

子宮内膜間質細胞の脱落膜化過程における細胞老化とプロゲステロン受容体膜構成因子1との関係

吉江 幹浩¹⁾, 津留 涼也¹⁾, 小島 淳哉²⁾, 草間 和哉¹⁾, 西 洋孝²⁾, 田村 和広¹⁾

1) 東京薬科大学薬学部内分泌薬理学教室

2) 東京医科大学医学部産科婦人科学教室

はじめに

子宮内膜は、増殖期におけるエストロゲンの作用により増殖・肥厚し、排卵後は、黄体から分泌されるプロゲステロン (P4) の作用により内膜を構成する間質細胞 (ESC) の分化や腺の成熟化を遂げ、胞胚の着床に備える。とりわけ ESC は、月経周期の分泌期中期において、主に黄体から産生される P4 の作用や cAMP シグナルの活性化により、形態的かつ機能的に性質の異なる脱落膜細胞へと分化し始める。この ESC の分化過程を脱落膜化といい、着床部位周辺では脱落膜化がさらに進行し、脱落膜が形成される。ESC は、脱落膜化に伴い、線維芽細胞様の形態から敷石状の形態へと変化し、プロラクチン (PRL) やインスリン様成長因子結合タンパク質 1 (IGFBP1) を産生・分泌する。培養 ESC に P4 や cAMP 誘導体を処置することにより、生体内と同様に特徴的な形態変化と PRL や IGFBP1 の分泌亢進を伴う脱落膜化を誘導することが可能である^{1,2)}。

脱落膜化過程において一部の ESC では、不可逆的に細胞周期が停止した細胞老化を起こすことが報告されている³⁾。一般的に老化細胞では、細胞老化随伴分泌現象 (senescence-associated secretory phenotype; SASP) と呼ばれるインターロイキン (IL) などの炎症性サイトカインやさまざまな分泌タンパク質が産生され、周辺細胞の老化誘導や免疫細胞の遊走による老化細胞の除去機構が働く。フォークヘッド型転写因子 forkhead box protein O1 (FOXO1) は、脱落膜化マーカーの発現誘導だけでなく、細胞老化に関与することが知られている^{1,3)}。脱落膜化過程では、細胞分化と老化が適切なバランスで維持されており、その破綻は脱落膜化の異常や早産と連関すると考えられている^{4,5)}。

P4 は、生殖機能において必須のホルモンであり、子

宮や卵巣における作用のほとんどは細胞内の典型的 P4 受容体 (PGR) を介して発揮される。しかしながら、この PGR とは異なる非典型的な P4 受容体の存在が示唆されており、その 1 つとして P4 に親和性を示す Progesterone Receptor Membrane Component (PGRMC) がある。ヒト卵巣顆粒膜細胞において PGRMC1 を介した P4 シグナルが、アポトーシスを抑制すること⁶⁾、子宮特異的に PGRMC1 を欠損したコンディショナルノックアウトマウスでは妊孕能が低いことや内膜嚢胞が形成されることが報告されている⁷⁾。また、PGRMC1 は、P4 作用の他にヘムに配位することで 2 量体を形成し、上皮増殖因子受容体やシトクロム P450 との相互作用を介してがんの増殖や化学療法への耐性化に関与することなど、その作用は多岐にわたる^{8,9)}。

われわれは、以前に子宮内膜の PGRMC1 発現が月経周期の増殖期と比較して分泌期において低いこと (図 1 A)、培養 ESC に P4 や cAMP 誘導体を処置して脱落膜化を誘導すると PGRMC1 発現が低下すること (図 1 B)、この PGRMC1 発現の低下機構としてマイクロ RNA (mir-98) が関与すること、さらに PGRMC1 機能の阻害により脱落膜化の指標となる PRL や IGFBP1 発現が亢進する知見を得ている (図 1 C, D)。しかしながら、ESC の脱落膜化に伴う細胞老化と PGRMC1 との関係は不明であり、本研究では脱落膜化時に起こる細胞老化と PGRMC1 との関係について調べた。

