

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09779

研究課題名（和文）不妊症治療の創薬分子標的の発掘をめざした糖鎖修飾シグナルトランスダクションの検討

研究課題名（英文）The assessment of glycosylation modification in uterine endometrium to find a new therapeutic target molecule for infertility treatment.

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、着床に備えて子宮全体としては、glycocalyxの硫酸化の変化が重要である事を報告してきた。そこで子宮内膜のglycocalyxの硫酸化の促進により着床を促進させる戦略を考えた。しかしながら、どのくらい促進させる事が必要なのだろうか？もし、過剰になった場合にどのようなものだろうか？マウス着床期子宮で一過性にglycocalyxの硫酸化を促進するために遺伝子導入を行い、検討した。硫酸化を促進したマウスでは、着床数に有意差を認めないものの胎盤形成が阻害されていた。この事から、glycocalyxの過剰な硫酸化により広義の着床現象を全うする事ができない事が示唆された。

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。一方で、日本も含めた世界的な治療周期あたりの出生率は充分とはいえない。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。本研究は、着床能を前方視的に評価する診断機器の機序を解明するだけでなく、将来的に着床不全不妊症の治療の分子標的の検索にも応用できる。これまで子宮内膜のglycocalyx全体の変化を電気生理学的に評価したような研究はなく、さらに生理学的な着床現象を評価した報告もない。

研究成果の概要（英文）：Uterine receptivity is associated with various glycosylation changes that affect negative charge density at the luminal epithelial cell surface. Our previous study suggests that implantation failure shows deficiency of sulfation change in the uterine glycocalyx and vaginal bioelectrical impedance (VZ) can electrophysiologically determine alterations of the endometrium in preparation for implantation. To investigate whether induction of sulfation change in the uterine glycocalyx support implantation, implantation was assessed in mouse model using the 3'-sulfo-Lewis a and 3'-sulfo-Lewis x epitopes remodelling. The remodelling of 3'-sulfo-Lewis a and 3'-sulfo-Lewis x epitopes could suppress placentation in mouse.

研究分野：生殖医療

キーワード：不妊症 子宮 着床 糖鎖 子宮内膜 胎盤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

着床は trophoblasts における L-selectin と子宮内膜の 6-sulfo sLe^x を含む糖鎖リガンドの結合から始まる事 [1-2]、子宮受容能に多くの glyocalyx の関与が知られている [3-8]。子宮内膜が受精卵 (胚) を受け入れる着床現象にむけた準備として、子宮内膜においては適切な glyocalyx 発現の変化が必要である事が知られている。

これまでの我々の研究において、子宮内膜は、着床に備えて子宮全体として glyocalyx の硫酸化およびシアル酸化ヘシフトする変化を呈し [9]、これを、局所の電気生理学的パラメータ測定値によりマウスおよびヒトにおいて検知する事が可能である事、そして局所の電気生理学的パラメータ測定値により、子宮の着床能を評価できる事を報告してきた [9-11]。着床期一過性に子宮局所で約 50% の Stat3 活性を抑制させたヒト着床不全不妊症マウスモデル [12] は glyocalyx のシアル酸化に変化がなかったが、硫酸化ムチン and/or 硫酸化プロテオグリカンの発現が減少する事を確認した [9]。この事から着床期子宮内膜における glyocalyx の変化のかぎは硫酸化ではないかと考えるに至った。そして、子宮内膜の glyocalyx の硫酸化を促進する戦略により着床現象の補助的に作用するのではないかと考えた。

しかしながら、どのくらいの硫酸化の促進が必要なのだろうか？ 子宮内膜における glyocalyx の硫酸化の定量化は難しい。また、それぞれの症例において、バリエーションがある可能性もある。そこで、仮に、glyocalyx の硫酸化を過剰に誘導した場合にどのような作用がおこるのかを検討する事にした。

