

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390453

研究課題名（和文）着床機能異常を検出する生理的パラメーターの創出

研究課題名（英文）Investigation of uterine parameter to evaluate 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（和文）：

接着から胎盤形成に至る正常な着床過程は妊娠の成立の鍵を握る。不妊症だけでなく、妊娠中におこる病態はこの妊娠現象の早期におこる着床現象の何らかの異常により引き起こされると考えられている。広義の着床現象をリアルタイムに低侵襲に評価することが効率のよい不妊治療、および妊娠に係わる病態の治療に反映できるのではないかと考え、我々の作成したマウス病態モデルを用いて、リアルタイムに低侵襲に着床現象を評価できるような生理的パラメーターの創出とその機器の開発をめざした基礎研究を行った。

研究成果の概要（英文）：

Implantation is a key process for pregnancy. It is considered that abnormal implantation, which is occurred at the early stage of pregnancy, is a cause of not only infertility and also pregnancy related conditions and complications. We hypothesized that if we can assess implantation in real time, it could be useful for the treatment of infertility and pregnancy related conditions and complications. We investigated a new parameter to evaluate uterine receptivity using our mouse model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

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：生殖医学、着床

1. 研究開始当初の背景

妊娠に関連する病態は主に妊娠後半におこるが、その原因は妊娠のきわめて初期の段階である着床過程にあると考えられている。一回あたりの月経周期において児を得る確率はおよそ30%といわれている(Zinaman et al., 1996 Fertil Steril 65, 503-509. Hoozemans et al., 2004 Reprod BioMed Online 9, 692-

715.)。そのうち50-60%が妊娠20週以降まで到達する。つまり受精卵の75%が着床していないが、また実際に臨床的に認識されていない(Wilcox et al., 1988 N Engl J Med 319, 189-194.)。着床現象は受精し分割を始めた胚と子宮内膜の接着から始まり、子宮内膜への浸潤そして胎盤形成から成る。体外授精—胚移植が臨床現場にとりいれられるようになり、妊

娠までの過程においてどこに問題があるのかわかりやすくなった。しかしながら受精し、分割し、順調に成長を始めた胚を子宮に移植してもそのうちたった17%だけが妊娠にいたる事ができる。不妊症だけでなく、妊娠中におこる病態、妊娠高血圧症候群やpreterm premature rupture of membrane (pPROM) intrauterine growth restriction (IUGR) 等はこの妊娠現象の早期におこる着床現象の何らかの異常により引き起こされると考えられている。

着床現象が妊娠期間においても限られた短い時間であるのにもかかわらず、様々な物質の関与が報告されてきた。しかしその生理的意義が不明であり、着床に関わる病態についての説明はできていない。

我々は、妊娠のような局所における劇的な、しかしながら一過性の現象に関連する病態を解析するには子宮局所の生体内一過性遺伝子導入方法が必要ではないか、と考え HVJ-E ベクターを用いてその開発を行った (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.)。そして、これを用いて着床期子宮において Nuclear factor kappaB を抑制する事により、着床遅延マウスモデル (Biochem. Biophys Res Commun. 2004, 321: 886-892.)、STAT-3 活性を 50%抑制する事による 着床不全マウス病態モデル (FEBS Lett. 2006, 580: 2717-2722.)、胎盤形成期に子宮に一過性に TIMP-3 を強制発現させる事により 妊娠高血圧症候群マウスモデル (投稿準備中)、妊娠後期子宮に VEGF を導入する事により 妊娠高血圧症候群の治療モデル (Horm Metab Res. 2006, 38:619-24.) を作製し、妊娠に係わる病態の物質的な基盤について検討してきた。

これらマウス病態モデルを用いて、広義の着床現象をリアルタイムに低侵襲に評価することが効率のよい不妊治療、および妊娠に係わる病態の治療に反映できるのではないかと考えるに至った。

不妊症における着床不全はホルモン環境と子宮の機能および形態の不一致によっておこると考えられてきた。臨床的に子宮内膜の機能は (1) 子宮内膜を採取して組織学的に検討する内膜日付診、(2) 血中プロゲステロンレベル、(3) 超音波による子宮内膜厚の測定、により評価されてきた。しかしながら (1) の内膜検体の採取は侵襲が大きく、ルーチンで行う事が困難であるのに加え、実際にはその意義と臨床的な効果について未だ結論がでていない。(2) および (3) について、それぞれが正常値であっ

