

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006-2007

課題番号：19390429

研究課題名（和文） 子宮内膜着床能のリアルタイム検出法の開発

研究課題名（英文） Development of a new method for evaluation of uterine receptivity

研究代表者

木村 正(KIMURA TADASHI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90240845

研究成果の概要：

現在の不妊治療においては着床不全の診断および治療方法を確立する事が求められている。現在血中プロゲステロンレベルおよび超音波下における子宮内膜の厚さの測定によって、子宮内膜の着床能は評価されている。しかしながら、これらパラメーターに問題がなく、明らかな問題がなくても妊娠に至らない症例があまりに多い。生化学的手法による機能の評価はその即時性にどうしても問題があり、臨床上の方針決定に用いることが困難である。そこで生理学的な手法を用い、低侵襲にリアルタイムに子宮内膜の着床能を前方向的に評価して、その周期の治療方針に反映する事ができるようなパラメーターとシステムの開発を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：不妊症、着床不全、リアルタイム計測、生体内遺伝子導入、マウスモデル、ex vivo

1. 研究開始当初の背景

ヒト着床不全は、ホルモン環境と子宮内膜の形態および機能のこれらの不一致によって引き起こされていると考えられてきた。この事から、子宮内膜着床能の評価法として臨床的には①血中プロゲステロンレベル、②超音

波下における子宮内膜の厚さ、③子宮内膜を組織学的に検索する内膜日付診、が行われてきた経緯がある。しかしながら、③内膜日付診は侵襲が強い事に加え、臨床的な意義について疑問視されるようになり(Mayers RW et al., Fertil Steril 2004; 82:1278-82., Bourgain C et al., Gynecol Obstet Invest 2007; 64:131-133.)、現在では

ほとんど行われなくなった。現在では、子宮内膜着床能は①血中プロゲステロンレベル②超音波下による子宮内膜の厚さにより評価されている。しかしながら、これら二つのパラメーターにおいて問題がなくても、妊娠に至らない症例があまりに多い。実際に内膜の厚さによってグループにわけて、それぞれのグループにおける妊娠率を比較した時に、子宮内膜の厚さが6mm未満では8mm以上の時と比べて妊娠率が有意に低いという報告がある(Noyes, N et al., Fertil Steril, 2001;76:92-7.)。しかし一方で、妊娠した群と妊娠に至らなかった群との比較では内膜の厚さに有意差がないという報告もある(Leibovitz, Z et al., Ultrasound Obstet Gynecol, 1999;14:194-9., Vlaisavljevic V et al., Ultrasound Obstet Gynecol, 2001;17:239-44.)。IVF 周期において採卵日から+12日目(胚移植から10日目)におけるプロゲステロンレベルは妊娠した群では有意に高値を示したが、それ以前では両群間に差がないという報告がある(Noyes, N et al., Fertil Steril, 2001;76:92-7. Vlaisavljevic V et al., Ultrasound Obstet Gynecol, 2001;17:239-44.)。

以上の文献的・臨床的考察から、我々はリアルタイムに低侵襲に子宮内膜の受容能力を評価できるようなシステムの開発ができれば、「この周期は着床できる」ので胚移植を行うといった、臨床の指針となる新しい診断技術の第一歩に成り得るという着想を持つに至った。

2. 研究の目的

我々は、着床のような子宮局所における一過性のダイナミックな現象を生化学的背景を検討するには、子宮局所に対する一過性の遺伝子導入方法が必要であると考え、HVJ-E vector (Haemagglutinating virus of Janan-envelope)を用いた遺伝子導入方法を開発した(Mol Ther. 2002, 6:219-226. Mol. Hum. Reprod. 2003, 9: 603-609. J Reprod Immunol. 2005, 67:13-20. J Reprod Immunol. 2006, 70:59-69.)。この方法を用いて、着床遷延マウスモデル(NF-kappaBの一過性の抑制: Biochem. Biophys Res Commun. 2004, 321: 886-892.)、着床不全マウスモデル(STAT3の一過性の抑制: FEBS Lett. 2006, 580: 2717-2722.)を作製した。これらのモデルマウスは同じ妊娠日において、ホルモン環境は同じであるが着床する子宮と着床しない子宮を提供し、今後の生理学的検討に有用であると思われる。着床期の子宮内腔にはムチンなどの粘液物質の分泌量の変化や、Evans blue透過性の亢進のような血管系の変化などが起こることが知られている。従来、生理学の領域では表面分泌液の変化などによる管空臓器の電気的特性の変化はインピーダンスを指標に、また、