2. 研究の目的

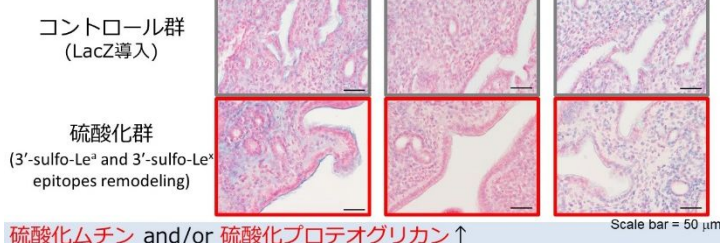
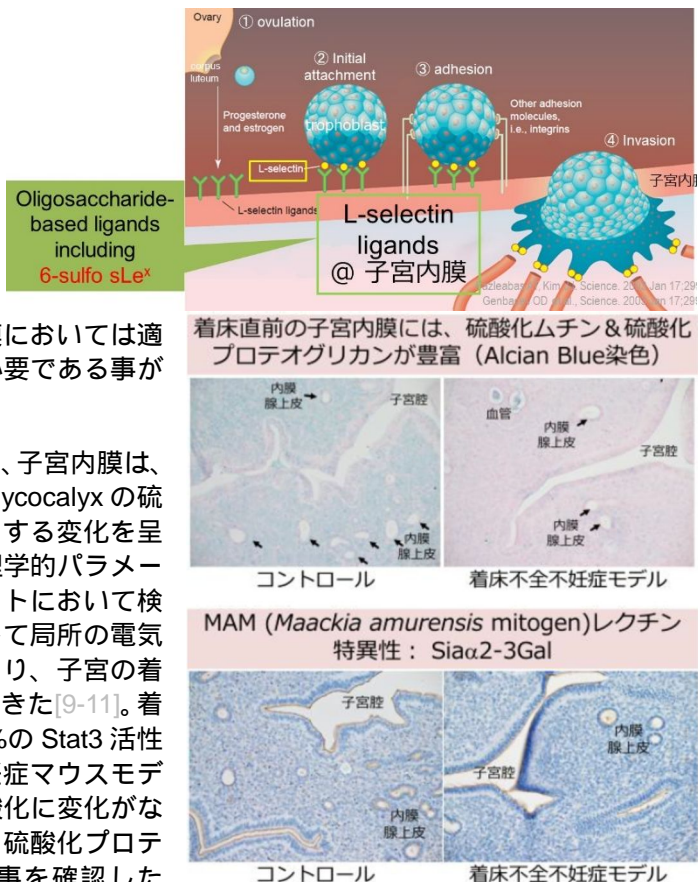
本研究では、マウス一過性遺伝子導入方法を用いて、子宮内膜の glyocalyx を着床期一過性に過剰な硫酸化を誘導した時に胎盤形成を含む広義の着床現象における生理現象への影響を検討する事を目的とした。

3. 研究の方法

Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ)-envelope ベクター [13-14] を用いてマウス子宮局所に対して、3'-sulfo-Le^a and 3'-sulfo-Le^x エピトープのリモデリングシステム [15] を用いて一過性に glyocalyx の硫酸化の促進を誘導した。なお、3'-sulfo-Le^a and 3'-sulfo-Le^x エピトープのリモデリングシステム plasmid DNA は本家孝一教授からご供与頂いたものを用いた。コントロールとして LacZ を導入し、Glyocalyx の硫酸化の促進を誘導した後の胎盤形成を含む広義の着床現象について検討を行った。

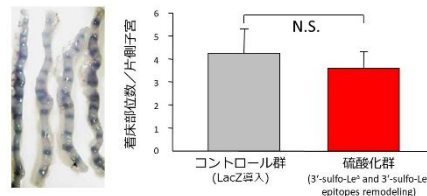
4. 研究成果

交配後 1.5 日目に遺伝子導入を施行し、その 24 時間後の交配後 2.5 日目において遺伝子導入効率は最大になる。この時の硫酸化ムチン and/or 硫酸化プロテオグリ



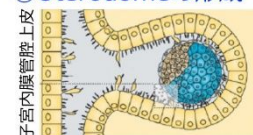
カンの発現を評価するために、アルシアンブルー染色を行って検討を行った。硫酸化群においてはアルシアンブルー染色が明らかに強い染色性が認められた。いずれの群においても methylation によりアルシアンブルー染色の染色性は認めらなくなり、さらに saponification により復活した事から、これらが硫酸化ムチン and/or 硫酸化プロテオグリカンである事が明らかとなった。

交配後 4.5 日目に尾静脈から Evans blue を投与し、着床部位においては血管透過性が亢進している事から、青色に染色される。これにより着床部位数について検討を行った。両群間において、着床数については有意差を認めなかった。

