

子宮内膜間質細胞の脱落膜化における Epidermal Growth Factor Receptor を介した細胞機能調節

後藤 香里^{1,2)}, 河野 康志¹⁾, 甲斐 由布子²⁾, 宇津宮 隆史²⁾, 橋原 久司¹⁾

大分大学医学部産科婦人科¹⁾, セント・ルカ産婦人科²⁾

はじめに

着床期には、子宮内膜間質細胞はホルモンの影響を受けて脱落膜細胞へと分化する。この子宮内膜の脱落膜化は、胚着床のために必要な分化であり¹⁾、妊娠成立には子宮内膜の受容能に加えて、成熟した胚盤胞の存在²⁾、ホルモンや成長因子などの分泌³⁾、母体免疫寛容⁴⁾などが必須である。脱落膜化の分子機序については、分泌期中期において、子宮内膜間質細胞は卵巣の黄体から産生される黄体ホルモン (progesterone ; P₄) や着床した場合には胚の絨毛から産生されるヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin ; HCG) が細胞内の環状アデノシン一リン酸 (cyclic adenosine monophosphate ; cAMP) 濃度を上昇させ、脱落膜細胞へと分化する。脱落膜へ分化した細胞の機能についてはさまざまな局所因子が関与する。多くの組織で発現が報告されている上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor : EGFR) も子宮内膜での発現が認められており、増殖期で増加し、分泌期で低下がみられるという報告⁵⁾や分泌期に増加するという報告がある⁶⁾。また、黄体ホルモン作用薬 (progestin) により発現が増加するという報告もある⁷⁾。EGF ファミリーの1つであり EGFR のリガンドとなる epiregulin に関しては、分泌期後期に子宮内膜間質細胞での発現を認め⁸⁾、主に末梢血マクロファージや正常胎盤組織にも認められる⁹⁾が EGFR を介し epiregulin がリガンドとして、脱落膜細胞がどのような機能変化をするか、着床や妊娠維持にどのような影響を与えるかについては知られていない。

本研究では、ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化における EGFR の発現変化ならびに EGFR を介した細胞の機能変化について検討した。

脱落膜化に伴う EGFR の mRNA 発現とタンパク発現

子宮筋腫等手術時にインフォームドコンセントを得て採取した子宮内膜は間質細胞を分離し、2回継代した細胞を実験へ用いた¹⁰⁾。子宮内膜間質細胞の脱落膜化における機能を検討するため、分離された子宮内膜間質細胞は0.5 mM の dibutyl (db) -cAMP (cAMP) と100 nM の酢酸メドロキシプロゲステロンアセテート (medroxyprogesterone acetate ; MPA) を用い16日間刺激して脱落膜化を誘導した¹¹⁾。子宮内膜間質細胞の脱落膜化の確認は形態変化、および培養上清中の prolactin の産生を確認した。

ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化に伴う経時的な EGFR の mRNA 発現とタンパク発現について検討した。EGFR mRNA の発現は cAMP と MPA の添加後4日目から増加した (図1A)。一方、非脱落膜化細胞では cAMP と MPA の添加前であるコントロールと比較して増加を認めなかった。タンパクでは刺激8日目で脱落膜化細胞の EGFR 発現が増加し、コントロールでは増加を認めなかった (図1B)。この結果より、脱落膜化に伴い EGFR の発現は増加した。

脱落膜化細胞における EGFR を介した IL-8, MCP-1, MMP-1, VEGF の mRNA 発現

脱落膜化細胞における EGFR を介した interleukin (IL)-8, monocyte chemotactic protein (MCP)-1, matrix metalloproteinase (MMP)-1, vascular endothelial growth factor (VEGF) の mRNA 産生を検討するため、16日間脱落膜化を誘導した細胞に EGFR のリガンドの1つである epiregulin を添加し検討した。1 nM の epiregulin 添加し、8時間後の細胞を実験に用いた。IL-8 および MMP-1 は epiregulin の添加によりコントロールと比較して発現が増加する結果を示した。細胞内伝達経路を検討するため、MEK 阻害剤である U0126 を用い mRNA の産生を検討した。U0126 添加により産生は抑制され、EGFR を介した反応は ERK 1/2 を介することが示唆された (図2)。

