

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10685

研究課題名(和文) 免疫賦活作用を期待したビタミンDによる着床不全・習慣流産に対する新規治療戦略

研究課題名(英文) The immune regulatory activated by Vitamin D has been the novel treatment for recurrent implantation failure and recurrent pregnancy losses

研究代表者

太田 邦明(Ota, Kuniaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：90424142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：免疫制御作用を有するビタミンDの欠乏、テトラメチレンヒドロ葉酸代謝還元酵素の遺伝子多型に起因するホモシステインの上昇、耐糖能異常といずれも生体内における炎症を惹起する機構が着床能から初期の胎盤形成の発生・生殖過程に影響があることが解明された。妊孕能向上のためにはビタミンDを中心とした包括的な栄養指導が必要である可能性が示唆され、プレコンセプションケアのエビデンス確立への基盤となった。

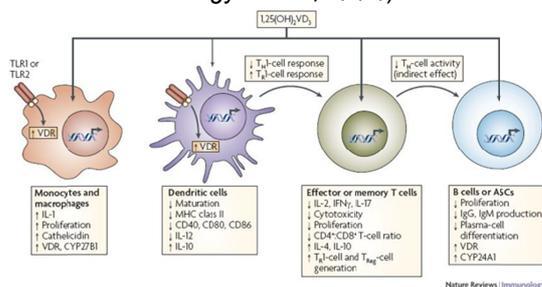
研究成果の概要(英文)：Vitamin D deficiency as the immune regulatory, elevation of homocysteine caused by gene polymorphism of tetramethylene hydrofolate metabolic reductase, impaired glucose tolerance to induce the circumstance of inflammation in vivo were clarified that there is an influence on the reproductive process of implantation and placentation. It is suggested that comprehensive nutritional education centered on vitamin D may be necessary for improving fertility, and it became the basis for the evidence of pre conception care.

研究分野：生殖医学、生殖免疫学、内分泌・代謝学

キーワード：ビタミンD テトラメチレンヒドロ葉酸代謝還元酵素 ホモシステイン 耐糖能異常 プレコンセプションケア

1. 研究開始当初の背景

抗くる病因子として発見されたビタミンD はカルシウム代謝調節, 細胞増殖抑制・分化促進, 免疫応答制御など様々な生理作用を持つことが知られている. ビタミンDの生理作用はリガントである1,25(OH)₂D₃ がビタミンD受容体(VDR)に結合し, 標的遺伝子の転写制御を行うことにより発揮される. 個体レベルではビタミンD は生体に欠かすことができない因子であることは, 臨床的には広く知られている. 近年, 諸外国の検討により活性型ビタミンD が様々な免疫調整作用を持つことが知られている(J. Rodrigo Mora et al, Nature Reviews Immunology 2008; 下図).



我が国でもビタミンD 欠乏症は増加しており, 全国的に発症が相次いでいる. 一方で, ビタミンD 欠乏と関連する疾患は次々と明らかになっている. ビタミンD 欠乏状態が, 骨粗鬆症のみならず, 大腸癌・乳癌・前立腺癌などの悪性腫瘍を始め, 糖尿病や多発性硬化症などの自己免疫疾患, 結核などの感染症, 精神疾患など多くの疾患の発症に関与する. 一方で, 生殖能力を持つ多くの日本人女性がビタミンD 不足と診断されている(J Bone Miner Metab. 2005;23(2):147-51). 妊娠現象は母体にとってみれば, 半同種移植片

(semiallograft), すなわち, 自己と同一のHLA ハプロタイプを1/2 共有する妊卵, 胎児や胎盤が生着するという現象である. 血液そのものの交流がない点では移植とは異なるものの, 免疫学的な機序が妊娠継続の成否に何らかの形でかかわっている可能性がある. そのため, 近年, 着床および妊娠の維持を一つの移植として考え, 原因不明の不妊症患者の中に免疫学的妊娠維持機構の破綻によるものが存在することが考えられている. 具体的には妊娠の成立と維持には T helper (Th) 2 優位の環境が重要であり, 母体と胎児の接点に

