

マウス子宮内膜における インスリン様成長因子結合タンパク質3の役割

Insulin-like growth factor binding protein 3 in the mouse endometrium

前川 哲弥・竹内 栄・高橋 純夫

Tetsuya Maekawa, Sakae Takeuchi, Sumio Takahashi

岡山大学大学院自然科学研究科生体統御学グループ

Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

はじめに

哺乳類の子宮内膜は、上皮細胞と間質細胞で構成されている。ラットやマウスの子宮内膜上皮細胞と間質細胞の増殖は、発情周期に伴い変化する。図1にラットの子宮内膜の上皮細胞と間質細胞のDNA合成細胞数の割合の変化を示している。上皮細胞では、発情前期と発情間期1日目に、また間質細胞では発情間期の2日目にそれぞれDNA合成細胞が増加し、それについて細胞分裂が起きることが分かる。これらの子宮内膜細胞の細胞分裂は、卵巣から分泌される発情ホルモンと黄体ホルモンによって制御されている。すなわち、上皮細胞の増殖は、発情ホルモンによって、間質細胞の増殖は黄体ホルモンと発情ホルモンの両ホルモンによって促進されている[1]。この性ステロイドホルモンによる子宮内膜上皮細胞増殖は、子宮内膜内で産生される成長因子によって担われていることが知られている[2]。また、子宮内膜間質細胞の増殖も子宮内膜で産生される成長因子によって制御される[3, 4]。

インスリン様成長因子1 (IGF1) は、子宮内膜で産生され、マウス子宮内膜の上皮細胞や間質細胞の細胞増殖を促進する[5, 6]。また、IGF1の発現は発情ホルモンによって促進され[7, 8]、発情周期にともない子宮での遺伝子発現も変動する(図1)。したがって、IGF1は、子宮内膜上皮細胞や間質細胞の増殖制御に重要な役割を担っていると考えられる。

インスリン様成長因子結合タンパク質(IGFBP)は、6種のサブタイプが知られている。その一種であるIGFBP3は、多くの組織で大量に発現している。IGFBP3は、IGF1と結合し、IGF1作用を阻害し、IGF1の半減期を延長することが知られている[9]。また、IGFBP3は、IGFBP3受容体(Lrp1)に結合し、細胞増殖を直接的に抑制することも知られている[10]。

マウス子宮においてもIGFBP3は発現し、発情周期にともない変動する[11-13]。したがって、子宮内膜のIGFBP3は、性ステロイドホルモンの制御を受けて産生が制御され、分泌されたIGFBP3はIGF1作用を制御していることが考えられる。そこで、我々は子宮内膜間質細胞培養系を用いてIGFBP3の細胞増殖に及ぼす作用を解析した。

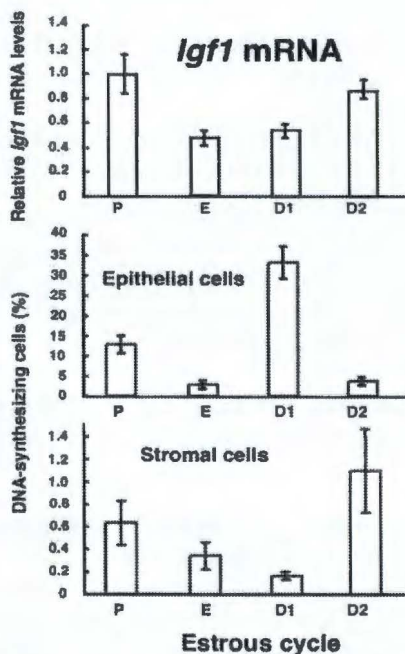


図1 成熟ラット子宮におけるインスリン様成長因子1 (IGF1) mRNA と上皮細胞と間質細胞におけるDNA合成細胞数の割合。Igf1 mRNAは、半定量RT-PCR法により、DNA合成細胞はプロモデオキシウリチンの核への取込を免疫組織化学的に検出して同定した。

