

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390434
 研究課題名（和文） 生殖過程における組織再構築機構の解析—体循環細胞による再生機序の解明を目指して—
 研究課題名（英文） Analysis of tissue remodeling mechanisms by circulating blood cells during human reproduction
 研究代表者
 藤原 浩 (FUJIWARA HIROSHI)
 京都大学・医学研究科・准教授
 研究者番号：30252456

研究成果の概要（和文）：

生殖医療において着床不全患者が問題となっている。これまで生殖免疫学の分野では胎児の免疫学的寛容性の獲得の機序が検討されてきたが、本研究では妊娠初期の末梢血中の免疫細胞が母体の黄体と子宮内膜の分化を促進して胚着床を誘導することを見出した。また末梢血中の血小板が黄体形成や胎盤形成において血管網の再構築を制御していることを明らかにし、着床不全患者に対する自己免疫細胞を用いた新しい治療法を開発した。

研究成果の概要（英文）：

Although it has been widely accepted that adequate endometrial differentiation for embryo implantation is induced by ovarian sex steroid hormones, the precise molecular mechanism(s) concerning human embryo attachment to endometrial epithelium remains unclear. Accordingly, implantation failure in patients treated with in vitro fertilization and embryo transfer has been increasingly focused on in the field of assisted reproductive technology. On the other hand, during the past several decades the mechanisms for establishing maternal immune tolerance against embryo have been investigated in reproductive immunology. Recently, accumulating evidence suggests that activated immune cells actively contribute to establishment of pregnancy. In accordance with it, we found that peripheral blood immune cells positively affect function and differentiation of maternal endometrium and corpus luteum of pregnancy to facilitate embryo implantation during early pregnancy. In addition, platelets were shown to regulate vascular remodeling process in corpus luteum and placental formation. Based on these findings, we have successfully developed a new therapy for patients with implantation failure using autologous peripheral blood immune cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

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：組織再構築、黄体形成、胎盤形成、胚着床、妊娠

1. 研究開始当初の背景

哺乳類における生殖機構の特徴として子宮内での胎児の発育が挙げられるが、このためには黄体形成や子宮内膜への胚着床、さらに胎盤形成に至る一連の過程が必須である。これらの現象では細胞の融合・増殖・分化のみならず様々な臓器組織の再構築いわゆる **Tissue remodeling** が重要と考えられているが、その機構については不明な点が数多く残されている。

上記の生殖活動においては正常な妊娠成立の情報を母体の各臓器に的確に伝達する機構の存在が不可欠である。従来の生殖医学ではヒト妊娠初期における妊娠成立・維持は内分泌系である **HCG** ホルモンで制御されていると考えられていたが、内分泌系のみでは説明困難な事象がこれまで多くの研究者から指摘されてきた。そこで本研究代表者の藤原は発想を転換し、内分泌系が血液中の液性因子を利用するのに対して、血液中の細胞成分である免疫細胞が妊娠成立の情報を血流を介して全身性に卵巣、着床部位や諸臓器に伝達し、母体の妊娠維持への対応を促進しているという新しい概念を導入した。また **HCG** が免疫細胞を直接活性化することを示し、その作用が従来から想定されていた **LH/HCG** 受容体を介した機構ではなく、免疫系機構の中でもより **primitive** な系である糖鎖抗原受容体によって伝達される可能性を提示した。さらに自己の免疫細胞を胚からのシグナルである **HCG** で刺激したのちに子宮内膜上皮細胞へ作用させることにより子宮内膜の胚に対する接着能が亢進することを **in vitro** で示した。これらの結果から新しい内分泌・免疫系のネットワークによる相互応答の機構を提案することとなり、これらの基礎実験の成果に基づいて京都大学医学部の倫理委員会承認のもと、体外受精治療に対して不成功を繰り返す難治性の着床不全患者を対象に自己の免疫細胞を利用した新しい治療法を考案し、有意な臨床結果を得ることに成功した。

一方でヒト胚の着床成立後の胎盤形成においては、胚の栄養膜細胞(絨毛外栄養膜細胞 **Extravillous trophoblast**, **EVT**)の母体内ラセン動脈内侵入による母体血管の再構築が必須である。一般に臓器組織の再構築では組織幹細胞をはじめとする様々な細胞がお互いに相互作用しながら組織形成をしていると考えられるが、それを媒介する物質として細胞接着因子や細胞遊走因子 (**chemokine** etc) などの分子群に近年注目が集まっている。

