

着床関連因子として同定されたスタスミンとインスリン様増殖因子低親和性結合タンパク質 Insuline-like growth factor-binding protein 7 の生殖内分泌学的意義

向後博司,* 吉江幹浩, 杓掛真彦, 田村和広

Roles of Implantation-related Factors, Stathmin and Insuline-like Growth Factor-binding Protein 7 in Reproductive Endocrinology

Hiroshi KOGO,* Mikihiro YOSHIE, Masahiko KITSUKAKE, and Kazuhiro TAMURA
*Department of Endocrine Pharmacology, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,
1432-1 Horinouchi, Hachioji City, Tokyo 192-0392, Japan*

(Received January 8, 2008)

Successful implantation and placentation require that trophoblasts adhere to the uterine epithelium and penetrate the decidualized endometrium. However, the biochemical mechanisms of the establishment of pregnancy including these phenomena have not yet to be definitively elucidated. We have found that stathmin, a cytosolic phosphoprotein that regulates microtubule dynamics, and insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-related protein 1 (IGFBP-rP1, now called IGF-binding protein 7) were highly expressed in the endometrium around the time of implantation and decidualization. In this article, we review our recent findings of the research regarding the functions of these implantation-associated proteins in endocrine physiology and pharmacology. Analysis of the expression of both factors in rodent and human uterus has revealed that both factors are crucial for the process of endometrial stromal cell differentiation.

Key words—stathmin; insuline-like growth factor-binding protein 7; pregnancy; uterus; implantation; endometrium

1. はじめに

筆者は、長年に渡り、エストロゲンの生理並びに薬理作用の発現機構にはじまり、視床下部-下垂体系と卵巣や子宮機能に及ぼす薬物の影響を解析してきたが、その研究の一環として昭和 62 年 (1987) に Kansas 大学医学部生理学・産婦人科学研究室に 1 年間留学し、生殖系に及ぼす環境毒 (O,P'-DDT, chlordecone) の生理、薬理学的研究を行った。この研究で、O,P'-DDT 及び chlordecone (Kepone) は、着床を遅延させたラットに投与するとエストロゲン様作用を発揮して着床を誘起することを見い出して発表した。^{1,2)} その後、着床周辺期における子宮内プロスタグランジン (PG)F_{2α} の動態等の研究を進め、平成 8 年 (1996) から、不妊症治療の新しいターゲットとなり得る子宮性の着床因子の探索に取

りかかった。その研究過程の中で、当研究室では、ラットの着床成立時に特異的に発現が上昇する遺伝子として、微小管調節因子のスタスミンとインスリン様成長因子 (IGF) 結合タンパク質 7 (IGFBP7) を同定した。本稿では、この 2 つの因子の生殖臓器を中心とした生理活性と臨床薬理学的意義の展望について紹介する。

2. スタスミンの細胞生物学的意義

スタスミン (別名 oncoprotein 18: Op18) は、細胞外シグナルに応じてリン酸化されるタンパク質として同定された。^{3,4)} N 末端側には 4 つのセリンリン酸化部位を有する調節ドメインがあり、C 末端側にはタンパク質との相互作用ドメインが存在する (Fig. 1 上段)。スタスミンの特徴的な機能として微小管動態と細胞周期進行の制御がある。スタスミンは、N 端側が関与する微小管の崩壊活性 (カタストロフィーの促進) に加えて、C 端側の相互作用ドメインを介して微小管を構成する α/β チューブリンヘテロダイマーを捕捉することにより遊離型のチューブリン量を減少させ、微小管の脱重合を促進す

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)

現住所: 〒190-0003 東京都立川市栄町 3-37-4

*e-mail: kogo@ps.toyaku.ac.jp

本総説は、平成 19 年退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

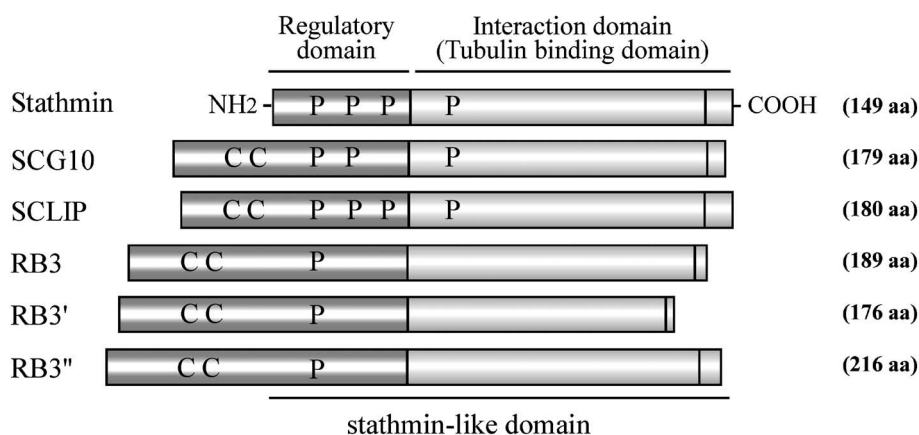


Fig. 1. Schematic Diagram of Stathmin and Stathmin Family Proteins (SCG10, SCLIP, RB3, RB3' and RB3'')

Stathmin-like domain is highly conserved among the stathmin family proteins. The N-terminal regulatory domain promotes microtubule catastrophe and contains several serine residues (P). The extended N-terminal contains two cysteine residues (C) which lead to membrane association or anchoring. The C-terminal interaction domain binds to tubulin α/β heterodimers.

