



A Novel Selective Progesterone Receptor Modulator Asoprisnil activates Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)-mediated Signaling Pathway in Cultured...

佐々木, 紘子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4065

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004065>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	佐々木 絃子
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 1867 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 19 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

A Novel Selective Progesterone Receptor Modulator Asoprisnilactivates Tumor Necrosis
Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)-mediated Signaling Pathway in Cultured
Human Uterine Leiomyoma Cells in the Absence of Comparable Effectson Myometrial （選択的プ
ロゲステロン受容体モジュレーターAsoprisnil は培養ヒト子宮筋腫細胞において Tumor Necrosis
Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)を介したアポトーシスを誘導する）

審 査 委 員

主 査	教 授	藤澤 正人
	教 授	横野 浩一
	教 授	杉村 和朗

子宮筋腫は性成熟婦人において最も発生頻度の高い良性子宮平滑筋腫瘍である。従来より、主にエストロゲンが子宮筋腫の発育を促進すると考えられてきたが、我々の教室における一連の研究でプロゲステロンも子宮筋腫の増殖・アポトーシスに関与し、その発育を促進することが明らかとなった。子宮筋腫患者は、過多月経や月経困難症などにより子宮摘出を余儀なくされることが多いが、保存的治療により子宮筋腫縮小を図り、過多月経や月経困難症の改善を図る試みもなされている。近年、11 β -benazaldoxime 置換型 J-compound である選択的プロゲステロン受容体モデュレーターである asoprisnil が開発された。asoprisnil はプロゲステロン受容体に対してプロゲステロンと比べて 3 倍の結合親和性を有するが、エストロゲン受容体に対する親和性はない。有症状の子宮筋腫女性に対して asoprisnil を用いた randomized controlled trial の成績が報告され、asoprisnil 25 mg、12 週間経口投与により子宮筋腫体積縮小率は 36%に達し、子宮筋腫随伴症状の軽快が認められたことから、asoprisnil の子宮筋腫治療に対する有用性が示された。しかし、asoprisnil が子宮筋腫縮小をきたす機序に関して不明な点が多い。我々は、無血清培養系を用いて asoprisnil の培養筋腫細胞の増殖能とアポトーシスに及ぼす影響を培養正常子宮平滑筋細胞との対比において検討した成績では、asoprisnil 添加により培養筋腫細胞の増殖能が抑制され、epidermal growth factor、insulin-like growth factor-I および transforming growth factor β 3 とこれら局所成長因子の受容体発現が減少し、さらに内因性アポトーシス経路に関わる Bcl-2 発現の抑制、caspase cascade の活性化を介してアポトーシスが誘導されることを見出した。一方、asoprisnil 添加は培養正常子宮平滑筋細胞の増殖能とアポトーシスに

影響を与えなかった。

今回の研究では、asoprisnil が培養筋腫細胞において tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)を介した外因性のアポトーシス経路の賦活化に及ぼす影響を培養ヒト正常子宮平滑筋細胞との対比において検討を行った。

asoprisnil 添加により培養子宮筋腫細胞の TRAIL、death receptor (DR) 4、DR5、caspase-8、-7、-3 発現が増加し、一方アポトーシス阻害蛋白の X-linked chromosome-linked IAP (XIAP)発現が減少することを認めた。しかし、asoprisnil は正常子宮平滑筋細胞の TRAIL 経路を活性化せず、アポトーシス阻害蛋白発現に影響を及ぼさなかった。

当院倫理委員会承認のもとに、手術時摘出された子宮筋腫組織と正常子宮平滑筋組織からそれぞれの細胞を単離し、10%FBSを含む Phenol-redを含まないDMEMで120時間予備培養をした後、無血清培地に変えて各種濃度のasoprisnil (10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} M)を添加下および非添加下に培養した。添加後4時間、8時間および24時間におけるアポトーシス誘導蛋白発現(TRAIL、death receptor (DR) 4、DR5、cleaved caspase-8、-7、-3、cleaved PARP) およびアポトーシス抑制蛋白発現(cellular inhibitor of apoptosis protein (cIAP)-1, cIAP-2, X-linked chromosome-linked IAP (XIAP)をウエスタンブロット法にて検討した。また、プロゲステロンのTRAIL経路関連蛋白発現とアポトーシス誘導にasoprisnilが拮抗するか検討した。まず、asoprisnil添加後の培養筋腫細胞のTRAIL、DR、caspase蛋白発現の時間的推移を検討したところ、培養ヒト子宮筋腫細胞でのTRAIL発現は 10^{-7} M以上のasoprisnil添加後8時間と24時間で非添加群に比し有意に増加した。培養筋腫細胞でのDR4とDR5蛋白発現は 10^{-6} Mの asoprisnil添加後4時間、ま

