

子宮内膜症の病態におけるプロゲステロン受容体コシャペロン FKBP52の役割 —「プロゲステロン抵抗性」への関与—

廣田 泰

東京大学医学部産科婦人科

はじめに

子宮内膜症の病因は未解明であり、その病因説のうち最も広く受け入れられているのが逆流月経血中の子宮内膜が腹腔内で着床・増殖するという逆流説である。現在までのさまざまな子宮内膜症の研究により、月経血の逆流がその病態形成にきわめて重要であると考えられている。また、エストロゲンは子宮内膜細胞に対し増殖作用を有することが知られており、子宮内膜症はエストロゲン依存性に増悪する疾患であることが広く認められている。閉経後女性、卵巣切除患者、GnRH アゴニスト治療患者のような低エストロゲン環境が子宮内膜症病変を萎縮させることもその根拠となっている。エストロゲンに対し、もう1つの卵巣ホルモンであるプロゲステロン(P4)はエストロゲンの細胞増殖作用を抑制し子宮内膜細胞の分化(脱落膜化)を誘導する作用をもち、妊娠中の高P4状態や偽妊娠療法と呼ばれるプロゲステン療法が子宮内膜症病変を退縮させることが知られる。プロゲステロン受容体(PR)欠損マウスを用いた子宮内膜症モデルにおいて子宮内膜症様病変が増大すること[1]を合わせて考えると、プロゲステロンは子宮内膜症の進展に抑制的に働いていることが示唆される。その一方で、子宮内膜症に関連する疼痛に対しプロゲステン療法が有効でない一部の患者群が存在することや治療終了後に子宮内膜症の悪化をしばしば認めることなどの臨床的背景に加え、子宮内膜症女性の子宮内膜(正所性子宮内膜)および子宮内膜症病変(異所性子宮内膜)においては非子宮内膜症女性の子宮内膜と比べP4応答性遺伝子発現が低下しているという最近の研究報告[2]から、子宮内膜症における「P4抵抗性」という病態の存在が推測される[3]。この「P4抵抗性」という概念は、細胞、組織あるいは個体のP4に対する応答能の低下と、それ

に伴うエストロゲン活性の増強によって定義される。このように「P4抵抗性」の子宮内膜症の病因・病態への関与が推測されるものの、その関与の程度やそのメカニズムについてはこれまで不明であった。

正常な子宮内膜組織と比べて、子宮内膜症患者の正所性および異所性子宮内膜組織におけるP4投与後のP4応答性遺伝子の変化は乏しいと考えられている[2]。そのメカニズムの1つとして、子宮内膜症病変におけるPRのisoformであるPR-AとPR-Bの発現を検討した文献がある[4]。この検討では正所性の子宮内膜に比べて子宮内膜症病変ではPR-A、PR-Bの発現がともに低下しており、それがP4抵抗性の一因となっているとされている。P4応答能の低下に伴いP4のエストロゲン拮抗作用が低下し、エストロゲン作用の増強による子宮内膜症の誘導や悪化が引き起こされると考えられる。以上のことから、P4抵抗性を有する動物モデルの作成が子宮内膜症の病態の解明に有用であると考えられたため、本研究では子宮がP4抵抗性を示すFKBP52欠損マウスを用いて新しい子宮内膜症モデルを作成し、子宮内膜症の病態におけるP4抵抗性の意義について検討した。さらに、ヒトの臨床検体を用いて、子宮内膜症におけるFKBP52発現を調べ、FKBP52自体が子宮内膜症の病態形成に関わっている可能性を検討した。

PR コシャペロン FKBP52欠損マウスはP4抵抗性を示す

P4はその受容体(PR)を介して遺伝子転写を活性化し、排卵、着床など生殖現象を調節している。イミュノフィリンFKBP52はPRのコシャペロンであり、PR複合体を構成しP4-PR結合を強化している。PR複合体は、受容体単量体、シャペロン蛋白Hsp90二量体、p23およびHsp90との結合に必要なTPR配列を含む4つのコシャペロンのうちの1つで構成される。FKBP52はその4つのコシャペロンの1つであり、Hsp90とPRの両者に結合しPR複合体の構造を安定化させることでP4とPRの結合を強化し、P4-PRシグナルを増強する。一方

連絡先: 廣田 泰, 東京大学医学部産科婦人科
〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1
TEL: 03-3815-5411
FAX: 03-3816-2017
E-mail: yhirota-tky@umin.ac.jp