ある脱落膜リンパ球が Th2 型の応答をすることが大きな役割を果たすと考えられている. 逆にTh1 型の免疫応答は, 母体の細胞傷害性T細胞や NK細胞を活性化し局所的には, 絨毛・胎盤血管周囲の炎症を引き起こすことで毛細血管内における凝固線溶系の破綻をきたす. その結果, 絨毛浸潤異常や胎盤血流障害が生じ切迫流早産や胎児発育遅延の原因, さらに全身的には妊娠高血圧症候群や HELLP 症候群といった生命に関わる異常妊娠の原因になる. 最近, ビタミンDが生殖医療・周産期医療に関して需要である報告が増えており(Hum Reprod. 2012 Oct; 27(10):3015-27), 実際にビタミンD不足の妊婦は妊娠後期において妊娠高血圧症候群の発症が有意に高いことが知られている(J Clin Endocrinol Metab. 2007 Sep;92(9):3517-22). このことは本来ビタミンD が持つとされるTh2 優位環境への免疫制御作用は妊娠過程において必須の可能性があり, 妊娠初期の着床・胎盤形成にも関わっている可能性を十分に示唆する. しかしながら妊娠初期の異常である着床不全・不育症の病態に免疫制御作用のあるビタミンD が関わっている報告は国内外で皆無であった.

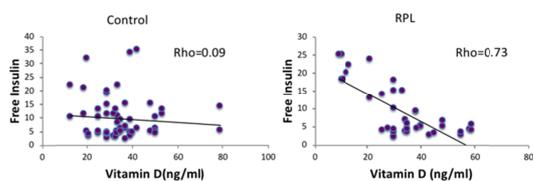
2. 研究の目的

厚生労働科学研究班(齊藤班)の報告では登録された2,361 例の不妊症の年齢分布を解析すると日本全体の出産年齢の分布と比較して不妊症の方はあきらかに35 歳以上の高齢の方の割合が高く, 35 歳~39 歳で流産率24.6%, 40~44 歳で51.0%と年齢とともに流産率は高まっている. また現代日本人女性の40代の大多数がビタミンD 不足とされている. まさに拳児希望女性の高齢化と加齢によるビタミンD 不足が現代日本の不妊・不育症患者像と一致する. そこでビタミンD, さらにビタミンDに関連する因子と生殖異常(不妊症・不育症)の検討を本研究の目的とした.(1)ビタミンDは骨代謝を制御する代表的なホルモンであるが, 免疫制御作用など多彩な機能を有している. 生殖領域では, ビタミンD欠乏が多嚢胞性卵巣症候群の病態基盤であるインスリン抵抗性に関与するとの報告があるが, 妊娠能に関する検討はこれまで報告がなかった.

一方で、AGEsは耐糖能障害進展のバイオマーカーであり、その受容体 (receptor for AGE, RAGE) を介したAGEs-RAGE系は、栄養環境の悪化により酸化ストレスや慢性炎症を惹起する以上のことから、ビタミンD欠乏を伴う生殖異常患者とAGEsの関連性を解明し、ビタミンDとAGEsを用いた生殖医療へのアウトカムを予測する新規栄養代謝バイオマーカーの可能性を検討することを目的とした。(2)メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) 遺伝子変異は葉酸の合成低下による神経管閉鎖障害のリスク因子であるが、ホモシステインの上昇による酸化ストレスの亢進と血栓形成にも関与する。ホモシステイン上昇による着床部位の微細血栓形成は流産の一因となり、MTHFR遺伝子多型は妊孕性低下と関連する可能性がある。最近、スウェーデンより発表された大規模調査のPopulation-Based studyにおいてビタミンDとホモシステインが負の相関関係であることが報告された(Hoogendijk E0 et al, Eur J Epidemiol 2016)。さらに、ビタミンDはホモシステインの上昇を予防するとの報告がある(Krie Bitzsch C et al, J Bone Miner Res. 2011)。以上の背景から、研究目的はビタミンD、MTHFR遺伝子多型が生殖領域、特に妊孕能における栄養環境改善の新規バイオマーカーとなり得るか検討することである。

