Japan Society of Obstetrics and Gynecology

日本産科婦人科学会雑誌 ACTA OBST GYNAEC JPN Vol. 52, No. 8, pp.1179—1189, 2000（平成12, 8月）

シンポジウム2 子宮内膜の機能とその異常

細胞周期調節因子からみた正常子宮内膜および内膜癌の増殖制御機序

信州大学医学部産婦人科
塩 沢 丹 里

Involvement of the Cell Cycle-related Molecules in Steroid Hormone-dependent Growth of the Normal and Neoplastic Human Endometrium

Tanri SHIOZAWA
Department of Obstetrics and Gynecology, Shinshu University School of Medicine, Nagano

Key words: Endometrium · Endometrial carcinoma · Cyclin · Cyclin-dependent kinase · p27

目 的

子宮内膜腺上皮は，増殖期にはエストロゲンの作用により活発に増殖し，排卵後はプロゲステロンの作用により速やかに増殖を停止し着床に必要な分泌能を獲得する．月経周期という短期間内に起きるこの極めてダイナミックな形態的・機能的な変化は腺上皮の有するエストロゲン受容体(ER)やプロゲステロン受容体(PR)を介して引き起こされると考えられる．また一部の子宮内膜癌も正常子宮内膜腺上皮と同様ERやPRを発現し，その増殖がやはりエストロゲンで刺激され，プロゲステロンで抑制される．性ステロイド受容体を有する正常内膜腺上皮や内膜癌の性ステロイドによる増殖の制御機構は現在まで，性ステロイド受容体自身の発現量や性ステロイドホルモンの代謝酵素の観点から，あるいは性ステロイドによって発現量がコントロールされる各種のgrowth factorの関与といった視点から研究されてきたが，これら性ステロイド受容体を有する細胞においてエストロゲンがどのような細胞内分子機構を介して増殖したり，プロゲステロンが増殖を抑制するかはほとんど不明であった．一方，細胞増殖はG1→S→G2→M期と細胞周期が進行することにより達成されるが，近年，細胞周期の制御にはサイクリン，サイクリン依存性燐酸化酵素(cyclin-dependent kinase，cdk)，癌抑制遺伝子産物などからなる細胞周期調節因子の相互作用が注目されている[1)~3)]．すなわち，特定の細胞周期にのみ発現されるサイクリンはパートナーである特定のcdkと複合体を形成して(図1)，癌抑制遺伝子産物であるretinoblastoma gene product(Rb)等を燐酸化して不活化し，細胞周期の進行を促進させる一方，p53をはじめとする癌抑制遺伝子産物やcdk inhibitor(cdkI)はサイクリンやcdkの機能に拮抗して細胞増殖を抑制すると考えられている．そこで本研究では，まず性ステロイドによって制御される正常子宮内膜腺上皮の増殖およびその抑制における細胞周期調節因子の発現や相互作用を解析することを目的とし，これらが子宮内膜癌においては正常子宮内膜に比しどのように異なるかを解析した．

対象および方法

1．各種内膜組織における細胞周期調節因子の発現の免疫染色：信州大学医学部付属病院にて患者の同意のもとに手術によって得られた正常子宮内膜組織50例(増殖期25例，分泌期25例)，子宮内膜増殖症30例(単純型12例，複雑型10例，異型増殖症8例)，子宮内膜癌82例(G1；40例，G2；27例，G3；15例)，medroxyprogesterone acetate(MPA)投与前後の内膜増殖症7例のフォルマリン固定，パラフィン包埋切片を対象とした．通常の脱パラフィン後，クエン酸緩衝液にてマイクロウェーブ

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

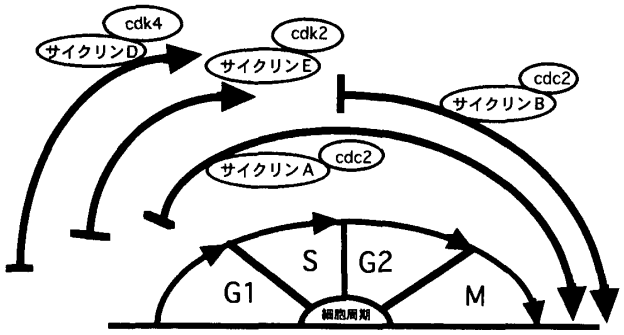

図1 主な細胞周期調節因子

処理し，一次抗体として抗サイクリンD1(Progen)抗体，抗サイクリン(E，A，B1)，cdk4, cdk2, cdc2，p27，c-Jun，c-Fos抗体(Santa Cruz)，抗Rb，p16，p21抗体(Pharmingen)，抗p53，Ki-67抗体(Immunotech)を24時間反応させた．その後ヒストファインSAB-POキット(ニチレイ)を使用して二次抗体を反応させジアミノベンチジンにて可視化した．また内膜癌における各因子の発現の有無と生存分析，および予後因子としての可能性をKaplan-Meier法，log-rank testにて検討した．

2．内膜腺上皮細胞のエストロゲン増殖刺激における細胞周期調節因子の関与

(i)正常内膜腺上皮細胞の分離培養：根上[4]の報告をもとに若干の変更を加えて以下の如く施行した．すなわち，新鮮な増殖期子宮内膜組織を約1 mm角の大きさに細切し，コラゲナーゼ処理後，組織を200μmと37μmのメッシュに通し，腺上皮細胞を分離した．更にこの細胞をトリプシン消化し単細胞化した．培養液にはHam F-12(phenol red free)＋15%FCSを使用した．この方法で得られた培養細胞はER陽性，上皮細胞のマーカーであるサイトケラチン(CK22，Biomeda)の陽性率は90%以上であった．

(ii)正常内膜腺上皮細胞および内膜癌Ishikawa細胞(ER/PR陽性)における細胞周期調節因子の発現：培養液をHam F-12＋0.1% charcoal処理FCSに変更し，rapamycin 50ng/mlを添加して3日間培養したのち培養液を再びHam F-12＋0.1% charcoal処理FCSにもどしてE_2を10^{-6}Mの濃度で添加し，添加2，4，6，12，24時間後に細胞を回収した．細胞より蛋白質を抽出し，Western blottingを施行した後，各種細胞周期調節因子に対する抗体を使用してフィルター上の目的の抗原を検出した．バンドの可視化にはECLキット(Amersham)を用いた．

