

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月4日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11087

研究課題名(和文) 前方視的に子宮の着床能を評価システムの構築-至適測定時期の検討-

研究課題名(英文) Development of uterine receptivity evaluation system

研究代表者

中村 仁美 (NAKAMURA, HITOMI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80467571

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)：月経周期ごとに前方視的に子宮の着床能を評価できるようなパラメータの探索を行い、マウスを用いた基礎概念実証、できるだけ既存の医療機器を用いて作成した装置を用いて行ったヒトにおける安全性の確認と概念実証を経て、パラメータを決定した。本研究では事業化のためにセンサーを最終設計し、月経周期内におけるこれらパラメータの変化を検討するために臨床研究を行う準備を行った。さらにこれらパラメータの測定値を変化させる物質的基盤についても検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本は生殖補助医療の年間施行症例数が世界で最も多い国の1つであり、ここ20年で約10倍に増加した。2016年における年間総出生児において約5.4%は生殖補助医療によって出生した児である。一方で、治療周期あたりの出生率は2016年度の実績において、約5.3万人出生/44.7万治療周期=11.8%と十分な治療効率とはいえない。現在の不妊治療の治療効率を向上させるためには現在ブラックボックスである受け入れ側の子宮の着床能を月経周期ごとに前方視的に評価しその周期ごとの治療方針に反映させなければならない。

研究成果の概要(英文)：After the investigation of parameters which can evaluate the prospect of uterine receptivity, we have proved our basic concept using mice models. Then we developed the system for human clinical study using the existing medical equipment as much as possible. In this clinical trial we confirmed our basic concept without disturbing pregnancy. In this study, we designed a sensor for commercialization. To investigate the alteration of these parameters during menstrual cycle using this sensor, we prepared a clinical study as per legal requirements. Moreover, we assessed uterine glycocalyx to determine whether these parameters can electrophysiologically detect the sulfation and sialylation changes in the uterine glycocalyx in preparation for implantation.

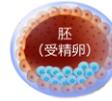
研究分野：生殖医学

キーワード：生殖医学 不妊症 子宮 着床 glyocalyx

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

妊娠成立の要件として卵側および受け入れ側の子宮の2つの条件がある。そして、両方が適切な状態にあるときにはじめて妊娠が成立する。問題のないカップルがタイミングのあった性交渉としたとしても、月経周期あたりの最大の妊娠率は40%に満たず、月経周期あたりの生児獲得率は10-25%といわれている事から、月経周期ごとに状況が変化する事が考えられる。

	○	○	×	×
	○	×	○	×
	○	×	×	×

自然妊娠では、本当に排卵したのか、排卵した卵子は受精したのか、受精卵はその後正しく発生したのだろうかなど多くは不明である。しかしながら、体外受精-胚移植を中心とした生殖補助医療においては、体外で着床直前まで発生する事を確認した受精卵（胚）を移植するにもかかわらず、妊娠率、生児獲得率は十分とはいえない。

受け入れ側の子宮の着床能を評価するために多くの検討がされてきた。しかしながら、臨床的には、(a)血中プロゲステロンレベル、(b)超音波診断装置を用いた子宮内膜の厚さの測定で評価されている。過去にはこれに加え、(c)子宮内膜を採取して組織学的に検討を行う、日付内膜診が行われてきた経緯があるが、前方視的な検索ではない上に侵襲が強いため一般日常診療では行われなくなった。(a)(b)については今日の日常診療でも施行されている。しかし、これらパラメータに問題がないにもかかわらず妊娠に至らない症例が多く、前方視的に着床能を評価するのに不十分であると認識されている。そのため、あらたなパラメータが必要である。

これまでの基礎研究：物質的標的マーカー

これまで多くの検討がされてきたが、着床現象における物質的基盤はあまりよくわかっていない。我々はSTAT3活性を子宮局所で着床期一過性に50%だけ抑制する事によりプロゲステロンレベルは正常にもかかわらず着床不全を呈するヒト着床不全モデルマウスを作成した[FEBS Lett. 580 (11): 2717-2722.]。ヒト臨床検体においても着床不全不妊症を疑う原因不明の反復不成功症例では、子宮内膜におけるSTAT3活性が低下している事が報告された[Dimitriadis E et al., (2007) Reprod Biol Endocrinol, 5:44-51. Choi Y, Kim HR et al. (2016) PLoS One 11:e0157696. Subramani E et al., (2016) Fertil Steril 105:1076-1084.]。ところが、STAT3活性の評価には子宮内膜を採取する必要があり、侵襲が大きくさらにその月経周期の治療に反映できるような前方視的な検索ではない。そのため、未だコンセンサスが得られたヒト子宮の着床能を前方視的に評価する事ができる物質的マーカーはない。