る。⁵⁻⁷⁾ また、この活性はリン酸化により制御されており、リン酸化が起こると微小管脱重合活性は低下する。⁸⁾ スタスミンをリン酸化する因子には MAP キナーゼ、⁹⁾ サイクリン依存性キナーゼ、¹⁰⁻¹²⁾ カルモジュリン依存性キナーゼ、¹³⁾ プロテインキナーゼ A^{12,14)} 等がある。細胞周期進行過程の有糸分裂期においてスタスミンのリン酸化が起こるが、リン酸化部位の変異体では細胞周期の進行がみられないことから、スタスミンの適切なリン酸化制御により細胞周期が進行すると考えられている。¹⁵⁾ スタスミンは、super cervical ganglion-10 (SCG10), SCG-10 like protein (SCLIP), rat homolog of XB3 (RB3) とそのスプライシングバリエーションである RB37' と RB3'' を含むリン酸化タンパク質ファミリーの 1 つである (Fig. 1)。¹⁶⁾ スタスミンが様々な組織にユビキタスに発現するのに対して SCG10 は神経系に特異的に局在している。¹⁷⁾ RB3 と SCLIP は、スタスミンと SCG10 の同族体として同定され、¹⁸⁾ RB3 は SCG10 と同様に神経系に発現しているが、SCLIP はスタスミンに似て様々な組織に広範囲に分布している。¹⁹⁾ SCG10, SCLIP, RB3 にはスタスミン様ドメインと呼ばれるスタスミンと構造がよく似た配列に加えて N 末端の伸長した配列内にシステイン残基を持つ (Fig. 1)。これらスタスミンファミリータンパク質はスタスミンと同様にチューブリンを捕捉して微小管の脱重合を促進する。Schubart らにより作製されたスタスミン遺伝子欠損マウスは、正常に発育することが報告されている

が、²⁰⁾ 最近になって、老齢のスタスミン欠損マウスは、軸索変性症を発症すること²¹⁾や恐怖に関する記憶や本能的な危機回避能力が正常マウスに比べて低下していること²²⁾が報告されている。

3. ラット妊娠子宮におけるスタスミン発現と着床・脱落膜化への関与

ラットの交配後、膣口にプラグ (膣栓) が確認できた日を妊娠 1 日目とすると、妊娠 5 日目にエストロゲンの一過性の分泌上昇 (エストロゲンサージ) が起こり胞胚は妊娠 6 日目の早朝に子宮内膜に着床する。特に胞胚の着床に不可欠であると考えられている子宮内膜因子として白血病阻止因子 (LIF) や Heparin-binding EGF like growth factor (HB-EGF), シクロオキシゲナーゼ-II (COX-II) 等があり、それらは胞胚の着床時に発現が上昇する。²³⁾ この着床時での分子機構を解明するために、着床が起こる直前である妊娠 5 日の子宮と妊娠 6 日目の子宮における mRNA 発現の違いを比較した結果、妊娠 6 日目の子宮において発現が上昇する遺伝子の 1 つとしてスタスミンを同定した。²⁴⁾ ラットの着床周辺期子宮におけるスタスミン発現を解析したところ、スタスミンの発現は、着床日の妊娠 6 日目から増加し、脱落膜 (子宮内膜間質細胞が増殖・分化した組織で母体胎盤の基盤となる) が形成される時期にさらなる増加がみられ、脱落膜化が完了する時期 (妊娠 12 日目以後) には減少した (Fig. 2, 中・下段)。着床期子宮におけるスタスミンの発現部位は、主に着床部位 (implantation site; IS) の脱落膜細胞であ

ることが分かった。着床と子宮のスタスミン発現との関係について着床遅延モデルを用いて検討した。着床遅延モデルでは (Fig. 3), 妊娠ラットの下垂体を妊娠 3 日目 (卵巣摘出の場合は妊娠 4 日目) に摘出する。この場合, 卵巣ステロイド生成が低下し, 着床が起こらないが, プロゲステロン (P4) の連続投与を行うと P4 投与期間中の数日間, 妊卵は着床しない状態で子宮管腔を浮遊している。このような着床遅延を起こした動物において妊娠 6, 7, 8 日目, スタスミン発現は上昇しなかった。この状態で, 17 β - エストラジオール (E2) を妊娠 8 日目に投与すると, 投与翌日に着床が観察され, 遅延着床が誘起 (妊娠 9 日目) されるとスタスミン発現の高進が認められた。一方, 卵巣摘出動物への卵巣ステロイド (P4 又は E2) 投与は, スタスミンタンパク質発現に対して影響を示さなかった。また, 発情周期内において発現レベルの変動はなかった。偽妊娠ラットの 6 日目の子宮では, 正常妊娠 6 日目 (着床

日) にみられたようなスタスミンの発現の増加は起こらなかったことから, 子宮内スタスミン発現の増加は, 卵巣ステロイドによる直接的な作用ではなく, 着床誘起と連動していることが証明された。さらに, 偽妊娠ラットへの子宮へのオイル注入により誘起される人為的脱落膜化モデルを用いた検討では (Fig. 4), 子宮内スタスミン発現は脱落膜腫が形成されるオイル処置 24 時間後に増加し, 48 時間後でピークとなったのち, 低下した。以上の検討結果から, ラット妊娠子宮におけるスタスミンの発現高進は, 着床過程における内膜間質細胞の脱落膜化と密接に関連していることが明らかとなった。^{24,25)}

4. マウス子宮のスタスミン発現とスタスミン欠損動物の生殖能

スタスミン遺伝子欠損マウスでは, 上述したように神経系の異常や行動異常が観察されている。しかしながら, マウスの生殖機能に関する詳細な解析は行われていなかったため, マウスの着床周辺期子宮

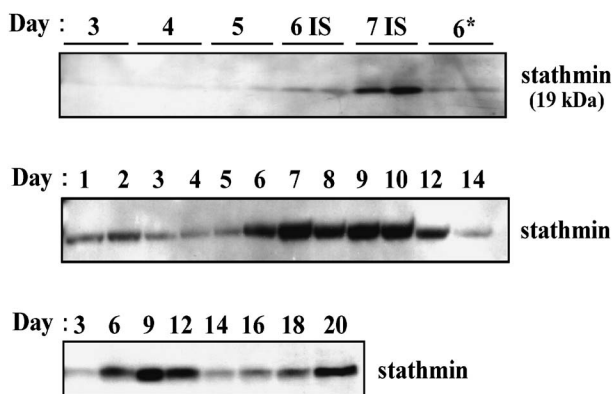


Fig. 2. Immunoblotting of Uterine Stathmin Expression during Pregnancy in Rats
Numbers at the top of the figures indicate the day of pregnancy. 6IS and 7IS, Implantation sites (IS) on Days 6 and 7, 6*: inter-IS on Day6.