(iii)正常内膜腺上皮細胞におけるサイクリン-cdk複合体の形成の免疫沈降法による観察：E_2無添加とE_2添加後24時間後の培養腺上皮細胞より蛋白を抽出した．更に抗サイクリンD1，E抗体をセルロースビーズ(Pharmingen)に吸着させ，これらの抽出した蛋白と反応させ免疫沈降した．その後，沈降した蛋白を使用してWestern blottingを施行，抗cdk4，cdk2抗体にてこれら抗原の有無を検討した．

(iv)サイクリンD1プロモーターを使用したルシフェラーゼ(luciferase)アッセイによるサイクリンD1転写調節機序の解析：サイクリンD1遺伝子上流に存在するプロモーター領域から最長−1,749pbまでの領域で各種の長さの計9個のdeletion constructを調整し，その下流にリポーターとしてluciferase遺伝子を結合させ，plasmidに組み込んだものを使用した[5]．導入効率のinternal controlとしてRenilla発現plasmid(PRL)を使用した．更にc-Jun/c-Fos発現plasmidとしてpCMV-c-Jun/c-Fosを用いた[6]．前述した培養正常内膜腺上皮細胞あるいは内膜癌Ishikawa細胞に各サイクリンD1プロモーターを有するplasmidとPRLをlipofection法(Qiagen)にてtransfectionし，その後培養液をHam F-12＋0.1%FCSとし，E_2(10^{-6}M)添加と無添加の条件で48時間培養した．培養後，蛋白を抽出後，dual reporter kit(Promega)にて螢光を発色させ螢光量を計測した．結果はRenillaに対するluciferaseの螢光量の比で表した．更にサイクリンD1の転写に対するc-Jun/c-Fosの作用を検討するためにサイクリンD1プロモーターplasmid，c-Junあるいはc-Fos発現plasmidおよびPRLを上述と同様にtransfectionし，E_2無添加で48時間培養した後，luciferase活性を計測した．

3．内膜腺上皮のプロゲステロンによる増殖抑制における細胞周期調節因子の関与

(i)cdkIの発現の免疫染色による観察：各性周

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

期での正常内膜組織，およびMPA添加前後で子宮内膜増殖症におけるcdkIであるp27，p16，p21の発現を免疫染色によって検討した．

(ii)培養腺上皮細胞，および内膜癌細胞(Ishikawa；ER/PR陽性，KLE；ER/PR陰性)にprogesterone(P_4)又はMPAを添加した際の各種サイクリン，cdk，およびcdkI蛋白の発現のWestern blottingによる観察：前述した如く培養腺上皮細胞を調整しHam F-12＋15%FCSで24時間培養したのち，培養液をHam F-12＋charcoal処理後0.1%FCSに変更し，$E_2 10^{-6}$Mに加えてP_4を10^{-8}Mで加えて6日間培養した後に蛋白を抽出した．IshikawaおよびKLE細胞は培養液＋0.1%FCSにMPAを10^{-8}M，10^{-6}Mで加えて14日間培養した後，細胞増殖抑制効果をMTT法にて検討した．さらにその細胞より蛋白を抽出し，Western blottingを施行し，各細胞周期調節因子の発現を検討した．

(iii)培養腺上皮細胞およびIshikawa細胞におけるプロゲステロン投与後のp27蛋白増加機序の解析：これらの細胞より抽出したRNAを用いてp27mRNAの発現をNorthern blottingにて観察した．プローブの作成は正常内膜より抽出したDNAをtemplateとし，岡本らの報告[7]に基づいてprimerを作成し，polymerase chain reaction(PCR)にて[^{32}P]-CTPをラベリングして使用した．また，p27の蛋白分解におけるプロゲステロンの影響を観察するため，分泌期に得られた正常腺上皮培養細胞および内膜癌細胞(Ishikawa)に蛋白合成阻害剤であるcycloheximideを100μMで添加して新

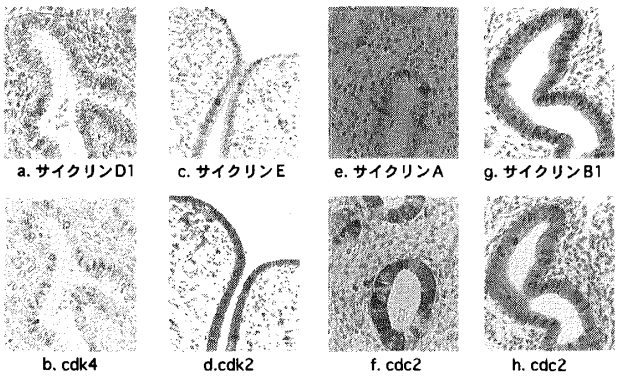

図2　増殖期腺上皮における各サイクリンとcdkの発現(aとb，cとd，eとf，gとhは連続切片)

たな蛋白の産生をブロックした後，その後のp27蛋白量の変化をプロゲステロン(正常内膜；P_4 10^{-6}M，Ishikawa，MPA10^{-6}M)添加群と未添加群とで経時的(6，12，24時間後)に観察し，プロゲステロンのp27蛋白分解における作用を検討した．

(iv)正常内膜腺上皮細胞におけるp27の機能の評価：p27発現plasmid(pcDNA3-p27)[8]を正常腺上皮細胞にtransfectionし，導入後の増殖能の変化をproliferating cell nuclear antigen(PCNA)量により検討した．

結果と考察

1．内膜組織における細胞周期調節因子の発現の免疫染色

(i)正常内膜腺上皮：正常内膜腺上皮では増殖期に増殖刺激因子である各種サイクリン，cdkの発現の観察が散在性に認められた．これら各因子間の発現を連続切片にて観察したところ，サイクリンとcdkの局在には相関関係がみられた．サイクリンD1陽性細胞とcdk4陽性細胞と，サイクリンE陽性細胞はcdk2陽性細胞と，サイクリンAおよびB1陽性細胞はcdc2陽性細胞とそれぞれ共通する傾向が観察された(図2)．また，これらのサイクリン・cdk陽性細胞は増殖中の細胞を認識するKi-67抗原も陽性であった．分泌期腺上皮ではこれら因子のうちでサイクリンD1，A，B1，cdk4，cdc2は陰性となったが，サイクリンEおよびcdk2陽性細胞は分泌期にも観察された．しかしながら分泌期におけるこれらサイクリンE・cdk2陽性細胞はKi-67陰性であった(図3)．これらの所見から，正常内膜の腺上皮は増殖期に種々のサイクリンやcdkを発現し，またこれら多くのサイクリン・cdk陽性細胞がKi-67陽性であったことから，これらの因子が腺上皮細胞の増殖に関与している可能性が示された．また，分泌期におけるサイクリンE・cdk2陽性細胞は何らかの機能抑制を受けていることが考えられた[9]．