連絡先：後藤香里，大分大学医学部産科婦人科
〒879-5593 大分県由布市挾間町医大ヶ丘1丁目1番地
TEL : 097-586-5922
FAX : 097-547-1221
E-mail : k-goto@oita-u.ac.jp

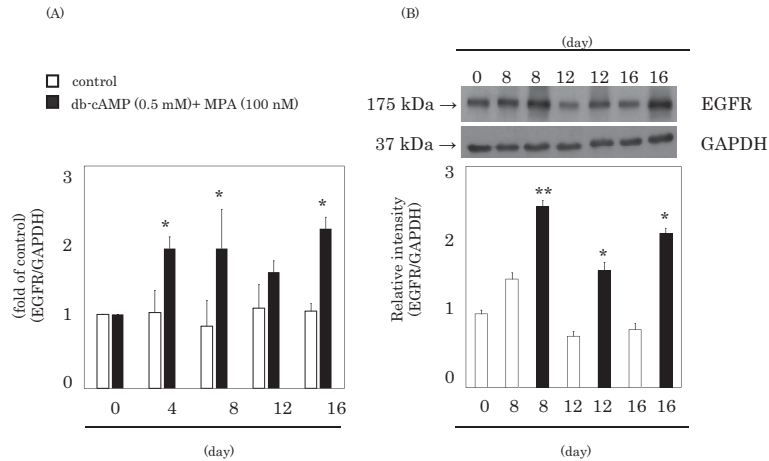


図1 脱落膜化に伴う EGFR の発現
子宮内膜間質細胞は16日間0.5 mM の dibutyryl (db) -cAMP (cAMP) と100 nM の MPA を用い脱落膜化を誘導した。
(A) 子宮内膜間質細胞の脱落膜化に伴う経時的な EGFR の mRNA 発現。
(B) 子宮内膜間質細胞の脱落膜化に伴う経時的な EGFR のタンパク発現。
*: p<0.05, **: p<0.01, vs. day 0

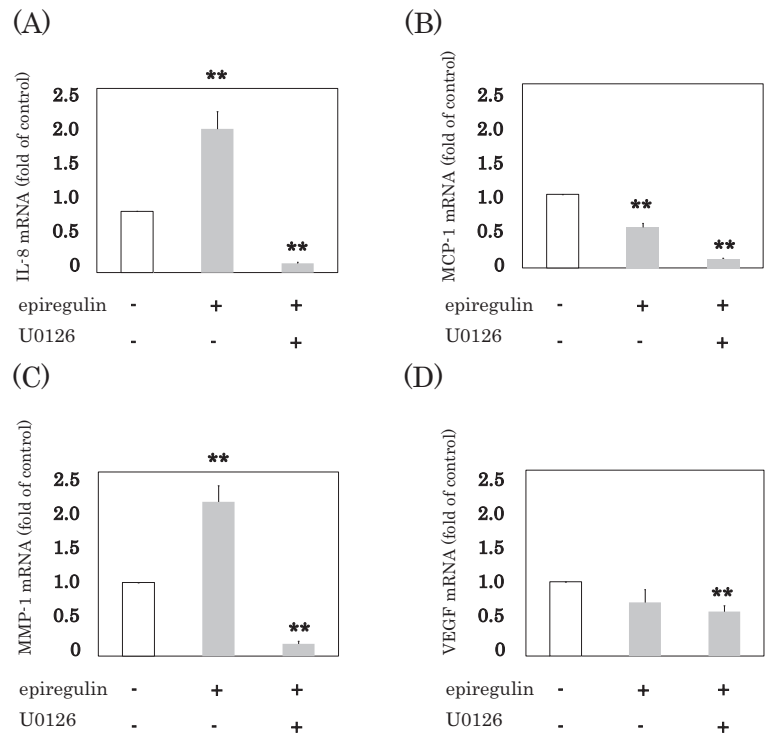


図2 脱落膜化細胞における EGFR を介した IL-8, MCP-1, MMP-1, VEGF の mRNA 発現
16日間脱落膜化を誘導した細胞に1 nM の epiregulin を添加し産生された mRNA を検討した。また MEK 阻害剤である U0126 を添加し情報伝達経路についても検討した。
(A) IL-8, (B) MCP-1, (C) MMP-1, (D) VEGF
**: p<0.01, vs. コントロール