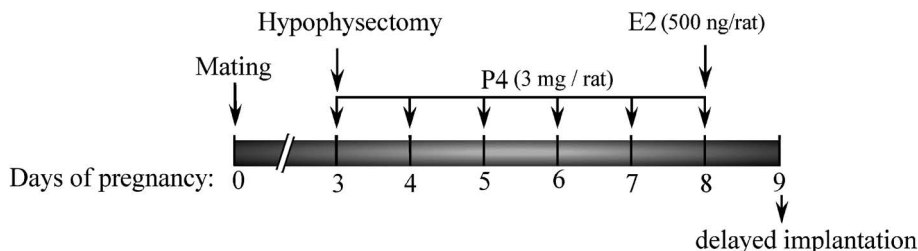


Fig. 3. Delayed Implantation Model in Rats
Pregnant rats were hypophysectomized on day 3 of pregnancy to deplete endogenous ovarian steroids. Progesterone (P4: 3 mg/rat/d) was administered for 6 days to keep the blastocysts in the uterine horns. In this condition, blastocysts were dormant and never implanted into the uterus. When the rats were treated with 17 β -estradiol (E2: 500 ng/rat) on day 8, the dormant blastocyst were activated and implanted into uterus on day 9 (delayed implantation).

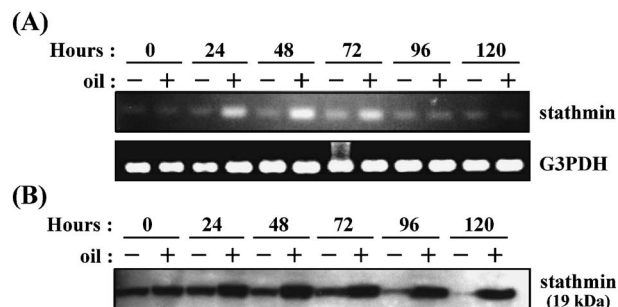


Fig. 4. Effect of Artificial Decidualization on Stathmin Expression in the Pseudopregnant Rats
Uterine stathmin levels were measured 0–120 h after sesame oil infusion into one uterine horn on Day 5 of pseudopregnancy [oil (+)]. As a control, the intact horn was subjected to the same analysis [oil (-)]. A: Stathmin mRNA levels were detected by RT-PCR analysis. Each reaction was performed using RNA sample pooled from 2 to 3 animals. B: The protein levels of stathmin were measured by Immunoblotting.

におけるスタスミン発現とともに、スタスミン欠損マウスの着床、脱落膜化、生殖能、さらにスタスミンファミリー遺伝子 (SCG10, SCLIP, RB3) の発現を検討した。スタスミン発現レベルは受精後、徐々に増加し、ラットの場合ほど顕著ではないが、着床(マウスでは妊娠5日目)と脱落膜形成初期にピークとなった。スタスミンは、妊娠5,6日目において非着床部位である着床部位間に比べ着床部位 (IS) において高発現していた。また、脱落膜形成時のスタスミンの局在は主に脱落膜細胞と血管内皮細胞であった。ラットと同様、人為的脱落膜化を誘起すると、脱落膜腫の形成とともにスタスミン発現は増加したのち、形成後はそのレベルは低下した。これらの結果より、マウス子宮においてもラットと同様にスタスミン発現は脱落膜形成時に制御されていることが明らかとなった。²⁶⁾

一方、スタスミン欠損マウスの出産胎児数は、野生型に比べて少なかったものの妊娠初期の着床数に影響はなかった [Fig. 5(A), (B)]. また、スタスミン欠損マウスの脱落膜腫重量 [Fig. 5(C)] 及び脱落膜マーカー (アルカリホスファターゼ, デスミン, サイクリン D3) の発現は減少傾向を示した (データには示していない) が、野生型マウスとの有意差はなかった。²⁶⁾ このことから、スタスミン欠損マウスの出産数の低下は着床過程の異常で説明できないことが分かった。その原因については今のところ特定できていないが、スタスミンファミリーを構成する SCG10 は野生型及びスタスミン欠損マウ

スにおいて脱落膜形成時に高発現し、RB3 と SCLIP は野生型に比べスタスミン欠損マウスで発現レベルが高かったこと²⁶⁾から、野生型及びスタスミン欠損マウスにおけるスタスミンファミリーの着床・脱落膜化への関与と、スタスミン欠損マウスでの正常な着床・脱落膜化における代償的役割が推察された。

5. ヒト子宮内膜におけるスタスミン発現と脱落膜化

ヒトの子宮組織では、スタスミン発現レベルが他の臓器よりも高いという報告¹⁸⁾があることから、ヒト子宮並びに胎盤組織におけるスタスミン発現と培養子宮内膜間質細胞におけるスタスミンの役割について解析した。^{27,28)} ヒト子宮内膜でのスタスミンタンパク質の局在は、主に子宮内膜のリモデリングが起こる機能層に存在する腺上皮細胞と間質細胞に認められたが、リアルタイム RT-PCR 法により解析した月経周期内でのスタスミン mRNA の発現量に変化はなかった。また、妊娠初期 (妊娠7週目) の完成された脱落膜組織では、スタスミンは発現しておらず、同時期の胎盤の絨毛の栄養膜細胞層と子宮内膜へと浸潤する絨毛外栄養膜細胞で高度な発現が確認された。²⁷⁾ ヒトの場合、胞胚着床前に起こる子宮内膜の脱落膜化は胞胚の過剰な浸潤を防ぐとともに着床後の胎盤形成の基盤を作る上でも重要である。この脱落膜、胎盤の形成不全は胎児の発育不全若しくは流産にかかわる。我々は、卵巣ステロイド又は cAMP アナログ (ジブチリル cAMP: db-cAMP)

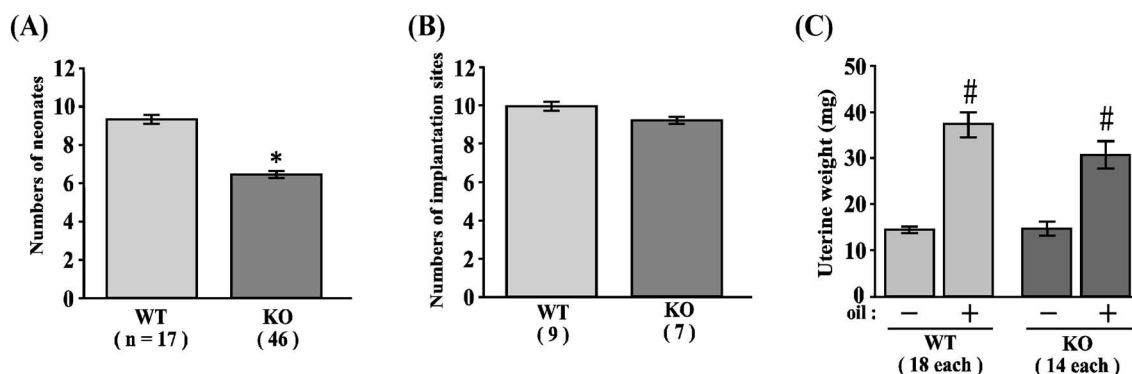


Fig. 5. Numbers of Neonates (A), Implantation Sites (B), and the Weight of the Uterus in Oil-induced Decidualization Model (C) in Stathmin-KO Mice

