

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11260

研究課題名（和文）転写因子HAND2による着床制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism for embryo implantation by transcription factor HAND2

研究代表者

岡田 英孝（OKADA, Hidetaka）

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：80330182

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：子宮内膜は、プロゲステロン作用により適切に分化（脱落膜化）して胚受容能を獲得している。ヒト子宮内膜局所で転写因子HAND2が、ヒト子宮内膜の細胞レベルでどのように機能しているのかを解析した。HAND2の発現抑制した培養子宮内膜間質細胞では、形態学的および機能的な脱落膜化が抑制されていた。血管新生因子の発現調節にもHAND2が関わっているという新たな知見を得た。これらの結果から、HAND2が脱落膜化や血管新生などの子宮内膜機能調節において、重要な役割を担っていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不妊治療において、着床率向上のために黄体ホルモン補充療法が行われている。黄体ホルモンは、胚着床ならびに以後の妊娠維持に必要な不可欠な性ステロイドホルモンである。今回の検討により、HAND2という転写因子が、黄体ホルモンによる子宮内膜の機能調整に重要な役割を担っていることが明らかとなった。本研究により見出した新知見は、将来の不妊治療（生殖医療）の発展に寄与すると考える。

研究成果の概要（英文）：Progesterone is an essential regulator of decidualization and a prerequisite for successful blastocyst implantation. Decidualization of the human endometrium involves a dramatic morphological and functional differentiation of human endometrial stromal cells (ESCs). We have demonstrated that small interfering RNA mediated silencing of HAND2 expression in ESCs during progesterone induced decidualization attenuates both the morphological differentiation and the levels of the decidua specific factors. Furthermore, HAND2 regulated the expression of angiogenic factors. These results suggest that the transcription factor HAND2 plays a key role in the regulation of the decidualization and angiogenesis of human ESCs.

研究分野：産婦人科

キーワード：子宮内膜

1. 研究開始当初の背景

体外受精・胚移植法の技術進歩により、採卵や胚移植の成功率は飛躍的に向上したが、移植あたりの妊娠率はいまだに不良である。妊娠率向上のためには、着床のメカニズムを解明することが重要な課題となっている。しかしながら、妊娠成立が子宮内膜というブラックボックスで起こる生命現象であり、不妊症の病因や病態を把握することは容易ではない。

プロゲステロン（黄体ホルモン）は、胚着床ならびに以後の妊娠維持に必要な不可欠な性ステロイドホルモンである。生殖医療においては、着床率向上のためにプロゲステロン補充療法が行われている。その標的組織である子宮内膜は、プロゲステロン作用により適切に分化（脱落膜化）して胚受容能を獲得している。脱落膜化の意義を明確するには、プロゲステロンに制御される標的遺伝子の同定とその機能解析が重要となる。

ヒト子宮内膜において、HAND2 という新規転写因子が、プロゲステロンで早期に誘導される分子であり、着床期内膜で有意に増加することを明らかにしてきた。HAND2 は、basic helix-loop-helix 構造を有する新規転写因子であり、実験動物において HAND2 が着床や脱落膜化に必要であることが、国外の複数の研究グループから報告されている。しかしながら、HAND2 がヒト子宮内膜の細胞レベルでどのように機能しているのか分かっていない。ヒト子宮内膜での HAND2 の調節機構や役割の解明は、まさに始まったばかりでその意義の解明が急がれている。

2. 研究の目的

ヒト子宮内膜において、HAND2 がプロゲステロンで早期に誘導される新規転写因子であることを見出してきた。HAND2 発現をマウス子宮局所で抑制すると着床が阻害されることから、HAND2 が子宮内膜機能調節に関与することを十分に支持するものであるが、これらの知見は動物実験により得られたものである。ヒト子宮内膜における HAND2 の調節機構やその分子機構の解明が必要となっている。

HAND2 は、プロゲステロンによる脱落膜化とともに誘導される転写因子なので、まずは脱落膜化における HAND2 の機能を検討した。ヒト子宮内膜培養細胞を用いて、分化による形態学的変化や脱落膜化関連因子を解析した。

短期間で急速に変化する子宮内膜は、生体内で最も顕著な血管新生の場となっている。着床現象の要となるのは血管新生であり、これを制御する血管新生因子の調節機構や役割を解明する必要がある。これまで子宮内膜機能調節に関わる血管新生因子として Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)、Angiopoietin (ANGPT)、Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1/CXCL12) が、性ステロイドホルモンにより特異的に制御されていることを明らかとした。性ステロイドホルモンにより制御される血管新生因子への HAND2 の作用を検討した。