EGFR を介した細胞の走化性

EGFR を介した細胞の走化性を検討するため, *in-vitro*

wound repair assay を行った。方法は以前の検討方法に従った^{12,13)}。serum free DMEM, もしくは serum free DMEM に epiregulin を加え, 2 mm の cell scraper を用い細胞を剥離した。剥離後直ちに観察する箇所を決定し,

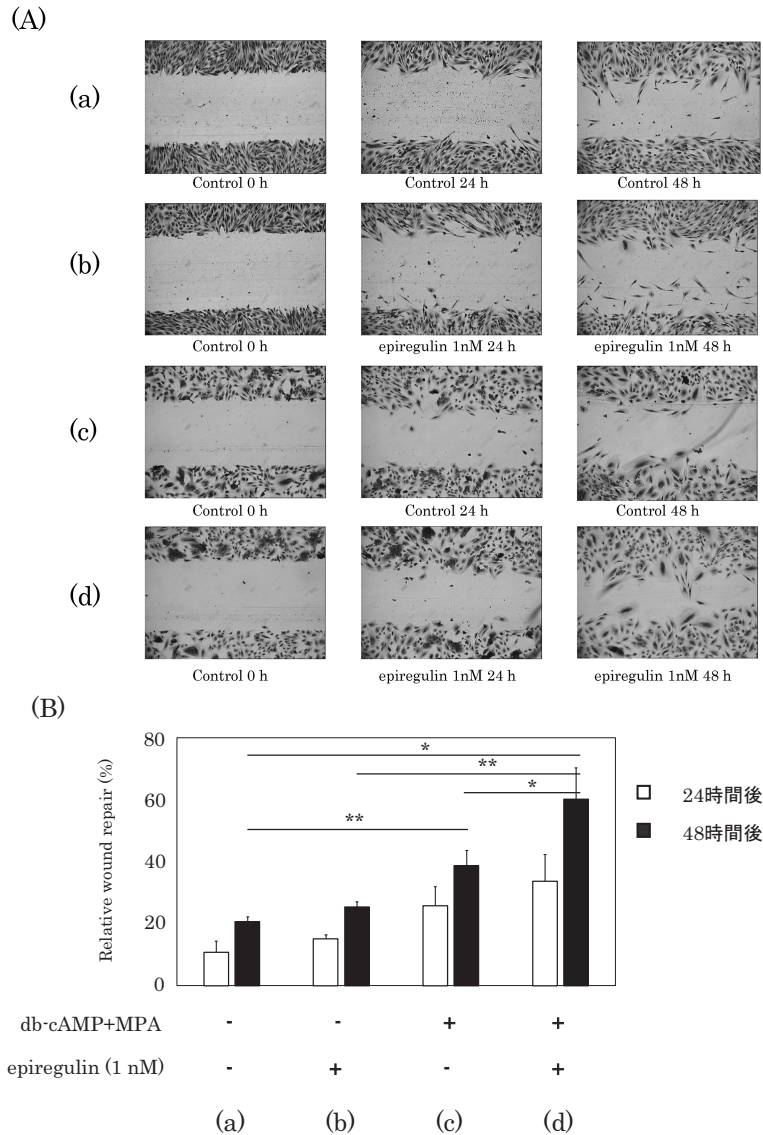


図3 EGFRを介した細胞の走化性を検討するため、*in-vitro* wound repair assayを施行した。

- (A) 培養48時間における非脱落膜化細胞、脱落膜化細胞の走化性。
 (a) 非脱落膜化細胞コントロール、(b) 非脱落膜化細胞 epiregulin 添加、(c) 脱落膜化細胞コントロール、(d) 脱落膜化細胞 epiregulin 添加。
 (B) 培養48時間における非脱落膜化細胞、脱落膜化細胞の細胞修復率。