血管系の変化は皮膚や管空臓器でインピーダンスや光ファイバーを用いたレーザー血流計などを用いて評価されてきた経緯がある。さらには、今日、最も頻用されている医療機器のひとつであるパルスオキシメータでは血液中の酸素化ヘモグロビンと還元ヘモグロビンの濃度差を可視光(赤色光)や近赤外光の吸光度で測定して無侵襲で血流情報を得ている。これも新たな血管系の評価指標として使用できる可能性がある。

今回の申請での目的は、低侵襲かつそれに引き続き妊娠を妨害しない子宮腔内で用いることができるプローブをまず、マウスに対して開発し、なおかつ、着床遷延モデル、着床不全モデルで正常コントロールと有意な差が出るパラメーターを探索し、同定することにある。

将来的にはヒト子宮内腔の着床環境をリアルタイムで評価するシステムの開発に本研究をトランスレーションすることを目標とした。

3. 研究の方法

我々の開発した個体レベルでの子宮腔内への高効率・一過性の遺伝子導入システムとそれを用いた一連の着床関連病態モデルは生体を用いてそのホルモン環境を変えることなく子宮腔内の着床環境を自在に変化させることができる、世界的にも他に類をみない技術である。本研究ではこれを実験モデルとして用いた。

このように、生殖医療に携わりながら分子生物学を専門とする研究者グループ(木村)が作製した生物学モデルを用いて、産科医療のスペシャリストとなった分子生物学を専門とする研究者(下屋浩一郎;川崎医大産婦人科・教授)と産科学領域で長年実地医療に携わり、その工学的な知識を生かして、医用工学の専門家となった研究者(細野剛良;大阪電気通信大学・教授)と共同でチームを作りこの研究を行った。

(1)レーザードップラー法によるマウス子宮局所の血流の計測:

血流測定システムとしてはユニークメディカル・レーザー血流計TBF-LC1を使用した。プローブの形状については、同メーカーの協力のもと、直径1mmまでのニードル型プローブを特注開発した。これにより、組織の外側から直接測定するようなシステムとした。また、陰部より子宮腔内に挿入できるようなプローブを作製し、子宮腔内より直接血流測定ができるようなシステムを開発した。

(2)マウス膣インピーダンスの測定：
インピーダンスの測定として室町機械のMK-10Cを用い、プローブのみマウス膣に挿入できるものに改良したものをを用いた。

(3)マウス子宮腔内のin-vivo pHおよび電位差の測定：
精密デジタルpH・mVメーター（CL-9D01）を用いて本測定システムを構築した。マウス膣部より子宮腔内に挿入できるような形状のアンチモン電極を作製し、計測用のプローブとした。

(4)正常マウスの測定：
正常マウスにおいて、膣スミア法で性周期を同定、あるいは妊娠を膣栓により確認し、交配後翌日より、マウスのimplantation windowに相当する性交後3.5日目から5.5日目までのマウスを用いた。マウスは麻酔下に開腹し、子宮の血流、子宮腔内からの血流測定、子宮腔内からのpHおよび電位差測定、膣インピーダンスの測定を行った。

(5)病態モデルマウスを用いた検討：
HVJ-EベクターにSTAT3デコイを封入したものを性交後1.5日目の子宮腔内に導入した着床不全モデルマウスあるいは同様にNF-kappaB decoyを子宮腔内に導入した着床遅延マウスの妊娠初期についても同様に行った。

4. 研究成果

マウス子宮で生理学的パラメータを測定するために、まず吸入麻酔装置、パルスオキシメーターを用いてSpO2および心拍数、体温をモニタリングしながら計測するシステムを構築した。先端0.5mmのレーザードップラー血流計プローブ（図1）を脳定位装置を改良した支持台に装着してその先端を組織に過剰に圧迫することなく密着できるような装置を作成した（図2）。



図 1



図 2

麻酔下で開腹の後、①胃、②肝臓および③腎臓表面にそれぞれプローブをあて、その血流を測定した。妊娠中は体内循環血液総量が上昇する事から、子宮局所について検討するためには、リファレンスとして腎臓の血流量が最も安定している事が示され、最も安定していた③腎臓表面の血流をもって、多臓器血流とのリファレンスとした(図3)。