仮説：子宮内膜上皮における粘液物質の変化を電気生理学的にとらえる事ができないか？

着床現象においてはSTAT3のシグナル制御をうけ、子宮内膜上皮における糖鎖や糖脂質などの粘液物質が変化する。一般論として物質が硫酸化やシアル酸化した時にpHが変化する事が知られている。この事から、着床能の評価として子宮内膜上皮における糖鎖や糖脂質などの粘液物質の変化を電気生理学的にとらえる事ができないか？と考えた。

マウスを用いた概念実証

着床期（交配後3.5-5.5日目）前日である交配後2.5日目に、臆インピーダンスおよび体表をリファレンスとした子宮腔内の酸化還元電位差ORP (Oxidation-Reduction Potential)を測定し、測定値から子宮の着床能を予測できるか検討した。前述の着床不全モデルマウスでは臆インピーダンス値(VZ)が有意に高値、子宮ORPは有意に低値を示した(p<0.001)。それぞれのパラメータについて、 $VZ = X_{VZ} \text{ k}\Omega$ をカットオフ値と設定すると感度0.826、特異度0.727 [Nakamura H et al., (2018) Hum Reprod. 33: 2241-2248.]、 $ORP = X_{ORP} \text{ mV}$ をカットオフ値と設定すると、感度1.0、特異度0.862であった[Nakamura H et al., (2018) Reprod Fertil Dev. 30: 619-623.]。これら2つのパラメータを用いる事で90.9%の着床能を前方視的に予測できる事が明らかとなった。

ヒトにおける安全性の確認と概念実証（臨床研究I）

ヒトでも基礎概念が実証されるのかおよび測定の実行の安全性を検討するために、できるだけ既存の医療機器を用いて大阪大学医学部附属病院および定生会谷口病院の2施設で臨床研究（前向き、介入なし）[#12261(813-3)]を施行した。臨床研究に係るすべての方法は倫理委員会の基準に従い、倫理委員会の承認の下に施行した。臨床研究に関する倫理指針に求められている保障責任に対して臨床研究責任保険に加入した上で施行した。

対象	体外受精-胚移植術および凍結融解胚移植術をうける不妊症患者 (20-45 歳) 93 症例 (予定症例数: 100 症例)	
検討項目	安全性の検討	有害事象の有無 妊娠を阻害しないか?
	測定時期の検討	(i) 月経開始 9 or 10 日目 (ii) 採卵日もしくはプロゲステロン投与前日 (iii) 胚移植直前
	測定パラメータ	(d) 子宮局所 ORP、 (e) 子宮局所インピーダンス (UZ) (f) 膣インピーダンス (VZ)
最終評価項目	妊娠の帰結	

基礎概念実証と安全性実証のために可能な限り既存の医療機器を用いて検証を行った臨床研究 I から以下の 5 点が明らかとなった。

- (A) マウスで確認された変化をヒトにおいても確認
- (B) この検査システムが妊娠を阻害しない
- (C) 至適測定部位は子宮腔内である
- (D) 至適パラメータは酸化還元電位(ORP)とインピーダンス(UZ)の併用
- (E) 排卵以前にその月経周期の着床能を評価可能

上記(E)の結果より、体外受精-胚移植術を含む生殖補助医療だけでなく、一般不妊治療への応用が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、(1) これを実用化するために、センサー付き子宮腔内カテーテルの製品化のための最終設計を行い、(2) これを臨床研究のために大量生産する事、(3) 倫理委員会の承認を得た上で、至適測定時期の検討のために月経周期内におけるパラメータの変化について検討する事、さらに、仮説の通り、(4) 子宮腔内の glycoalyx が硫酸化およびシアル酸化しているのか物質的基盤について検討する事を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) (2) センサー付き子宮腔内カテーテルの製品化設計と作成