A: The neonates produced by WT and stathmin-KO mice were counted within 3 days after parturition. B: On days 7 and 8 of pregnancy, the uteri from WT and stathmin-KO mice were isolated and the implantation sites were counted. C: Ovariectomized WT and stathmin KO mice were treated with P4 for 7 days. On the 4th day of P4 treatment, sesame oil was infused into the lumen of one uterine horn to induce decidualization. The contralateral horn, which was not given the oil infusion, served as the control. On the 4th day after the oil injection (day 8), the mice were killed and their uteri were weighed. The results are expressed as mean ± S. E. (A, B, C). * $p < 0.01$: vs. WT, # $p < 0.01$: vs. oil-.

処置による *in vitro* 脱落膜化モデルを用いて、ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化過程におけるスタスミン発現の意義を調べた。単離した子宮内膜間質細胞への卵巣ステロイド処置により脱落膜化は進行し、培養6日目まで脱落膜化マーカーの IGF binding protein-1 (IGFBP-1) の発現とその分泌は著しく増加した (Fig. 6, Day 0 vs. 6)。一方、スタスミン mRNA 及びタンパク質発現は培養6日目では開始時と比べ減少した。しかしながら、あらかじめスタスミン発現を抑制した状態 (Fig. 6, siRNA 群) で脱落膜刺激 (卵巣ステロイド処置) を与えても、control (control siRNA 処置群) でみられるような IGFBP-1 の高発現は認められなかった。また、db-cAMP 処置による脱落膜化に対してもスタスミン発現抑制により、脱落膜マーカーの発現が顕著に減少した。脱落膜刺激を与えない条件下でのスタスミン発現の抑制は、子宮内膜間質細胞の増殖能の有意な低下をもたらした。したがって、ヒトにおいてスタスミンは、子宮内膜や胎盤に発現すること、またその機能として子宮内膜間質細胞の増殖と脱落膜細胞への分化誘導に参与する可能性を示唆した。^{27,28)}

6. スタスミンの臨床薬理学的意義

スタスミンは、ヒト前立腺がん、^{29,30)} 卵巣がん、³¹⁾ 乳がん³²⁾において高発現していることが報告されている。Mistry らはリボザイムを用いてスタスミン発現を抑制すると前立腺がん細胞の増殖が抑制されること、さらに微小管重合促進薬のパクリタキセルと併用すると抗腫瘍作用が相乗的に増加することを

報告している。^{33,34)} 腫瘍組織における血管新生は腫瘍形成を促進させることから、血管新生は抗がん治療における重要なターゲットの1つとなっている。近年、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) において、スタスミンの発現を抑制すると *in vitro* で血管新生を模倣する特徴的な血管内皮細胞の管腔形成が阻害され、この阻害作用は低濃度のパクリタキセル処置によりさらに増強することも報告されている。³⁵⁾ 抗がん治療において作用機序の異なる薬物を併用した際の副作用の増加は臨床的な問題の1つである。スタスミン発現抑制と微小管作用薬の併用は、作用点が微小管という点で共通していることから、多剤を併用した際の副作用を軽減できる可能性もあり、今後、*in vivo* におけるスタスミン発現抑制が抗がん治療に応用されることが期待される。

7. IGFBP7 と妊娠成立—脱落膜化における役割—

IGF 結合タンパク質 (IGF-binding protein) である IGFBP7 は、ヒト染色体の 4q12-13 にコードされている分泌型のタンパク質であり、正常髄膜細胞で発現がみられる一方で、髄膜腫細胞では発現が減少している遺伝子の1つとして見い出された。その由来細胞から Meningioma associated cDNA 25 (Mac25) と名付けられた。その後の研究により IGFBP7 は様々な作用を持つことが明らかとなり、その作用から Tumor adhesion factor (TAF), Pro-stacyclin stimulating factor (PSF), Angiomodulin などと呼ばれていた。これは、N 末端領域においては IGFBP とのホモロジーが高く、C 末端領域に対しては相同性が低い IGF 結合タンパク質関連タンパク質 (IGFBP related protein: IGFBP-rP1) である。現在、IGFBP-rP1-10 まで 10 種類が同定されている。近年になって、この IGFBP-rP1 は一般的に IGFBP7 と呼ばれるようになった³⁶⁾ が、他の IGFBP1-6 と比べて IGF に対する親和性は低く、逆にインスリンとの親和性は他の IGFBP (IGFBP1 から IGFBP 6 まで 6 種類が存在) よりも数百倍高い (インスリン結合能が高い) という特徴を持つ。インスリンとインスリン受容体との結合を妨げる作用を持つことが報告されている。³⁷⁾ IGFBP1-6 は、IGF の代謝、分布、IGF 受容体への結合性を修飾する作用を示すが、IGFBP7 には IGF の影響を受けない作用も観察されているので IGF 作用の調節以外の独自の生理活性があると考えられる。

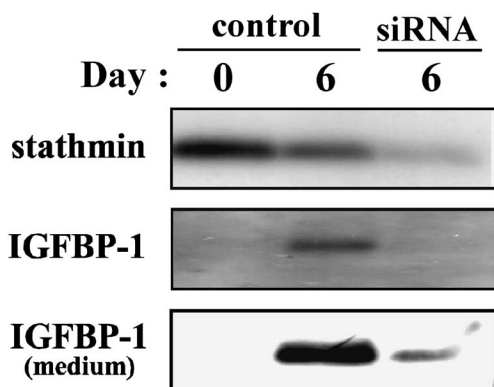


Fig. 6. Effect of Stathmin Knock-down on Both P4 and E2-induced Decidualization in Cultured Endometrial Stromal Cells

Control and stathmin siRNA was transfected to stromal cells 1 day before ovarian steroid stimulation. The cell lysate and culture media were subjected to Immunoblot analysis for stathmin and IGFBP-1.

