

機関番号：32409

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591928

研究課題名 (和文) 脱落膜化異常が関与する疾患の病態解明とその治療について

研究課題名 (英文) Elucidation of pathophysiology for abnormal decidualization and development of its treatment

研究代表者

梶原 健 (KAJIHARA TAKESHI)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80286103

研究成果の概要 (和文)：子宮内膜間質細胞を用い hCG の脱落膜化への直接的影響を検討した。FOXO1 と Mn-SOD の発現は脱落膜化刺激により発現が誘導され、hCG の添加によりさらに上昇した。脱落膜化刺激により酸化ストレスにより誘導されるアポトーシス細胞は有意に減少し、hCG を添加することでさらに減少した。hCG は FOXO1 や Mn-SOD の発現に関して促進的に働くことにより、hCG は子宮内膜に作用し、その適切な使用が着床率を向上させる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：To test this hypothesis, primary HESCs cultures were decidualized with 8-bromo-cAMP and medroxyprogesterone acetate in the presence or absence of rhCG at various concentrations. Hydrogen peroxide was used as a source of reactive oxygen species (ROS). rhCG conferred additional protection to oxidative cell death in decidualizing HESCs in a dose-dependent manner. In parallel, rhCG augmented the expression of the decidual transcription factor FOXO1 and its downstream target, the ROS scavenger superoxide dismutase 2 (SOD2). These results suggest that hCG improves the uterine environment upon implantation by suppressing apoptotic responses the maternal decidua under oxidative stress conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：子宮内膜脱落膜化

## 1. 研究開始当初の背景

体外受精・胚移植周期においては排卵誘発・胚培養技術を含めた様々な部分で工夫がなされそれに伴い妊娠率も上昇してきたが、ここ数年間の妊娠率にはほぼ変化がなく、また形態良好胚を移植しても妊娠に至らない症例が散見される。この原因の大きな一つは

着床期周辺の子宮内膜機能のメカニズムに関し未だ不明な点が多く、その部分に関する工夫がほとんどなされていないためである。そのため着床期周辺の子宮内膜機能のメカニズム一端を明らかとし、その知見より適切な治療法を開発することは不妊症治療における着床率改善、しいては妊娠率上昇のため

には重要なポイントである。

## 2. 研究の目的

ヒト絨毛性腺刺激ホルモン (hCG) は受精後 7 日目以降の胞胚から分泌されており、一般に知られている黄体賦活作用による妊娠維持機構以外にも、子宮内膜組織には LH/CG 受容体が発現していることから、着床期周辺の子宮内膜細胞に対する hCG の直接的な作用、さらに胚と子宮内膜の相互作用も想定されている。しかし、hCG の子宮内膜に対する直接作用に関しては未だ不明な点も多い。

子宮内膜の脱落膜化は受精卵の着床、絨毛細胞の侵入、胎盤の形成に重要な過程であり、これまでに我々はこの過程においてフォークヘッド転写因子の一つである FOXO1 が重要な役割を果たしていることを明らかにした。脱落膜化障害は着床障害、しいては不妊および産科異常の原因となる可能性が考えられている。本研究では子宮内膜間質細胞 (HESCs) 培養系を用い hCG が及ぼす脱落膜化さらには各種転写因子の発現に対する影響、またその分子メカニズムに関して検討を行い、hCG の HESCs の脱落膜化過程に及ぼす有用性の有無とその分子メカニズムを *in vitro* のレベルで検討し、その臨床応用の可能性を探ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト子宮内膜間質細胞の分離・培養

手術で得られた標本から子宮内膜を採取し、間質細胞 (HESCs) を分離・培養に用いた。既報の方法に従い、酵素処理後、子宮内膜組織を腺細胞と間質細胞に分離し、間質細胞をチャコール処理した 10%FBS (DCC-FBS)、グルタミン、抗生物質を含んだ DMEM/F12 を用い、37°C、95%air、5%CO<sub>2</sub> の条件下にて培養した。Confluent に達した HESCs は 0.5mM 8-bromo-cAMP (8-bro-cAMP) と 10<sup>-6</sup>M medroxyprogesterone acetate (MPA) の両者にて脱落膜化刺激を行い同時に 0.01~1IU/ml の hCG を添加し培養した、4 日間培養を行い、タンパク質を抽出した。なお培養液は 2%DCC-FBS、グルタミン、抗生物質を含んだ DMEM/F12 を用いた。