FKBP52欠損時においてはPRの下流のシグナルは低下するが、両者の結合自体は最低限保たれているので、シグナルは低下するものの最低限保たれている。そのため大量のP4を投与することによってシグナルを強化することができる。これらのことから、FKBP52欠損マウスはP4抵抗性を示すよいモデルと考えられる。FKBP52欠損マウスは子宮内膜のPRの下流のシグナルが減弱しており、着床障害をきたす [5, 6]。しかしながらこの着床障害はP4の補充により救済される。FKBP52欠損マウスに対して少量のP4を投与した際には、着床は救済されるものの、その後の妊娠は継続できず流産してしまう。しかし大量のP4を投与した際には、正常な妊娠・分娩が可能になる [6]。このようにFKBP52欠損マウスは子宮内膜のP4抵抗性を形成するため、P4抵抗性モデルマウスとしてP4シグナルの研究には有用な *in vivo* の系であると考えられる [6]。

FKBP52欠損によって マウス子宮内膜症様病変が増悪する

同種間の子宮内膜移植を行い、子宮内膜症のモデルマウスを作成した。他の文献では子宮内膜症マウスモデルを作成する際にエストラジオール (E2) 投与と卵巣摘出を行うのが一般的であるが、われわれはFKBP52欠損マウスの特徴を生かすためにこれらの処置を行わずに生理的なホルモン濃度を維持したモデルを用いることとした。ドナーマウスとレシピエントマウスのホルモン状態を同調させるために、ドナーおよびレシピエントの *estrus cycle* を *diestrus* に揃え、ドナーから子宮を摘出して細切後にレシピエントの腹腔内に注入し、移植2週間

後にレシピエントの腹腔内病変を観察・評価した。本モデルで形成された病変は、大量のエストロゲン投与を行う従来のモデルで頻繁にみられる嚢胞形成を伴わず、ヒト子宮内膜症の腹膜病変に類似していた。組織学的所見でもヘモジデリンの沈着や出血などが認められ、ヒト子宮内膜症病変に類似した病変が確認された。

そこで、野生型およびFKBP52欠損マウスで子宮内膜症モデルを作成し、子宮内膜症様病変の数と重量を評価したところ、病変の数と重量は野生型の群と比較しFKBP52欠損群で有意に増加した (図1)。このことからFKBP52の欠損により、子宮内膜症病変が増悪することが分かった。次に病変部の細胞増殖能の変化をKi67染色によって検討したところ、FKBP52欠損マウスで作成した子宮内膜症様病変のKi67陽性間質細胞の増加が認められた。このことよりFKBP52欠損によって子宮内膜症様病変において細胞増殖が促進されていることが分かった。また、Flk1発現細胞 (血管内皮細胞) を β -galactosidase 染色で検出できるFlk1^{lacZ/+}マウスをドナーあるいはレシピエントマウスのバックグラウンドに導入し、子宮内膜症様病変部での血管新生を評価した。この遺伝子をレシピエント側に導入したものでは血管新生が認められたが、ドナー側に導入したものでは新生血管の形成は認められなかった。この結果から病変部に出現する新生血管はレシピエント由来のものであることが分かった。また、レシピエント側から来る新生血管の数を、FKBP52欠損とコントロールの病変で比較検討したところ、FKBP52欠損病変の血管新生が有意に増加していた。このことからFKBP52欠損によって子宮内膜症様病変で血管新生が促進されることが分かった。

次に、エストロゲンによって誘導される、炎症性ケ

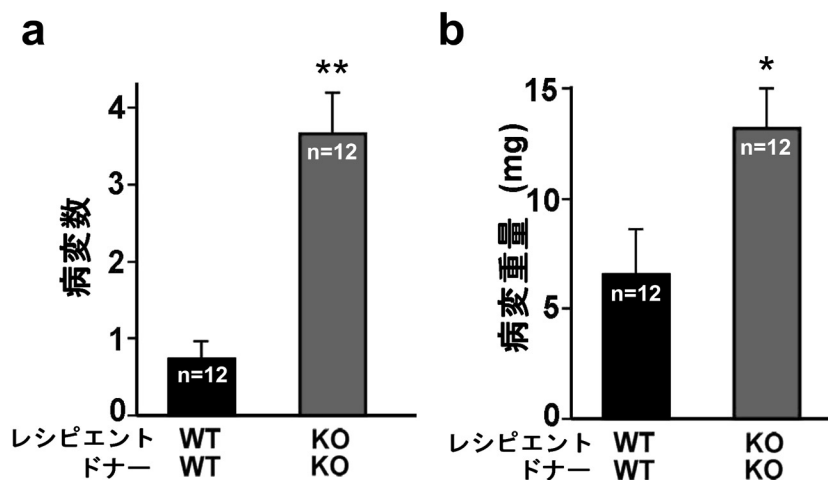


図1 マウス子宮内膜症様病変の数 (a) と重量 (b) がFKBP52欠損によって増加する
WT: 野生型マウス, KO: FKBP52欠損マウス。*, p<0.05.