IGFBP7は、ヒトにおいて生殖組織も含めてほぼ全身に存在している。³⁸⁾しかしながら、正常組織におけるIGFBP7の作用及びその役割についての報告はほとんどない。IGFBP7もスタスミンと同様に、着床時に高発現する着床関連因子として同定したタンパク質である。ラット子宮におけるIGFBP7 mRNAの発現は、プラーク確認後、経日的に観察すると、妊娠5日目より発現が上昇し、着床日である妊娠6日目にその発現量がピークに至ることが明らかとなった (Fig. 7)。このIGFBP7 mRNAの局在を検討するとその強い発現は、両子宮角に複数みられる着床部位と着床部位の間の組織にあった。特に妊娠7日以降の胞胚周辺の脱落膜化を起した部位ではIGFBP7 mRNAの発現はほとんど検出されず、その発現は脱落膜化部位を取り囲む細胞と着床部位間の間質組織にあった。着床前日のラット子宮より全子宮細胞を調製し、IGFBP7を処置し、細胞増殖に対するIGFBP7の作用をみると、IGFBP7はIGFの存在の有無に係わらず子宮内膜細胞の増殖を抑制する。前述のようにIGFBP7はIGFと結合することができるが、IGFBP7の子宮内膜細胞の増殖抑制効果は、IGFを介さない独自の作用によるものであることが考えられる。プロスタサイクリン(PGI₂)は、核内受容体の1つであるPPAR- δ を介して齧歯類の子宮における胞胚の着床や子宮内膜の脱落膜化に重要な働きをしていると考えられている。³⁹⁾子宮におけるPGI₂の主な産生場所である子宮筋細胞に対してIGFBP7を処置すると、COX-IIのmRNA発現の上昇を介してPGI₂の産生が増加したことから、IGFBP7はラット子宮において着床周辺部位に発現、分泌されオートクライン、パラクライン的に作用し、一部PGI₂の産生を増加させる

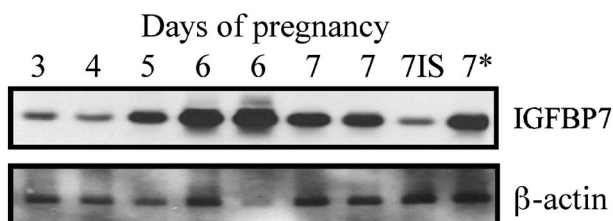


Fig. 7. Uterine IGFBP7 mRNA Expression in the Periimplantation Period in the Rat

Northern blot data of uterine IGFBP7 mRNA expression during the early stage of pregnancy. Implantation sites were isolated on day 7 of pregnancy (7IS). 7IS: Implantation sites on day 7, 7*: nonimplantation sites on day 7.

ことで妊卵が着床し易い環境を作り、着床後は子宮内膜の脱落膜化に伴って起こる増殖を制御することにより妊娠成立に適した状態を準備しているかも知れない。⁴⁰⁾

なお、本研究過程において(2003年)、IGFBP7がヒトの着床の受容能獲得に関与することを示唆する論文⁴¹⁾が発表されている。この報告では、マイクロアレイ解析により胞胚受容期の子宮内膜組織と非受容期の異なる発現量の遺伝子群、並びに接着能が高い内膜細胞株(RL95-2)と接着能が低いHEC-1A株間での発現量が異なる遺伝子群を同定し、各々前者で著しい上昇を示す遺伝子としてIGFBP7を検出している。その後、当研究室においてもIGFBP7がヒト子宮内膜に月経周期を通して発現しており、その発現は分泌期の子宮腺組織で高く、培養子宮内膜間質細胞や腺細胞がIGFBP7を分泌することを確認している。⁴²⁾また、培養ヒト子宮内膜間質細胞は、P4, E2の処置、若しくはdb-cAMPの処置により脱落膜化細胞へ分化するが、IGFBP7特異的siRNAによりあらかじめ間質細胞のIGFBP7発現を抑制すると、脱落膜化刺激を与えても脱落膜化が誘起されなかった (Fig. 8)。

8. IGFBP7と妊娠成立—リンパ球遊走における役割—

ヒト子宮では月経周期に伴うホルモン動態の変化により、子宮内膜の肥厚、分化が起こるが、子宮内

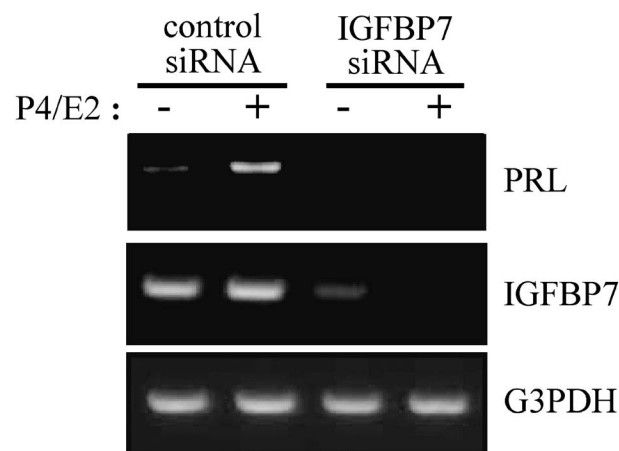


Fig. 8. Effect of IGFBP7 Knockdown on PRL Expression in an Ovarian Steroid-induced Ddecidualization Model

Endometrial stromal cells were treated for 24 h with IGFBP7 siRNA or an irrelevant control siRNA and then cultured for an additional 48 h with or without both 1 μ M progesterone and 10 nM estrogen stimulation. Cellular mRNA was subjected to semi-quantitative RT-PCR analysis.