本研究従事者はこれまで世界に先駆けて免疫細胞が細胞遊走因子を分泌して胚の浸潤を促進する可能性、ヒト免疫細胞が **HCG** に反応して **chemokine** を分泌すること、さ

らに動脈に向かう胚の栄養膜細胞(**EVT**)に **chemokine** 受容体が発現し、**chemokine** がその浸潤を促進することを明らかにしてきた。またこれらの研究の一環として **EVT** に特異的に発現している新規の分子 (**laeverin** と命名) を発見したが、アミノ酸配列の構造決定や **recombinant-laeverin** の検討から、この蛋白が細胞表面に存在するアミノペプチダーゼであり、細胞遊走因子を代謝する酵素であることが示された。さらに興味深いことに母体血管内の血小板が **chemokine** を分泌し **EVT** の浸潤移動を母体血管へと誘導している可能性が判明した。この知見に基づいて再検討したところ、黄体形成期の血管新生を血小板が誘導している可能性が示され、この仮説は **Endocrinology** 誌の表紙に採択された。

これら一連の研究成果から末梢血中、すなわち全身循環系に存在する細胞成分は生殖現象に緊密に関わり、妊娠情報の伝達のみならず、組織の再構築に主要な役割を演じているという新しい概念を着想するに至った。生殖医療が扱っている生命の誕生は生命の再生とも言い換えることができるが、現在目覚ましい進歩を遂げている臓器や細胞の再生医療では、臓器幹細胞の実用化が積極的に進められている。産婦人科分野においても子宮内膜や子宮筋の幹細胞に関する優れた研究成果が我が国から発表されてきた。ここで注目すべき知見は各臓器の幹細胞が末梢血中にも存在し、いわゆる **Perivascular Niche** と名付けられている血管周囲の特定な場所で幹細胞が **stable** な状態なままで維持されているという新しい概念である。この発表と偶然にも呼応して本研究従事者は先に述べた **laeverin** が **EVT** 以外の細胞として **Perivascular Niche** から活性化過程に誘導された幹細胞そのものに発現していること、すなわち **laeverin** がこれまでに手に入らなかったヒト組織幹細胞の新しいマーカーである可能性を見いだした。さらに脊髄切断幼若ラットにおいて神経再生部に誘導されるグリア幹細胞に **laeverin** 発現が誘導されることが観察された。そこでこれまでの免疫細胞および血小板に加えて解析の対象を組織幹細胞まで広げ、**laeverin** 蛋白機能解析情報の **advantage** を生かして生殖臓器の組織再構築の制御機構のみならず臓器の再生医療にも応用できる新しい知見を得る可能性があり本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究はヒト黄体形成の組織再構築機構と妊娠時の黄体維持機構、ヒト胚着床時の子宮内膜の分化誘導機構と胚の子宮内膜間質内埋没の誘導機構、さらに **EVT** の母体子宮内膜ラセン動脈の再構築機構を体循環に存

在する免疫細胞、血小板および幹細胞に着目して、(1) HCG などの内分泌系機構と免疫系機構とのネットワークを介した母体-胚間の相互応答機序に基づき総合的に解析し新しい知見を得ること、さらにこれら検討から明らかとなった成果をもとに(2)不妊症例に対する安全かつ有効な診断法と治療法の開発を計画し、臨床応用可能なプロトコールを検討して最終年度にはそれを提言できる段階まで研究を遂行すること、またヒト黄体形成とラセン動脈の再構築、さらにラットの脊髄神経再生を組織形成のモデルとして幹細胞の動態を詳細に同定・検討して、(3)組織再生医療へ応用できる新しい概念の提示と治療法の開発の方向性を確立すること、以上3点を研究期間内に達成することを目標として計画された。

3. 研究の方法

(1) ヒト免疫細胞および血小板による黄体形成と血管新生およびその機能維持機構の解析

患者の同意の上で卵巣組織から黄体を採取し、黄体細胞を HCL-1 抗体を用いた cell sorter 法で回収し、妊娠または非妊娠女性から採取・分離した末梢血単核球および血小板と共培養してサイトカインの産生を測定した。また Flow cytometry 法にてサイトカインの産生変化をした細胞分画の同定を行い、さらに高濃度の HCG を添加して cytokine 産生と機能分子の発現の変化を観察してレクチン関連受容体の役割を検討した。また末梢血単核球および血小板の血管作動性因子産生に対する HCG の作用を解析する目的で、HCG 存在下にこれらの血球細胞をヒト臍帯静脈上皮細胞 (HUVEC) と共培養し、HUVEC の増殖能および migration 能の変化を観察した。