ても着床不全をおこしている症例があまりに多い。これらの3つのパラメーターが結果的に「着床」に必要な状況であるかもしれないが、これらがリアルタイムに子宮の着床能を評価しているとは言えない。我々も予備的な臨床材料を用いた検討において、この3つのパラメーターがお互いに相関していない事を確認した (投稿準備中)。このことより、これらのパラメーターが他の因子に制御される結果的な現象のひとつでしかない事が示唆された。

また妊娠高血圧症候群は、血圧と尿蛋白によって診断されるが、これらはいわば病態の結果をみているのにすぎず、前方向的に妊娠高血圧症候群を診断するものではない。血中の生化学的マーカーについても同様である。超音波 3D パワードップラー法を用いてヒト子宮の血流量を測定する試みがされている。しかしながら、妊娠した群と妊娠に至らなかった群または妊娠高血圧症候群と正常妊娠の比較にとどまり、その意義とメカニズムを説明するには至らない。

そこで、我々はマウス子宮局所の血流量を測定する事により着床現象を評価できないかと考え、レーザードップラー法を用いた局所血流量、パルスオキシメーターを用いて SpO2 および心拍数、体温を同時に測定するシステムの構築を行った。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、非妊娠時の性周期においても子宮の血流量に (および子宮/腎臓の血流量においても) 変化がある事 (図1)、着床した同一の個体においても着床部位と非着床部位では子宮における血流量に変化があ

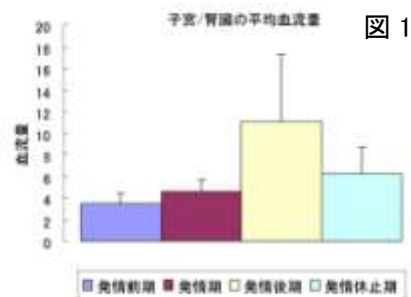
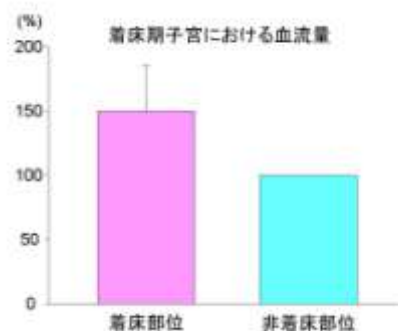
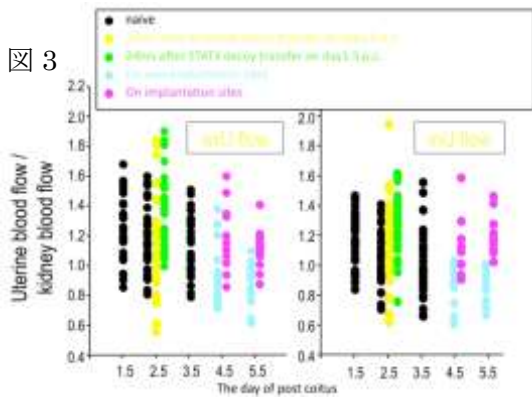


図 2



る事が確認された(図2)。しかしながら、測定値のばらつきがあまりに大きく、このパラメーターにおいて測定値から前方視的に妊娠の帰結について予測ができない事がわかった(図3)。



本研究では、これまでの結果をふまえ不妊症と妊娠にかかわる病態の治療のために、リアルタイムに低侵襲に着床現象を評価できるような生理的パラメーターの創出とその機器の開発をめざす。

前述の我々の作成したマウスモデルを用いて、着床部位における電気的特性を測定し、その意義について生理的および分子生物学的な検討をする基礎研究を目的とする。これにより、着床現象を前方向的に評価し、治療方針に反映できるような診断機器の実現をめざした。

2. 研究の目的

着床不全の病態だけでなく、着床現象そのものの物質的基盤も未だ明らかではない。これまで多くの検討がされてきたが、未だコンセンサスが得られたヒト子宮の着床能を評価することができる物質的マーカーがないのが現状である。

我々は、妊娠のように子宮局所で一過性におこるダイナミックな現象とそれにかかわる病態の検討には、子宮局所で一過性に遺伝子を導入する実験モデルが必要と考え、センダイウイルスの外殻を用いたHVJ-E vectorを用いてマウス子宮に対する一過性の遺伝子導入方法を開発した[J Reprod Immunol. 2006, 70:59-69. Mol. Hum. Reprod. 2003, 9: 603-609. Mol Ther. 2002, 6:219-226. Mol Hum Reprod. 2003, 9: 603-609.]。

着床現象のように妊娠初期の限られた短い期間に起こる現象であるのにもかかわらず4つの過程があり、多くの物質の関与が報告されていることから、経時的多段階性を保つために、いくつかの多機能転写因子がこれらを制御しているのでは?と仮定し、検討を重