着床期内膜でプロゲステロン受容体発現を確認すると、血管、免疫細胞、腺細胞では非常に弱く、間質細胞では強くなっている。つまり、プロゲステロンの標的細胞である間質細胞が、オートクライン・パラクライン因子を誘導して、子宮内膜の微小環境を整える中心的な役割を担っていると推察されている。HAND2 欠損したマウスでは着床不全となり、HAND2 が間質細胞から分泌する細胞増殖因子を抑制して腺上皮細胞の分化を促進するメカニズムが提唱されている。そこで、HAND2 による子宮内膜間質上皮の分子ネットワークに着目して解析した。

3. 研究の方法

研究材料は、患者の同意のもとに附属病院および関連施設において、各種良性病変に対して行われる子宮摘出手術、不妊検査の一環として行う子宮内膜組織（日付）診、子宮内容掻爬術などで得られた組織を採取した。ヒト子宮内膜組織を機械的および酵素的に融解して、ヒト子宮内膜間質細胞を分離培養した。

HAND2 の機能を明らかにするため、子宮内膜間質細胞を用いて、形態学的変化や脱落膜化関連因子を解析した。HAND2 に対する特異的な inhibitor が無いので、siRNA によりノックダウン（発現抑制）した細胞にて分子生物学的機能解析を行った。形態学的変化は、HAND2 の発現抑制した間質細胞を、紡錘形から類円形への脱落膜化変化が確認できる長期間（12 日間）培養して、光学顕微鏡にて詳細に評価した。脱落膜化への影響は、そのマーカーである PRL だけでなく、脱落膜化関連因子として、これまで報告のあった FBLN1、IL-15、PC6、dickkopf-1 を解析した。siRNA を導入した細胞から RNA を抽出・精製し、ゲノム DNA の混入を防ぐために DNase 処理をした RNA を用いて cDNA を作製してリアルタイム PCR で発現動態を評価した。

次に、性ステロイドホルモンにより制御されている血管新生因子（VEGF、ANGPT1、ANGPT2、SDF-1）の発現調整について、HAND2 の作用を検討した。プロゲステロンを添加培養して、HAND2 発現を抑制した細胞を用いて、これら血管新生因子の発現変化を調べた。

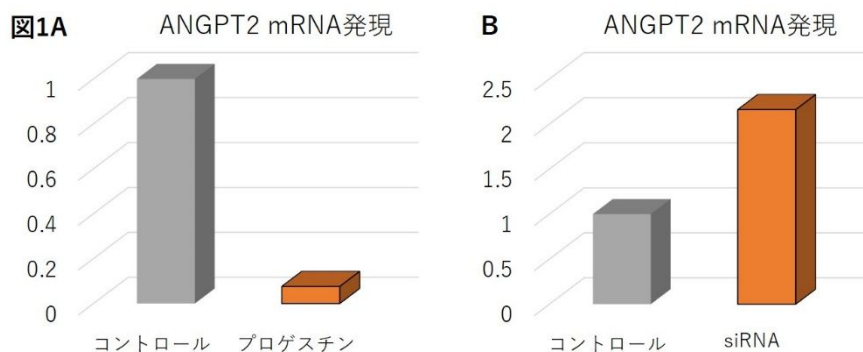
子宮内膜間質 上皮の分子ネットワークを解析については、実験動物で間質細胞から分泌される細胞増殖因子 Fibroblast growth factors（FGFs）が、腺上皮細胞の分化を促進させるメカニズムが提唱されている。そこで、血管新生因子でもある FGFs ファミリーに着目して検討した。

4．研究成果

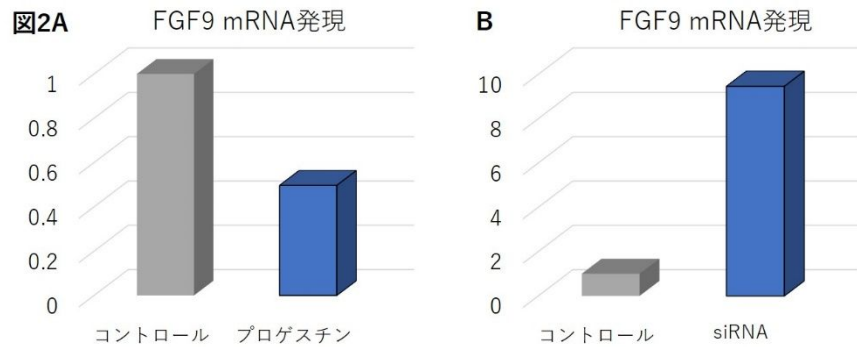
siRNA が HAND2 mRNA の発現を抑制しているのを確認した。HAND2 蛋白の発現抑制については、培養間質細胞を抗 HAND2 抗体で免疫染色と Western blot 法を行った。間質細胞に HAND2 siRNA を導入することにより、HAND2 の蛋白質が抑制していることが確認できた。