3. 研究の方法

(1)

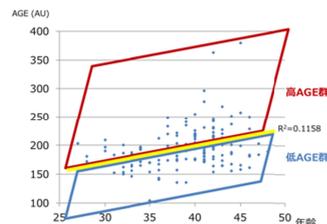


我々は不育症患者ではビタミンDとインスリン抵抗性が相関していることを明らかにしてきた。(unpublished data)。そこで本研究では体外受精プログラムに参加している148名の患者を対象に血中25-ヒドロキシビタミンD (AMH, DHEA-S, テストステロン, FSH 基礎値, プロラクチン), HOMA-R, 酸化ストレスマーカー (d-ROM, BAP), 糖化ストレスマーカー (AGE)と体外受精成績を検討した。

(2)不育症群 (n=77)とコントロールとして流産経験のない不妊症群 (n=29)のinsulin, protein S, protein C, PAI-1, homocysteine, 25(OH)₂VitaminD₃(VD)をELISAで、MTHFR C677T遺伝子多型をPCRで評価し、統計学的に解析を行った。

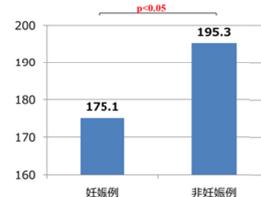
4. 研究成果

(1)女性に不妊原因がない例と比較し、各疾患群で有意にAGEs値が高値を示した。39



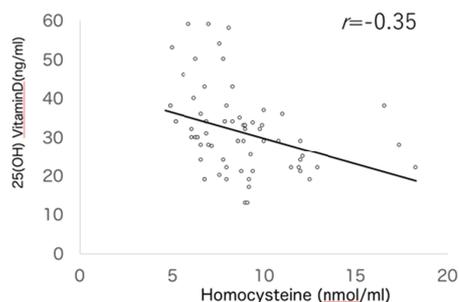
歳以下の高AGE群では低AGE群と比較し、有意にAMH値が低く (3.4 vs 1.8 ng/mL, p<0.05), 基礎FSH値は高い傾向にあった (6.8 vs 9.7 mIU/mL, p=0.12)。AGEs値と受精率や胚発育に差はみられなかった。妊娠例では非妊娠例と比較して有意にAGEs値が低値を示した (171.2 vs 195.9 AU, p<0.05)。本結果からAGEsは胚発生には関与が明らかとならなかったが、総妊娠を考慮すると妊娠する群では明らかにAGEsは低値であり、着床する母体側に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

	妊娠群 (n=23)	非妊娠群 (n=36)	P-value
平均年齢(歳)	37.0	39.2	n.s.
AGE値	175.1	195.3	p<0.05



(2)MTHFR C677T遺伝子多型は、両群で有意差がなかった。不育症群はコントロール群に比べてホモシステインが高い傾向にあった。不育症群においてMTHFR C677T遺伝子多型のホモ変異(TT)と比較して野生型,ホモ変異で統計学的にも有意差があった。ホモシステインの変異アリル数と増加幅とビタミンDの変異アリル数と減少幅はともに有意なトレンドが確認された。ホモシステインとビタミンDの間には有意な負の相関を認めた。この結果

からMTHFR遺伝子変異に基づくHCY増加は不育症リスクを上昇させた。さらにTアレル保因者はVD摂取によりホモシステイン減少させ、効率的に流産を低減させるテイラーメイド予防の可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Ota K, Takahashi T, Shiraishi S, Mizunuma H. A combination of microwave endometrial ablation and post-operative dienogest administration is effective for treating symptomatic adenomyosis. *J Obstet Gynaecol Res.* 2018 *in press*. 査読あり

Ota K, Sato K, Ogasawara J, Takahashi T, Mizunuma H, Tanaka M. Easy and safety technique for the laparoscopic application of the Seprafilm in gynecologic surgery. *Asian Journal of Endoscopic Surgery.* 2018 *in press*. 査読あり