(2) 末梢血免疫細胞や血小板によるヒト子宮内膜分化・再構築およびヒト胚着床誘導機構の解析

患者の同意を得た後に婦人科手術時に摘出された子宮より分泌期初期の子宮内膜を採取して上皮細胞を分離し培養し、ヒト blastocyst 様 BeWo 細胞塊を用いた attachment assay 法にて胚接着能を検討した。また末梢血単核球および血小板の存在下で子宮内膜上皮細胞に発現誘導される遺伝子群を Microarray 法で同定し、発現が変化した遺伝子群について、増殖期後期および各分泌期の女性から子宮内膜上皮細胞を採取し、月経周期の発現変化を Northern blot 法で確認した。単核球および血小板由来の液性因子として S1P を培養子宮内膜上皮細胞に添加して子宮内膜の胚受着能に対する促進機構に関する知見を得た。

(3) 胚の子宮内膜間質内への埋没およびヒト絨毛外栄養膜細胞の母体子宮内膜ラセン

動脈再構築機構の解析

抗 laeverin 抗体を用いて胎盤より精製した laeverin 蛋白を免疫源にして多種類の単クローン抗体を作成し、分離 EVT の増殖や浸潤を変化させる機能抗体を選別した。さらに laeverin 遺伝子のはいったトランスファーベクターを構築後、Sf9 細胞にバキュロウイルスを発現させ、感染細胞を回収し、これを大量培養してアフィニティ精製法および SDS-PAGE を用いて r-laeverin を分離精製後、peptidase 活性とその基質を確認した。さらに r-laeverin をヒト絨毛癌由来の細胞株に添加培養して形態的な観察、Invasion assay および WST assay を行いその生物学的作用を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト免疫細胞および血小板による黄体形成と血管新生およびその機能維持機構の解析

末梢血単核球または血小板にて黄体細胞で発現変化した機能分子として、chemokine を分解する酵素である Dipeptidyl peptidase IV および chemokine 受容体である CCR4 が同定された。さらに HCG 存在下に末梢血単核球および血小板をヒト臍帯静脈上皮細胞 (HUVEC) と共培養したところ、脂質走化性因子である S1P の分泌が増強されることが示され、黄体形成期の血管新生機構に関して、内分泌系と免疫系の相互応答のもとに血管内皮の走化性が制御されている可能性が示された。

(2) 末梢血免疫細胞や血小板によるヒト子宮内膜分化・再構築およびヒト胚着床誘導機構の解析

(1) で同定された S1P を培養子宮内膜上皮細胞に作用させたところ上皮細胞の運動性を増強させることが明らかとなった。また Eph-ephrinA system によって子宮内膜上皮間の結合が解離することが示され、ヒト胚の子宮内膜内への侵入機構に免疫細胞および血小板が関与している可能性が示唆された。

(3) 胚の子宮内膜間質内への埋没およびヒト絨毛外栄養膜細胞の母体子宮内膜ラセン動脈再構築機構の解析

これまでに新しく同定された laeverin が妊娠 4 週の初期から胚由来の絨毛外栄養膜細胞に特異的に発現していること、さらにリコンビナント laeverin が絨毛外栄養膜細胞の浸潤を増強することが観察され、新しい母体子宮内膜ラセン動脈再構築機構が提示された。

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 10 件)