膜の変化と同時に白血球やリンパ球の子宮内膜への浸潤も同時に起きている。分泌期後期の子宮内膜に存在する白血球やリンパ球は、子宮内膜組織構成細胞の約40%を占めるといわれている。⁴³⁾ この子宮内膜へのリンパ球の浸潤には、インターロイキン(IL)-8やMonokine induced by interferon- γ などのサイトカインが係わることが考えられているが、特に子宮内膜の白血球、リンパ球の大部分を占めるナチュラルキラー(NK)細胞の遊走には10 kDa インターフェロン誘導タンパク質(Interferon- γ inducible protein of 10 kDa, IP-10/CXCL10, IP-10)やIL-15, SDF-1(CXCL12)などが係わっている。⁴⁴⁻⁴⁷⁾ 子宮内膜に存在するNK細胞は、末梢血中に存在しているNK細胞とは異なるサブセットで、細胞障害性や産生するサイトカインなどが異なっている。⁴⁸⁾ この子宮内膜特異的なNK細胞が、子宮内膜の正常な脱落膜化、胎盤形成、胎児-母体間の免疫寛容などに係わると考えられており、習慣性流産を起こす患者では子宮内膜中の内膜特異的NK細胞が減少している。⁴⁹⁾ このNK細胞を子宮内膜へ誘引すると考えられているIP-10は、IGFBP7と結合できることが報告されている。⁵⁰⁾ IP-10の子宮内膜組織における局在は主に内膜腺組織であり、その発現は分泌期に高い。⁴⁵⁾ この局在部位と発現時期はIGFBP7のそれと似ており、子宮内膜におけるIGFBP7とIP-10の関連性が考えられた。そこで、IP-10の持つリンパ球遊走作用に対するIGFBP7の作用について子宮内膜間質細胞を用いて検討したところ、IGFBP7は細胞表面の細胞外基質(ECM)と結合し、IP-10を細胞表面にストアーすることでその局所的濃度を高め、IP-10のリンパ球遊走作用を増強させることを示唆する結果が得られた(薬学会第126年会, 2007)。子宮内膜組織における両タンパク質の局在や、子宮内膜へのリンパ球の遊走時期を考慮すると、IGFBP7がリンパ球の子宮内膜への浸潤に係わっていることが予想される。子宮内膜組織における脱落膜化やリンパ球の存在は正常な妊娠成立に不可欠なため、ラット子宮における役割とは異なるものの、ヒトにおいてもIGFBP7は妊娠に適した環境に維持する役割を持つものと推察できる。

9. 卵巣内IGFBP7発現と卵胞の分化

IGFは、卵巣における卵胞の成熟に係わってお

り、その作用が他のIGFBPにより調節されていることは知られているが、IGFBP7も卵巣に存在している。ウシ黄体やブタ卵巣においてIGFBP7の発現、局在部位が報告されている。^{51,52)} 我々は、IGFBP7がラット成熟卵胞の卵胞液中に分泌され、IGFBP7 mRNAが成熟卵胞の顆粒膜細胞と莢膜に局在していることを明らかにした。⁵³⁾ 顆粒膜細胞は、卵胞内における主要な卵胞ホルモン産生部位であり、排卵後は黄体細胞へと分化する。IGFBP7は、FSHにより発現が誘導されるラット顆粒膜細胞のCYP19A1発現を抑制することでE2産生を阻害する。さらに、IGFBP7発現を特異的siRNAによりノックダウンすると、CYP19A1の基底レベルの発現量が上昇したことから、IGFBP7は卵胞中の顆粒膜細胞に存在する卵胞内ステロイド産生抑制因子であり、卵胞構成細胞の正常な分化に不可欠な因子であることが示唆された。^{53,54)} この考察を支持する報告の1つとして、近年、IGFBP7ノックアウトマウスでは卵胞から形成される黄体に形態的異常がみられることが学会発表されている。なお、IGFBP7は、齧歯類、ウシ、ブタ等のみならず、ヒトの卵巣黄体でも発現が確認されている。⁵⁵⁾

10. 子宮疾患並びに腫瘍、糖尿病とIGFBP7

2種類の抗ヒトIGFBP7抗体を組み合わせたIGFBP7のElisa定量法を確立し、⁴²⁾ ヒト血清中のIGFBP7を測定した。既に、IGFBP7はヒト子宮内膜において月経周期内でその発現量は変化し、最大で約150倍程度の発現量の違いがみられることが報告されていた。⁴¹⁾ もし月経期間内の発現量の変化が血中のIGFBP7量に反映され、疾患において変化するのであれば、疾病の新たな診断マーカーとすることができる可能性がある。しかしながら、月経周期内の血中IGFBP7レベルはほぼ一定であり、子宮内膜において変化するIGFBP7の発現量は、血中のIGFBP7量に変化を与えないことが分かった。また、子宮頸がん患者、食道がん患者、大腸がん患者の血清中IGFBP7量を測定しても健常人とがん患者における血清中IGFBP7量に変化はなく、組織中のIGFBP7の発現量は血清中IGFBP7量に影響を与えないことが判明した。しかし、子宮内膜症患者及び血液透析を行っている糖尿病患者から採取した血液中のIGFBP7量は健常人と比較して有意に上昇していた。特に糖尿病患者では健常人よりも

2倍以上のレベルを有する患者もいた (Fig. 9) (薬学会第125年会, 2006). 糖尿病患者における血中IGFBP7量の増加は Lopez-Bermejo ら⁵⁶⁾が発表しており, その報告において, 血中のIGFBP7量とC-reactive protein量や可溶性2型TNF受容体量が正の相関性を持つことや抗炎症作用を持つアディポネクチンレベルと負の相関性があることなどを報告している. 一方, 子宮内膜症患者では血中のIL-6などの炎症性サイトカイン量が健常人に比べ上昇していることも知られている. IGFBP7は, TGF- β やIGFといったサイトカインによりその発現が誘導されることが報告⁵⁷⁾されており, 子宮内膜症や糖尿病患者における血中IGFBP7量の増加は, 両疾患により増加した血中や腹腔の炎症性サイトカインの作用によるものである可能性が考えられる.

上述したように, IGFBP7はヒトにおいてはほぼ全身に発現しているタンパク質であるが, IGFBP7を発現している組織ががん化した場合, 多くの場合, その発現が失われている. これに関しては乳がんと関連性が詳細に検討されており, IGFBP7は正常乳腺において発現し, がん化すると, IGFBP7の発現が消失する. 乳がん細胞株であるMCF-7細胞においても同様で, IGFBP7を発現していないMCF-7細胞にレトロウイルスベクターを利用してIGFBP7を強制発現させると, その増殖は抑制される. ベクターを導入したMCF-7細胞を培養したコンディションドメディウムを用いてインタクトのMCF-7細胞を培養してもその増殖は抑制される.⁵⁸⁾がん細胞においてIGFBP7の発現が抑制される理

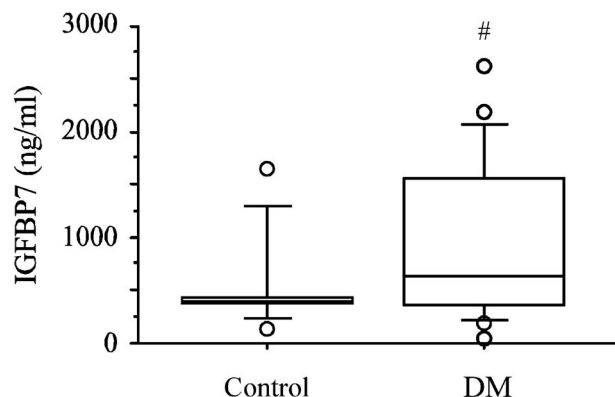


Fig. 9. Serum IGFBP7 Concentrations in the Diabetes Mellitus (DM) Patients with Hemodialysis
Serum from 33 hemodialysis patients with non-DM (15 subjects) or DM (18 patients) was collected. $^{\#}p < 0.01$, vs. control.