た 10^{-7} M以上のasoprisnil添加後 8 時間と 24 時間で非添加群に比し有意に増加した。培養筋腫細胞でのcleaved caspase-8 蛋白発現は 10^{-6} M asoprisnil添加後 4 時間と 8 時間、また 10^{-7} M以上のasoprisnil添加後 24 時間で非添加群に比し有意に増加した。さらに培養筋腫細胞でのcleaved caspase-7 蛋白発現は 10^{-7} M asoprisnil添加後 24 時間で非添加群に比して有意に増加し、cleaved caspase-3 蛋白発現は 10^{-8} M および 10^{-7} M添加後 24 時間で非添加群に比して有意に増加した。一方、asoprisnil添加により培養正常子宮平滑筋細胞のTRAIL、DR4、DR5、caspases蛋白発現に影響はみられなかった。

次に、培養筋腫細胞において、 10^{-7} M のasoprisnil添加(8 時間)により増加したDR4 とcleaved PARP蛋白発現は 100 ng/mlのプロゲステロン同時添加により拮抗を受け、有意に減少した。また、有意差は認められなかったがasoprisnil添加により増加したTRAILとDR5 蛋白発現もプロゲステロンの同時添加により減少した。

asoprisnil添加後の培養筋腫細胞のXIAP、cIAP-1 とcIAP-2 蛋白発現の時間的推移を検討したところ、培養ヒト子宮筋腫細胞でのXIAP発現は 10^{-6} M添加後 4 時間で有意に減少し、 10^{-7} M以上のasoprisnil添加後 8 時間においてXIAPとcIAP-1 発現は減少傾向を示した。しかし、asoprisnil添加は培養筋腫細胞のcIAP-2 発現には影響を与えなかった。一方、asoprisnil添加により培養正常子宮平滑筋細胞のXIAP、cIAP-1 とcIAP-2 蛋白発現に影響はみられなかった。

以上より、asoprisnil は培養筋腫細胞に対してプロゲステロン アンタゴニストとして作用し、TRAIL を介したアポトーシス経路を活性化するとともに、アポトーシス抑制蛋白発現を抑制することで、アポトーシス誘導をきたすことが明らかになった。

本研究は、プロゲステロン受容体モジュレーターである asoprisnil が培養筋腫細胞に対して TRAIL 経路を介してアポトーシスを促進することを世界に先駆けて明らかにしたものとして価値ある集積である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1 8 6 9 号	氏 名	佐々木 絃子
論文題目 Title of Dissertation	A Novel Selective Progesterone Receptor Modulator Asoprisnil activates Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand(TRAIL)-mediated Signaling Pathway in Cultured Human Uterine Leiomyoma Cells in the Absence of Comparable Effects on Myometrial Cells 選択的プロゲステロン受容体モジュレーターAsoprisnil は培養ヒト子宮筋腫細胞において Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand(TRAIL)を介 したアポトーシスを誘導する		
審査委員 Examiner	主 査 蔭澤 正人 Chief Examiner 副 査 横野 浩一 Vice-examiner 副 査 杉村 和朗 Vice-examiner		
審査終了日	平成 19 年 7 月 1 8 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