できるだけ既存の医療機器を使った臨床研究 I では、胃食道逆流症の診断に用いられている pH モニター (一般名: ペーハーセンサ付食道用カテーテル; 医療機器承認番号 22500BZX00088000) にインピーダンス測定用の電極を配置したものを使用した。ところが、インピーダンス測定の際の接触抵抗が安定していない事が後に発覚した。そこで、接触抵抗を検査できるような装置を開発し、接触抵抗が一定となり、かつ (ディスプレイ製品を想定したために) 製作コストをおさえて大量生産ができるような製品設計を行った。

(3) 臨床研究

平成 29 年 4 月 14 日に臨床研究法が公布され、本案件が、未承認の機器を用いる事から特別臨床研究法に該当する事が想定されたためにそのための倫理委員会の承認申請の準備を行った。

(4) 子宮腔内の glycoalyx の物質的基盤の検討

これまで単一の糖鎖の評価については多くの検討がなされている。受精卵が着床する点とその周辺では糖鎖によってはその発現が異なる。しかしながら、将来着床する点を予測する事は不可能である。そのため、子宮腔内の glycoalyx 全体としての変化を知る必要がある。しかしながら、これまでそのような検討はなかった。

生殖分野における糖鎖研究の第一人者であるマンチェスター大学の John Aplin 教授と共同でこれを行った。

子宮が着床準備をしていく過程において、子宮内膜における glycoalyx 全体が硫酸化およびシアル酸化する事について着床時期が明らかであるマウスを用いて、Alcian blue 染色、MAM (Maackia amurensis mitogen, specified to Sia α 2-3 Gal) レクチン染色により形態学的に評価を行った。

着床不全不妊症モデルとして前述の着床期一過性に子宮局所で Stat3 活性を遺伝子導入により抑制したマウスを用いて同様の検討を行った。

なお、すべての動物実験は本学医学系研究科倫理委員会の承認を得て、医学部附属動物実験施設にて行った。組み替え DNA 実験についても、大阪大学大学院医学系研究科の承認を得た上ですべてこの基準に従って行った。

4. 研究成果

(1) (2) センサー付き子宮腔内カテーテルの製品化設計と作成

医療機器製造許可（医療機器一般）および第二種医療機器製造販売業許可をもつ企業で、医療機器の製造と開発を行う企業に依頼し、センサー付き子宮腔内カテーテルの作成を行った。

(3) 臨床研究

実際に製品化設計されたセンサー付き子宮腔内カテーテルが完成するのを待って、当院の特別臨床研究事前相談、利益相反委員会の審査、特別臨床研究倫理委員会ブラッシュアップ会議の審査を経て、特別臨床研究倫理委員会に審査依頼申請をした。

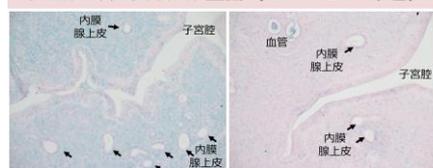
(4) 子宮腔内の glyocalyx の物質的基盤の検討

着床直前の子宮内膜では、アルシアンブルー染色強陽性であった（右上図）。このアルシアンブルー染色部位は、メチル化処理をすると染色性が消失し、saponification 処理をしても染色性が復活しない事から硫酸化ムチンおよび硫酸化プロテオグリカンが豊富に存在する事を確認した。

また、着床直前の子宮内膜において Sia α 2-3Gal に特異性のある MAM (Maackia amurensis mitogen) レクチンの染色性を認めた（右下図）。この染色性は neuraminidase (Sialidase) の前処理により消失した。この事から、MAM 特異性を確認した。

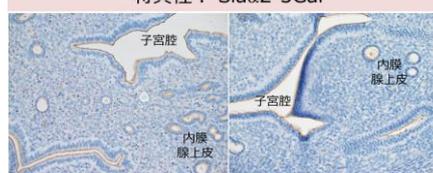
しかしながら、約 50% の Stat3 活性を子宮局所で抑制した着床不全不妊症モデルマウスでは、MAM レクチンの染色性についてはコントロールと差がないが、硫酸化ムチン and/or 硫酸化プロテオグリカンが明らかに減少している事が確認された [Nakamura H et al. (2018) Hum Reprod. 33: 2241-2248.]。

着床直前の子宮内膜には、硫酸化ムチン&硫酸化プロテオグリカンが豊富 (Alcian Blue染色)



コントロール 着床不全不妊症モデル

MAM (Maackia amurensis mitogen)レクチン
特異性: Sia α 2-3Gal



コントロール 着床不全不妊症モデル

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 33 件) (全て査読有り)

