

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 5 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20208

研究課題名（和文）子宮内膜間葉系幹細胞の活性化と再生による妊孕能獲得メカニズムの解明

研究課題名（英文）Activation and regeneration of endometrial mesenchymal stromal cells for acquiring receptivity

研究代表者

村上 圭祐 (Murakami, Keisuke)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90597064

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：周期的な脱落膜化と月経が受容能獲得に重要である。本研究では、子宮内膜脱落膜化がその後の子宮内膜再生能に及ぼす影響を解析した。In vitroでヒト子宮内膜間質細胞に脱落膜化刺激を加え、U群（刺激なし）とD群（刺激あり）でコロニー形成能、パラクライン効果を介する近傍細胞のコロニー形成能へ及ぼす影響について比較解析した。コロニー形成能は、D群で高値を示した。パラクライン効果の解析では、U群、D群ともに、インサートにD群の細胞を播いて共培養した時にコロニー形成能は高値を示した。子宮内膜脱落膜化はコロニー形成能の改善やパラクライン効果を介して、次周期の子宮内膜再生に影響を及ぼしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜脱落膜化が、着床・その後の妊娠維持に重要であることはよく知られているが、着床しなかった場合に次周期の子宮内膜再生に及ぼす影響についてはまだ研究されていない。本研究結果より、子宮内膜脱落膜化はコロニー形成能の改善やパラクライン効果を介して、次周期の子宮内膜再生に影響を及ぼしていることが示唆された。子宮内膜菲薄化などの反復着床不全患者に対して、子宮内膜脱落膜化細胞の自己移植療法を開発することで、子宮内膜再生能が改善し不妊治療成績が改善することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Cyclic regeneration and menstruation is crucial for acquiring receptivity. In this study, we aimed to clarify the effect of endometrial decidualization for subsequent cycle regeneration. Human endometrial stromal cells were isolated and decidualized with cAMP and MPA. Colony forming unit (CFU) and paracrine effect for CFU of neighboring cells were compared between undecidualized cells and decidualized cells. CFU is significantly higher in decidualized cells. In analysis of paracrine effect, CFU of undecidualized cells and decidualized cells are both improved when they are co-cultured with decidualized cells. We conclude that endometrial decidualization could affect subsequent cycle regeneration through the improvement of CFU and paracrine effect.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：子宮内膜 脱落膜化 再生 月経 コロニー形成能 パラクライン効果

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国では少子高齢化による生殖年齢層の減少に伴い、出生数は年々減少している。一方、晩婚化に伴い不妊症の夫婦は年々増加し、現在では出生児の32人に1人は体外受精を含む高度生殖医療 (ART: Assisted Reproductive Technology) によって出生している。体外受精における妊娠率は1個の受精卵(胚)で20 - 40%程度であり、形態学的良好胚を複数回移植しても妊娠しない反復着床障害 (RIF: recurrent implantation failure) 患者は胚移植後の妊娠率は3-10%と非常に低いため、精神的にも金銭的にも負担が大きい。従来、RIFは染色体異常などの形態学的に判断の不可能な胚の異常が不妊原因であると考えられてきた。臨床レベルで胚の一部を採取し、染色体検査を行い、染色体異常のない胚を子宮内に移植する着床前診断 (PGD: Preimplantation Genetic Diagnosis) が日本でも行われ始めたが、PGD後の胚移植時の妊娠率は30 - 60%であり、胚だけが着床障害の原因ではないことは最近明らかとなっている。

ヒト子宮内膜は生殖年齢期間において約400回もの増殖、分化、剥奪といったダイナミックな変化を繰り返す非常に再生能の高い組織である。月経開始とともに卵巣では卵胞が発育し、一方子宮では子宮内膜が増殖、脱落膜変化を起こし着床に備える。排卵後6-10日目が着床期と呼ばれ、この時期に子宮内膜脱落膜細胞は栄養膜の侵入の調節、妊娠時特有の子宮内膜免疫細胞の動員、血管新生の制御をすることで、組織を再構築している。子宮内膜にも間葉系幹細胞が存在することが最近の研究で分かってきており、ヒト子宮内膜の再生における中心的な役割を果たしていると考えられている。