- ①Fuji H, Fujiwara H, Horie A, Suginami K, Sato Y, Konishi I. Ephrin A1 stimulates cell attachment and inhibits cell aggregation through the EphA receptor pathway in human endometrial carcinoma-derived Ishikawa cells. Hum Reprod 26:1163-1170, 2011 査読有り
- ②Fuji H, Fujiwara H, Horie A, Sato Y, Konishi I. Ephrin A1 induces intercellular dissociation in Ishikawa cells: possible implication of the Eph-ephrin A system in human embryo implantation. Hum Reprod 26:299-306, 2011 査読有り
- ③Fujiwara H, Ideta A, Araki Y, Takao Y, Sato Y, Horie A, Tsunoda N, Aoyagi Y, Konishi I. Possible Contribution of Circulating Blood Cells to Embryo Implantation. Indian Journal of Physiology and Pharmacology 54:51-59, 2010 査読有り
- ④Sato Y, Fujiwara H, Konishi I. Role of platelets in placentation. Med Mol Morphol 43:129-133, 2010 査読有り
- ⑤Fujiwara H, Araki Y, Toshimori K. Is the zona pellucida an intrinsic source of signals activating maternal recognition of the developing mammalian embryo? Journal of Reproductive Immunology 81:1-8, 2009 査読有り
- ⑥Fujiwara H. Do circulating blood cells contribute to maternal tissue remodeling and embryo-maternal cross-talk around the implantation period? Molecular Human Reproduction 15:335-343, 2009 査読有り
- ⑦Maruyama M, Arisaka N, Goto Y, Ohsawa Y, Inoue H, Fujiwara H, Hattori A, Tsujimoto M, Histidine 379 of Human Laeverin/Aminopeptidase Q, a Nonconserved Residue within the Exopeptidase Motif, Defines Its Distinctive Enzymatic Properties. Journal of Biological Chemistry 284:34692-34702, 2009 査読有り
- ⑧Takao Y, Fujiwara H, Yoshioka S, Fujii S, Ueda M. Monoamine oxidase A is highly expressed by the human corpus luteum of pregnancy. Reproduction 136:367-375, 2008 査読有り

⑨Nishio T, Kawaguchi A, Fujiwara H. Emergence of highly neurofilament-immunoreactive zipper-like axon segment at the transection site in scalpel-cordotomized adult rat. Neuroscience 155:90-103, 2008 査読有り

⑩藤原 浩 免疫細胞を用いた着床率向上の試み 日本産科婦人科学会雑誌 60:N399-402,2008 査読無し

〔学会発表〕(計 9 件)

①藤原 浩 ヒト黄体形成の調節機構 第 15 回日本生殖内分泌学会 平成 22 年 11 月 20 日 豊中

②藤原 浩 着床の基礎と臨床 第 55 回日本生殖医学会学術講演会 平成 22 年 11 月 12 日 徳島

③Fujiwara H, Fujii H, Takao Y, Horie A, Sato Y, Konishi I. EphrinA1 induces cell attachment and intercellular dissociation in Ishikawa cells. 14th World Congress of Gynecological Endocrinology 平成22年3月4日 Firenze, Italy

④Fujiwara H. Circulating immune cells contribute to embryo implantation during early pregnancy. The 3rd International Forum on Repeated IVF Failure 平成21年11月7日 Guangzhou, China

⑤藤原 浩 着床をめぐる最近の話題、末梢血免疫細胞による胚着床誘導機構とその臨床応用 第 27 回日本ヒト細胞学会学術集会 平成 21 年 8 月 22 日 東京

⑥Fujiwara H. Circulating blood cell contribution to embryo implantation. IUPS Satellite Symposium on Endometrial Receptivity and Blastocyst Implantation 平成 21 年 7 月 25 日 Kyoto, Japan

⑦藤原 浩 難治性着床不全、不育症に対する治療の試み 日本生殖免疫学会第 23 回学術集会 平成 20 年 12 月 6 日 富山

⑧Fujiwara H. Immune cell contribution to systemic crosstalk between mother and embryo around implantation period. The 1st International workshop on Reproductive Biology:“Recent Progresses in Reproductive Biology” SKLAB 2008 平成 20 年 10 月 10 日 Beijing, China

⑨藤原 浩 周産期免疫、常態と病態、着床

誘導機構について 日本産婦人科・新生児血液学会第 18 回学術集会 平成 20 年 6 月 28 日 福岡

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称：絨毛外栄養膜細胞特異的蛋白

発明者：藤原 浩 他 1 名

権利者：藤原 浩 他 1 名

種類：物理学、測定試験

番号：4346540

取得年月日：平成 21 年 7 月 24 日

国内外の別：国内

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 浩 (FUJIWARA HIROSHI)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30252456

(2) 研究分担者

藤田 潤 (FUJITA JUN)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：50173430

西 英一郎 (NISHI EIICHIRO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30362528

西尾 健資 (NISHIO TAKESHI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70303790

服部 明 (HATTORI AKIRA)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：50300893

(3) 連携研究者

高尾 由美 (TAKAO YUMI) (H20-21)

京都大学・医学研究科・助教 (H22. 3. 31 退職)

研究者番号：20447957