モカイン MCP-1と RANTES, 血管新生因子 VEGF を ELISA 法で測定した。これらのケモカインおよび VEGF は子宮内膜症病変や腹腔内貯留液で高濃度を示すという報告されている。子宮内膜症マウスの腹腔内の MCP-1, RANTES および VEGF 濃度を野生型マウスと FKBP52 欠損マウスで比較すると, FKBP52 欠損マウスで高濃度であった。このことから FKBP52 欠損マウスで作成した子宮内膜症モデルマウスの腹腔内では炎症が増強していることが分かった。また, これらのケモカインはエストロゲンによって誘導されることから, FKBP52 欠損マウスでエストロゲンの応答能が高まっていることが推測され, その一因として P4 抵抗性の関与が考えられた。

ヒト子宮内膜症でも FKBP52 発現が低下する

上記の FKBP52 欠損マウスを用いた検討から, 子宮内膜症の病態における P4 抵抗性の関与の可能性が示されたが, さらに FKBP52 それ自体がその病態形成に関わっている可能性を考慮し, ヒト子宮内膜症での FKBP52 発現を検討した。FKBP52 の免疫染色では, 非子宮内膜症女性の子宮内膜の上皮および間質細胞では, 分泌期および増殖期ともに FKBP52 の発現が認められたが, 子宮内膜症患者の正所性子宮内膜では FKBP52 発現がやや低下しており, 子宮内膜症病変については卵巣嚢胞, 腹膜病変および深部病変いずれも FKBP52 発現が顕著に減弱していた。

次に発現検討に定量性をもたせるために, 定量的 PCR を用いて FKBP52 mRNA 発現を検討したところ, 免疫染色の結果と同様に, 非子宮内膜症女性の子宮内膜に比べ, 子宮内膜症患者の正所性子宮内膜および異所性子宮内膜(卵巣嚢胞由来)で FKBP52 の発現が有意に低下していた(図 2)。さらに増殖期・分泌期で分けて検討すると, 増殖期で特に発現が低下していた。以上の検討から FKBP52 自体が子宮内膜症の病態に関与している可能性が示された。

考 察

PR-A 欠損マウスと PR-B 欠損マウスを用いた報告から, PR の 2 つの isoform は細胞特異的に発現し, 機能も異なっていることが分かってきている [7]。PR-A は排卵, 着床, 脱落膜化など, 卵巣および子宮の機能制御に必要であり, PR-B は乳腺の発達に必要である [8]。ヒト子宮内膜間質細胞は PR-A の発現が優位であることが報告されていることから [9], FKBP52 は PR-A の機

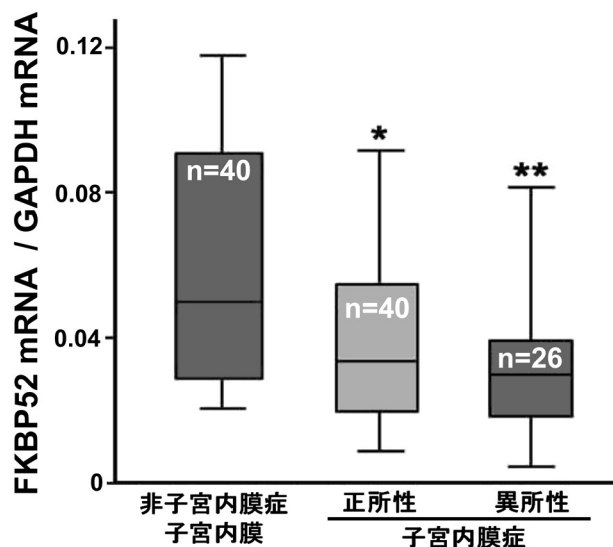


図 2 ヒト子宮内膜症において FKBP52 mRNA 発現が低下している
*, p<0.05 (vs 非子宮内膜症群の子宮内膜), **, p<0.01 (vs 非子宮内膜症群の子宮内膜)。

