

平成30年 5月15日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15701

研究課題名(和文) 子宮頸部の指標による子宮内膜の胚受容能の新規評価法の開発

研究課題名(英文) Cervical biomarkers to detect uterine endometrial receptivity

研究代表者

廣田 泰 (HIROTA, YASUSHI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40598653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：着床障害は良好胚を胚移植しても妊娠しないことで定義されるが、着床障害の診断法の確立が生殖医学の大きな課題となっている。本研究では、非侵襲的な子宮内膜の胚受容能の検査法の確立を目指して、子宮頸部上皮の分子変化を指標とした子宮内膜の胚受容能の新規検出が可能であるかを検討した。3つの着床障害マウスモデルを用いて着床特異的に発現する子宮頸部上皮の320遺伝子を抽出することができ、胚接着調節因子LIFの子宮頸部細胞における発現が、ヒトでもマウスでも子宮内膜の着床能の指標となることが判明した。本研究により、子宮頸部上皮遺伝子の検討により着床能評価が可能であることが示され、新規着床検査の基盤知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to establish a new diagnostic strategy for implantation failure. To identify cervical biomarkers for embryo implantation using mouse models of implantation failure, we employed laser capture microdissection system to dissect cervical tissues from three types of mouse models of drug-induced implantation failure, and control mice, and RNA-seq of these cervical tissues were performed. We identified 320 genes with implantation-dependent upregulation in the mouse cervical epithelium, which was shown by mouse models of drug-induced implantation failure. The selected genes are candidates of cervical biomarkers in uterine capacity of implantation. Cervical epithelium obtained by cervical smear may be a useful material to detect the implantation capacity of the uterus. Although our findings in the current study were achieved by the animal studies, we believe that our newly-established approaches in mice can be clinically applied to humans.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮頸部 子宮内膜 LIF 着床 胚受容能 着床障害 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

体外受精が不妊治療としてごく一般化し、現在では出生児の20人に1人が体外受精・胚移植妊娠によるものになっている。現在、受精卵を用いた着床前診断が臨床的応用されつつあり、この分野の研究・臨床が世界的に精力的に進められており、良好胚を形態学的ではなく遺伝学的に選別する時代が到来している。その一方で、着床障害の治療はこれまで革新的な診断・治療法が全く提案されておらず、子宮内は未だブラックボックスといえる。着床障害は良好胚を胚移植しても妊娠しないことで定義されるが、着床障害の新規診断・治療法の確立が不妊治療の残された最後の大きな課題となっている。ヒトもマウスも卵子は卵管内で精子と受精し、着床前期胚として卵管内で発育し、着床直前に胚盤胞となり子宮内に移入する。マウス子宮内膜に関しては、排卵直後にはエストロゲン(17 β -estradiol; E2)の作用によって子宮内膜管腔は鋸歯状となるが、その後の卵巣黄体化に伴いプロゲステロン(P4)に暴露されることで、子宮内膜は適切な細胞増殖・分化の状態を獲得し、管腔はスリット状になる。その後P4に加えて再度E2が卵巣から分泌され、その作用を受けた子宮内膜上皮は、何らかの生理活性物質を放出し、その作用により胚が活性化され、子宮への接着反応、すなわち着床が開始する。着床により胚および子宮内膜の細胞分化が加速する。着床においては、子宮内膜と胚という2つの要素において、着床を可能にする能力がタイミングよく獲得されることが必須である。このうち子宮内膜側の能力を「子宮内膜の胚受容能」と呼ぶ。マウスおよびヒトの子宮内膜の胚受容能の獲得に際して、子宮内膜の増殖能のダイナミックな変化(子宮内膜上皮増殖抑制・間質増殖亢進)と、子宮内膜上皮の細胞極性の減弱が認められ、これらは子宮内膜の胚受容能獲得の必要条件と考えられている。P4の影響下に、これらの変化が起こることがその後の着床の成立には必須であり、この機構が障害されると着床しない。

2. 研究の目的

子宮内膜日付診にしても上記の子宮内膜の指標を用いるとしても、子宮内膜の胚受容能の検出には子宮内膜を採取し組織を調べることが必要となるが、臨床的には子宮内膜組織診を行った周期は胚移植を行うことができない。また着床能を調べる非侵襲的検査としては子宮内膜厚を超音波で測定することしかなく機能的な指標はないのが現状である。このような問題を解決するためには、子宮内膜の胚受容能の獲得機構の詳細を明らかにすると同時に、非侵襲的な子宮内膜の胚受容能の検査法の確立が望まれる。本研究は、子宮頸部上皮の分子変化を指標とした子宮内膜の胚受容能の新規検出法の開発を目指した基礎的研究である。子宮頸部の扁平