Ota K, Kwak-Kim J, Takahashi T, Mizunuma H: Pregnancy complicated with PFAPA (periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis) syndrome: a case report. *BMC Pregnancy Childbirth* 2018 *in press*. 査読あり

Yumura Y, Tsumimura A, Okada H, **Ota K**, Kitazawa M, Suzuki T, Kakinuma T, Takae S, Suzuki N, Iwamoto T: Current status of sperm banking for young cancer patients in Japanese

nationwide survey. *Asian J Androl.* Feb 2. 2018 査読あり

doi: 10.4103. 2018 /aja.aja_74_17.

太田邦明, 高橋俊文, 水沼英樹: 卵巣組織凍結・移植の現状と未来. *日本がん・生殖医療学会誌* 2018; 1(1): 23-26. 査読なし

太田邦明, 白石 悟: 卵巣未熟奇形腫に対して妊孕性温存を考慮した治療によって寛解した一例 生殖医療医からの考察を踏まえて. *日本婦人科腫瘍学会雑誌* 2017; 35(2): 170-174. 査読なし

Sato K, **Ota K**, Maki J, Sato S, Masuda H, Tanaka M. Laparoscopic fenestration of a large peritoneal inclusion cyst: Description of a new surgical technique. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 219:68-69. 2017 査読あり

doi: 10.1016/j.ejogrb.2017.10.015.

Ota K, Sato K, Tanaka M. Ureteral stenosis due to DIE (deep infiltrating endometriosis) with difficulty in treatment; Case report and brief literature review. *Gynecol Minim Invas Ther.* 6(4):214-216. 2017 査読あり
doi:org/10.1016/j.gmit.2017.06.007.

Ota K, Sato Y, Shiraishi S. Giant polyp of uterine cervix: A case report and brief literature review. *Gynecol Obstet Case Rep* 3:2. 2017 査読あり
doi:10.21767/2471-8165.1000049.

Kwak-Kim J, Skariah A, Wu L, Salazar D, Sung N, **Ota K**: Humoral and cellular autoimmunity in women with recurrent pregnancy losses and repeated implantation failures: A possible role of vitamin D. *Autoimmun Rev.* 15(10):943-7. 2016 査読あり

doi: 10.1016/j.autrev.2016.07.015.

Ota K, Dambaeva S, Kim MW, Han AR, Fukui A, Gilman-Sachs A, Beaman K, Kwak-Kim J: 1,25-Dyhydroxy-vitamin D3 regulates NK-cell cytotoxicity, cytokine secretion, and degranulation in women with recurrent pregnancy losses. *Eur J Immunol.* 45(11):3188-99. 2015 査読あり
doi: 10.1002/eji.201545541.
Nakagawa K, Kwak-Kim J, **Ota K**, Kuroda K, Hisano M, Sugiyama R, Yamaguchi K: Immuno suppression with tacrolimus improved reproductive outcome of women with repeated implantation failure and elevated peripheral blood Th1/Th2 cell ratios. *Am J Reprod Immunol.* 73(4):353-61. 2015 査読あり
doi: 10.1111/aji.12338.
Ono M, Kajitani T, Uchida H, Arase T, Oda H, Uchida S, **Ota K**, Nagashima T, Masuda H, Miyazaki K, Asada H, Hida N, Mabuchi Y, Morikawa S, Ito M, Bulun SE, Okano H, Matsuzaki Y, Yoshimura Y, **Maruyama T**: CD34 and CD49f double-positive and lineage marker-negative cells isolated from human myometrium exhibit stem cell-like properties involved in pregnancy-induced uterine remodeling. *Biol Reprod.* 93(2): 1-9. 2015 査読あり
doi:
10.1095/biolreprod.114.127126.
宮崎 薫, 佐藤 健二, **太田 邦明**, 小川 誠司, 飯野 孝太郎, 升田 博隆, 丸山 哲夫, 末岡 浩, 田中 守: 臍部トロッカー挿入時に胃損傷をきたし, 腹腔鏡下にて修復し得た1例. *産科と婦人科* 2015; 2(7). 832-835. 査読なし