脱落膜化過程における細胞老化に対する PGRMC1 機能の抑制効果

ESC の細胞老化における PGRMC1 の役割を検討するため、細胞老化マーカーである senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) 活性を指標とし、細胞老化に対する PGRMC1 阻害薬 (AG205) および PGRMC1 siRNA の効果を調べた (図 2)。PGRMC1 阻害薬 (図 2 A, B) または PGRMC1 ノックダウン (図 2 C-E) は、SA- β -Gal 活性を増加させた。また、db-cAMP/P4 によ

連絡先: 吉江幹浩 東京薬科大学薬学部内分泌薬理学教室
〒192-0392 東京都八王子市堀之内1432-1
TEL: 042-676-4536
FAX: 042-676-4529
E-mail: yoshie@toyaku.ac.jp

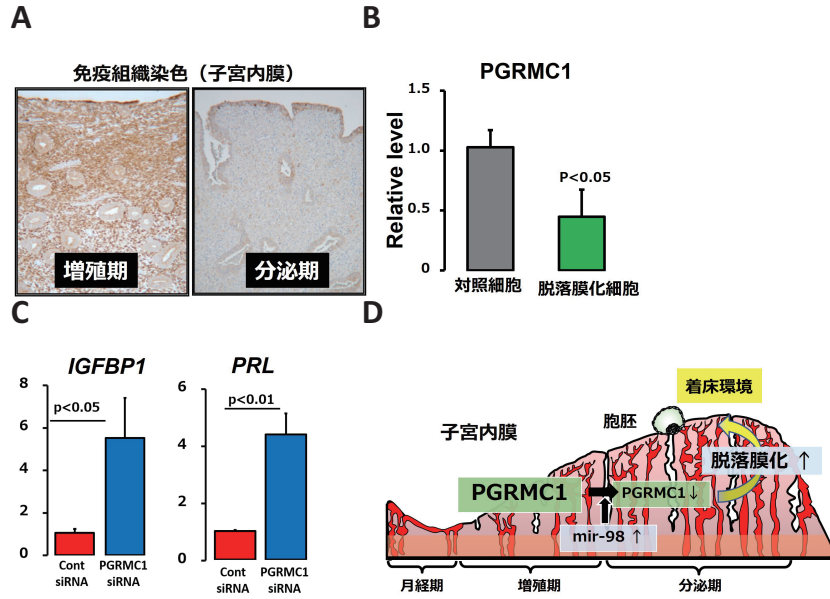


図1 子宮内膜間質細胞 (ESC) の脱落膜化における PGRMC1発現とその抑制効果
 (A) 増殖期および分泌期の子宮内膜における PGRMC1免疫染色像 (茶色: 発現部位).
 (B) ESC の *in vitro* 脱落膜化における PGRMC1タンパク質発現の変化.
 (C) 脱落膜化マーカーの発現に対する PGRMC1ノックダウンの効果.
 (D) 脱落膜化における PGRMC1発現調節機構とその役割の概略図