ねてきた[Biochem. Biophys Res Commun. 2004, 321: 886-892. J Reprod Immunol. 2005, 67:13-20. Am. J. Reprod. Immunol. 2004, 51: 16-21.]。この結果、STAT3が着床不全の病態の分子標的と成り得るのではないかという結果を得た[未発表 data]。しかしながら、STAT3を分子標的として非侵襲的にかつ前方視的に着床能を評価するのは困難であるために、着眼点を変えた。

着床期子宮においては、物質Aが産生される。少なくともこの一部はSTAT3により制御されている[未発表 data]。

この現象は単一の物質を標的とした時に、種によってその発現パターンが異なるが、全体としての反応は同じである。このことから、着床期子宮における変化を電気生理学的に捉え、このパラメーターをもって前方視的に子宮の着床能を評価することができないか?と考えるに至った。

一方で、着床現象全般において着床部位で血管透過性が上昇する事から、これをとらえ評価する事により着床現象の評価につなげる事ができないかという事を検討する。血管系の変化は皮膚や管腔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。

そこで本研究では、一過性遺伝子導入法を駆使した着床遷延、着床不全、胎盤侵入不全モデル動物に対して、

- (1) 物質Aを基盤とした電気生理的なパラメーターの検索、
- (2) 生体色素を静脈より投与した際に血管透過性の上昇しているところに色素が一時的に残ることから、これらを子宮でリアルタイムに低侵襲にモニタリングできるようなシステムの開発を行った。さらに、それぞれについて生理学および分子生物学的に検討を行う事を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 物質Aを基盤とした電気生理的なパラメーターの検索
- 電気生理学的パラメーターX、Y、Zに着目し

た。膣におけるZおよび、子宮腔内のX、Yの検討をするためのプローブの作製およびシステムの構築を行った。

①マウス妊娠初期における電気生理的パラメータX、Y、Zの測定：

8-10週齢のICRマウスメスを同系の雄と交配させた。膣栓を確認した朝を交配後0.5日目とした。

連日、麻酔下においてマウス膣におけるZおよび子宮腔内におけるY、Zを測定した。

②物質Aの変化による変化の検討：

着床期子宮腔内においては物質Aの変化が報告されている。この変化を膣における電気生理的パラメータZにおいてとらえる事ができるのか、検討を行った。発情前期マウスにおいて物質Aを遺伝子導入により人工的に変化させた。マウス性周期については、膣スミアを採取し、それをギムザ染色して組織学的に検討を行った。HVJ-Eベクターを用いて、卵管側より直接子宮腔内に遺伝子導入を行った。麻酔下において24時間後における膣Zを測定した。

③ヒト着床不全モデルマウスを用いた検討：交配後1.5日目に麻酔下に開腹し、卵管側より直接、子宮腔内にSTAT3 decoy および遺伝子導入のコントロールとして scramble decoy をHVJ-Eベクターを用いて遺伝子導入した。交配後2.5日目に膣におけるZおよび子宮腔内におけるY、Zを測定した。マウス着床期は交配後3.5日目から5.5日目であり、着床期直前である交配後2.5日目におけるそれぞれのパラメータの測定値から妊娠の帰結に関して、予測できるかどうかを検討した。

(2)血管透過性に関する検討：

ユニークメディカル社において現在開発中のマウス用組織造影システムの改良に参画した。本システムは生体色素であるインドシアグリーンを静脈より注入して、この色素が血液中のタンパク質と結合する。これを870nmの励起波長のモノクロ CCD (近赤外線) カメラで体外から検出する事ができるというシステムである。すでに、このシステムを用いて、リンパ節および血管を検出する事ができる事を確認している。そこで、このシステムを用いて、子宮の血管透過性を体表、あるいは子宮腔内から検出する事ができるようにシステムを最適化した。