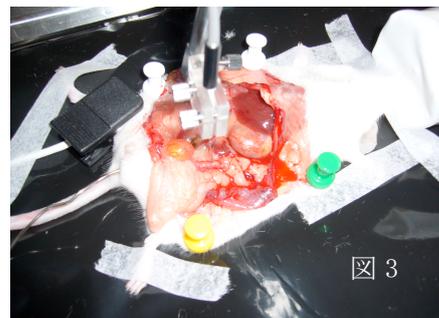
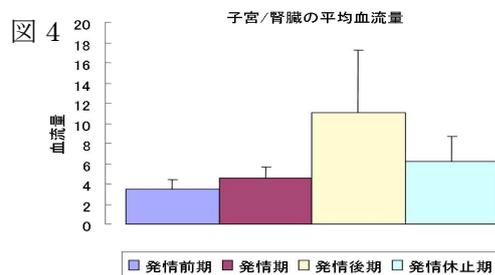


図 3

(1) 非妊娠時の性周期における子宮の血流量

マウス膣スミアを形態学的に観察し、性周期ごとの子宮の血流の測定を行った。性周期において、明らかな子宮血流量の差を認めた(図4)。



(2) 着床期における着床部位および非着床部位の血流量

さらに、交配後4.5日目の着床期子宮について検討を行った。着床期子宮では胚が着床する部位で血管透過性が上昇している事が知られている。血管透過性の上昇している部位はマ

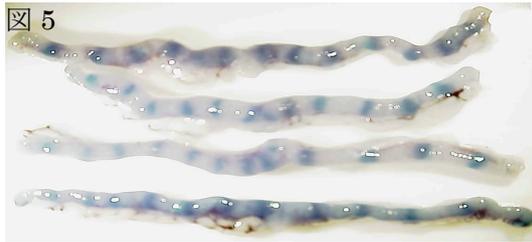


図5
ウス尾の静脈より Evans Blue を注射する事で可視化する事ができる事が知られている(図5)。Evans Blue を静脈より注射したのち、開腹して子宮の着床部位と非着床部位を各々別に子宮間膜の反対側よりプローブをあてて血流量を測定した。子宮の着床部位での血流量が非着床部位に比べて150%血流量が増加している事が明らかとなった(図6)。

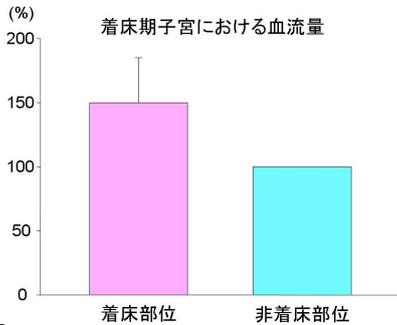
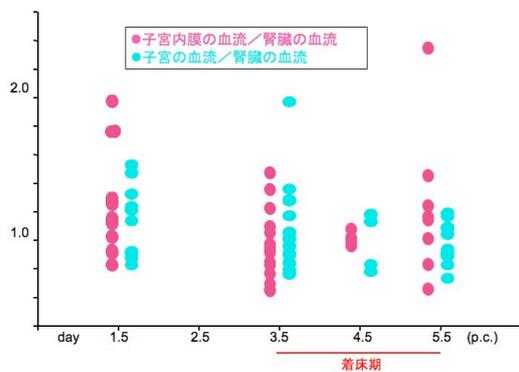


図 6

(3)妊娠初期における子宮と子宮腔内の血流量の測定

現在、子宮の外側から直接血流量を測定、子宮腔内にプローブを挿入して子宮内膜の血流量の測定を妊娠初期に行っている。いずれも腎臓の血流をリファレンスとして、妊娠初期において連日測定を行った。それぞれの個体において、6点の測定を行った。Evans Blue の尾静脈からの注入により、可

図 7



視化した着床部位の幅の平均値が $1.9 \pm 0.05 \text{cm}$ 、非着床部位の幅の平均値が $1.3 \pm 0.06 \text{cm}$ であった事から、1.5cm 間隔で測定を行った場合、測定した6点がすべてどちらかに偏る事がないと考え、すべて1.5cm 間隔で測定を行った(図7)。