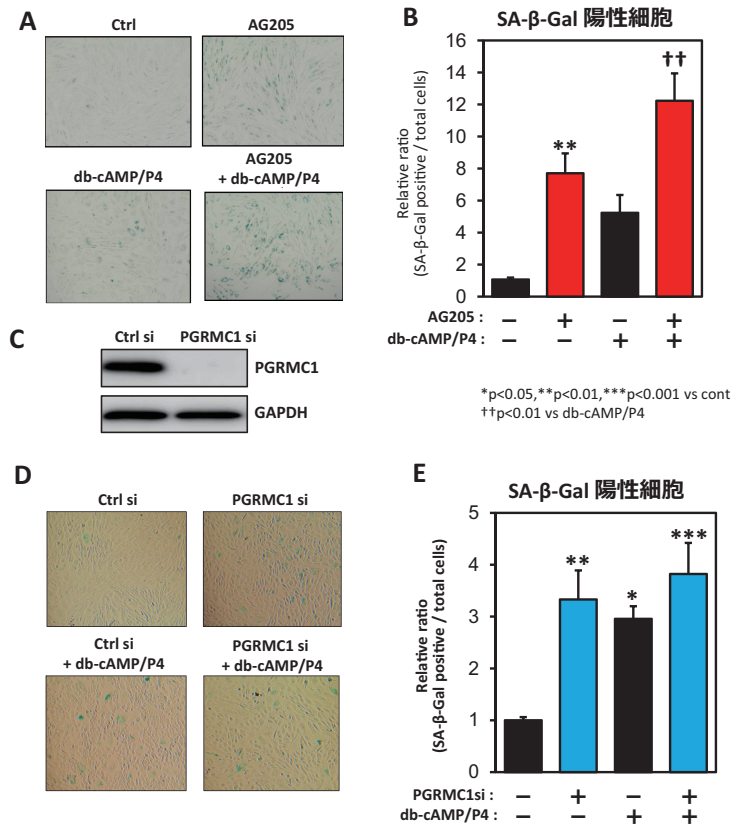


図2 ESC の脱落膜化に伴う細胞老化に対する PGRMC1機能阻害の効果
 初代培養ヒト ESC に PGRMC1阻害薬 (AG205) (A, B) または, PGRMC1 siRNA (C-E) を処置し, 脱落膜化刺激として P4 (1 mM) とジブチリル cAMP (0.5 mM) を 2 日間処置した. (A, D) SA-β-Gal 染色像 (緑色). (B, E) SA-β-Gal 陽性細胞の割合.

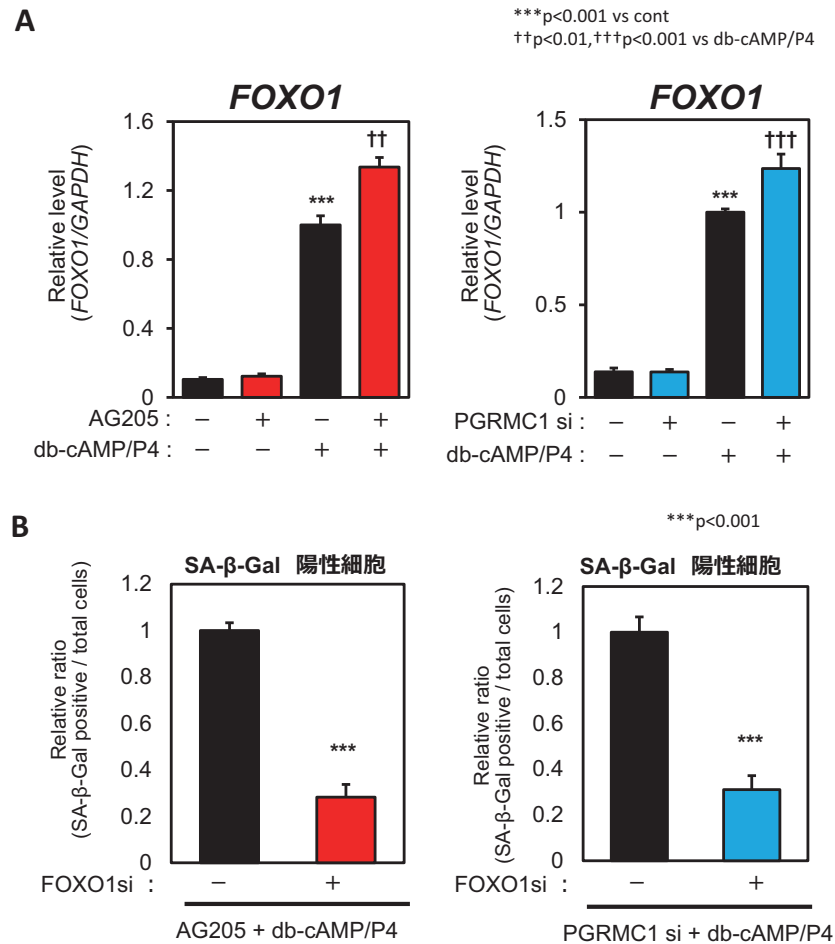


図3 脱落膜化過程でのPGRMC1機能の抑制により誘導される細胞老化とFOXO1との関係
 (A) 上記、図2と同様の実験後、FOXO1 mRNA発現をリアルタイムRT-PCRにて解析した。
 (B) ESCにAG205またはPGRMC1 siRNAおよびFOXO1 siRNAを処置後、脱落膜化刺激を加え、細胞老化への影響をSA-β-Gal活性を指標にして調べた。

る脱落膜化刺激下において誘導される細胞老化に対してもこれら処置は、SA-β-Gal活性を上昇させたことから、脱落膜化時に起こる細胞老化とPGRMC1との関係が示唆された。