なお、すべての動物実験は大阪大学医学部お

よび大阪電気通信大学の動物実験に関わる倫理委員会の承認のもとに行った。また、動物を用いた実験は両大学の附属動物実験施設内で行った。

組み替えDNA実験についても、すでに大阪大学医学部の承認を得ており、この基準に従った。

4. 研究成果

(1)マウス妊娠初期における電気生理的パラメータX、Y、Zの測定：

マウス交配後0.5日目より交配後5.5日目までの連日マウス膣におけるZおよび子宮腔内におけるY、Zを測定した。

子宮腔内におけるXについては、初期妊娠において変化が認められなかった。子宮腔内Yおよび膣Zについては初期妊娠において、連日変化していく事が認められた(図4)。

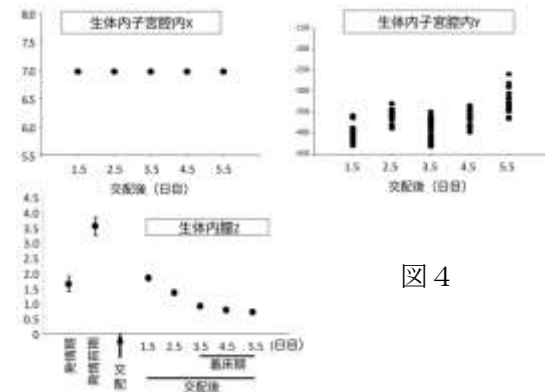
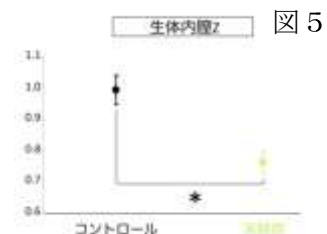


図4

(2)物質Aの変化による変化の検討：

我々の仮説を証明するために、子宮腔内における物質Aを人工的に変化させて、膣において電気生理学的パラメータZでこの変化をとらえる事ができるのか検討した。

実験群において、膣Zは有意差をもって低値になる事が示された。この事から我々の仮説が膣においても電気生理学的パラメータZにおいて検出する事ができる事が示された。



(3)ヒト着床不全モデルマウスを用いた検討：ヒト着床不全モデルマウスを用いて、着床期直前である交配後2.5日目に膣におけるZと子宮腔内Yを測定した。

ヒト着床不全モデルマウスでは、有意にそれぞれのパラメータが上昇する事が認められた(図6)。

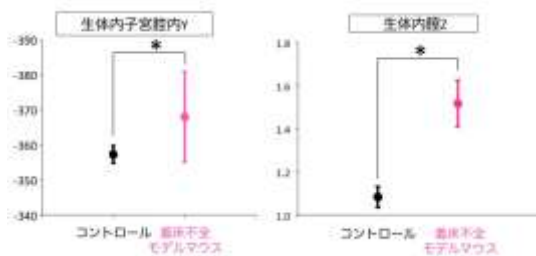
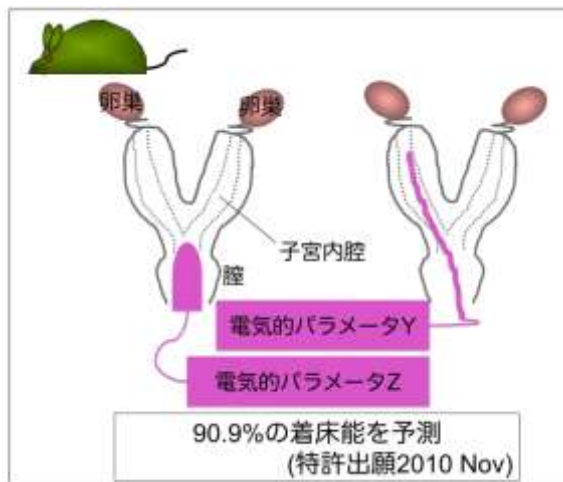


図 6

また、これら測定値から、前方視的に妊娠の帰結を 90.9%の確立で予測する事ができる事が認められた。これを特許申請した。



(4) 血管透過性に関する検討：

着床期マウスの尾静脈よりインドシアグリーンを注入し、870nmの励起波長のモノクロ CCD (近赤外線) カメラで体外から検出できるか検討をした。注入するインドシアグリーンの量と、励起光の強度を最適化する事を検討したが、肝臓に蓄積された ICG により体表から子宮を観察できない、もしくは、子宮からの光が不十分で体表からの検出ができなかった。現在、システムそのものの調整を行っている。

まとめ：

着床不全不妊症の診断装置として、本研究によって得られた基礎研究を応用するべく、将来の事業化を担う企業と共同研究を開始した。2012年度の臨床研究を経て、2017年には薬事承認を得て、国内での事業化をめざす。妊娠高血圧症候群や preterm premature rupture of membrane (pPROM) intrauterine growth restriction (IUGR) 等妊娠中におこる病態を標的とした検討は本研究期間中に結論を得るまでに至らなかった。今後、他の系によって作成した妊娠高血圧症候群モデルマウスを用いて検討していく予定である。

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 43 件)