その結果、残念ながら現在まで妊娠初期において妊娠日における子宮腔内の血流量に差を認めない傾向である。今後さらに個体数を増やして改めて検討をする予定である。

(4)子宮腔内の pH および電位差の測定

交配後翌日より、5.5日目まで連日、子宮腔内にプローブを挿入して、子宮腔内の in-vivo pH(図8)と電位差(図9)の測定を行った。電位差のリファレンスとしては皮下にアースをとった。

現在のところ子宮腔内の in-vivo pH の測定値には変化が認められない。これは一つの原因にアンチモン電極を使用しているためとも考えられる。子宮腔内の電位差については、妊娠日齢で大きく差がある傾向が認められた。いずれもまだすべての測定が終了していないため、今後更なる検討が必要である。また、着床不全、着床遷延モデルマウスを用いて、着床できる子宮内腔と着床できない子宮内腔における差を検討中である。

図 8

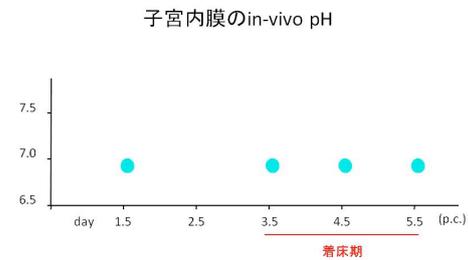
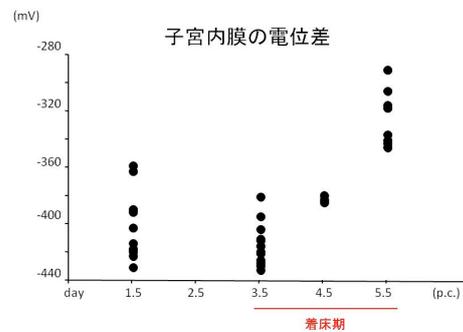


図 9



(5) 臍インピーダンスの測定

マウス臍内に挿入することができるプローブを作製して、交配後翌日より着床期終了まで、連日、臍インピーダンスの測定を行った。臍インピーダンスはラットにおいて非妊娠時の発情前期に上昇する事が報告されており、これにより交配適期の判定がされてきた。しかしながら、妊娠中における着床期を標的とした検討は今までにない。これまでの結果を図 10 に示す。これまでの結果から、着床期にむけて低下していく傾向が認められた。この方法を更に進めて、子宮内腔のインピーダンス測定を現在行っている。

今後これらの測定を継続とともに、我々が一過性遺伝子導入方法を用いて作製した着床不全マウスおよび着床遅延マウスについても検討を行っていく予定である。

子宮内着床環境をリアルタイムで数値化していき、生理学的および分子生物学的な基礎検討を加える事で、計測値にはじめて意義をもたせる事ができる。①どのようなパラメータをどのように測定するのか、②その測定系の開発、③測定された電気的パラメータ値に対して生理学的側面および分子生物学的側面からの基礎データを合わせる④これによって電気的パラメータ値に対して意義をもたせる事ができないかと考える。また、装置をヒト子宮腔内に挿入できるように大型化してヒト症例での測定を視野に入れた改良も計画中である。本研究により蓄積された基礎データが、将来の着床環境をリアルタイムに診断する事ができる機器への応用が期待される。

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 40 件) (全て査読あり)

(1) Kimura, T., Ogita, K., Kumasawa, K., Koyama, S., Tsutsui, T., Nakamura, H., **Two multipotential transcription factors, NF-kappaB and Stat-3 play critical and hierarchal roles for implantation.** Indian J Physiol Pharmacol, 2009 in press.

(2) Mohammad, A.H. Khan., Valerie, A. Ferro., Koyama, S., Kinugasa, Y., Song, M., Ogita, K., Tsutsui, T., Murata, Y., Kimura, T. **Immunization of male mice with plasmid DNA vaccine encoding gonadotrophin releasing hormone (GnRH-I) and T-helper epitopes suppress fertility in vivo.** Vaccine 25:3544-3553, 2007.

(2) Kinsey, CG., Bussolati, G., Bosco, M., Kimura, T., Pizzomo, MC., Chemin, ML., Cassoni, P., Novak, JF. **Constitutive and ligand-induced nuclear localization of oxytocin receptor.** Journal of Cellular and Molecular Medicine 11:96-110,2007.