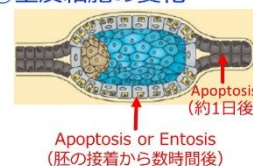


子宮内膜に胚が接触すると上皮細胞がくびれてチャンバー状になる(uterodome の形成) しながら、この現象において trophoectderm-上皮細胞の接触が必須なのかは不明である[16]。その後、上皮細胞は変化する()、胚の接着面における上皮細胞は胚の接着から数時間後にはアポトーシスもしくはエントーシスをおこす。一方で胚の接着のない上皮細胞は、胚の接着から約 1 日後にアポトーシスをおこす[16]。そしてその後、トロホプラストの分化()がおこる[16 ; 右図も文献 16 から引用]。

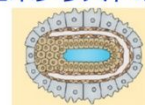
① Uterodome の形成



② 上皮細胞の変化



③ トロホプラストの分化

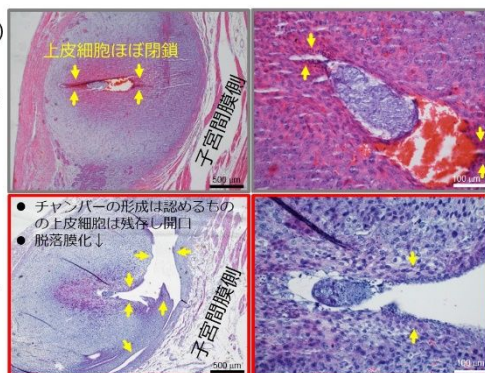


交配後 6.0 日目において、コントロール群においては、上皮細胞はほぼ閉鎖していたのに対し、硫酸化群においては、uterodome の形成(チャンバーの形成)は認められたものの、上皮細胞は残存し、開口していた。また、間質細胞部分の脱落膜化のエリアも明らかに小さかった。

交配後 6.0 日目
(妊娠確認=0.5 日目)
着床部位数: N.S.

コントロール群
(LacZ 導入)

硫酸化群
(3'-sulfo-Le^a and 3'-sulfo-Le^x
epitopes remodeling)



交配後 13 日目において胎児数を観察したところ、硫酸化群では有意な低下が認められた。着床数には有意差は認められなかった事から glycoalyx の硫酸化を後進させる事により胎盤形成の障害がおこり、その結果流産率が上昇する事が示唆された。

これら結果より、子宮内膜の glycoalyx の硫酸化は着床現象に重要であり、着床不全ではこれが低下する。一方で、過剰に促進させると、子宮内膜管腔上皮細胞が閉鎖せず胎盤形成が障害される事、さらに子宮内膜管腔上皮細胞が閉鎖しない事により吸収できない異常な子宮腔内の液性成分の諸流がおこっている事が示唆された。

これらの事象より、残念ながら、glycoalyx の硫酸化を促進により着床現象の補助的に作用する事により治療に応用する戦略については否定された。しかしながら、glycoalyx の硫酸化が着床現象だけでなく胎盤形成にも関与している事が示唆された事から、我々の作成した局所の電気生理学的パラメータの測定システムが、子宮の着床能を前方視的に評価し、不妊治療の治療効率の向上だけでなく、胎盤形成についても評価できるシステムへの応用が期待される。

< 引用文献 >

- 1 Fazleabas AT, Kim JJ. (2003) Science. 17;299(5605):355-6.,
- 2 Genbacev OD et al., (2003) Science. 299(5605):405-8.
- 3 Anderson TL et al. (1986) Biol Reprod 34: 701-720.