プロゲステロンを添加した培養間質細胞は、紡錘形から類円形に形態変化を認めたが、HAND2 の発現抑制した細胞は、紡錘形のままであり、形態学的な脱落膜化を認めなかった。また、HAND2 発現抑制細胞では、脱落膜化関連因子である PRL、FBLN1、IL-15 発現が有意に抑制されていた。HAND2 は、脱落膜化における細胞形態変化とその関連因子発現に関与しており、脱落膜化過程で要となる因子であることが明らかとなった。

血管新生因子である VEGF、ANGPT1、ANGPT2、SDF-1 については、プロゲステロン添加培養により、性ステロイドホルモンの影響を確認した。プロゲステロンにより、ANGPT2 mRNA 発現が低下していた（図 1A）。HAND2 発現抑制細胞でプロゲステロン刺激により、ANGPT-2 発現が上昇しており、HAND2 が血管新生因子の発現制御に関与することが判明した（図 1B）。



ヒト子宮内膜に発現している FGFs について、プロゲステロンを添加培養した間質細胞で検討した。これら FGFs の中で、唯一 FGF9 の mRNA および蛋白質の発現量が、プロゲステロン刺激で低下していた (図 2A)。HAND2 遺伝子ノックダウンを行った間質細胞で、プロゲステロン添加により FGF9 の mRNA、蛋白質いずれの発現量も有意に増加した (図 2B)。これらの結果から、プロゲステロンが誘導する HAND2 が、子宮内膜間質 上皮ネットワークに関わる FGF9 発現を抑制している分子機構が明らかとなった。