1. [Nakamura H](#), Hosono T, Taniguchi T, [Kumasawa K](#), Goa S, Ono M, [Kimura T](#). (2018) Prediction of pregnancy after frozen-thawed embryo transfer via in vivo intrauterine oxidation-reduction potential measurements: a pilot study. *Reprod Med Biol.* 17: 255-261. DOI: 10.1002/rmb2.12098.
2. [Nakamura H](#), Hosono T, [Kumasawa K](#), [Kimura T](#). (2018) Prospective evaluation of uterine receptivity in mice. *Reprod Fertil Dev.* 30: 619-623. DOI: 10.1071/RD17209.
3. [Nakamura H](#), Hosono T, [Kumasawa K](#), Jones C. J. P. Aplin, J. D., [Kimura, T](#). (2018) Vaginal bioelectrical impedance determines uterine receptivity in mice. *Hum Reprod.* 33: 2241-2248. DOI: 10.1093/humrep/dey313.

[学会発表] (計 5 1 件)

1. [中村仁美](#). [金南孝](#). [正木秀武](#). [熊澤恵一](#). [平野賢一](#). [木村正](#). (2018) 脂質代謝と男性生殖—基礎検討からの提案— (シンポジウム) 第63回日本生殖医学会.
2. [熊澤恵一](#). (2018) Preeclampsiaの診断と治療～日本発のエビデンス (シンポジウム) 第39回日本妊娠高血圧学会学術集会.
3. [熊澤恵一](#). (2018) FGRの新しい治療方法 (シンポジウム) 第6回 新胎児研究会.
4. [Kumasawa K](#), [Nakamura H](#), [Kimura T](#). (2016) A novel of biomarker profiles in experimental aged maternal mouse with pregnancy induced hypertension. 19th Congress of the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies (シンポジウム) (FAOPS 2016).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 「Vagina evaluation device and uterus evaluation devices」

発明者: [Hitomi Nakamura](#), [Tadashi Kimura](#), Takayoshi Hosono

権利者: Osaka University

種類: 特許

番号: 特許願 16/250, 564 (15/129, 783 の分割) 号

出願年: 2019 年

国内外の別: 国際

名称：「Vagina evaluation device and uterus evaluation devices」
発明者：Hitomi Nakamura, Tadashi Kimura, Takayoshi Hosono
権利者：Osaka University
種類：特許
番号：特許願 15/129,783 号
出願年：2016 年
国内外の別：国際

○取得状況（計 1 件）
名称：「膣評価装置及び子宮評価装置」
発明者：中村仁美 木村正 細野剛良
権利者：大阪大学
種類：特許
番号：特許第 06414713 号
取得年：2018 年
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：木村 正
ローマ字氏名： KIMURA, Tadashi
所属研究機関名：大阪大学
部局名：医学系研究科
職名：教授
研究者番号（8 桁）：90240845

研究分担者氏名：香山 晋輔
ローマ字氏名： KOYAMA, Shinsuke
所属研究機関名：大阪大学
部局名：医学系研究科
職名：招聘教員
研究者番号（8 桁）：30528005

研究分担者氏名：熊澤 恵一
ローマ字氏名： KUMASAWA, Keiichi
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名：講師
研究者番号（8 桁）：90444546

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：John D. Aplin
ローマ字氏名：John D. Aplin
Maternal and Fetal Health Research Centre, Division of Developmental Biology and
Medicine, School of Medical Sciences, Faculty of Biology, Medicine and Health,
University of Manchester, Manchester M13 9WL, UK
Maternal and Fetal Health Research Centre, St. Mary's Hospital, Central
Manchester University Hospitals NHS Foundation Trust, Manchester Academic Health
Sciences Centre, Manchester M13 9WL, UK

研究協力者氏名：Carolyn J.P. Jones
ローマ字氏名：Carolyn J.P. Jones
Maternal and Fetal Health Research Centre, Division of Developmental Biology and
Medicine, School of Medical Sciences, Faculty of Biology, Medicine and Health,
University of Manchester, Manchester M13 9WL, UK
Maternal and Fetal Health Research Centre, St. Mary's Hospital, Central
Manchester University Hospitals NHS Foundation Trust, Manchester Academic Health
Sciences Centre, Manchester M13 9WL, UK

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。