(ii)子宮内膜増殖症，子宮内膜癌における細胞周期調節因子の発現：子宮内膜増殖症の各組織型の細胞における，増殖中の細胞を認識するKi-67抗原陽性細胞率は単純型，複雑型，異型増殖症でおのおの6.3%，10.4%，5.4%でありこれはいず

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

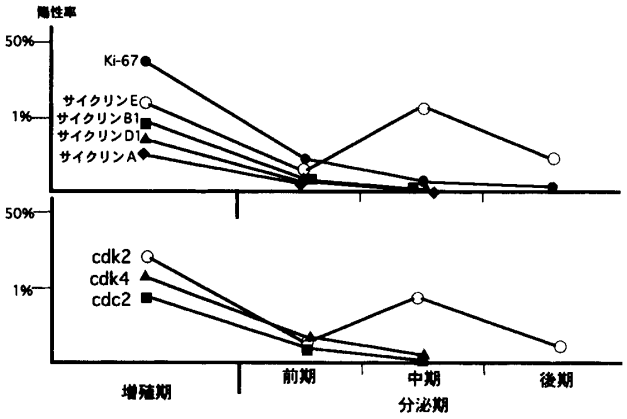

図3 各サイクリン・cdkの性周期による発現パターン

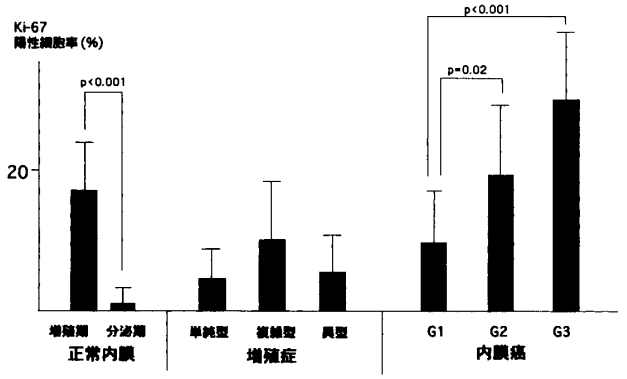

図4 各組織型での増殖能

れも正常子宮内膜腺上皮の増殖期での値(約18%)より低値であった(図4). これは増殖症の増殖能がその名前から想像されるよりは低いことを示し, これに呼応してこれら各増殖症におけるサイクリン, cdkの過剰発現は一部の複雑型および異型増殖症症例に観察されたにとどまった.

内膜癌におけるKi-67陽性細胞率は組織学的gradeにてG1, G2, G3で各々10.5%, 19.5%, 31.5%であり特にG2からG3の症例は活発な増殖能を有することが示された(図4). これらの内膜癌において, 細胞周期促進因子である各サイクリン・cdkの過剰発現が観察された. 正常内膜腺上皮における各種サイクリン・cdkの陽性率の上限がおおよそ1%であったことから, 癌細胞のサイクリンおよびcdkの陽性細胞率が1%以上の症例を陽性症例とすると, 表1に表される頻度でサイクリンやcdkの陽性症例が観察された. G1, G2, G3とgradeが進むに従いサイクリン・cdkの過剰発

表1 内膜癌のgradeとサイクリン・cdk陽性症例率

	組織学的 grade			計(82例)
	G1(40例)	G2(27例)	G3(15例)	
サイクリンD1	45.0%	70.4%	93.3%	62.2%
サイクリンE	67.5%	66.7%	60.0%	65.9%
サイクリンA	17.5%	48.2%	66.7%	36.6%
サイクリンB1	35.0%	25.9%	33.3%	31.7%
cdk4	30.0%	55.5%	86.7%	48.8%
cdk2	70.0%	74.1%	86.7%	74.4%
cdc2	57.5%	81.5%	86.7%	70.7%

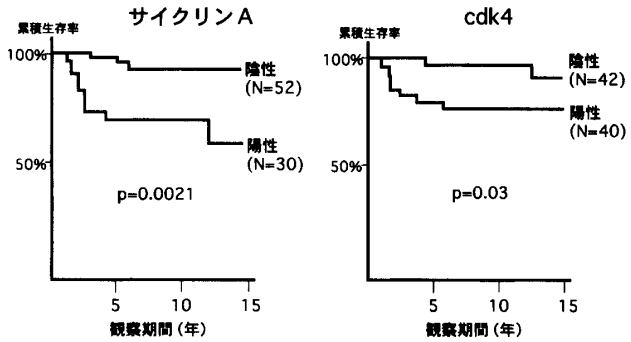

図5 サイクリンA, cdk4の発現と内膜癌患者の予後

現の頻度が増加する傾向が観察されたことから, high gradeの癌ほど多種の因子の異常が蓄積され, 活発な増殖能を獲得している可能性が考えられた. これらの発現でサイクリンEはG1からG3にわたって陽性症例が観察され, その一方でサイクリンD1, サイクリンA, cdk4はG2からG3のhigh gradeの癌に多い傾向が観察された. 更にこれらの因子のなかでサイクリンAとcdk4陽性例は陰性例に比して有意に予後不良であった(サイクリンA; $p=0.0021$, cdk4; $p=0.03$, 図5)ことから, 関与する因子によって細胞学的悪性度が異なる可能性が示唆された.

2. 正常内膜腺上皮細胞および内膜癌細胞のエストロゲン増殖刺激における細胞周期調節因子の関与

(i)培養腺上皮細胞のE_2による増殖刺激における各サイクリンの発現: 培養腺上皮細胞のE_2刺激による増殖能をまず評価するために, 月経周期8～12日目に採取した内膜より腺上皮を分離し, 5×10^3個を96ウェルプレートに撒き, Ham F-12+15%FCSにて24時間培養した後培養液をHam F-

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

12＋0.1%FCSに変更して3日間培養した．3日目に〔^{3}H〕-thymidineと$E_2 10^{-6}$Mを添加し，添加後24，48，72時間後に〔^{3}H〕-thymidineの取り込み量を計測した．E_2添加24時間後ではE_2添加群が未添加群に対して15%の取り込みの増加が観察され，72時間後ではその差は30%となり，有意差を認めた．また，$P_4 10^{-6}$M添加した際にはE_2による取り込みの増加は拮抗された(図6)．この細胞のE_2による増殖刺激における各サイクリンの発現をWestern blottingにて観察したところ，添加後4時間でまず最初にサイクリンD1の発現が観察され，添加後約6時間でサイクリンEが，さらにサイクリンA，B1の順に発現が観察された(図7a)．これはサイクリンD1，E，A，B1の基本的な発現順序と一致するものであった．E_2添加前と添加後24時間の細胞の蛋白抽出液に対して抗サイクリンD1抗体，抗サイクリンE抗体にて免疫沈降し，沈降後の蛋白をWestern blotting後，抗cdk4，抗cdk2抗体にて検出したところ，cdk4，cdk2ともE_2添加後の蛋白に存在し，E_2添加後の正常内膜腺上皮においてはサイクリンD1-cdk4およびサイクリンE-cdk2の複合体が形成されていることが確認された(図7b)．この複合体によると考えられるRb蛋白の燐酸化はE_2添加24時間後にRbのバンドシフトにより認められた(図7a)．