2. 研究の目的

ヒトは月経を有する数少ない生物であり、周期的な脱落膜化反応と月経が受容能獲得に重要なステップである。組織再生は細胞自身の増殖能や分化能に加えて、細胞からの分泌物が近傍の細胞へ作用するパラクライン効果を介して促進される。我々は、子宮内膜脱落膜化は胚受容能の獲得だけではなく、着床しなかった場合の次周期の子宮内膜再生にも影響を及ぼしていると推測している。また、レスベラトロールはSirtuin (SIRT)1を活性化し、レチノイン酸シグナルを含む様々な分子経路を介し細胞老化や酸化ストレスを抑制し、間葉系幹細胞の自己複製を促進することが報告されており、子宮内膜再生能改善に有用なのではないかと推測した。本研究では、まず、子宮内膜の脱落膜化反応がその後の子宮内膜再生能や脱落膜化能に及ぼす影響について解析した。次に、レスベラトロールが子宮内膜の老化や脱落膜化反応へ及ぼす影響を解析した。

3. 研究の方法

当院で婦人科良性疾患に対して腹腔鏡下手術を施行した患者を対象にインフォームドコンセントを得て子宮内膜を採取し、メスで細切し、コラゲナーゼ処理し、子宮内膜間質細胞を分離抽出し、細胞培養した。子宮内膜間質細胞に脱落膜化刺激 (cAMP + MPA) を8日間加えたD群 (Decidualized cells) と加えなかったU群 (Undecidualized cells) において、コロニー形成能、継代後の再脱落膜化能、共培養によるパラクライン効果を介する近傍細胞のコロニー形成能へ及ぼす影響について比較解析した。

次に、子宮内膜間質細胞の脱落膜化過程でレスベラトロールを添加し、添加群と非添加群との間でレチノイン酸シグナル関連遺伝子および脱落膜マーカー (PRL, IGFBP1) の発現を分子解析した。

(1) コロニーフォーミングアッセイ

U群とD群を継代し、6-well-plateに100 cells/cm²で細胞を蒔いて、15日間培養した。15日後

に培養を終了しホルマリン固定後にヘマトキシリンで染色した。50細胞以上の密集した細胞をコロニーとし、コロニー形成能(%)は、(コロニー数 / 播種した細胞数) × 100で算出した。

(2) 脱落膜化実験

子宮内膜間質細胞に脱落膜化刺激 (cAMP + MPA) を8日間加え、RNeasy plus mini kitを用いてRNAを採取した。レスベラトロールの子宮内膜への影響を解析する際には、脱落膜化刺激 (cAMP + MPA) にレスベラトロールを添加した。SuperScript II Reverse Transcriptase for RT-PCR kitを用いて、cDNAを作成し、RTQ-PCRで脱落膜マーカー (PRL、IGFBP1、11 HSD1)、SIRT1、レチノイン酸シグナル関連遺伝子 (CRABP2、RAR) の発現を解析した。

(3) 共培養実験

U群とD群を継代し、インサートを用いて共培養実験を行った。ディッシュには、U群かD群の細胞を低密度 (100 cells/cm²) で播き、インサートにはメEDIUMのみか、U群かD群の細胞を高密度 (7000 cells/cm²) で播き 15日間共培養した。15日後に、ディッシュに撒いた細胞のコロニー形成能を比較した。

4. 研究成果

コロニー形成能は、U群 0.1(0.1-1.4)、D群 0.8(0.2-2.5)と有意にD群で高値を示した ($p=0.005$)。U群とD群の継代後の再脱落膜化過程での脱落膜化マーカー (PRL、IGFBP1、11 HSD1) の発現は両群間で有意差は認めなかった。U群とD群の継代後の共培養によるパラクライン効果の解析では、U群の共培養によるコロニー形成能は、インサート内容: Medium 0.2(0.1-0.9)、U群 0.4(0.3-2.1)、D群 1.1(0.4-2.9)であり、D群と共培養した時に有意に高値を示した ($p=0.001$)。D群の共培養によるコロニー形成能は、インサート: Medium 0.5(0.1-1.0)、U群 0.8(0.2-3.4)、D群 1.4(0.5-4.2)であり、D群と共培養した時に有意に高値を示した ($p=0.002$)。

レスベラトロールが子宮内膜の老化や脱落膜化に及ぼす影響の解析では、レスベラトロールの添加により子宮内膜間質細胞のSIRT1発現が亢進した。またレスベラトロール添加により、子宮内膜脱落膜化過程においてPPAR / の発現増加 (細胞分化の誘導) とCRABP2-RAR シグナル (アポトーシスの誘導) の発現抑制を認め、2つのレチノイン酸シグナルを制御していた。しかし、脱落膜化マーカーであるPRL、IGFBP1の発現は著明に抑制された。