子宮筋腫は性成熟婦人において最も発生頻度の高い良性子宮平滑筋腫瘍である。子宮筋腫患者は、過多月経や月経困難症などにより子宮摘出を余儀なくされることが多いが、保存的治療により子宮筋腫縮小を図り、過多月経や月経困難症の改善を図る試みもなされている。近年、11s-benazaldoxime 置換型 J-compound である選択的プロゲステロン受容体モジュレーターである asoprisnil が開発された。asoprisnil はプロゲステロン受容体に対してプロゲステロンと比べて 3 倍の結合親和性を有するが、エストロゲン受容体に対する親和性はない。有症状の子宮筋腫女性に対して asoprisnil を用いた randomized controlled trial の成績が報告され、asoprisnil 25 mg、12 週間経口投与により子宮筋腫体積縮小率は 36%に達し、子宮筋腫随伴症状の軽快が認められたことから、asoprisnil の子宮筋腫治療に対する有用性が示されている。しかし、asoprisnil が子宮筋腫縮小をきたす機序に関して不明な点が多い。著者らは、すでに無血清培養系を用いて asoprisnil により培養子宮筋腫細胞の増殖能が抑制され、アポトーシスが誘導されることを見出している。

本研究は、培養ヒト正常子宮平滑筋細胞、培養子宮筋腫細胞を用いて tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)を介した外因性のアポトーシス経路の賦活化に及ぼす asoprisnil の影響について検討を行っている。まず、著者らは asoprisnil 添加による培養子宮筋腫細胞の TRAIL、death receptor (DR) 4、DR5、caspase-8、-7、-3 の発現の変化について検討した。asoprisnil 添加後の培養筋腫細胞の TRAIL、DR、caspase 蛋白発現の時間的推移を検討したところ、培養ヒト子宮筋腫細胞での TRAIL 発現は 10^{-7} M 以上の asoprisnil 添加後 8 時間と 24 時間で非添加群に比し有意に増加した。培養筋腫細胞での DR4 と DR5 蛋白発現は 10^{-6} M の asoprisnil 添加後 4 時間、また 10^{-7} M 以上の asoprisnil 添加後 8 時間と 24 時間で非添加群に比し有意に増加した。培養筋腫細胞での cleaved caspase-8 蛋白発現は 10^{-6} M asoprisnil 添加後 4 時間と 8 時間、また 10^{-7} M 以上の asoprisnil 添加後 24 時間で非添加群に比し有意に増加した。さらに、培養筋腫細胞での cleaved caspase-7 蛋白発現は 10^{-7} M asoprisnil 添加後 24 時間で非添加群に比して有意に

増加し、cleaved caspase-3 蛋白発現は 10^{-8} M および 10^{-7} M 添加後 24 時間で非添加群に比して有意に増加した。一方、asoprisnil 添加により培養正常子宮平滑筋細胞の TRAIL、DR4、DR5、caspases 蛋白発現に影響はみられなかった。次に、プロゲステロンの TRAIL 経路関連蛋白発現とアポトーシス誘導に asoprisnil が拮抗するか検討した。培養筋腫細胞において、 10^{-7} M の asoprisnil 添加(8 時間)により増加した DR4 と cleaved PARP 蛋白発現は 100 ng/ml のプロゲステロン同時添加により拮抗を受け、有意に減少した。また、有意差は認められなかったが asoprisnil 添加により増加した TRAIL と DR5 蛋白発現もプロゲステロンの同時添加により減少した。さらに、asoprisnil 添加後の培養筋腫細胞の XIAP、cIAP-1 と cIAP-2 蛋白発現の時間的推移を検討したところ、培養ヒト子宮筋腫細胞での XIAP 発現は 10^{-6} M 添加後 4 時間で有意に減少し、 10^{-7} M 以上の asoprisnil 添加後 8 時間において XIAP と cIAP-1 発現は減少傾向を示した。しかし、asoprisnil 添加は培養筋腫細胞の cIAP-2 発現には影響を与えなかった。一方、asoprisnil 添加により培養正常子宮平滑筋細胞の XIAP、cIAP-1 と cIAP-2 蛋白発現に影響はみられなかった。以上より、著者らは asoprisnil は培養筋腫細胞に対してプロゲステロン アンタゴニストとして作用し、TRAIL を介したアポトーシス経路を活性化するとともに、アポトーシス抑制蛋白発現を抑制することで、アポトーシス誘導をきたすことを明らかにした。

本研究は、プロゲステロン受容体モジュレーターである asoprisnil の培養子宮筋腫細胞におけるアポトーシス経路への影響について研究を行ったものであるが、従来ほとんど行われなかった TRAIL 経路を介したアポトーシスの促進について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。