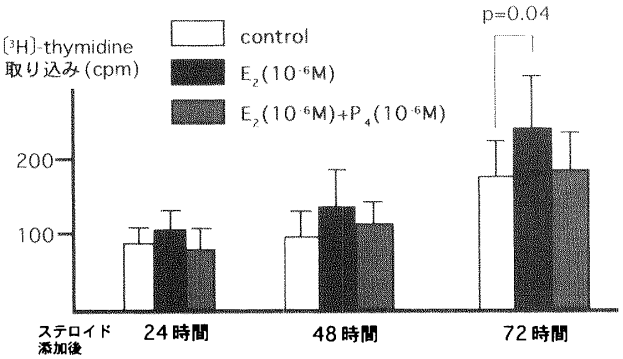

図6　培養内膜腺上皮細胞の増殖に及ぼす性ステロイドの影響

(ii)E_2刺激によるサイクリンD1発現の機序の解析：正常細胞が増殖刺激を受けて増殖を開始する際に，サイクリンがD1→E→A→B1の順に発現される現象は比較的多種の細胞において共通して観察されるモチーフであることから，正常内膜がE_2刺激を受けて増殖するという内膜腺上皮特有の性質を更に理解するためにはE_2によるサイクリンD1の発現機序を解析することが非常に重要である．サイクリンD1蛋白の発現量は主にmRNAの転写量によって調節されると報告されていることから[5]，今回の研究ではサイクリンD1のプロモーターに着目した．サイクリンD1のプロモーターの特徴として，estrogen responsive element(ERE)がないこと，初期転写調節因子であるc-Jun/c-FosがAP-1 siteを有する点にある．また，c-jun/c-fos遺伝子はその上流にEREを有しE_2添加後比較的速い時間にc-Jun/c-Fosが誘導されると報告されている．これらのことから，内膜腺上皮細胞のE_2刺激によるサイクリンD1の発現に

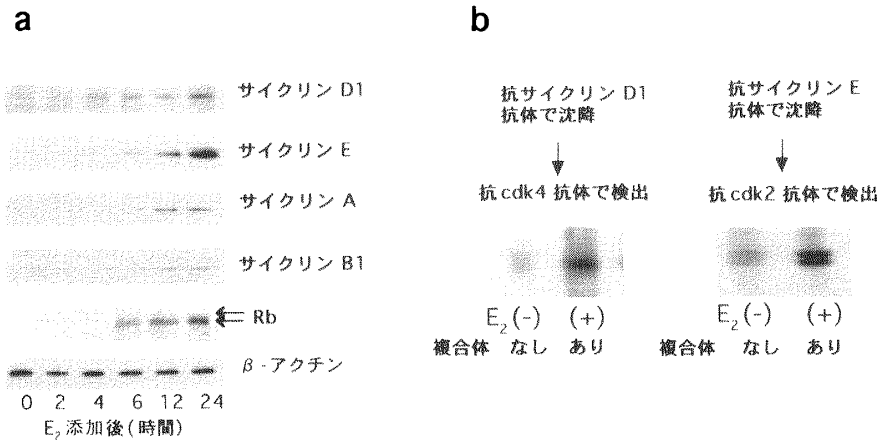

図7　培養腺上皮細胞のE_2添加によるサイクリンの発現(a)とサイクリン-cdk複合体の形成(b)