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

48時間培養を行った。epiregulin 刺激前、刺激後24時間、48時間の細胞は Diff-Quic solution (Sysmex) を用いて染色し、剥離後の細胞修復率は ImageJ, ver. k 1.45 (National Institutes of Health) を用い算出した。スクラッチされた細胞の走化性について示す (図3A)。48時間後の細胞において、脱落膜化細胞の修復率は促進し、epiregulin 添加によりさらに促進する結果を示した (図3B)。

脱落膜化に伴う homeobox A10 mRNA の発現

脱落膜化に伴う homeobox A10 (HOXA10) mRNA 発現について示す。cAMPとMPAの刺激後4日目から非脱落膜化細胞において発現は増加し、16日目で最も増加する結果を示した。一方脱落膜化細胞では12日目で最も発現が増加し、16日目で減少する傾向を示した (図4)。

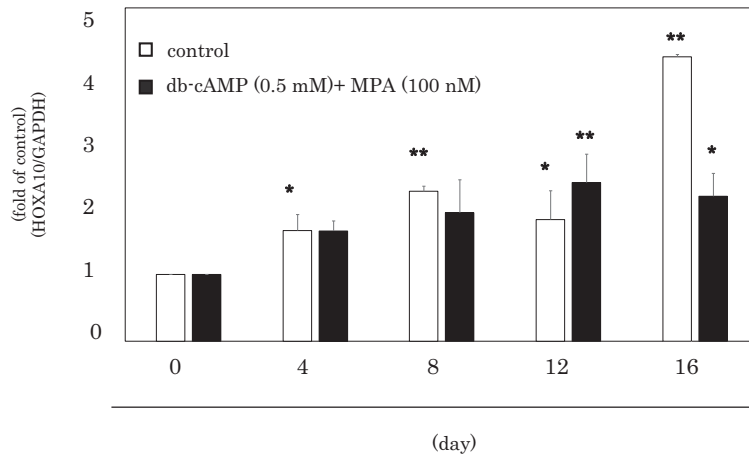


図4 脱落膜化に伴う HOXA10 mRNA の発現
子宮内膜間質細胞は16日間 cAMP と MPA を用い脱落膜化を誘導した，子宮内膜間質細胞の脱落膜化に伴う経時的な HOXA10 の mRNA 発現について検討した。
* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs. day 0

おわりに

今回，子宮内膜間質細胞の脱落膜化における EGFR を介した細胞機能調節について検討し，1) 脱落膜化細胞において，EGFR の mRNA およびタンパク発現は非脱落膜化細胞と比較して増加した。2) 脱落膜化細胞に EGFR のリガンドである epiregulin 1 nM を添加したところ，IL-8 および MMP-1 は発現が増加し，MEK 阻害剤である U0126 を用いた場合，産生は阻害された。3) 細胞走化性は，刺激48時間後の脱落膜化細胞において促進し，epiregulin 添加群でさらに促進した。4) HOXA10 mRNA 発現は，非脱落膜化細胞において増加した一方，脱落膜化細胞は刺激12日目で最も発現が増加したが，16日目で減少する傾向を示した。今回の結果から，分化した脱落膜化細胞では EGFR の発現が増加し，着床期の子宮内膜間質細胞や栄養膜細胞で発現する epiregulin がリガンドとなり，EGFR を活性化し，その下流の ERK 1/2 を活性化した結果，IL-8 や MMP-1 の産生を増加させることが示唆された(図5)。着床部位には IL-8 の増加により白血球が遊走され，免疫細胞の分布の変化がおこり，MMP-1 が増加することで細胞外マトリックスを分解，改変し，栄養膜細胞の浸潤に貢献すると考えられる。また，脱落膜化細胞において epiregulin 添加後に細胞の走化性が促進したことより，栄養膜細胞浸潤による脱落膜組織の再構築や修復に関与することも推測される。HOXA10 は脱落膜化刺激中，一旦は産生が増加するもののその後低下する傾向を示した。HOXA10 に関しては子宮内膜間質細胞において，脱落膜化に伴い発現が増