材料と方法

子宮内膜上皮細胞と間質細胞の培養

ICR系雌マウス(21-23日齢)を用いた。子宮から子宮内膜上皮細胞と間質細胞を単離し、無血清培養をおこなった[5, 14]。単離した上皮細胞はコラーゲンでコートした培養皿に、間質細胞はpoly-L-lysineでコートした培養皿に蒔き、Dulbecco改変Eagle培地とHam F12培地の1:1混合の培養液で培養した[15]。

ホルモンおよびIGF1の投与

Estradiol-17 β (E2), progesterone (P4)はSigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)から購入し、培養細胞には24時間作用させた。IGF1 (recombinant human, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala,

Sweden), IGFBP3 (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA)をもちいて、上皮細胞には48時間、間質細胞には16時間作用させた。

DNA合成細胞の検出

DNA合成は、Cell Proliferation ELISA Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いて検出した。培養液中にプロモデオキシウリジン (100 μ M)を4時間投与し、その間のDNA合成を測定した。

RNA抽出と逆転写、PCR増幅

RNAは培養細胞からシングルステップ法により抽出した[16]。RNAはThermoscript Reverse Transcriptase (Invitrogen, CA, USA)により逆転写し、*Igf1*, *Igfbp3*, IGF1受容体(IGF1R, *Igf1r*) mRNAを下に示す特異的プライマーを用いてTakaraTaq (Takara Bio, Otsu, Japan)によりRT-PCR法により増幅した。内部標準としてリボソームタンパク質L19 (*Rpl19*)を用いた。

Igf1 (FP, GTCGTCTTCACACCTCTTCTACCT; RP, TAAAAGCCCCTCGGTCCACACAC), *Igf1r* (FP, TTCTTCTATGTCCCGCCAAA; RP, AGCCTCGTTTACCGTCTTGAT), *Igfbp3* (FP, TAAGCACCTACCTCCCTCCCAACCT; RP, TTITGGGATGTGGACGCCTCTGGGACT), *Rpl19* (FP, GAAATCGCCAATGCCAACTC; RP, TCTTAGACCTGCGAGCCTCA)。

統計処理

データは平均値と標準誤差で表し、分散分析法で解析した。群間の差はTukeyテストにより検定した。

結果

マウス子宮内膜におけるIGF1による細胞増殖の促進とIGFBP3による阻害作用

子宮内膜上皮細胞と間質細胞を、IGF1 (100 ng/ml)の存在条件下または非存在条件下で培養し、あわせてIGFBP3を作用させた。なお、各処理は上皮細胞には48時間、間質細胞には16時間行った。上皮細胞と間質細胞の両細胞において、IGF1はDNA合成を促進した。IGFBP3 (1, 100 mM)は、IGF1のDNA合成促進作用を抑制した(図2)。IGFBP3単独では、抑制作用は認められなかった。

マウス子宮内膜におけるE2とP4による*Igf1*, *Igfbp3*, *Igf1r*のmRNA発現に及ぼす効果

子宮内膜の上皮細胞と間質細胞にE2 (10^{-9} M)とP4 (10^{-7} M)を投与し、24時間後の各遺伝子の発現を半定量的RT-PCR法により解析した。子宮内膜上皮細胞においては、E2により*Igfbp3* mRNA量が有意に増加した。また、E2+P4投与により、*Igfbp3* mRNAと*Igf1r* mRNA量が増加した。子宮内膜間質細胞においては、E2投与により*Igf1* mRNA量は増加し、*Igfbp3* mRNA量は低下した。P4投与により、*Igfbp3* mRNA量は増加した。また、E2+P4投与により、*Igfbp3* mRNA量は低下した(図3)。