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

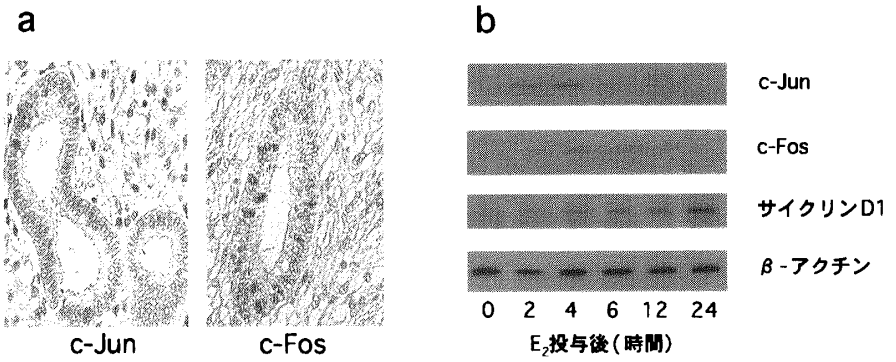

図8 正常内膜における c-Jun, c-Fos の発現. a；in vivo, b；in vitro

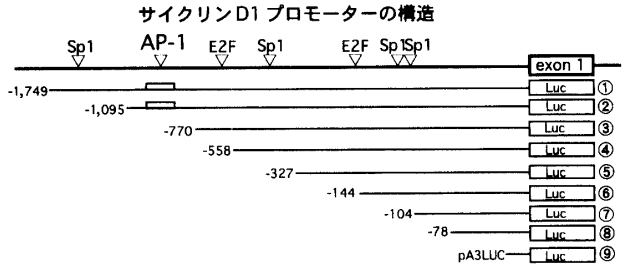

図9 今回使用したサイクリン D1プロモーターの deletion construct

c-Jun/c-Fos が関与している可能性を検討した. まず, 実際に c-Jun/c-Fos が内膜組織に発現しているかを免疫染色にて観察したところ, c-Jun, c-Fos ともに増殖期の腺上皮に観察された(図8a). 次に c-Jun/c-Fos の発現を培養腺上皮細胞に Western blotting で観察したところ, E_2添加後2時間で特に c-Jun の発現が観察され, サイクリンD1の発現に先行していることが判明した(図8b). サイクリンD1の発現に c-Jun/c-Fos が関与していることを更に明らかにするために, サイクリンD1のプロモーター用いた luciferase アッセイを施行してサイクリンD1遺伝子の転写調節機序を検討した. 9種類のプロモーターの deletion construct の下流に luciferase 遺伝子を組み込んだ plasmid(図9)と Renilla 発現 plasmid を培養腺上皮内膜細胞に transfection し, E_2(10^{-8}M)添加の有無で luciferase 活性を測定したところ, E_2無添加時にはすべての plasmid に有意な活性を認めなかったが, E_2添加時にはプロモーター上に初期転写調節因子である c-Jun/c-Fos が結合する部位である AP-1 site を有する1番と2番のプロモーターにだけ活性の上昇を認めた(図10a). この結果よりは, E_2による内膜腺上皮の増殖におけるサイクリンD1の発現には AP-1結合部位を介した c-Jun/c-Fos が関与している可能性が示唆された. 更にサイクリンD1プロモーターを有する plasmid に c-Jun あるいは c-Fos 発現 plasmid を co-transfection し, E_2無添加で培養して luciferase 活性を測定したところ, AP-1結合部位を有する1と2のプラスミドに c-Jun を co-transfection したときにのみ luciferase の活性の上昇がみられた(図10b). これらから, 培養腺上皮内膜の E_2による増殖刺激に際しては c-Jun が AP-1 site を介してサイクリンD1の発現を促進している可能性が示唆された.

(iii) ER 陽性内膜癌 Ishikawa 細胞の E_2による増殖刺激における細胞周期調節因子の関与：Ishikawa 細胞を前述の培養腺上皮細胞と同じく3日間血清除去＋rapamycin 添加下で培養したのち E_2を添加し, 添加後の各サイクリンの発現を Western blotting により検討したところ, サイクリンD1は E_2添加前より認められ, また, E_2添加後の増加も軽度にとどまった(図11a). また Ishikawa 細胞にサイクリンD1のプロモーターの deletion construct を有する plasmid を transfection し, E_2添加の有無でその活性を検討したところ, サイクリンD1の転写活性は E_2無添加時に特に AP-1 site より下流のプロモーター部位に観察された. また E_2無添加に対する E_2添加による活性の上昇が最も大きかったのは5番のプロモーター plasmid

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

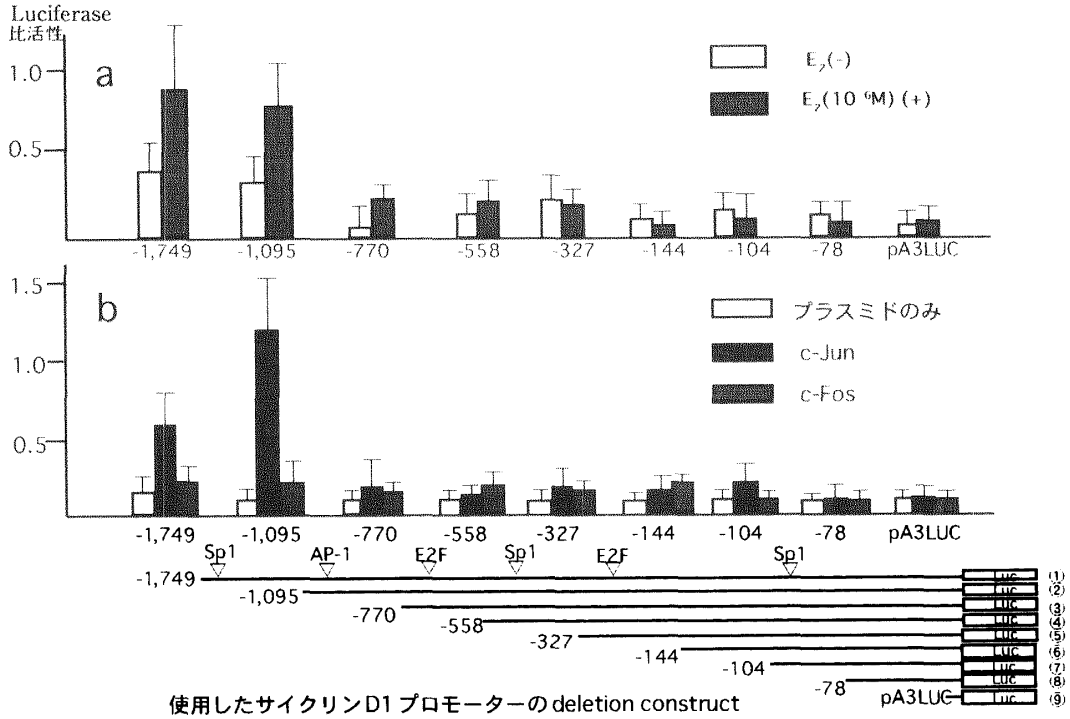

図10　正常内膜腺上皮でのluciferaseアッセイの結果．a；サイクリンD1の転写活性に対するE_2添加の影響，b；サイクリンD1の転写活性に対するc-Jun/c-Fosの影響

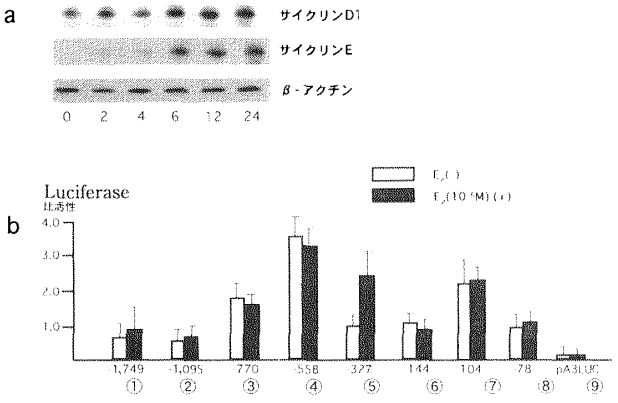

図11　Ishikawa細胞のE_2刺激によるサイクリンの発現(a)と，E_2刺激によるサイクリンD1の転写活性(b)