加するが，脱落膜化後は発現が減少することで LIF や IL-6 を産生し，STAT 3 を活性化させて MMPs を産生し絨毛の浸潤を促す¹⁴⁾ということが報告されている。今回の結果より，HOXA10 も脱落膜化ならびに MMPs 産生に影響を与え，栄養膜細胞の浸潤に関与することが示唆された。VEGF は epiregulin の添加により増加が確認されなかったが，脱落膜化に伴い発現は増加し血管新生に寄与すると考える¹¹⁾。

脱落膜の機能変化に関する以前の検討では，protease activated receptor (PAR) -1 も cAMP と MPA の刺激により発現が増加し，着床や栄養膜細胞浸潤により起こる微量な出血より誘導されると推測される thrombin がリガンドとなり PAR-1 を活性化し，IL-8，MMP-1，MCP-1 を産生すること，細胞走化性が促進されることを報告した¹⁵⁾。EGF ファミリーの1つである heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) は脱落膜細胞において発現し，栄養膜細胞の浸潤に関与することが報告されている¹⁶⁾。着床前の増殖期にも PAR-1 や EGFR の存在は確認されているが^{5,6,17)}，今回の結果より，脱落膜へと分化することで EGFR や PAR-1 などの受容体発現は増加し，その増加した受容体は着床時期に発現が増加するリガンドにより刺激され，妊娠に必要な環境へ推移すると考えられる。

以上のことより，EGFR はその活性化を介して絨毛細胞浸潤の受容や組織修復，免疫細胞分布の変化など，妊娠成立と維持に向けての機能調節の一旦を担っている可能性が示唆された。

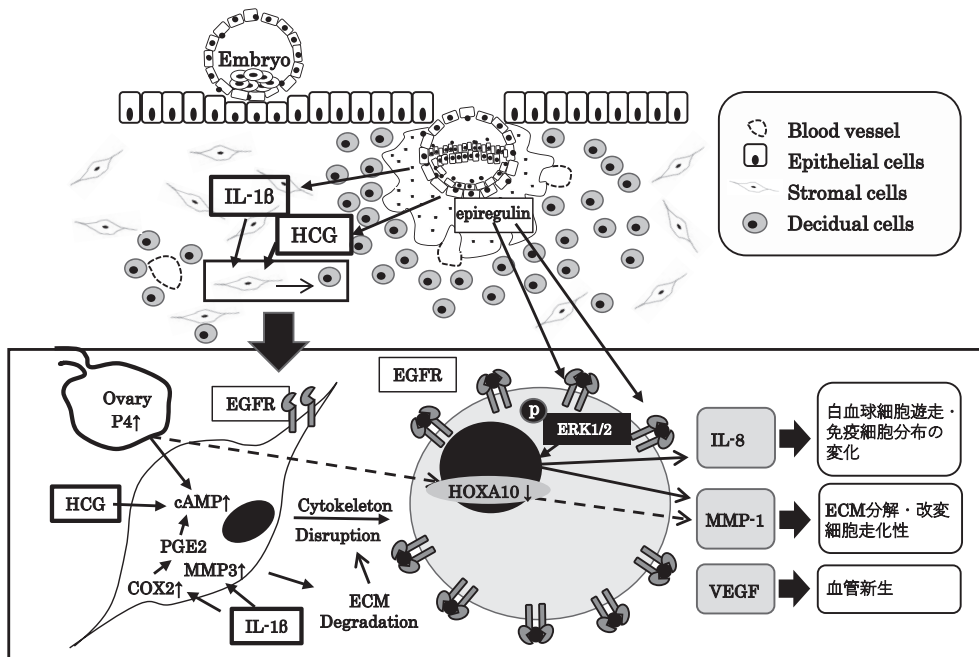


図5 脱落膜化細胞におけるEGFRの役割
 分化した脱落膜化細胞はEGFRの発現が増加し、着床時期に子宮内膜間質細胞に発現する epiregulin や栄養膜細胞からの epiregulin がリガンドとなり、EGFR が活性化される。EGFR が活性化することで ERK 1/2 を活性化し、IL-8やMMP-1が産生される。HOXA10も脱落膜化ならびにMMPs産生に影響を与えられ、VEGFもまた、血管新生に寄与すると考えられる。