- 4 Aplin JD & Jones CJ. (2012) *Glycobiology* 22: 470-478.
- 5 Aplin JD et al. (2001) *Biochem Soc Trans.* 29: 153-156.
- 6 Morris JE et al. (1988) *J Biol Chem* 263: 4712-4718.
- 7 Zhu Z et al. (1992) *J Reprod Fertil* 95: 813-823.
- 8 Zhu Z et al. (1990) *J Reprod Fertil* 88: 71-79.
- 9 Nakamura H et al. (2018) *Hum Reprod.* 33: 2241-2248.
- 10 Nakamura H et al. (2018) *Reprod Fertil Dev.*30(4):619-623.
- 11 Nakamura H et al. (2018) *Reprod Med Biol.*17(3):255-261.
- 12 Nakamura H et al. (2006) *FEBS Lett.* 580 (11): 2717 2722.
- 13 Kaneda Y et al. (2002) *Mol Ther.* 6(2):219-26.
- 14 Nakamura H et al. (2003) *Mol Hum Reprod.* 9(10):603-9.
- 15 Ikeda N et al. (2001) *J Biol Chem* 276: 38588-38594.
- 16 Aplin JD & Ruane PT (2017) *Journal of Cell Science.* 130:15-22.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sato N, Kumasawa K, Yamashita M, Miyake T, Nakamura H, Kimura T.	4. 巻 46
2. 論文標題 Therapeutic potential of combination therapy of soluble VEGF receptor 1 and conventional chemotherapy for ovarian cancer growth.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res.	6. 最初と最後の頁 636-645
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.14205.	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 Shigeta N, Kumasawa K, Tanaka A, Badger Wing J, Nakamura H, Sakaguchi S, Kimura T.	4. 巻 140
2. 論文標題 Dynamics of effector and naive Regulatory T cells throughout pregnancy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Reprod Immunol.	6. 最初と最後の頁 103135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jri.2020.103135.	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 Yagi K, Mimura K, Tomimatsu T, Matsuyama T, Kawanishi Y, Kakigano A, Nakamura H, Endo M, Kimura T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Potency of Tokishakuyakusan in treating preeclampsia: Drug repositioning method by in vitro screening of the Kampo library.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0244684.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0244684.	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 伴田 美佳, 瀧内 剛, 高橋 直子, 高岡 幸, 佐治 史恵, 三宅 達也, 中村 仁美, 木村 正.	4. 巻 3
2. 論文標題 当院における妊孕性温存療法の現状について	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本がん・生殖医療学会誌	6. 最初と最後の頁 119
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 伊藤 風太, 三宅 達也, 浅利 真司, 佐治 史恵, 伴田 美佳, 高橋 直子, 高岡 幸, 中村 仁美, 瀧内 剛, 木村 正	4. 巻 72
2. 論文標題 当院における小児に対する卵巣組織凍結保存の現況	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 産婦人科の進歩	6. 最初と最後の頁 190
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 Sato Noriko, Kumasawa Keiichi, Yamashita Michiko, Miyake Tatsuya, Nakamura Hitomi, Kimura Tadashi	4. 巻 46
2. 論文標題 Therapeutic potential of combination therapy of soluble VEGF receptor 1 and conventional chemotherapy for ovarian cancer growth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 636 ~ 645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.14205	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 Koizumi Kaori, Nakamura Hitomi, Iijima Masumi, Matsuzaki Takashi, Somiya Masaharu, Kumasawa Keiichi, Kimura Tadashi, Kuroda Shun'ichi	4. 巻 21
2. 論文標題 In vivo uterine local gene delivery system using TAT displaying bionanocapsules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Gene Medicine	6. 最初と最後の頁 e3140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgm.3140	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 Furuya Kiichiro, Kumasawa Keiichi, Nakamura Hitomi, Kimura Tadashi	4. 巻 516
2. 論文標題 Endothelin-1 profiles in advanced maternal age complicated with hypertensive disorders of pregnancy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 941-944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.06.147	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 Yasui Yuri, Kumasawa Keiichi, Minato Kenji, Nakamura Hitomi, Kimura Tadashi	4. 巻 5
2. 論文標題 Narrowing abdominal aorta and vein is a simple and useful method for preparing a mice model of gestational hypertension	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e01576-e01576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2019.e01576	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 Fukuda Yayoi	4. 巻 7
2. 論文標題 A New Function of Granulocyte Colony-stimulating Factor (G-CSF): Suppression of Cell Proliferation in Uterine Endometrial Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gynecology and Obstetrics	6. 最初と最後の頁 92-92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11648/j.jgo.20190703.17	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 Furuya Kiichiro, Kumasawa Keiichi, Nakamura Hitomi, Nishimori Katsuhiko, Kimura Tadashi	4. 巻 42