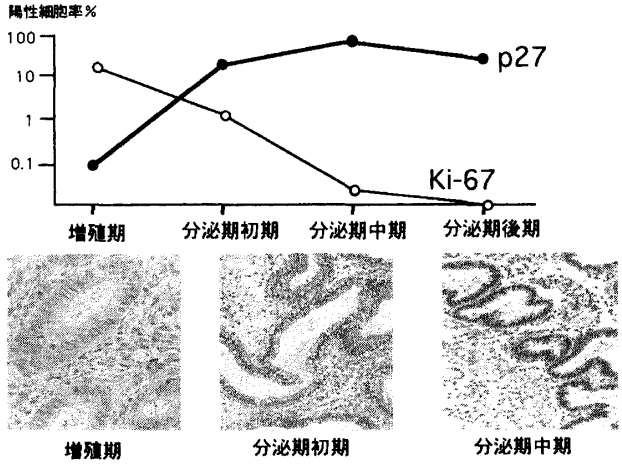

図12　各性周期における p27の発現

で，この結果はサイクリンD1プロモーターがこのすぐ下流にある転写因子E2F結合部位を介してE_2の増殖刺激を受けている可能性を示唆した(図11b)．

3．内膜腺上皮細胞および内膜癌のプロゲステロンによる増殖抑制における細胞周期調節因子の関与

(i)細胞周期発現の免疫染色による観察：分泌期腺上皮ではサイクリンEとcdk2以外のサイクリン，cdkの発現は著明に低下した(図3)．細胞増殖抑制因子群(p53，Rb，p21，p16，p27)の正常内膜での発現は，増殖期ではこれらの発現はすべて陰性であった．一方分泌期においてはこれらの増殖抑制因子のうちでサイクリン・E-cdk2複合体のinhibitor[10)11)]であるp27の分泌期前期から後

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

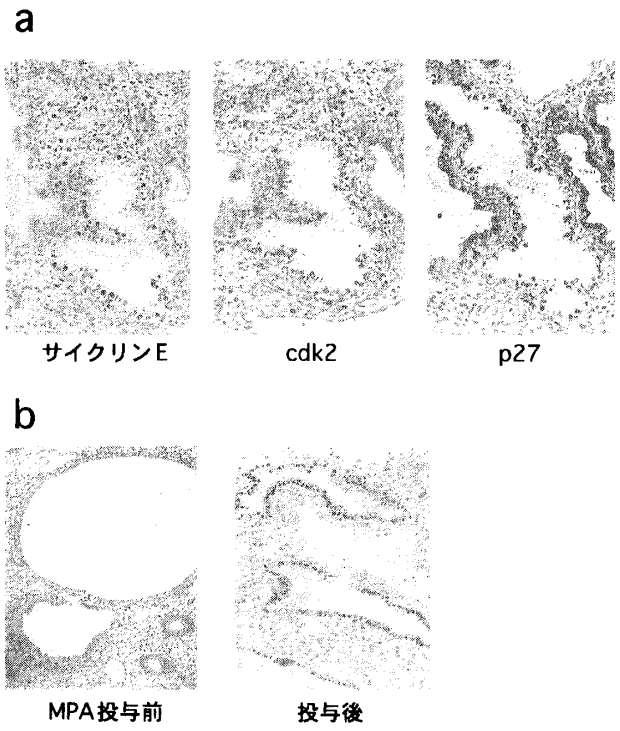

図13 分泌期内膜におけるサイクリンE・cdk2陽性細胞とp27(a)，およびMPA投与前後の増殖症でのp27の発現(b)

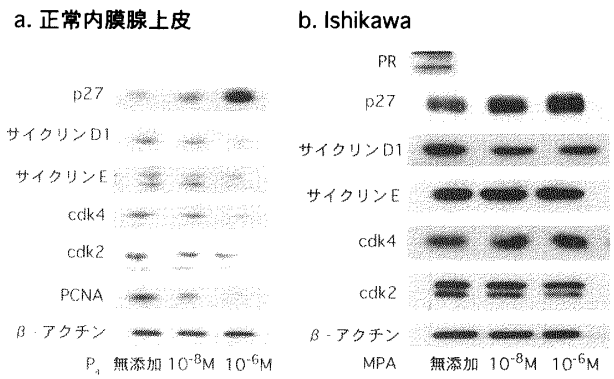

図14 正常内膜腺上皮(a)およびIshikawa細胞(b)における細胞周期調節因子発現のプロゲステロンによる影響

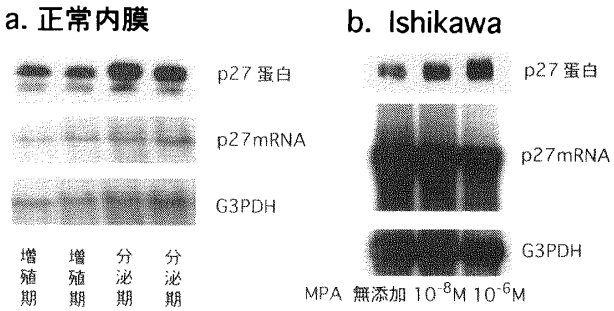

図15 正常内膜(a)およびIshikawa細胞(b)におけるp27mRNAの発現のNorthern blotting

期にわたる瀰漫性の発現を認め(図12)，この発現パターンはKi-67と対照をなしていた．さらにこのp27の発現を前述のサイクリンEの発現と比較すると，分泌期でのサイクリンE・cdk2陽性細胞に一致した部位にp27の強い発現を認め(図13a)，またこの部位はKi-67は陰性であったことから，分泌期におけるサイクリンE・cdk2陽性細胞はp27によって拮抗されている可能性が示唆された[12]．また，分泌期におけるp27の発現の増加はp27がプロゲステロンによって誘導されている可能性を示唆するものと考えられたため，この可能性を更に検討するためMPA治療後の内膜増殖症の腺上皮におけるp27の発現を観察したところ，MPA治療後のp27の発現は治療前に比べ著明に増強しており(図13b)，p27はプロゲステロンにて誘導される可能性を示唆するものと考えられた．

(ii)培養内膜腺上皮および内膜癌のプロゲステロンによる増殖抑制における細胞周期調節因子の関与：培養正常内膜腺上皮へのP_4の添加実験では，サイクリンD1，E，cdk4，PCNAの発現はP_4の濃度依存性に減少した．cdk2ではその減少はこれらの因子と比較して軽度であった．その一方でp27の発現はP_4の濃度依存性に増加した(図14a)．PR陽性子宮内膜癌細胞Ishikawaを0.1%FCS+DMEMの培地にMPAを10^{-8}M，10^{-6}Mで添加して14日間培養したのちに細胞数をMTT法により算定したところ，MPAの濃度依存性に細胞数が減少し，10^{-6}M時にMPA未添加細胞に比較して38%の細胞数の減少が観察された．これらの細胞を使用してWestern blottingを施行したところ，サイクリンD1，E，cdk4，cdk2の発現にはMPAの添加による変化がなかったもののp27の発現はMPAの濃度依存性に増加した(図14b)．PR陰性の内膜癌であるKLEにはMPA添加による細胞数の変化も各サイクリン，cdkの発現の変化も観察されなかった．これらの結果から，正常内膜の腺上皮プロゲステロンによる増殖抑制においてはサ