### (2) タンパク質の精製と Western blot 解析

分離・培養した HESCs より NP-40 lysis buffer (1%nonidet P-40, 100mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM NaF, 1mM sodium orthovanadate, 30mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 100mM glycerophosphate, and protease inhibitors) を用いてタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質 30 μg を 10%SDS-PAGE ゲル

にて泳動後、PVDF-membrane へブロッティングした。一次抗体として抗 FOXO1 抗体 (Cell Signaling 社)、抗 Cu, Zn-SOD1 抗体 (Santa Cruz 社)、抗 Mn-SOD 抗体 (Santa Cruz 社)、抗 LH/CG 受容体抗体 (Santa Cruz 社)、抗 α-Tubulin 抗体 (Santa Cruz 社) を用い、ECL Detection System (Amersham 社) により、それぞれのタンパク質を検出した。

### (3) アポトーシス細胞の検出

脱落膜化刺激を行った HESCs に 0.01~1IU/ml の hCG を同時に添加した群と添加しない群を作製し 4 日間培養後した。酸化ストレスとして 100mM の過酸化水素を添加し、さらに 4 時間培養し Cell Death Detection ELISA plus kit (Roche Diagnostics 社) を用いてアポトーシス細胞を検出した。

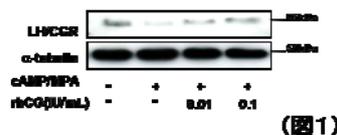
### (4) 蛍光免疫組織化学

ガラス・カバースリップ上で HESCs 培養し、前述した方法で脱落膜化刺激を 3 日間行い、同時に 0.1IU/mL の hCG を添加した群と、添加していない群を作製した。100mM の過酸化水素を添加しさらに 4 時間培養し、その後 4%パラホルムアルデヒドにて 2 時間固定した。抗 Bax 抗体 (Santa Cruz 社)、抗 Bcl-2 抗体 (Dako 社) にて蛍光免疫組織化学法を用いその発現を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) HESCs における LH/CG 受容体の発現

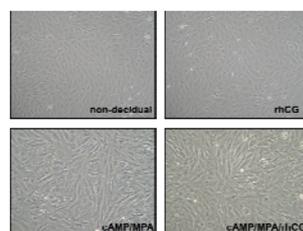
HESCs における LH/CG 受容体の発現は脱落膜化刺激を行うことにより、その発現は抑制されたが、hCG を添加することにより回復してきた (図 1)。



(図 1)

### (2) HESCs の形態に及ぼす hCG の影響

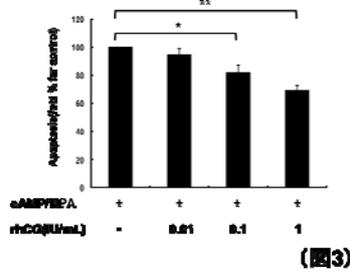
HESCs は形態学的には 8-bro-cAMP と MPA による刺激を行うと脱落膜化細胞に特有な大型の敷石状の形態を示していた。しかし脱落膜化刺激を行った HESCs に hCG を添加しても大きな形態学的な変化は示さなかった (図 2)。



(図 2)

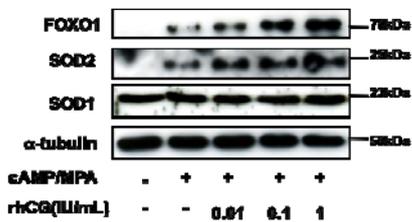
### (3)HESCs 酸化ストレス抵抗性への hCG の影響

以前我々が報告したのと同様に、脱落膜化刺激を行うことにより過酸化水素（酸化ストレス）にて誘導されるアポトーシス細胞は有意に減少した。さらに脱落膜化した HESCs に hCG を添加することにより濃度依存性にアポトーシス細胞は減少した（図 3）。



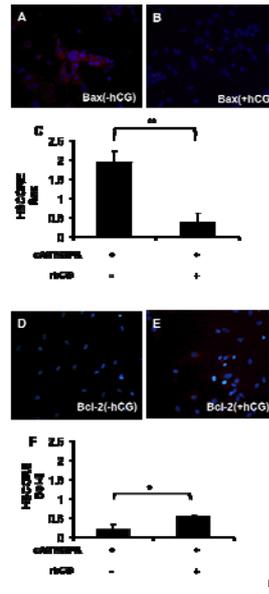
(図3)

これまでに我々が脱落膜化刺激により誘導され、脱落膜化機構に重要な役割を果たしていると報告してきた転写因子のひとつである FOXO1 は、8-bro-cAMP と MPA による刺激によりその発現は誘導され、hCG を添加することにより、さらに濃度依存性にその発現は誘導された。また FOXO1 の標的遺伝子で活性酸素消去酵素である Mn-SOD も同様に hCG を添加することにより濃度依存性にその発現が増強された。しかし他の活性酸素消去酵素の Cu, Zn-SOD の発現には変化はなかった（図 4）。