これらの結果から、脱落膜化、血管新生、間質 上皮ネットワークなどの子宮内膜機能調節において、HAND2 が重要な役割を担っていることが明らかとなった。本研究により見出した新知見は、将来の生殖医療の発展に大きく寄与すると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Murata H, Tanaka S, Okada H.	4. 巻 18
2. 論文標題 Immune Tolerance of the Human Decidua.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10020351.	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 Kido T, Murata H, Nishigaki A, Tsubokura H, Komiya S, Kida N, Kakita-Kobayashi M, Hisamatsu Y, Tsuzuki T, Hashimoto Y, Okada H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Glucose transporter 1 is important for the glycolytic metabolism of human endometrial stromal cells in hypoxic environment.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon.	6. 最初と最後の頁 e03985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e03985. eCollection 2020 Jun.	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 Murata H, Tanaka S, Tsuzuki-Nakao T, Kido T, Kakita-Kobayashi M, Kida N, Hisamatsu Y, Tsubokura H, Hashimoto Y, Kitada M, Okada H.	4. 巻 295
2. 論文標題 The transcription factor HAND2 up-regulates transcription of the IL15 gene in human endometrial stromal cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 9596-9605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.012753. Epub 2020 May 22.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kakita-Kobayashi M, Murata H, Nishigaki A, Hashimoto Y, Komiya S, Tsubokura H, Kido T, Kida N, Tsuzuki-Nakao T, Matsuo Y, Bono H, Hirota K, Okada H.	4. 巻 161
2. 論文標題 Thyroid Hormone Facilitates in vitro Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells via Thyroid Hormone Receptors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrinology.	6. 最初と最後の頁 bqaa049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endo/bqaa049.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murata H, Tsuzuki T, Kido T, Kakita-Kobayashi M, Kida N, Hisamatsu Y, Okada H.	4. 巻 19
2. 論文標題 Progesterin-induced heart and neural crest derivatives-expressed transcript 2 inhibits angiopoietin 2 via fibroblast growth factor 9 in human endometrial stromal cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reprod Biol.	6. 最初と最後の頁 14-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.repbio.2019.02.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishigaki A, Kido T, Kida N, Kakita-Kobayashi M, Tsubokura H, Hisamatsu Y, Okada H.	4. 巻 19
2. 論文標題 Resveratrol protects mitochondrial quantity by activating SIRT1/PGC-1 expression during ovarian hypoxia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reprod Med Biol.	6. 最初と最後の頁 189-197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12323	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okada H, Tsuzuki T, Murata H.	4. 巻 17
2. 論文標題 Decidualization of the human endometrium.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reprod Med Biol	6. 最初と最後の頁 220-227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12088.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 都築朋子、木田尚子、小野淑子、岡田英孝	4. 巻 68
2. 論文標題 女性不妊における治療薬の基礎と実践：いつ・だれに・どう使うか ギナドトロピン製剤	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 薬局	6. 最初と最後の頁 44-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岡田英孝	4. 巻 59
2. 論文標題 不妊症 - 拳児希望患者の取り扱い -	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 今日の治療指針	6. 最初と最後の頁 1245-46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Maiko Kobayashi:1 Hiromi Murata:2, Yoshiko Hashimoto:1, Shinnosuke Komiya:1, Hiroaki Tsubokura:1, Naoko Kida:1, Takeharu Kido:1, Yoji Hisamatsu:1, Toshiko Ono:1, Sonoko Okada:1, Tomoko Nakao:1, Hidetaka Okada:1
2. 発表標題 Thyroid hormone facilitates in vitro decidualization of human endometrial stromal cells in a thyroid hormone receptors-dependent manner
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeharu Kido:1 Hiromi Murata:1, Hiroaki Tsubokura:1, Naoko Kida:1, Maiko Kobayashi:1, Yoji Hisamatsu:1, Yoshiko Hashimoto:1, Hidetaka Okada:1
2. 発表標題 Importance of glucose transporter 1 under hypoxic environment in human endometrium
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村田紘未、田中進、中尾朋子、木田尚子、橋本佳子、辻 祥子、小野淑子、岡田園子、岡田英孝
2. 発表標題 脱落膜化で誘導されるIL15遺伝子の新規HAND 2 結合配列の同定
3. 学会等名 第65回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kobayashi Maiko, Tsubokura Hiroaki, Kido Takeharu, Kida Naoko, Hisamatsu Yoji, Murata Hiromi, Ono Toshiko, Okada Sonoko, Nakao Tomoko, Okada Hidetaka
2. 発表標題 Novel function of thyroid hormone during decidualization in human endometrial stromal cells and its molecular mechanism
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Murata Hiromi, Nakao Tomoko, Kido Takeharu, Kida Naoko, Kobayashi Maiko, Hisamatsu Yoji, Tsubokura Hiroaki, Okada Hidetaka
2. 発表標題 Heart and neural crest derivatives-expressed transcript 2 involves in vascular maturation during decidualization of human endometrial stromal cells via fibroblast growth factor
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kido Takeharu, Murata Hiromi, Tsubokura Hiroaki, Kida Naoko, Kobayashi Maiko, Hisamatsu Yoji, Nakao Tomoko, Okada Hidetaka
2. 発表標題 Metabolic pathway of human endometrial stromal cell under hypoxic condition
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidetaka Okada, Hiromi Murata, Naoko Kida, Maiko Kobayashi, Takeharu Kido, Hiroaki Tsubokura, Yoji Hisamatsu, Tomoko Nakao
2. 発表標題 PROGESTIN ENHANCES INTERLEUKIN 15 VIA A TRANSCRIPTION FACTOR HAND2 IN HUMAN ENDOMETRIUM
3. 学会等名 ASPIRE2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidetaka Okada, Takeharu Kido
2. 発表標題 The influence of hypoxia on angiogenesis and metabolism in human endometrial stromal cells
3. 学会等名 75th ASRM Scientific Congress & Expo (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Murata Hiromi, Kida Naoko, Kido Takeharu, Kobayashi Maiko, Hisamatsu Yoji, Ono Toshiko, Okada Sonoko, Tsuzuki Tomoko, Okada Hidetaka
2. 発表標題 HAND2はプロゲステロン誘導性脱落膜化においてヒト子宮内膜のIL-15を調節する
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 村田 紘未, 木田 尚子, 小林 真以子, 木戸 健陽, 小野 淑子, 岡田 園子, 都築 朋子, 岡田 英孝
2. 発表標題 ヒト子宮内膜においてプロゲステンにより誘導されるHand2はIL-15を制御する
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 村田 紘未, 小林 真以子, 木戸 健陽, 木田 尚子, 松本 みお, 岡野 友美, 吉田 彩, 久松 洋司, 小野 淑子, 岡田 園子, 都築 朋子, 岡田 英孝
2. 発表標題 転写因子HAND2によるヒト子宮内膜機能調節機構の解明
3. 学会等名 第62回日本生殖医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木田 尚子, 都築 朋子, 木戸 健陽, 小林 真以子, 岡野 友美, 村田 紘末, 久松 洋司, 小野 淑子, 岡田 園子, 岡田 英孝
2. 発表標題 凍結融解胚移植のホルモン補充周期における黄体ホルモン製剤の種類による臨床成績に及ぼす影響
3. 学会等名 第62回日本生殖医学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

関西医科大学産婦人科 http://www7.kmu.ac.jp/obgyn/ http://www.kmu.ac.jp/faculty/medical/category3/unit19.html
--

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	村田 紘末 (MURATA Hiromi)		
研究協力者	木田 尚子 (KIDA Naoko)		
研究協力者	小林 真以子 (KOBAYASHI Maiko)		

6. 研究組織（つづき）

	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	木戸 健陽 (KIDO Takeharu)		
連携研究者	中尾 朋子 (NAKAO Tomoko) (00465642)	関西医科大学・医学部・講師 (34417)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関