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

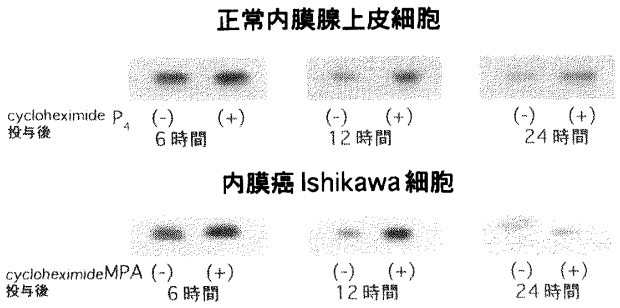

図16　正常内膜(a)およびIshikawa細胞(b)のp27蛋白分解におけるプロゲステロンの影響

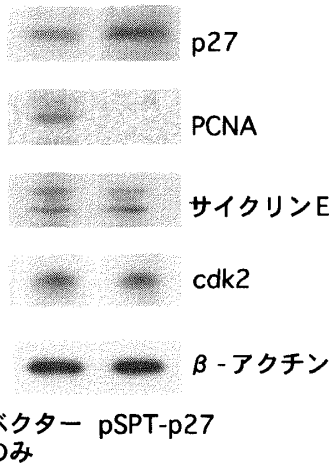

図17　正常内膜腺上皮へのp27の導入と細胞増殖能

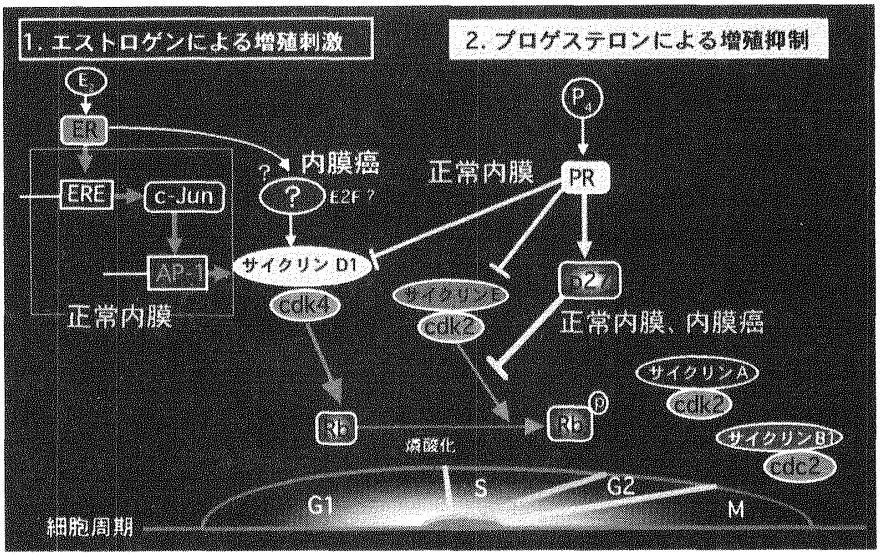

図18　内膜腺上皮の性ステロイドホルモンによる増殖制御のまとめ

イクリン，cdkの発現低下とp27蛋白の発現増加が，またPR陽性の内膜癌ではp27蛋白の増加のみが観察され，サイクリン，cdkの発現低下はみられなかったことが正常内膜とは異なる点であると考えられた．

(iii)p27蛋白量の調節機序：正常内膜組織より抽出したtotal RNAを使用しNorthern blottingにてp27mRNAの発現を観察したところ，各性周期の間で明らかなp27mRNAの発現の差は観察されなかった(図15a)．またIshikawa細胞にMPA(10^{-8}M，10^{-6}M)を添加した後p27mRNAの発現をNorthern blottingにて観察したところ，p27mRNAの発現はMPAの濃度による影響を受けなかった(図15b)．一方，cycloheximide投与後のp27蛋白量は正常内膜腺上皮，Ishikawa細胞とも検討したいずれの投与後時間においてもプロゲステロン，MPA投与細胞の方が無投与の細胞より多かった(図16)．これらの結果から，正常内膜，内膜癌とも，p27の蛋白量は転写レベルで調節されているのではなく，プロゲステロンによる蛋白分解の遅延，すなわち半減期の延長によるものである可能性が示唆された．

(iv)p27発現plasmidとvectorのみを増殖期に得られた正常内膜腺上皮にtransfectionし，3日後に蛋白抽出後Western blottingを施行した，p27発現plasmidではコントロールに対してp27の発

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

現が増加していたがPCNAの発現は低下していた．またサイクリンE，cdk2の発現量には両者に差はなかった(図17)．これらの結果から，p27は実際に内膜腺上皮細胞内で増殖抑制機能を発揮していることが確認された．

まとめ

正常子宮内膜の腺上皮においては，E_2による増殖刺激によりまずサイクリンD1が発現し，次いでサイクリンE，Aが順に発現し，またこれらがcdkと複合体を形成して細胞周期が進行することが観察された．この内膜腺上皮のE_2依存性細胞増殖にはE_2刺激によるサイクリンD1の発現がとりわけ重要であると考えられたが，このサイクリンD1発現はE_2により誘導される初期転写調節因子c-Junを介した分子機構によることが示唆された．すなわち，内膜腺上皮におけるE_2依存性増殖刺激経路の特徴としてE_2刺激→c-Jun発現→サイクリンD1発現と続く反応が重要であると考えられる．また内膜癌では正常内膜に比して一般にサイクリンおよびcdkの過剰発現が観察され異常な増殖能が獲得されているとともに，関与する細胞周期調節因子の差異により癌の悪性度も異なることが考えられ，また，サイクリンAは予後不良因子となりうる可能性も示唆された．一方，内膜腺上皮のプロゲステロンによる増殖抑制においては，プロゲステロンによるサイクリンやcdkの発現抑制とともにp27発現亢進が極めて重要な役割を果たしていると考えられ，その機序としてはプロゲステロンによる蛋白分解阻害作用によることが示唆された．すなわち，プロゲステロンにより増加したp27がサイクリンE・cdk2複合体に結合し，サイクリンE・cdk2の機能を阻害することによって細胞周期の進行を抑制すると考えられる(図18)．このように正常内膜においては細胞周期調節因子が性ステロイドによって巧妙に調節されて増殖やその抑制が制御されている一方，内膜癌は種々の程度でこれらの制御から逸脱し，活発な増殖能を獲得していると考えられた．

謝辞

本講演の機会をお与え頂きました青野敏博日本産科婦人科学会会長をはじめとする学会員の皆様ならびに座長の労をおとり頂きました寺川直樹教授ならびに蔵本博行教授に感謝の意を表します．