〔学会発表〕(計 11 件)

Ota K, Han A, Shiraishi S, Kwak-Kim J. The MTHFR C677T polymorphism confers a high risk for recurrent miscarriage in T allele carriers with Vitamin D deficiency. The 8th Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction Taipei, Taiwan, 2018 (口演発表)

太田邦明. Endometrial biology から紐解く, 黄体期管理の理論と実践 第134回関東連合産科婦人科学会 栃木2017 (ランチョンセミナー)

Ota K. Nutritional and environmental science in the reproductive age. The 11th of congress of the Pacific Society for Reproductive Medicine. Osaka, Japan, 2017 (招請講演).

太田邦明. 生殖期栄養環境マーカーの探索と臨床応用への可能性～母児二世にわたる栄養代謝環境を考えて～. 第35回日本受精着床学会総会・学術講演会 鳥取 2017 (シンポジウム).

Ota K, Han A, Shiraishi S, Kwak-Kim J. A lack of vitamin D affects serum homocysteine level in women with recurrent pregnancy losses and MTHFR C677T polymorphism. Chicago, USA, 2017 (口演発表).

Ota K, Shiraishi S, Tanaka M. Nutritional and environmental science in the reproductive age. 5th International Congress of Obstetrics and Gynecology, Prague, Czech Republic, 2017 (招請講演).

Ota K, Shiraishi S, Kwak-Kim J. Spontaneously ameliorated PFAPA (periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis) syndrome in pregnant woman with PFAPA: A case report. the 13th Congress of the International Society for Immunology of

Reproduction and the European Society for Reproductive Immunology, Erfurt, Germany, 2016.

Salazar M, Ota K, Sung N, Wu L, Skariah A, Dambaeva S, Beaman K, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. Inflammatory cytokines and chemokines are elevated in women with polycystic ovary syndrome(PCOS). the 13th Congress of the International Society for Immunology of Reproduction (ISIR) and the European Society for Reproductive Immunology, Erfurt, Germany, 2016.

Ota K, Kwak-Kim J, Tanaka M, Increased soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in recurrent pregnancy losses (RPL): a possible role of RAGE in RPL. 26th Conference of Korean Society for Assisted Reproduction. Yeosu Korea 2015(招請講演).

Maruyama T, Masuda H, Hida N, Oda H, Miyazaki K, Miki F, Hihara H, Ota K, Uchida H, Tanaka M, Non-invasive and real-time assessment of peritoneal lesions generated from human endometrial cell transplants locally accumulated by magnetic force in immunodeficient mice. 31th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Lisbon Portugal, 2015.

太田邦明, 丸山哲夫, 田中 守. ビタミンDは習慣流産患者のNK細胞機能を制御する. 第88回日本内分泌学会 総会・学術講演会 東京 2015 (若手研究奨励賞審査口演).

〔図書〕(計 3 件)

太田邦明, 『がん・生殖医療ハンドブック』
消化器がんや泌尿器科系がん手術が性

機能に及ぼす影響は?. (大須賀嬢, 鈴木直 編集主幹). メディカ出版 p123-128 2017.

太田邦明, 『実践よくわかる臨床生殖免疫学入門』ビタミンD.(柴原浩章 編集主幹). 中外医学社 p358-362 2017

太田邦明, 丸山哲夫. 『骨』を知る53の質問～ウェルエイジングをサポートするために～胎児期における骨の発生と成長について教えてください. 医薬ジャーナル社 p44-47 2015.

6. 研究組織

(1)研究代表者

太田 邦明 (OTA, Kuniaki)
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号: 90424142

(2)研究分担者

丸山 哲夫 (MARUYAMA, Tetsuo)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 10209702

長島 隆 (NAGASHIMA, Takashi)
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号: 40338116 (削除:平成27年7月28日)