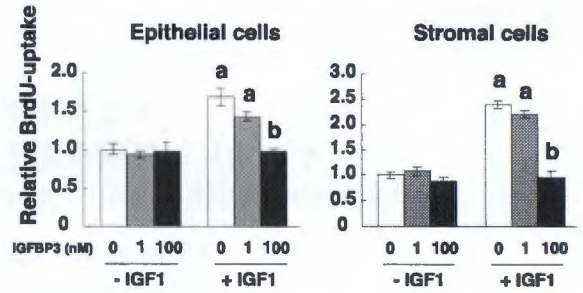


図2 マウス子宮内膜の上皮細胞と間質細胞におけるIGF1とIGFBP3投与によるDNA合成細胞数の割合の変化。DNA合成細胞はプロモデオキシウリジンの核への取込を免疫組織化学的に検出して同定した。a: $p < 0.05$, 対応する対照群(-IGF1)と比較して有意の差; b: $p < 0.05$, 対応するIGF1処理の対照群(+IGF1)と比較して有意の差。

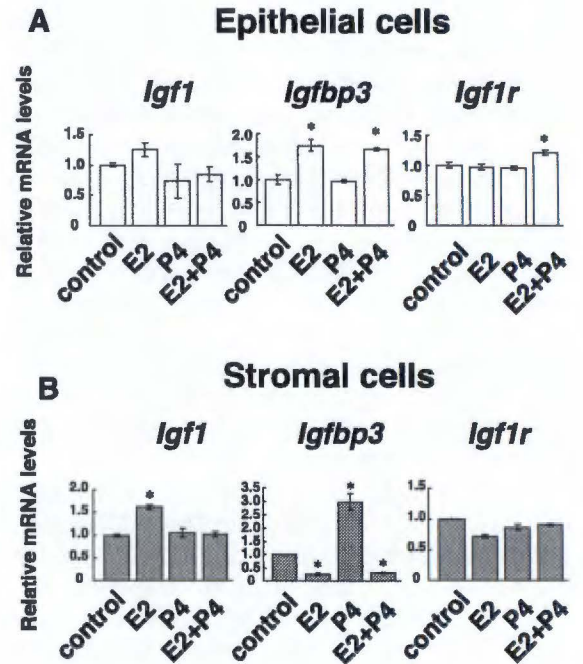


図3 マウス子宮内膜の上皮細胞(A)と間質細胞(B)におけるE2とP4投与による*Igf1*, *Igfbp3*, *Igf1r* mRNA発現の変化。各mRNAは、半定量的RT-PCR法により測定し、*Rpl19* mRNAを内部標準とした。*: $p < 0.05$, 対照群と比較して有意の差。

考察

IGFBP3は、様々な組織や細胞の増殖を阻害することが知られている[17-19]。本研究において、IGFBP3は、マウス子宮内膜細胞に対するIGF1の細胞増殖促進作用を阻害することが示された[15]。その一方、IGFBP3単独の細胞増殖抑制作用は認められなかった。子宮内膜細胞において、IGF1とIGFBP3はともに発現しているため、子宮内膜内でIGFBP3が傍分泌的にIGF1作用を調節する可能性が示唆された。

Igf1 mRNA 発現は、子宮内膜上皮細胞においては E2 により促進されるが、間質細胞においては抑制される。また、子宮間質細胞においてのみ、P4 は *Igf1* mRNA 発現を促進することが分かり、*Igf1* の転写は組織特異的な機構により制御されていることが示唆された。

Igf1 発現は、子宮内膜間質細胞において E2 により促進される。その一方、*Igf1* 発現は抑制されるので、IGFBP3 の発現は低下し、IGFBP3 の IGF1 抑制作用も減弱され、IGF1 の細胞増殖効果が高まることが推察される。しかしながら、子宮内膜上皮細胞においては、E2 により *Igf1* 発現は促進されるので、E2 による上皮細胞の増殖促進効果とは一致せず、さらに検討を進める必要がある。

要 約

マウス子宮内膜における IGFBP3 の発現と、その生理作用について解析した。IGFBP3 は、IGF1 の子宮内膜上皮細胞と間質細胞の増殖促進作用を阻害することが分かった。また、子宮内膜の上皮細胞と間質細胞とでは、*Igf1* の発現におよぼす E2 効果が異なり、*Igf1* の転写制御機構が組織により異なることが示唆された。