上皮細胞は子宮頸部細胞診の要領で容易に採取できるため、この細胞を用いた検出法は非侵襲的な方法として簡易で利便性が高い。

3. 研究の方法

動物実験は東京大学医学部・医学系研究科動物実験委員会の承認のもとに行った。ヒト検体を用いた研究は東京大学医学部・医学系研究科倫理委員会の承認のもとに、患者の同意を得て採取した検体を用いて行った。レーザーマイクロダイセクションで着床期のマウス子宮頸部上皮を切除・回収し、RNA-seqで解析した。PGRアンタゴニストであるRU486(day3午後8mg/kg体重を投与)、エストロゲン受容体アンタゴニストであるICI182780(day3午後7.5mg/kg体重を投与)、酸化ストレス誘導剤パラコート(day3午後70mg/kg体重を投与)による3つの着床障害マウスモデルを用いて着床特異的に発現する子宮頸部上皮の分子を抽出した。胚接着の機能因子であるLIFの、マウスおよびヒト子宮頸部における発現を解析した。

4. 研究成果

野生型マウス(C57/BL/6)の着床前期から着床期にかけて子宮頸部上皮に発現するmRNAをRNA-seqで調べ、時系列で比較した。day3午前からday4午前にかけて5倍以上増加および減少するtranscriptはそれぞれ359遺伝子および653遺伝子であり、day4午前からday4午後にかけて5倍以上増加および減少するtranscriptはそれぞれ262遺伝子および237遺伝子であった。PGRアンタゴニストRU486、エストロゲン受容体アンタゴニストICI182780、酸化ストレス誘導剤パラコートの投与により、day5午前に胚接着反応認められないことを確認した。子宮頸部細胞において、day3午前からday4午前にかけて2倍以上発現増加するtranscriptのうち、RU486、ICI182780、パラコートによる3つの着床障害マウスモデルでいずれも発現低下したものが、320遺伝子あった。このように、着床特異的に変動する子宮頸部遺伝子を抽出することが可能であった。胚接着調節因子であるLIFに着目してみると、マウス子宮頸部上皮のLIFはday3に比べてday4午前に有意に増加し、RU486およびパラコートによる着床障害マウスで低下していることが判明し、さらに、ヒト子宮頸部上皮でも着床期にLIF発現が増加していることが確認できた。以上の結果から、子宮頸部上皮細胞に発現する遺伝子を用いて着床能を評価でき、LIFがそのマーカーの1つになりうるということが考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計20件)