以上の結果より、子宮内膜脱落膜化はコロニー形成能の改善やパラクライン効果を介して、次周期の子宮内膜再生に影響を及ぼしていることが示唆された。また、レスベラトロールは、子宮内膜間質細胞に対しても抗老化作用があることは分かったが、脱落膜化過程での添加では脱落膜化反応を抑制することが明らかとなり、実臨床においては、黄体期のレスベラトロール摂取は控えた方が脱落膜化という観点からは良いことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikemoto Y, Kuroda K, Nakagawa K, Ochiai A, Ozaki R, Murakami K, Jinushi M, Matsumoto A, Sugiyama R, Takeda S	4. 巻 10
2. 論文標題 Vitamin D Regulates Maternal T-Helper Cytokine Production in Infertile Women	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 E902
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu10070902	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ochiai A, Kuroda K, Ozaki R, Ikemoto Y, Murakami K, Muter J, Matsumoto A, Itakura A, Brosens JJ, Takeda S	4. 巻 10
2. 論文標題 Resveratrol inhibits decidualization by accelerating downregulation of the CRABP2-RAR pathway in differentiating human endometrial stromal cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Death Dis	6. 最初と最後の頁 276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41419-019-1511-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 落合 阿沙子、黒田 恵司、村上 圭祐、尾崎 理恵、池本 裕子、増田 彩子、伊熊 慎一郎、地主 誠、北出 真理、板倉 敦夫
2. 発表標題 CRABP2-RAR経路は子宮内膜間質細胞の細胞老化と脱落膜化に必須である
3. 学会等名 第63回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asako Ochiai, Keiji Kuroda, Yuko Ikemoto, Rie Ozaki, Keisuke Murakami, Koji Nakagawa, Rikikazu Sugiyama, Shuko Nojiri, Mari Kitade, Atsuo Itakura
2. 発表標題 Effect of resveratrol supplementation during embryo transfer on IVF outcomes in infertile women: a cross-sectional study.
3. 学会等名 第70回 日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuko Ikemoto, Keiji Kuroda, Koji Nakagawa, Asako Ochiai, Makoto Jinushi, Keisuke Murakami, Yuki Ujihira, Akemi Matsumoto, Rikikazu Sugiyama, Satoru Takeda
2. 発表標題 Effect of vitamin D supplementation on preconception immune tolerance in infertile women
3. 学会等名 The 33rd Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 落合阿沙子、黒田恵司、池本裕子、尾崎理恵、村上圭祐、中川浩次、杉山力一、野尻宗子、竹田省
2. 発表標題 生殖補助医療におけるレスベラトロールのサプリメントの着床や妊娠維持への影響
3. 学会等名 第62回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Asako Ochiai, Keiji Kuroda, Keisuke Murakami, Rie Ozaki, Yuko Ikemoto, Yuki Ujihira, Makoto Jinushi, Jun Kumakiri, Mari Kiatade, Atsuo Itakura, Satoru Takeda
2. 発表標題 The sirtuin 1 activator resveratrol regulates the retinoic acid signaling pathway and suppresses decidualization of human endometrial stromal cells
3. 学会等名 第69回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 落合阿沙子、黒田恵司、村上圭祐、尾崎理恵、池本裕子、氏平由紀、地主誠、熊切順、北出真理、竹田省
2. 発表標題 Sirtuin活性化作用を持つレスベラトロールはレチノイン酸シグナルを介し着床における子宮内膜脱落膜化過程を抑制する
3. 学会等名 第61回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Kuroda, K., Brosens, J.J., Quenby, S., Takeda, S., Yamaguchi, T., Ikemoto, Y., Nakagawa, K., Murakami, K.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 125
3. 書名 Treatment strategy of unexplained infertility and recurrent miscarriage	

1. 著者名 竹田省、田中温、黒田恵司、佐藤雄一、熊切順、地主誠、桜井明弘、堀川隆、辻村晃、村上圭祐、伊熊慎一郎、竹田純、牧野真太郎、会田拓也、御木多美登、池本裕子、中尾佳月、根岸広明、山口貴史、竹本洋一、菊地盤、北出真理、尾崎理恵、加藤紀子、黒田雅子、斎藤寿一郎、坂本愛子、杉村基、手島薫、濱村憲佑	4. 発行年 2017年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 423
3. 書名 不妊症・不育症治療 希望に応える専門外来の診療指針	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松本 あけみ (Matsumoto Akemi)		
研究協力者	黒田 恵司 (Kuroda Keiji)		
研究協力者	竹田 省 (Takeda Satoru)		