し、それを制御できれば、MPA の効果をより高めることができ、治療抵抗性となった type 1 や難治性である type 2 子宮内膜癌に対する新たな治療戦略につながるものが期待されます (図 5)。そこで私たちは、子宮内膜癌における MPA が結合する progesterone response element (PRE) を含むプロモーターマクロアレイを作成し、MPA により誘導されるアポトーシス関連遺伝子、癌抑制遺伝子を同定し MPA の PR-A または PR-B を介した作用についてその機序の解明に取り組んでいます。

おわりに

以上、当教室で行われている生殖および内分泌に関連した研究について紹介させていただきました。

昨今の大学病院の産婦人科は、そのほとんどのマンパワーを臨床に割かれ、研究面においては厳しい状況ですが、幸いわれわれの教室では新入教室員の増加により、研究もできる体制を取れています。今後も、大学人としての責務・特権は夢のある研究ができることであることを自覚し、魅力ある研究室作りに努力していきたいと考えています。