1. Matsumoto L, Hirota Y, Saito-Fujita T,

- Takeda N, Tanaka T, Hiraoka T, Akaeda S, Fujita H, Shimizu-Hirota R, Igaue S, Matsuo M, Haraguchi H, Saito-Kanatani M, Fujii T, Osuga Y. HIF2 α in the uterine stroma permits embryo invasion and luminal epithelium detachment. *J Clin Invest.* 査読有, 2018, in press.
2. Egashira M, Hirota Y, Shimizu-Hirota R, Saito-Fujita T, Haraguchi H, Matsumoto L, Matsuo M, Hiraoka T, Tanaka T, Akaeda S, Takehisa C, Saito-Kanatani M, Maeda K, Fujii T, Osuga Y. F4/80+ macrophages contribute to clearance of senescent cells in the mouse postpartum uterus. *Endocrinology.* 査読有, Vol.158, 2017, pp.2344-2353, DOI:10.1210/en.2016-1886
 3. Hiraoka T, Hirota Y, Saito-Fujita T, Matsuo M, Egashira M, Matsumoto L, Haraguchi H, Dey SK, Furukawa KS, Fujii T, Osuga Y. STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized uterine matrix transplantation. *JCI Insight.* 査読有, Vol.1, 2016, pp.e87591, DOI:10.1172/jci.insight.87591
 4. Deng W, Cha J, Yuan J, Haraguchi H, Bartos A, Leishman E, Viollet B, Bradshaw HB, Hirota Y, Dey SK. p53 coordinates decidual sestrin 2/AMPK/mTORC1 signaling to govern parturition timing. *J Clin Invest.* 査読有, Vol.126, 2016, pp.2941-2954, DOI:10.1172/JCI87715
 5. Aikawa S, Kano K, Inoue A, Wang J, Saigusa D, Nagamatsu T, Hirota Y, Fujii T, Tsuchiya S, Taketomi Y, Sugimoto Y, Murakami M, Arita M, Kurano M, Ikeda H, Yatomi Y, Chun J, Aoki J. Autotaxin-lysophosphatidic acid-LPA3 signaling at the embryo-epithelial boundary controls decidualization pathways. *EMBO J.* 査読有, Vol.36, 2017, pp.2344-2353, DOI:10.15252/embj.201696290
 6. Takahashi N, Harada M, Hirota Y, Zhao L, Azhary JM, Yoshino O, Izumi G, Hirata T, Koga K, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. A Potential Role for Endoplasmic Reticulum Stress in Progesterone Deficiency in Obese Women. *Endocrinology.* 査読有, Vol.158, 2017, pp.84-97, DOI:10.1210/en.2016-1511
 7. Izumi G, Koga K, Takamura M, Bo W, Nagai M, Miyashita M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Yoshino O, Fujii T, Osuga Y. OSCM for Hysterosalpingography Modulates Dendritic Cell and Regulatory T Cell Profiles in the Peritoneal Cavity: A Possible Mechanism by Which OSCM Enhances Fertility. *J Immunol.* 査読有, Vol.198, 2017, pp.4277-4284, DOI:10.4049/jimmunol.1600498
 8. Takahashi N, Harada M, Hirota Y, Nose E, Azhary JM, Koike H, Kunitomi C, Yoshino O, Izumi G, Hirata T, Koga K, Wada-Hiraike O, Chang RJ, Shimasaki S, Fujii T, Osuga Y. Activation of Endoplasmic Reticulum Stress in Granulosa Cells from Patients with Polycystic Ovary Syndrome Contributes to Ovarian Fibrosis. *Sci Rep.* 査読有, Vol.7, 2017, pp.10824, DOI:10.1038/s41598-017-11252-7
 9. Akino N, Wada-Hiraike O, Terao H, Honjoh H, Isono W, Fu H, Hirano M, Miyamoto Y, Tanikawa M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Koga K, Oda K, Kawana K, Fujii T, Osuga Y. Activation of Nrf2 might reduce oxidative stress in human granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 査読有, 2017, pii: S0303-7207(17)30522-1, DOI:10.1016/j.mce.2017.10.002.
 10. Saito A, Hirata T, Koga K, Takamura M, Fukuda S, Neriishi K, Pastorfid G, Harada M, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Preoperative assessment of factors associated with difficulty in performing total laparoscopic hysterectomy. *J Obstet Gynaecol Res.* 査読有, Vol.43, 2017, pp.320-329, DOI:10.1111/jog.13198
 11. Shozu M, Ishikawa H, Horikawa R, Sakakibara H, Izumi SI, Ohba T, Hirota Y, Ogata T, Osuga Y, Kugu K. Nomenclature of primary amenorrhea: A proposal document of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology committee for the redefinition of primary amenorrhea. *J Obstet Gynaecol Res.* 査読有, Vol.43, 2017, pp. 1738-1742, DOI: 10.1111/jog.13442
 12. Makabe T, Koga K, Miyashita M, Takeuchi A, Sue F, Taguchi A, Urata Y, Izumi G, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Drospirenone reduces inflammatory cytokines, VEGF and NGF expression in human endometriotic stromal cells. *J Reprod Immunol.* 査読有, Vol.119, 2016, pp.44-48, DOI:10.1016/j.jri.2016.12.002.
 13. Takeuchi A, Koga K, Miyashita M,