由の1つとして, IGFBP7プロモーター領域のCpGアイランドのメチル化が関与しており, MCF-7をはじめとするIGFBP7発現が失われている多くの乳がん細胞においてメチル化が検出されている.⁵⁹⁾このIGFBP7プロモーター領域のメチル化の度合いは, 乳がん患者の病状の進行にも関連し, メチル化の程度が著しい患者ではその後の生存率が低下するという調査結果も得られている.

11. おわりに

ラット及びマウス子宮内でのスタスミン発現は, 着床直後に起こる脱落膜化時に顕著に増加し, 脱落膜の完了とともにそのレベルが低下することから, スタスミンは子宮内膜間質細胞の脱落膜化と密接に関連している. 一方, ヒト子宮内膜間質細胞において, 脱落膜化刺激前にスタスミン発現を抑えると脱落膜化が阻害されたことから, 詳細なメカニズムは検討中であるが, スタスミンは, 増殖性の細胞から脱落化に伴い分泌型の細胞に変化する際の分化の準備又は開始に必要な分子であることが示唆された. このように, スタスミンは, 子宮内膜間質細胞の脱落膜化に関与する細胞内調節因子であることが明らかとなった. この生理学的知見は将来, 生殖系医療に寄与するかもしれない. また, 最近の当研究室の研究でスタスミンが栄養膜細胞の遊走に関与する結果や細胞内のVEGF発現シグナル系にリンクしている知見も得られているので, 今後の機能解析に期待したい. 一方, IGFBP7は, それを産生する各組織において正常な細胞機能を維持しているように思える. IGFBP7の存在ががんの悪性化を阻止するという報告もあり,⁶⁰⁾生殖臓器においても同様の役割を持つかもしれない. IGFBP7に関する報告は癌組織における報告は多いものの, 正常組織における役割についてはまだ本質的な活性が解明されているとは言い難く, これからの研究の進展が期待される.

REFERENCES

- 1) Johnson D. C., Kogo H., Sen M., Dey S. K., *Toxicology*, **53**, 79-87 (1988).
- 2) Johnson D. C., Sen M., Kogo H., Dey S. K., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **195**, 44-50 (1990).
- 3) Sobel A., Tashjian Jr. A. H., *J. Biol. Chem.*, **258**, 10312-10324 (1983).
- 4) Sobel A., Boutterin M. C., Beretta L.,

- Chneiweiss H., Doye V., Peyro-Saint-Paul H., *J. Biol. Chem.*, **264**, 3765–3772 (1989).
- 5) Belmont L. D., Mitchison T. J., *Cell*, **84**, 623–631 (1996).
- 6) Curmi P. A., Andersen S. S., Lachkar S., Gavet O., Karsenti E., Knossow M., Sobel A., *J. Biol. Chem.*, **272**, 25029–25036 (1997).
- 7) Howell B., Larsson N., Gullberg M., Casimeris L., *Mol. Biol. Cell*, **10**, 105–118 (1999).
- 8) Marklund U., Larsson N., Gradin H. M., Brattsand G., Gullberg M., *EMBO J.*, **15**, 5290–5298 (1996).
- 9) Marklund U., Brattsand G., Shingler V., Gullberg M., *J. Biol. Chem.*, **268**, 15039–15047 (1993).
- 10) Luo X. N., Mookerjee B., Ferrari A., Mistry S., Atweh G. F., *J. Biol. Chem.*, **269**, 10312–10318 (1994).
- 11) Larsson N., Melander H., Marklund U., Osterman O., Gullberg M., *J. Biol. Chem.*, **270**, 14175–14183 (1995).
- 12) Beretta L., Dobransky T., Sobel A., *J. Biol. Chem.*, **268**, 20076–20084 (1993).
- 13) Melander Gradin H., Marklund U., Larsson N., Chatila T. A., Gullberg M., *Mol. Cell Biol.*, **17**, 3459–3467 (1997).
- 14) Gradin H. M., Larsson N., Marklund U., Gullberg M., *J. Cell Biol.*, **140**, 131–141 (1998).
- 15) Ozon S., Maucuer A., Sobel A., *Eur. J. Biochem.*, **248**, 794–806 (1997).
- 16) Stein R., Mori N., Matthews K., Lo L. C., Anderson D. J., *Neuron*, **1**, 463–476 (1988).
- 17) Maucure A., Moreau J., Méchali M., Sobel A., *J. Biol. Chem.*, **268**, 16420–16429. (1993).
- 18) Ozon S., Byk T., Sobel A., *J. Neurochem.*, **70**, 2386–2396 (1998).
- 19) Bieche I., Maucuer A., Laurendeau I., Lachkar S., Spano A. J., Frankfurter A., Lévy P., Manceau V., Sobel A., Vidaud M., Curmi P. A., *Genomics*, **81**, 400–410 (2003).
- 20) Schubart U. K., Yu J., Amat J. A., Wang Z., Hoffmann M. K., Edelmann W., *J. Biol. Chem.*, **271**, 14062–14066 (1996).
- 21) Liedtke W., Leman E. E., Fyffe R. E., Raine C. S., Schubart U., *Am. J. Pathol.*, **160**, 469–480 (2002).
- 22) Shumyatsky G. P., Malleret G., Shin R. M., Takizawa S., Tully K., Tsvetkov E., Zakharenko S. S., Joseph J., Vronskaya S., Yin D., Schubart U. K., Kandel E. R., Bolshakov V. Y., *Cell*, **123**, 697–709 (2005).
- 23) Paria B. C., Lim H., Das S. K., Reese J, Dey S. K. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **11**, 67–76 (2000).
- 24) Tamura K., Hara T., Yoshie M., Irie S., Sobel A., Kogo H., *Endocrinology*, **144**, 1464–1473 (2003).
- 25) Yoshie M., Tamura K., Kogo H., *Placenta*, **25**, 449–455 (2004).
- 26) Yoshie M., Tamura K., Hara T., Kogo H., *Mol. Reprod. Dev.*, **73**, 164–172 (2006).
- 27) Tamura K., Yoshie M., Nishi H., Osakabe Y., Isaka K., Hara T., Kogo H., *Reproduction*, **132**, 625–636 (2006).
- 28) Tamura K., Yoshie M., Hara T., Isaka K., Kogo H., *J. Reprod. Dev.*, **53**, 525–533 (2007).
- 29) Friedrich B., Grönberg H, Landström M., Gullberg M., Bergh A., *Prostate*, **27**, 102–109 (1995).
- 30) Ghosh R., Gu G., Tillman E., Yuan J., Wang Y., Fazli L., Rennie P. S., Kasper S., *Prostate*, **67**, 1038–1052 (2007).
- 31) Price D. K., Ball J. R., Bahrani-Mostafavi Z., Vachris J. C., Kaufman J. S., Naumann R. W., Higgins R.V., Hall J.B., *Cancer Invest.*, **18**, 722–730 (2000).
- 32) Curmi P. A., Nogues C., Lachkar S., Carelle N., Gonthier M. P., Sobel A., Lidereau R., Bieche I., *Br. J. Cancer*, **82**, 142–150 (2000).
- 33) Mistry S. J., Bank A., Atweh G. F., *Mol. Cancer Ther.*, **4**, 1821–1829 (2005).
- 34) Mistry S. J., Atweh G. F., *Mol. Cancer Ther.*, **5**, 3248–3257 (2006).
- 35) Mistry S. J., Bank A., Atweh G. F., *Mol. Cancer Res.*, **5**, 773–782 (2007).
- 36) Hwa V., Oh Y., Rosenfeld R. G., *Endocr. Rev.*, **20**, 761–787 (1999).
- 37) Yamanaka Y., Wilson E. M., Rosenfeld R. G., Oh Y., *J. Biol. Chem.*, **272**, 30729–30734 (1997).
- 38) Degeorges A., Wang F., Frierson Jr. H. F., Seth A., Sikes R. A., *J. Histochem. Cytochem.*, **48**, 747–754 (2000).
- 39) Paria B. C., Reese J., Das S. K., Dey S. K., *Science*, **296**, 2185–2188 (2002).