PGRMC1機能の抑制により誘導される細胞老化とFOXO1との関係

FOXO1は、IL-8の発現誘導を介して細胞老化を誘導することが報告されている³⁾。まず、FOXO1発現に対するPGRMC1機能阻害の効果について検証したところ、PGRMC1阻害薬およびノックダウンは、脱落膜化刺激により誘導されるFOXO1発現をさらに亢進させた(図3A)。また、AG205およびPGRMC1ノックダウンにより誘導されるSA-β-Gal活性は、FOXO1ノックダウンにより顕著に抑制された(図3B)。このことからPGRMC1

1機能の抑制による細胞老化の誘導機構にはFOXO1が深く関与することが示唆された。

SASP因子の発現に対するPGRMC1機能の抑制効果

同様にSASP因子IL-8の発現に対するPGRMC1機能の抑制効果について検討した(紙面の都合上データは示していない)。AG205処置により脱落膜化刺激1日目ではIL-8発現の増加傾向がみられ、2日目では減少した。また、培養液中のIL-8分泌量は、脱落膜化刺激2日目においてAG205処置により増加した。一方、PGRMC1ノックダウンはIL-8分泌を減少させる傾向を示した。このように、AG205処置とPGRMC1ノックダウンとの間でIL-8発現への作用には差異があり、詳細な検討が必要である。

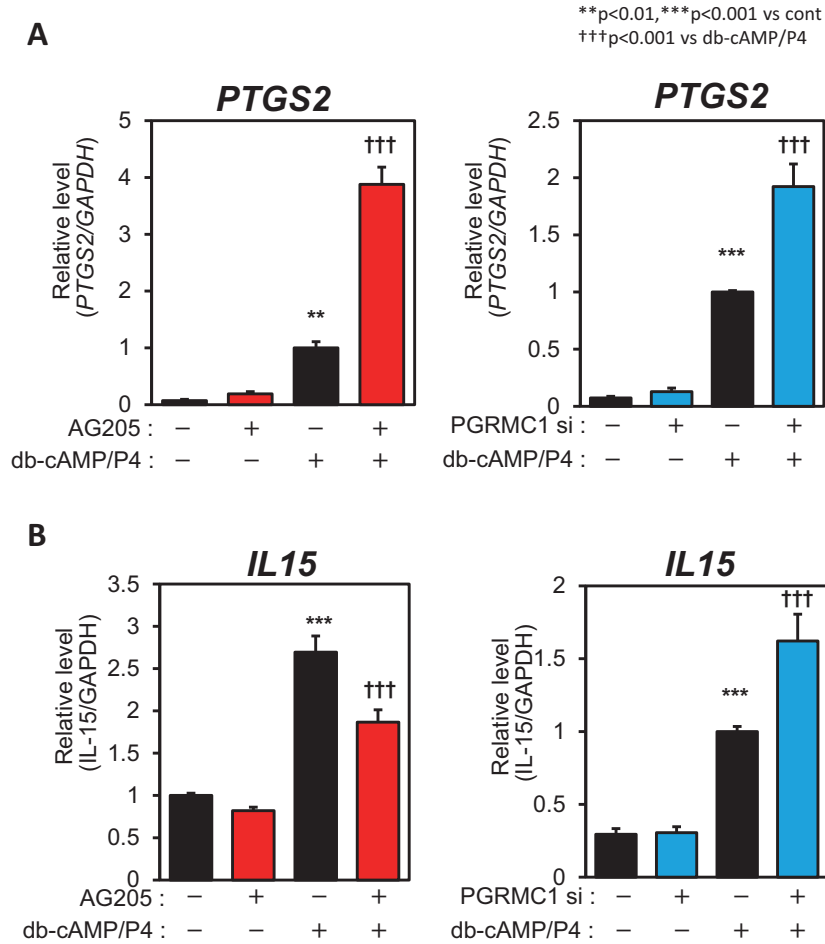


図4 脱落膜化過程における PTGS2 (COX-2), IL-15発現に対する PGRMC1機能の抑制効果 (A,B) 上記, 図2と同様の実験後, PTGS2 (A), IL-15 (B) 発現をリアルタイム RT-PCR にて解析した.