参考文献

- Huet-Hudson YM, Andrews GK, Dey SK (1989) Cell type-specific localization of *c-myc* protein in the mouse uterus: modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period. *Endocrinology* 125: 1683-1690
- Cooke PS, Buchanan DL, Young P, Setiawan Y, Brody J, Korach KS, Taylor J, Lubahn DB, Cunha GR (1997) Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6535-6540
- Beck CA, Garner CW (1992) Stimulation of DNA synthesis in rat uterine cells by growth factors and uterine extracts. *Mol Cell Endocrinol* 84: 109-118
- Komatsu N, Maekawa T, Takeuchi S, Takahashi S (2003) Epidermal growth factor and transforming growth factor- α stimulate the proliferation of mouse uterine stromal cells. *Zool Sci* 20: 639-645
- Shiraga M, Takahashi S, Miyake T, Takeuchi S, Fukamachi H (1997) Insulin-like growth factor-I stimulates proliferation of mouse uterine epithelial cells in primary culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 215: 412-417
- Inoue A, Takeuchi S, Takahashi S (2005) Insulin-like growth factor-I stimulated DNA replication in mouse endometrial stromal cells. *J Reprod Dev* 51: 305-313
- Murphy LJ, Murphy LC, Friesen HG (1987) Estrogen induces insulin-like growth factor-I expression in the rat uterus. *Mol Endocrinol* 1: 445-450
- Ohtsuki T, Otsuki M, Murakami Y, Hirata K, Takeuchi S, Takahashi S (2007) Alternative leader-exon usage in mouse IGF-I mRNA variants: class 1 and class 2 IGF-I mRNAs. *Zool Sci* 24: 241-247
- Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG (1999) The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20: 761-787
- Mochizuki T, Sakai K, Iwashita M (2006) Effects of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 (IGFBP-3) on endometrial cancer (HHUA) cell apoptosis and EGF stimulated cell proliferation in vitro. *Growth Horm IGF Res* 16: 202-210
- Girvigian MR, Nakatani A, Ling N, Shimasaki S, Erickson GF (1994) Insulin-like growth factor binding proteins show distinct patterns of expression in the rat uterus. *Biol Reprod* 51: 296-302
- Molnar, P Murphy, LJ (1994) Effects of oestrogen on rat uterine expression of insulin-like growth factor-binding proteins. *J Mol Endocrinol* 13: 59-67
- Tang XM, Rossi MJ, Masterson BJ, Chegini N (1994) Insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-I receptors, and IGF binding proteins 1-4 in human uterine tissue: tissue localization and IGF-I action in endometrial stromal and myometrial smooth muscle cells in vitro. *Biol Reprod* 50: 1113-1125
- Ross AK, Nelson KG, Sakai, Y, Fukamachi H, Burroughs CD, McLachlan JA (1993) Isolation and culture of mouse uterine epithelial and stromal cells, in *Methods in Toxicology* Heindel JJ, and Chapin RE, Editors. Academic Press, Inc., San Diego. p. 371-385
- Maekawa T, Takeuchi S, Kanayama M, Takahashi S (2009) Estradiol, progesterone, and transforming growth factor α regulate insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP3) expression in mouse endometrial cells. *Zool Sci* 26: 131-138
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159
- Huynh H, Chow P, Ooi L, Soo K (2002) A possible role for insulin-like growth factor-binding protein-3 autocrine

- /paracrine loops in controlling hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Cell Growth Differ* 13: 115 - 122
18. Mishra S, Murphy LJ (2004) The effects of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) on T47D breast cancer cells enriched for IGFBP-3 binding sites. *Mol Cell Biochem* 267: 83-89
19. Duan C, Xu Q (2005) Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *Gen Comp Endocrinol* 142: 44-52