- 40) Tamura K., Hara T., Kutsukake M., Iwatsuki K., Yanagida M., Yoshie M., Kogo H., *Endocrinology*, **145**, 5243–5251 (2004).
- 41) Dominguez F., Avila S., Cervero A., Martin J., Pellicer A., Castrillo J. L., Simon C., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **88**, 1849–1857 (2003).
- 42) Kutsukake M., Ishihara R., Yoshie M., Kogo H., Tamura K., *Mol. Hum. Reprod.*, **13**, 737–743 (2007).
- 43) King A., *Hum. Reprod. Update.*, **6**, 28–36 (2000).
- 44) Jones R. L., Hannan N. J., Kaitu'u T. J., Zhang J., Salamonsen L. A., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**, 6155–6167 (2004).
- 45) Kitaya K., Nakayama T., Daikoku N., Fushiki S., Honjo H., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**, 2470–2476 (2004).
- 46) Kitaya K., Yamaguchi T., Honjo H., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **90**, 2932–2940 (2005).
- 47) Hanna J., Wald O., Goldman-Wohl D., Prus D., Markel G., Gazit R., Katz G., Haimov-Kochman R., Fujii N., Yagel S., Peled A., Mandelboim O., *Blood.*, **102**, 1569–1577 (2003).
- 48) Hanna J., Goldman-Wohl D., Hamani Y., Avraham I., Greenfield C., Natanson-Yaron S., Prus D., Cohen-Daniel L., Arnon T. I., Manaster I., Gazit R., Yutkin V., Benharroch D., Porgador A., Keshet E., Yagel S., Mandelboim O., *Nat. Med.*, **12**, 1065–1074 (2006).
- 49) Yamamoto T., Takahashi Y., Kase N., Mori H., *Am. J. Reprod. Immunol.*, **41**, 337–342 (1999).
- 50) Nagakubo D., Murai T., Tanaka T., Usui T., Matsumoto M., Sekiguchi K., Miyasaka M., *J. Immunol.*, **171**, 553–561 (2003).
- 51) Casey O. M., Fitzpatrick R., McInerney J. O., Morris D. G., Powell R., Sreenan J. M., *Biochem. Biophys. Acta*, **1679**, 10–17 (2004).
- 52) Wandji S. A., Gadsby JE, Barber J. A., Hammond J. M., *Endocrinology*, **141**, 2648–2657 (2000).
- 53) Tamura K., Matsushita M., Endo A., Kutsukake M., Kogo H., *Biol. Reprod.*, **77**, 485–491 (2007).
- 54) Tamura K., Kutsukake M., Endo A., Kogo H., *Jpn. J. Reprod. Endocrinol.*, **11**, 21–25 (2006).
- 55) Phan B., Rakenius A., Pietrowski D., Bettendorf H., Keck C., Herr D., *Mol. Reprod. Dev.*, **73**, 878–884 (2006).
- 56) López-Bermejo A., Khosravi J., Fernández-Real J.M., Hwa V., Pratt K. L., Casamitjana R., Garcia-Gil M. M., Rosenfeld R. G., Ricart W., *Diabetes*, **55**, 2333–2339 (2006).
- 57) Hwa V., Tomasini-Sprenger C., Bermejo A. L., Rosenfeld R. G., Plymate S. R., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 4355–4362 (1998).
- 58) Burger A. M., Leyland-Jones B., Banerjee K., Spyropoulos D. D., Seth A. K., *Eur. J. Cancer*, **41**, 1515–1527 (2005).
- 59) Smith P., Nicholson L. J., Syed N., Payne A., Hiller L., Garrone O., Occelli M., Gasco M., Crook T., *Clin. Cancer Res.*, **13**, 4061–4068 (2007).
- 60) Sato Y., Chen Z., Miyazaki K., *Cancer Sci.*, **98**, 1055–1063 (2007).