共同研究者

信州大学医学部産科婦人科学教室教授：小西郁生

京都大学医学部婦人科産科学教室教授：藤井信吾

信州大学医学部産婦人科学教室：二階堂敏雄，施　顕章，清水元彦，高木　靖，加藤　清，今井　努，堀内晶子

培養細胞を御提供頂いた蔵本博行教授，野澤志朗教授，西田正人助教授，石渡　勇博士に深謝致します．

文献

1. *Sherr CJ.* G1 phase progression : Cyclin on Cue. Cell 1994 ; 79 : 551—555
2. *Nurse P.* Ordering S phase and M phase in the cell cycle. Cell 1994 ; 79 : 547—550
3. *Sherr CJ, Roberts JM.* Inhibitors of mammalian G 1 cyclin-dependent kinases. Genes & Dev 1995 ; 9 : 1149—1163
4. **根上　晃.** 正常ヒト子宮内膜上皮細胞のin vitroにおける腺管形成ならびに上皮化過程の形態学的研究．日産婦誌　1989 ; 41 : 1983—1990
5. *Yan YX, Nakagawa H, Lee MH, Rustgi AK.* Transforming growth factor-α enhances cyclin D1 transcription through the binding of early growth response protein to a cis-regulatory element in the cyclin D 1 promoter. J Biol Chem 1997 ; 272 : 33181—33190
6. *Sonnenberg JL, Rauscher FJ III, Morgan JI, Curran T.* Regulation of proencephalin by Fos and Jun. Science 1989 ; 249 : 1622—1625
7. **岡本康幸，中林仁美，菊川政次，中野　博.** 非放射性プローブを用いたribonuclease protection assayによる血液細胞中p27/Kip1 mRNAの検出．臨床病理　1996 ; 44 : 483—486
8. *Morisaki H, Fujimoto A, Ando A, Nagata Y, Ikeda K, Nakanishi M.* Cell cycle-dependent phosphorylation of p27 cyclin-dependent kinase (cdk) inhibitor by cyclin E/cdk2. Biochem Biophys Res Commun 1997 ; 240 : 389—390
9. *Shiozawa T, Li SF, Nakayama K, Nikaido T, Fujii S.* Relationship between the expression of cyclins/cyclin-dependent kinases and sex steroid receptors / Ki 67 in normal human endometrial glands and stroma during the menstrual cycle. Mol Hum Reprod 1996 ; 2 : 745—752
10. *Toyoshima H, Hunter T.* p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. Cell 1994 ; 7 : 67—74
11. *Polyak K, Lee M, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J.* Cloning of p 27 Kip 1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. Cell 1994 ; 78 : 59—66
12. *Shiozawa T, Nikaido T, Nakayama K, Lu X, Fujii S.* Involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p 27 Kip 1 in growth inhibition of endometrium in the secretory phase and hyperplastic endometrium treated with progesterone. Mol Hum Rep 1998 ; 4 : 899—905

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

Abstract

The growth of the normal human endometrium is stimulated by estrogen and suppressed by progesterone via the respective receptors, estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR). This is also the case in some part of endometrial carcinomas. Recent studies have revealed that the cell cycle-related molecules, such as cyclins, cyclin-dependent kinases (cdk), and cdk inhibitors (cdkI) play essential roles in cell proliferation. The present study was undertaken to investigate the possible involvement of the cell cycle-related molecules in steroid hormone-dependent growth of the normal and neoplastic endometrium.

Immunohistochemical staining demonstrated that in the normal endometrial glands, cyclins (D1, E, A, B1) and cdks (cdk4, cdk2, cdc2) were sporadically expressed in the proliferative phase, and the expression of these molecules except for cyclin E and cdk2 was reduced in the secretory phase. The cyclin- and cdk-positive cells were also positive for Ki-67. In endometrial carcinomas, however, overexpression of cyclins and cdks was observed in 30～75% of the cases examined. Overexpression of cyclin D1, A and cdk4 was more frequently observed in high grade endometrial carcinomas, and survival analysis revealed that cyclin A was an independent prognostic factor.

The molecular mechanisms for the estrogen-induced growth of the endometrium was analyzed using cultured glandular cells from normal proliferative endometrium with or without estradiol (E_2) stimulation. Expression of cyclin D1 was detected 4 hours after E_2 treatment, and followed by serial expressions of cyclin E, A, and B1. Immunoprecipitation analysis confirmed the formation of cyclin D1-cdk4 and cyclin E-cdk2 complexes, and subsequent phosphorylation of the Rb protein was also observed. For the intracellular pathway of cyclin D1 up-regulation by estrogen, we hypothesized the involvement of transcription factors, c-Jun/c-Fos, since the cyclin D1 possess c-Jun/c-Fos binding (AP-1) site but lacks the estrogen responsive element. The expression of c-Jun in cultured endometrial cells occurred 2 hours after E_2 stimulation, preceding the cyclin D1 expression. Luciferase assay using various cyclin D1 promoter constructs revealed that the elevated luciferase activity after E_2 stimulation was observed exclusively in the constructs possessing AP-1 site. Increased luciferase activity was also observed when c-Jun expression plasmid was co-transfected with constructs containing AP-1 site. On the other hand, in ER-positive endometrial carcinoma (Ishikawa) cells, the expression pattern of cyclins after E_2 stimulation as well as promoter activity of cyclin D1 differed from those of the normal endometrial cells.

Progesterone-induced growth suppression of the normal endometrial glands was examined by immunohistochemical staining of cdkIs (p16, p21, p27). Elevated expression of p27 in the secretory glands and the topological correlation between the p27-positive and the cyclin E/cdk2-positive cells suggests that p27 counteracts to the function of cyclin E/cdk2. Treatment with progesterone in the cultured endometrial cells also induced the expression of p27 protein. Northern blot analysis of p27mRNA and p27 protein-degeneration analysis using cycloheximide showed that elevated expression of p27 protein is due to its prolonged half life rather than transcriptional activation. Transfection of p27 expression plasmid resulted in the decrease of proliferating cell nuclear antigen expression.

In conclusion, up-regulation of cyclins and cdks by estrogen may play an essential role in the normal proliferative endometrium, and the estrogen-stimulated expression of cyclin D1 is mediated by c-Jun via AP-1 site. In the secretory endometrium, p27 is an important molecule in progesterone-induced growth suppression. In such ways, the steroid hormone-dependent growth of endometrial glands is regulated by cell cycle-related molecules. In endometrial carcinomas, however, the expression of these molecules is different from that of the normal counterpart.

NII-Electronic Library Service