2. 論文標題 Novel biomarker profiles in experimental aged maternal mice with hypertensive disorders of pregnancy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 29-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-018-0092-7	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 Kumasawa Keiichi, Furuya Kiichiro, Nakamura Hitomi, Iriyama T, Nagamatsu T, Osuga Y, Fujii T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Hypertensive disorders of pregnancy: Disease models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Translational Science	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15761/JTS.1000314	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 Furuya Kiichiro, Kumasawa Keiichi, Nakamura Hitomi, Nishimori Katsuhiko, Kimura Tadashi	4. 巻 42
2. 論文標題 Novel biomarker profiles in experimental aged maternal mice with hypertensive disorders of pregnancy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 29-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-018-0092-7	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Handa M, Takiuchi T, Takahashi N, Takaoka S, Miyake T, Nakamura H, Kimura T.
2. 発表標題 A case of controlled ovarian stimulation and successful oocyte retrieval under continuous administration of dienogest in a patient with catamenial pneumothorax
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下美智子、熊澤恵、中村仁美、木村正
2. 発表標題 絨毛ガン細胞BeWoに対するsFlt-1の細胞障害性の検討
3. 学会等名 第38回日本絨毛性疾患研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村仁美、八木一暢、John D. Aplin、Carolyn J.P. Jones、味村和哉、富松拓治、木村正.
2. 発表標題 3'-sulfo-Lea & Lexエピトープリモデリングによる胎盤形成への影響
3. 学会等名 第28回日本胎盤学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 H. Nakamura, T. Hosono, T. Taniguchi, K. Kumasawa, C.J.P. Jones, J.D.Aplin, S. Goa, M. Ono, T. Kimura.
2. 発表標題 In-vivo intrauterine oxidation-reduction potential determines uterine receptivity
3. 学会等名 35th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村仁美、細野剛良、谷口武、後安聡子、熊澤恵一、Carolyn J.P. Jones, John D. Aplin、木村正.
2. 発表標題 子宮の着床能を前方視的に評価するシステムの開発
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村仁美
2. 発表標題 脂質代謝と男性生殖
3. 学会等名 中性脂肪学会 第3回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michiko Yamashita, Keiichi Kumasawa, Hitomi Nakamura, Tadashi Kimura.
2. 発表標題 The status of anti-angiogenesis in the internal uterine os in patients with placenta previa
3. 学会等名 14th Congress of the International Society for Immunology of Reproduction/ The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yayoi Fukuda, Hitomi Nakamura, Keiichi Kumasawa, Tadashi Kimura.
2. 発表標題 G-CSF suppresses proliferation of human uterine endometrial carcinoma cells
3. 学会等名 14th Congress of the International Society for Immunology of Reproduction/ The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitomi Nakamura, Takayoshi Hosono, Keiichi Kumasawa, Carolyn J.P. Jones, John D. Aplin, Tadashi Kimura.
2. 発表標題 Importance of sialylation and sulfation change in the uterine glycocalyx to prepare for implantation
3. 学会等名 14th Congress of the International Society for Immunology of Reproduction/ The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigeta N, Nakamura H, Kumasawa K, Imai K, Saito S, Sakaguchi S, Kimura T.
2. 発表標題 Pregnant Case of Common Variable Immunodeficiency (CVID): Are Naive T Cells and Class-switched Memory (IgD-CD27+) B Cells Not Essential for Establishment and Maintenance of Pregnancy?
3. 学会等名 International Conference on Immunity and Immunochemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧内剛、伴田美佳、高橋直子、神田昌子、高岡幸、佐治史恵、三宅達也、中村仁美、木村正.
2. 発表標題 当施設における初期類内膜腺癌および子宮内膜異型増殖症に対する妊孕性温存治療の予後に関する検討
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伴田美佳、瀧内剛、高橋直子、神田昌子、高岡幸、佐治史恵、三宅達也、中村仁美、木村正。
2. 発表標題 多剤薬剤アレルギー既往を認める精漿アレルギー患者に対し、Progestin-primed ovarian stimulation(PPOS)による調節卵巣刺激法で採卵を行い、妊娠に至った一例
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 Vagina evaluation device and uterus evaluation device	発明者 Nakamura H, Kimura T, Hosono T.	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、10602955	取得年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 Vagina evaluation device and uterus evaluation device	発明者 Nakamura H	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、10271760	取得年 2019年	国内・外国の別 外国

〔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
研究分担者	木村 正 (Kimura Tadashi) (90240845)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	

	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	JONES Carolyn (Jones Carolyn J.P.)	マンチェスター大学	
研究協力者	Aplin John (Aplin John D)	マンチェスター大学	

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
---------	---------