謝 辞

本稿は、平成30年度日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞した研究内容をまとめたものである。本稿を執筆する機会を与えてくださいました日本生殖内分泌学会理事長 緒方勤教授、第23回学術集會会長 檜原久司教授、ならびに本誌編集委員の先生方に心から感謝申し上げます。

引用文献

1. Kim JJ, Taylor HS, Lu Z, Ladhani O, Hastings JM, Jackson KS, Wu Y, Guo SW, Fazleabas AT (2007) Altered expression of HOXA10 in endometriosis: Potential role in decidualization. *Mol Hum Reprod* 13, 323-332.
2. Edwards RG (1994) Implantation, interception and contraception. *Hum Reprod* 9, 985-995.
3. Maslar IA, Kaplan BM, Luciano AA, Riddick DH (1980) Prolactin production by the endometrium of early human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 51, 78-83.
4. Golander A, Zakuth V, Shechter Y, Spirer Z (1981) Suppression of lymphocyte reactivity in vitro by a soluble factor secreted by explants of human decidua. *Eur J Immunol* 11, 849-851.
5. Giudice LC (1994) Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance

- to reproductive medicine. *Fertil Steril*, 61, 1-17.
6. Möller B, Rasmussen C, Lindblom B, Olovsson M (2001) Expression of the angiogenic growth factors VEGF, FGF-2, EGF and their receptors in normal human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 7, 65-72.
7. Lockwood CJ, Krikun G, Schatz F (2001) Decidual cell-expressed tissue factor maintains hemostasis in human endometrium. *Ann N Y Acad Sci* 943, 77-88.
8. Ejlskjaer K, Sørensen BS, Poulsen SS, Mogensen O, Forman A, Nexø E (2005) Expression of the epidermal growth factor system in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 11, 543-51.
9. Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D, Morimoto S (1997) Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family. *Biochem J* 15, 69-75.
10. Furukawa Y, Kawano Y, Fukuda J, Matsumoto H, Narahara H (2009) The production of vascular endothelial growth factor and metalloproteinase via protease-activated receptor in human endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 91, 535-541.
11. Matsui N, Kawano Y, Nakamura S, Miyakawa I (2004) Changes in vascular endothelial growth factor production associated with decidualization by human endometrial stromal cells. *Acta Obstet Gynecol Scand* 83, 138-143.
12. Bilic G, Ochsenbein-Kölbl N, Hall H, Huch R, Zimmermann R (2004) In vitro lesion repair by human amnion epithelial and mesenchymal cells. *Am J Obstet Gynecol* 190, 87-92.
13. Matsumoto H, Nasu K, Nishida M, Ito H, Bing S, Miyakawa I (2005) Regulation of proliferation, motility, and con-

- tractility of human endometrial stromal cells by platelet-derived growth factor. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 3560-3567.
14. Godbole G, Suman P, Malik A, Galvankar M, Joshi N, Fazleabas A, Gupta SK, Modi D (2017) Decrease in Expression of HOXA10 in the Decidua After Embryo Implantation Promotes Trophoblast Invasion. *Endocrinology* 158, 2618-2633.
 15. Goto K, Kawano Y, Utsunomiya T, Narahara H (2018) Decidualization modulates a signal transduction system via protease-activated receptor-1 in endometrial stromal cells. *Am J Reprod Immunol* 80, e13036.
 16. Gonzalez M, Neufeld J, Reimann K, Wittmann S, Samalecos A, Wolf A, Bamberger AM, Gellersen B (2011) Expansion of human trophoblastic spheroids is promoted by heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and interleukin-1 β . *Mol Hum Reprod* 7, 421-33.
 17. Kawano Y, Furukawa Y, Kawano Y, Nasu K, Narahara H (2011) Thrombin-induced chemokine production in endometrial stromal cells. *Hum Reprod* 26, 407-413.