- Makabe T, Sue F, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Fujii T, Osuga Y. Dienogest reduces proliferation, NGF expression and nerve fiber density in human adenomyosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 査読有, Vol.207, 2016, pp.157-161, DOI:10.1016/j.ejogrb.2016.10.053
14. Haraguchi H, Koga K, Takamura M, Makabe T, Sue F, Miyashita M, Urata Y, Izumi G, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Oda K, Kawana K, Fujii T, Osuga Y. Development of ovarian cancer after excision of endometrioma. *Fertil Steril.* 査読有, Vol.106, 2016, pp.1432-1437.e2, DOI:10.1016/j.fertnstert.2016.07.1077.
15. Izumi G, Koga K, Takamura M, Makabe T, Nagai M, Urata Y, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Fujii T, Osuga Y. *Fertil Steril.* 査読有, Vol.107, 2016, pp.167-173.e2, DOI:10.1016/j.fertnstert.2016.09.036
16. Takamura M, Koga K, Izumi G, Urata Y, Nagai M, Hasegawa A, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Neutrophil depletion reduces endometriotic lesion formation in mice. *Am J Reprod Immunol.* 査読有, Vol.76, 2016, 193-199, DOI:10.1111/aji.12540.
17. Bolnick AD, Bolnick JM, Kilburn BA, Stewart T, Oakes J, Rodriguez-Kovacs J, Kohan-Ghadr HR, Dai J, Diamond MP, Hirota Y, Drewlo S, Dey SK, Armant DR; NICHD National Cooperative Reproductive Medicine Network. Reduced homeobox protein MSX1 in human endometrial tissue is linked to infertility. *Hum Reprod.* 査読有, Vol.31, 2016, pp.2042-2050, DOI:10.1093/humrep/dew143.
18. Miyashita M, Koga K, Izumi G, Sue F, Makabe T, Taguchi A, Nagai M, Urata Y, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Effects of 1,25-Dihydroxy Vitamin D3 on Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 査読有, Vol.101, 2016, pp.2371-2379, DOI:10.1210/jc.2016-1515.
19. Takahashi N, Harada M, Hirota Y, Zhao L, Yoshino O, Urata Y, Izumi G, Takamura M, Hirata T, Koga K, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. A potential role of endoplasmic reticulum stress in development of ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 査読有, Vol.428, 2016, pp.161-169, DOI:10.1016/j.mce.2016.03.032.
20. Taguchi A, Koga K, Kawana K, Makabe T, Sue F, Miyashita M, Yoshida M, Urata Y, Izumi G, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Resveratrol Enhances Apoptosis in Endometriotic Stromal Cells. *Am J Reprod Immunol.* Vol.75, 査読有, 2016, pp.486-492, DOI:10.1111/aji.12489.
- 〔学会発表〕(計12件)
1. Hirota Y, Hiraoka T, Saito-Fujita T, Fujii T, Osuga Y. Activated IL6-STAT3 pathway in adenomyosis. World Congress of Endometriosis 2017 (招待講演)(国際学会), 2017
 2. Hirota Y, Saito-Fujita T, Matsumoto L, Haraguchi H, Matsuo M, Hiraoka T, Akaeda S, Tanaka T, Takeda N, Osuga Y, Fujii T. Uterine hypoxia inducible factor contributes to blastocyst invasion by clearance of luminal epithelium at the site of blastocyst attachment. Society for the Study of Reproduction, 50th Annual Meeting(国際学会), 2017
 3. Hirota Y. Medical and Surgical Treatment in Adenomyosis. 18th APAGE Annual Congress 2017 (招待講演)(国際学会), 2017
 4. Hirota Y. STAT3: A Key Transcriptional Factor Not Only in Embryo Implantation but also in Endometrial Regeneration. Society for Reproductive Investigation, 65th Annual Scientific Meeting, Endometrium Satellite Meeting (招待講演)(国際学会), 2018
 5. Matsuo M, Hirota Y, Saito-Fujita T, Haraguchi H, Igaue S, Matsumoto L, Hiraoka T, Akaeda S, Tanaka T, Fujii T, Osuga Y. Levonorgestrel Inhibits Embryo Implantation by Downregulation of Uterine LIF Expression. Society for Reproductive Investigation, 65th Annual Scientific Meeting (国際学会), 2018
 6. 廣田泰. 生殖医学の最先端 不妊症治療におけるブレイクスルーを目指して 着床障害の分子機構の解明に基づく着床能の診断法と革新的治療技術の開発. 第69回日本産科婦人科学会学術講演会 シンポジウム, 2017
 7. 廣田泰. 天然型プロゲステロンが着床に与える影響. 第3回最適な不妊治療を考える会(招待講演), 2016
 8. 廣田泰. 黄体ホルモンによる子宮の胚受容能と着床の調節機構. 第5回プロゲステロン研究会(招待講演), 2016

9. 廣田泰, 子宮の線維化: 子宮腺筋症 ~ IL6 / STAT3 経路の関与 ~. 第1回 Frontier in basic and clinical research of fibrosis (招待講演), 2017
10. 廣田泰, 平岡毅大, 大須賀穰. IL6-STAT3 経路の活性化が子宮腺筋症の進展に寄与する. 第90回日本内分泌学会学術総会 シンポジウム(招待講演), 2017
11. Hirota Y. IL6-STAT3 signaling in adenomyosis. Asian Conference of Endometriosis 2016 (招待講演)(国際学会), 2016
12. Hirota Y. STAT3 promotes uterine regeneration in a mouse model of decellularized uterine matrix transplantation. Gordon Research Conference on Mammalian Reproduction (国際学会), 2016

〔図書〕(計1件)

1. 廣田泰, 日本産婦人科医会編. 研修ノート No.99 流産のすべて. 総ページ数 81 頁, 2018.

〔その他〕

1. ホームページ等
<https://plaza.umin.ac.jp/kyobgyn/recruit/aboratory/hirota.html>
2. 2017 年度日本内分泌学会研究奨励賞受賞: 廣田泰
3. 2017 年度日本医師会医学研究奨励賞受賞: 廣田泰

6. 研究組織

(1)研究代表者

廣田 泰 (HIROTA, Yasushi)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 40598653

(2)研究分担者 藤田知子

藤田 知子 (Saito-Fujita, Tomoko)
東京大学・医学部附属病院・研究員
研究者番号: 60375441