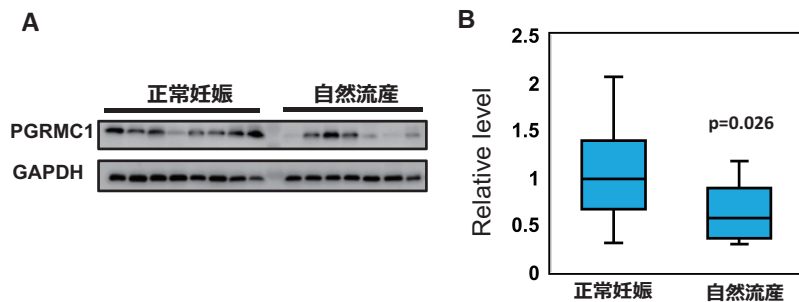


図5 正常妊娠および流産症例の脱落膜組織における PGRMC1発現 (A) 妊娠6~9週の正常妊娠(人口妊娠中絶, 11例)と流産(12例)症例の脱落膜組織における PGRMC1発現をウェスタンブロット法にて比較した. (B) デンシトメトリー解析.

脱落膜化過程におけるシクロオキシゲナーゼ(COX)-2, IL-15発現に対する PGRMC1 機能の抑制効果

上記と同様の実験系において着床関連因子として知られる COX2 (PTGS2) 並びに子宮特異的ナチュラルキラー

細胞 (uNK) の遊走促進作用を介して老化細胞を除去する IL-15³⁾ の発現に対する PGRMC1機能の抑制効果を調べた (図4). 脱落膜化刺激による PTGS2発現の増加は, AG205処置および PGRMC1ノックダウンによりさらに増強された (図4A). IL-15発現も脱落膜化刺激により増加した. この発現増加は, AG205の前処置により

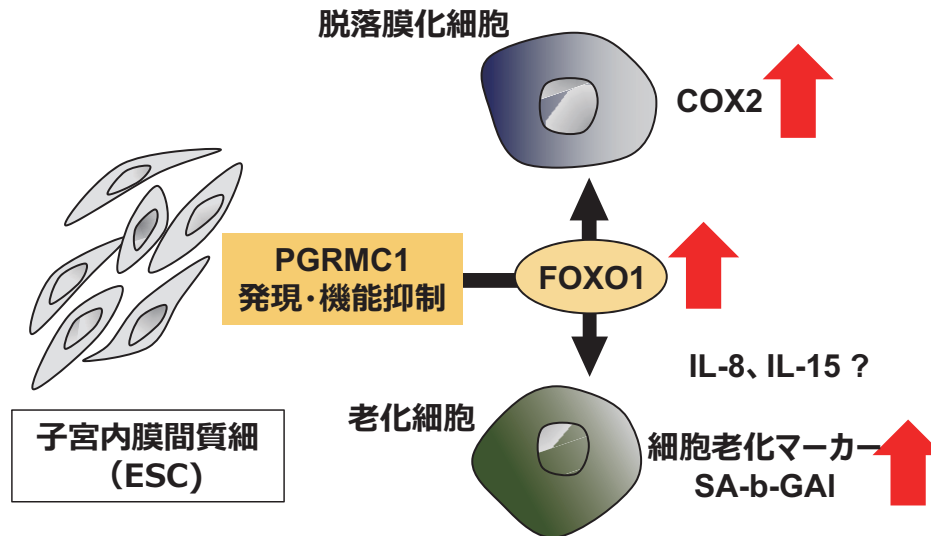


図6 脱着膜化過程における PGRMC1機能阻害による FOXO1を介した細胞老化誘導機構

減少し、一方、PGRMC1ノックダウン細胞では、脱着膜化刺激下での発現が亢進した(図4B)。IL-15発現に対するPGRMC1の役割については再検討の余地があるものの、COX2発現は、PGRMC1により抑制的に調節されていることが示唆された。