(4) Tskitishvili, E., Komoto, Y., Kinugasa, Y., Kanagawa, T., Song, M., Mimura, K., Tomimatsu, T., Kimura, T., Shimoya, K. **Relationship between human tumor-associated antigen RCAS1 and gestational diabetes mellitus.** American Journal of Reproductive Immunology 58:440-446, 2007.

(5) Hosono, T., Sugita, Y., Kandori, A., Arishiro, K., Suetake, A., Chiba, Y., Fukuda, H., Ikeda, T., Ogata, K., Miyashita, T., Tsukada, K. **Clinical problems in long duration fetal magnetocardiogram recording.** ICS International Congress Series 1300, 753-756, 2007.

他英文論文 24 件

他邦文論文 11 件

[学会発表] (計 29 件)

(1) 木村正 子宮内遺伝子導入法による生殖・妊娠現象の解析(シンポジウム) 第 18 回生殖医学研究会、京都、4.25/08.

(2) Tabata, C., Kumasawa, K., Watanabe, M., Yoshida, S., Zhang, Q., Khan, H. A., Tsutsui, T., Kimura, T., Nishimori, K. **Gene analysis of oxytocin receptor deficient mice around parturition.** 27th American Society for Reproductive Immunology, Toronto, Canada, 5.25/07.

(3) Tsutsui, T., Zhang, Q., Kumasawa, K., Nakamura, H., Temma, K., Negoro, H., Tabata, C., Ogita, K., Kimura, T. **The role of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in the development of mouse preeclampsia.** 28th Annual meeting American Society of Reproductive Immunology, Chicago, 6.11-14/08.

(4) Hosono, T., Arishiro, K., Sugita, Y., Kandori, A., Miyashita, T., Ogata, K., Mizuguchi, Y., Murakami, K., Ikeda, T. **Relationship between P wave amplitude in fetal magnetocardiogram and prognosis.** Proceedings of the 8th World Congress of Perinatal Medicine, Italy, 9.9-13/07.

(5) Ogita, K., Tabata, C., Kumasawa, K., Watanabe, M., Zhang, Q., Tsutsui, T., Nishimori, K., Kimura, T. **Is oxytocin receptor (OTR) essential for parturition: observation of OTR deficient mice around parturition?** Vllth World Congress on Neurohypophysial Hormones Regensburg, Germany, 09.19/07.

他国際学会 4 件
他国内学会 20 件

〔図書〕 (計 3 件)

(1) 木村 正 : スーパーローテーターのための内視鏡外科手術トレーニングマニュアル : 総論「講義室にて」婦人科 : 西田俊郎監修 中島清一・塩野裕之編 pp16-17 シュプリンガー・ジャパン, 2008.

(2) 木村 正 : 産婦人科疾患 流産 (習慣流産・不育症を含む) : 今日の治療指針 山口徹・北原光夫・福井次矢総編集 pp940-941 医学書院, 2008.

(3) 木村 正、荻田和秀 : 不育症の治療 A-1 頸管縫縮術 : 生殖医療ガイドライン 2007 日本生殖医学会編 pp279-281 金原出版, 2007.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕 (15 件)

(1) 木村正 : 止まらない産科縮 : Japan Medicine, 1.11/08.

(2) 木村正 : 外陰部の皮膚が薄く、痛む : 毎日新聞 からだと心相談室, 3.29/08.

(3) 木村正 : 子宮頸部円すい切除した

が・・・ : 毎日新聞 からだと心相談室, 6.21/08.

(4) 木村正 : 生理痛ひどく、生活に支障 : 毎日新聞 からだと心相談室, 11.1/08.

(5) 木村正 : 下腹部痛と冷感が常にある : 毎日新聞 からだと心相談室, 11.15/08.

他 10 件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 正 (KIMURA TADASHI)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号 : 90240845

(2) 研究分担者

細野 剛良 (HOSONO TAKAYOSHI)
大阪電気通信大学・医療福祉工学部・教授
研究者番号 : 60294104

下屋 浩一郎 (SHIMOYA KOUICHIRO)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 40291950

筒井 建紀 (TSUTSUI TATEKI)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号 : 00294075

(3) 連携研究者