

# 論文内容要旨

## 論文題目

### Molecular mechanism of the inhibition of estradiol-induced endometrial epithelial cell proliferation by clomiphene citrate.

(エストロゲンによる子宮内膜上皮細胞増殖効果をクエン酸クロミフェンが抑制する分子機構)

責任講座：産科婦人科学 講座

氏名：網田光香

### 【内容要旨】(1,200字以内)

【目的】クエン酸クロミフェン (CC) は、不妊症の原因の約 20%を占める排卵障害に対する第一選択薬として、不妊診療の場で広く使用されている。CC 治療は約 80%と高い排卵率が得られるものの、妊娠率は 20~30%と低値である。その原因として子宮頸管・内膜における CC の抗エストロゲン作用が想定されている。子宮内膜細胞はエストロゲン (E2) により増殖が促進されるが、CC による抑制作用の詳細な分子機構は明らかではない。今回、E2 の子宮内膜増殖効果に対する、CC による抑制作用の分子機構を検討した。【方法】子宮内膜上皮由来の 2 つの細胞株、Ishikawa 細胞、EM-E6/E7/hTERT 細胞を用いて、子宮内膜細胞における E2 による増殖促進効果に対する CC の影響を以下の項目について検討した。(1) 細胞増殖、(2) Estrogen responsive element (ERE)-tk-luciferase によるプロモーターアッセイ、(3) Green fluorescent protein を結合させた ER $\alpha$  (GFP-ER $\alpha$ ) を細胞内に導入、リガンド投与による GFP-ER $\alpha$  の局在の変化、(4) Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) と ER $\alpha$  の相互作用、(5) SRC-1 siRNA の導入による E2 の細胞増殖効果および ERE-tk の転写活性化に対する影響。【結果】(1) E2 による増殖効果は CC と抗エストロゲン剤 ICI182780 (ICI) により有意に ( $p < 0.01$ ) 抑制された。(2) E2 による ERE-tk の転写活性化は、CC と ICI により有意に ( $p < 0.05$ ) 阻害された。(3) リガンド非存在下では GFP-ER $\alpha$  は核内に均一に分布し、いずれのリガンドの投与後にも不均一な集積を示した。その変化の程度は E2、ICI、CC の順で大きかった。CC、ICI は E2 による GFP-ER $\alpha$  の局在の変化を部分的に抑制した。(4) 免疫沈降法で E2 投与によって SRC-1 と ER $\alpha$  は複合体を形成したが、CC、ICI は複合体形成を抑制した。また、免疫蛍光染色の結果、E2 投与により SRC-1 と ER $\alpha$  は局在が重複したが、CC、ICI は局在の重複を抑制した。(5) SRC-1 siRNA 導入により E2 による細胞増殖促進と ERE-tk の転写活性化は有意に ( $p < 0.01$ ) 抑制された。【結論】CC は子宮内膜上皮細胞において E2 の増殖促進効果と転写活性化を抑制する。その機序として、CC が ER $\alpha$  と SRC-1 の結合を阻害することが重要である。

平成 22 年 1 月 7 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

## 学位論文審査結果報告書

申請者氏名：網田 光善

論文題目：Molecular mechanism of the inhibition of estradiol-induced  
endometrial epithelial cell by clomiphene citrate.

(エストロゲンによる子宮内膜上皮細胞増殖効果をクエン酸クロミフェンが抑制する分子機構)

審査委員：主審査委員

白石 正



副審査委員

加藤 丈夫



副審査委員

後藤 薫



審査終了日：平成 21 年 1 月 7 日

### 【論文審査結果要旨】

クエン酸クロミフェンは、排卵誘発剤として不妊症治療の場で広く使用されているが、高い排卵率があるにもかかわらず妊娠率は低値である。その原因は、クエン酸クロミフェンが子宮頸管・内膜に対する抗エストロゲン作用であると考えられる。そこで、エストロゲンの子宮内膜増殖効果に対するクエン酸クロミフェンによる抑制効果の分子機構について子宮内膜上皮由来の細胞株を用い検討した論文である。検討の結果、以下の 5 項目が明らかとなった。

1. エストロゲンによる増殖効果は、クエン酸クロミフェンと抗エストロゲン剤により有意に( $p < 0.01$ )抑制された。
2. エストロゲンによる Estrogen responsive element-tk(ERE-tk)の転写活性は、クエン酸クロミフェンと抗エストロゲン剤により有意に( $p < 0.05$ )に阻害された。
3. クエン酸クロミフェン、抗エストロゲン剤は、エストロゲンによる Green fluorescent protein 結合エストロゲン反応因子  $\alpha$  の局在変化を部分的に抑制した。
4. エストロゲン投与で Steroid receptor coactivator-1(SRC-1)とエストロゲン反応因子  $\alpha$  は複合体を形成および局在重複したが、クエン酸クロミフェン、抗エストロゲン剤は、複合体形成の抑制および局在重複を抑制した。
5. SRC-1siRNA 導入でエストロゲンによる細胞増殖促進および ERE-tk の転写活性は有意に( $p < 0.01$ )抑制された。

以上から、クエン酸クロミフェンは子宮内膜上皮細胞でエストロゲンの増殖促進および転写活性を抑制し、それにクエン酸クロミフェンがエストロゲン反応因子  $\alpha$  と SRC-1 の結合を阻害することを分子機構から明らかにしたものである。本審査委員会では博士論文にふさわしいと判断し、合格とした。