能を強化していると推測される。一方, PR-A 発現は正所性に比べ異所性子宮内膜で低下しており, PR-B に至っては異所性子宮内膜ではほとんど検出されなかったという報告がある [4]。子宮内膜症における PR 発現低下は確かに P4 抵抗性の 1 つの成因に成り得るが, 異所性子宮内膜での FKBP52 発現低下という本研究での結果も, FKBP52 低下が子宮内膜症における PR シグナル減弱に寄与している可能性を示唆している。

FKBP52 は免疫制御や蛋白安定化・折りたたみ・輸送などに関わることが知られているため, 子宮内膜において PR 活性増強以外の機能をもつ可能性が考えられる。最近われわれは, 野生型マウス, FKBP52 欠損マウスおよび PR 欠損マウスの子宮を用いたプロテオミクス解析により, FKBP52 欠損子宮で特異的に低下する抗酸化物質 Prdx6 を同定し, マウス着床期子宮の酸化ストレス防御および着床成立に FKBP52-Prdx6 経路が関与していることを示した [10]。子宮内膜症の病態形成に酸化ストレスが関与していることが知られており, 子宮内膜症での FKBP52 低下によって酸化ストレスの影響が高まっている可能性も示唆される。また, 上記のプロテオミクス解析から, PR 欠損子宮および FKBP52 欠損子宮で低下する Galectin-1 というガラクトース結合レクチンを同定した [11]。Galectin-1 は PR シグナルを担う因子と考えられるが, これまでの報告では制御性 T 細胞の活性化など免疫寛容を誘導することや胎盤形成や流産との関連が知られている。Prdx6 および Galectin-1 のいずれについても, FKBP52 の低下した子宮内膜症の病態形成にどのような役割を果たしているかを考えると興味深く,

今後の検討が待たれる。

おわりに

今回、P4抵抗性マウスである FKBP52欠損マウスを用いた子宮内膜症モデルの検討で、FKBP52欠損により病変部の炎症・細胞増殖・血管新生が活性化し、子宮内膜症様病変の発育が促進されることが分かった [12]。またヒト子宮内膜症では、FKBP52発現低下が認められた [12]。本研究で得られた知見から、FKBP52発現低下が子宮内膜のP4応答能を減弱させ、子宮内膜症の発症・進展に寄与している可能性が示唆された。

引用文献

1. Fang Z, Yang S, Lydon JP, DeMayo F, Tamura M, Gurses B, Bulun SE (2004) Intact progesterone receptors are essential to counteract the proliferative effect of estradiol in a genetically engineered mouse model of endometriosis. *Fertil Steril* 82, 673-678.
2. Bulun SE, Cheng YH, Yin P, Imir G, Utsunomiya H, Attar E, Innes J, Julie Kim J (2006) Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 248, 94-103.
3. Giudice LC, Kao LC (2004) Endometriosis. *Lancet* 364, 1789-1799.
4. Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE (2000) Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2897-2902.
5. Tranguch S, Cheung-Flynn J, Daikoku T, Prapapanich V, Cox MB, Xie H, Wang H, Das SK, Smith DF, Dey SK (2005) Cochaperone immunophilin FKBP52 is critical to uterine receptivity for embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 14326-14331.
6. Tranguch S, Wang H, Daikoku T, Xie H, Smith DF, Dey SK (2007) FKBP52 deficiency-conferred uterine progesterone resistance is genetic background and pregnancy stage specific. *J Clin Invest* 117, 1824-1834.
7. Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ, Conneely OM (2003) Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 9744-9749.
8. Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP, Conneely OM (2000) Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 289, 1751-1754.
9. Mote PA, Balleine RL, McGowan EM, Clarke CL (1999) Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 2963-2971.
10. Hirota Y, Acar N, Tranguch S, Burnum KE, Xie H, Kodama A, Osuga Y, Ustunel I, Friedman DB, Caprioli RM, Daikoku T, Dey SK (2010) Uterine FK506-binding protein 52 (FKBP52)-peroxiredoxin-6 (PRDX6) signaling protects pregnancy from overt oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 15577-15582.
11. Hirota Y, Burnum KE, Acar N, Rabinovich GA, Daikoku T, Dey SK (2012) Galectin-1 Markedly Reduces the Incidence of Resorptions in Mice Missing Immunophilin FKBP52. *Endocrinology*, in press.
12. Hirota Y, Tranguch S, Daikoku T, Hasegawa A, Osuga Y, Taketani Y, Dey SK (2008) Deficiency of immunophilin FKBP52 promotes endometriosis. *Am J Pathol* 173, 1747-1757.