(図4)

一方、pro-apoptotic 因子である Bax は hCG を添加することによりその発現は抑制されたが、anti-apoptotic 因子である bcl-2 の発現は hCG を添加することにより増強していた（図 5）。



(図5)

### まとめ

脱落膜化 HESCs は hCG 添加により（1）FOXO1 を介した Mn-SOD の発現誘導（2）Bax の発現抑制、bcl-2 の発現誘導、の2つのメカニズムを介して、酸化ストレス抵抗性が強化されることが明らかとなった。hCG は子宮内膜に作用し、転写因子の発現を介して妊娠維持作用を果たし、その適切な使用が着床率を向上させる可能性が示唆された。

### 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5件）

① Kajihara T, Uchino S, Suzuki M, Itakura A, Brosens JJ, Ishihara O

Human chorionic gonadotropin confers resistance to oxidative stress-induced apoptosis in decidualizing human endometrial stromal cells.

Fertil Steril 95:1302-1307, 2011

② Brosens JJ, Hodgetts A, Feroze-Zaidi F, Sherwin JR, Fusi L, Salker MS, Higham J, Rose GL, Kajihara T, Young SL, Lessey BA, Henriot P, Langford PR, Fezleabas AT  
Proteomic analysis of endometrium from fertile and infertile patients suggests a role for apolipoprotein A-1 in embryo implantation failure and endometrium.

Mol Hum Reprod 16:273-285, 2010

③ 梶原 健、石原 理

ホルモン療法による着床率の向上

臨床婦人科産科 64:858-861, 2010

④梶原 健、内野聡美、石原 理  
着床不全に対する新しい治療の試み 内分泌療法

Hormone Frontier in Gynecology.  
16:138-142, 2009

⑤Kajihara T, Uchino S, Suzuki M, Itakura A, BrosensJJ, Ishihara O

Increase ovarian follicle atresia in obese Zucker rats is associated with enhanced expression of forkhead transcription factor FOXO1.

Med Mol Morphol 42:216-221, 2009

[学会発表] (計 9 件)

①梶原 健

脱落膜化細胞へのhCGの直接作用は製剤の由来により異なる

第 55 回日本生殖医学会・学術講演会 (徳島)  
2010. 11. 11-12

②梶原 健

脱落膜化細胞へのhCGの直接作用はレコンピナントと尿由来で異なる

第 28 回日本受精着床学会総会・学術講演会 (横浜) 2010. 7. 28-29

③梶原 健

着床不全の病態と治療法の可能性-hCG 療法を中心に (シンポジウム)

第 142 回日本生殖医学会関東連合地方部会 (栃木) 2010. 6. 12

④梶原 健

子宮内膜脱落膜化細胞の酸化ストレス抵抗性獲得メカニズムの検討

第 62 回日本産科婦人科学会総会・学術集会 (東京) 2010. 4. 23-25

⑤Kajihara T

Decidualized HESCs treated with rhCG become resistant to cell death induced by oxidative stress.

IFSS2010 20<sup>th</sup> World Congress on Fertility and Sterility (Munich) 2010. 9. 12-16

⑥梶原 健

子宮内膜脱落膜化細胞がhCGにより酸化ストレス抵抗性を獲得するメカニズムの検討

第 54 回日本生殖医学会・学術講演会 (金沢)  
2009. 11. 22-23

⑦梶原 健

子宮内膜脱落膜化細胞がhCGにより酸化ストレス抵抗性を獲得する細胞内メカニズムの検討

第 27 回日本受精着床学会総会・学術講演会 (京都) 2009. 8. 6-7

⑧梶原 健

ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) はヒト

子宮内膜脱落膜化細胞の酸化抵抗性を高める

第 61 回日本産科婦人科学会総会・学術集会 (京都) 2009. 4. 3-5

⑨Kajihara T

Decidualized HESCs treated with rhCG become resistant to cell death induced by oxidative stress.

IUSP satellite symposium on endometrial receptivity and blastocyst implantation, Kyoto 2009. 7. 25

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶原 健 (KAJIHARA TAKESHI)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80286103

(2) 研究分担者

石原 理 (ISHIHARA OSAMU)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：70176212

(H22：連携研究者)

板倉 敦夫 (ITAKURA ATSUO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：70262897

(H22：連携研究者)