流産症例の脱着膜組織における PGRMC1発現

脱着膜におけるPGRMC1発現と妊娠関連疾患との関係について調べるため、妊娠6～9週の正常妊娠と流産症例の脱着膜組織におけるPGRMC1発現をウェスタンブロットにて比較した(図5A, B)。PGRMC1タンパク質の発現レベルは、正常妊娠と比較して自然流産症例の脱着膜では低かった。上記のとおり、脱着膜化とともにPGRMC1発現が低下する知見を得ており、流産症例におけるPGRMC1発現の低下は意外であったが、着床周辺期と妊娠後の脱着膜ではPGRMC1の発現調節に差異があるのかもしれない。卵膜組織や絨毛細胞においてPGRMC1をノックダウンすると酸化ストレス誘導性の細胞老化が促進されることが報告されており、前期破水における酸化ストレス誘導性細胞老化への寄与とPGRMC1による保護作用が推察されている¹⁰⁾。よって、妊娠時の脱着膜では、PGRMC1が妊娠維持に寄与している可能性も考えられる。

終わりに

本検討においてESCにおけるPGRMC1機能の抑制が、脱着膜化時に起こる細胞老化を促進したことから、

分泌期で見られる時期特異的なPGRMC1発現の低下が、FOXO1発現の亢進を介して脱着膜化とそれに伴う適切な細胞老化を誘導し、胞胚の着床のみならず月経周期の進行における子宮内膜リモデリングに寄与することが推察された(図6)。流産症例の脱着膜における低PGRMC1発現と流産発症との関係については、脱着膜におけるPGRMC1の機能解析に加え、絨毛膜や羊膜も含めて統合的に解析を進めていきたいと考えている。

謝辞

本稿は、令和2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主に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 杉野法広教授、第25回学術集會会長 伊藤潔教授、また、本誌編集委員の先生方に感謝申し上げます。

引用文献

- Gellersen B, Brosens J (2003) Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol*, 178, 357-372.
- Yoshie M, Kusama K, Tamura K (2015) Molecular mechanisms of human endometrial decidualization activate cyclic Adenosine monophosphate signaling pathway. *JMamm Ova Res*, 32, 95-102.
- Brighton PJ, Maruyama Y, Fishwick K, Vrljicak P, Teeary S, Fujihara R, Muter J, Lucas ES, Yamada T, Woods L, Lucciola R, Hou Lee Y, Takeda S, Ott S, Hemberger M, Quenby S, Brosens JJ (2017) Clearance of senescent decidual cells by uterine natural killer cells in cycling human endometrium. *Elife* 6, e31274.
- Kusama K, Yoshie M, Tamura K, Nakayama T, Nishi H,

- Isaka K, Tachikawa E (2014) The role of exchange protein directly activated by cyclic AMP 2-mediated calreticulin expression in the decidualization of human endometrial stromal cells. *Endocrinology*, 155, 240-248.
5. Hirota Y, Daikoku T, Tranguch S, Xie H, Bradshaw HB, Dey SK (2010) Uterine-specific p53 deficiency confers premature uterine senescence and promotes preterm birth in mice. *J Clin Invest*, 120, 803-815.
 6. John J, Xiufang L, Anna G, Erika JM (2009) Progesterone activates a progesterone receptor membrane component 1-dependent Mechanism that promotes human granulosa/luteal cell survival but not progesterone secretion *J Clin Endocrinol Metab*, 94, 2644-2649.
 7. McCallum ML, Pru CA, Niikura Y, Yee SP, Lydon JP, Peluso JJ, Pru JK (2016) Conditional Ablation of Progesterone Receptor Membrane Component 1 Results in Subfertility in the Female and Development of Endometrial Cysts. *Endocrinol*, 157, 3309-3319.
 8. Kabe Y, Nakane T, Koike I, Yamamoto T, Sugiura Y, Harada E, Sugase K, Shimamura T, Ohmura M, Muraoka K, Yamamoto A, Uchida T, Iwata S, Yamaguchi Y, Krayukhina E, Noda M, Handa H, Ishimori K, Uchiyama S, Kobayashi T, Suematsu M (2016) Haem-dependent dimerization of PGRMC1/Sigma-2 receptor facilitates cancer proliferation and chemoresistance. *Nat Commun*, 7, 11030.
 9. Ryu CS, Klein K, Zanger UM (2017) Membrane Associated Progesterone Receptors: Promiscuous Proteins with Pleiotropic Functions - Focus on Interactions with Cytochromes P450. *Front Pharmacol*, 8, 159.
 10. Feng L, Allen TK, Marinello WP, Murtha AP (2019) Roles of Progesterone Receptor Membrane Component 1 in Oxidative Stress-Induced Aging in Chorion Cells. *Reprod Sci*, 26, 394-403.