- (1) Fujime, M., Tomimatsu, T., Okaue, Y., Koyama, S., Kanagawa, T., Taniguchi, T., Kimura, T. Central aortic blood pressure and Augmentation index during normal pregnancy. Hypertens Res. (in press) 査読あり
- (2) Nguyen TM, Nakamura, H., Wakabayashi, A., Kanagawa, T., Koyama, S., Tsutsui, T., Hamasaki, T., Kimura, T. Estimation of mouse fetal weight by ultrasonography: application from clinic to laboratory. Laboratory Animals. (in press) 査読あり
- (3) Koyama, S., Tomimatsu, T., Kanagawa, T., Kumasawa, K., Tsutsui, T., Kimura, T. Reliable predictors of neonatal immune thrombocytopenia in pregnant women with idiopathic thrombocytopenic purpura. Am J Hematol 87(1): 15-21, 2012 査読あり
- (4) Nakamura, H., Jasper, M. J., Hull, M.L. Aplin, J. D., Robertson, S.A. Macrophages regulate expression of alpha1,2 fucosyltransferase genes in human endometrial epithelial cells. Mol Hum Reprod 18(4): 204-215, 2012 査読あり
- (5) Kumasawa, K., Ikawa, M., Kidoya, H., Kasuwa, H., Saito, F., Morioka, Y., Takakura, N., Kimura, T., Okabe, M. Pravastatin induces placental growth factor(PGF) and ameliorates preclampsia in a mouse model. Proc Natl Acad Sci USA 108(4): 1451-1455, 2011 査読あり
- (6) Koyama, S., Tomimatsu, T., Kanagawa, T., Daimon, E., Kimura, T. Successful pregnancy after simultaneous pancreas-kidney transplantation from a brain-dead donor: the first case report in Japan. J Obstet Gynaecol Res 37: 1711-1716, 2011 査読あり
- (7) Kimura, T., Ogita, K., Kumasawa, K., Koyama, S., Tsutsui, T., Nakamura, H. Two multipotential transcription factor, NF-kappaB and Stat-3, play critical and hierarchical roles for implantation. Indian Journal of Physiology and Pharmacology 54(5): 27-32, 2010 査読あり

[学会発表] (計 32 件)

- (1) Hosono, T., Nitta, C., Iseki, T., Yamamoto, M., Igi, C. Effects of dexamethasone given to immature rats on behavior after growth. 第 89 回日本生理学会大会 松本市 03.31./2012
- (2) Hosono, T., Iseki, T., Yamamoto, M., Igi, C., Minato, K. Effects of administration of dexamethasone to immature rats assessed behaviorally during and after growth. Neuroscience 2011 Walter E. Washington Convention Center, Washington, USA

- 11.16./2011
- (3) Nakamura, H., Koyama, S., Tabata, C., Thang, N., Takiuchi, T., Masaki, H., Tsutsui, T., Kimura, T. Development of a new drug delivery system for uterus using bionanocapsule (BNC). 第63回日本産科婦人科学会・学術講演会 大阪市 08.29/2011
- (4) Akeno H, Hosono T. Prediction of prognoses of fetuses with congenital heart diseases using fetal magnetocardiogram. The 3rd Asian Symposium on Magnetocardiography 筑波市 12.09/2010
- (5) Kimura, T., Zhang Q, Nakamura, H., Kumasawa K, Koyama, S., Tabata C, Tsutsui, T. Significance of fetomaternal interface: from implantation failure to preeclampsia in model mice. 2nd International Conference on Reproductive Immunology. Shanghai, China. 10.02/2010
- (6) Hosono, T. Prediction of fetal prognosis using indexes in time and amplitude domains of fetal magnetocardiogram. Global Congress of Maternal and Infant Health. Barcelona, Spain 09.25/2010
- (7) Kimura, T., Zhang Q, Nakamura, H., Kumasawa K, Koyama, S., Tabata C, Tsutsui, T. Bizarre expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 in fetomaternal interface caused gestational hypertension in mice model. XI International Congress of Reproductive Immunology Cairns, AUSTRALIA 08.15.-19/2010
- (8) Nakamura, H., Jasper M, Robertson S, Kimura, T. Modelling uterine macrophage-epithelial cell communication in vitro using peripheral blood monocytes. XI International Congress of Reproductive Immunology Cairns, AUSTRALIA 08.15.-19/2010
- (9) 中村仁美、細野剛良、木村正 子宮の着床能を評価するための生理的パラメーターの検索 第62回日本産科婦人科学会学術講演会 東京都 04.23-25/2010
- (10) Kimura, T. Endometrial Stat3 activation and implantation failure. IUPS Satellite Symposium on Endometrial Receptivity and Blastocyst Implantation. Inamori Hall, Kyoto University 07.25/2009
- (11) Nakamura H., Hosono T., Kimura T. Investigation of uterine parameters to evaluate uterine receptivity. IUPS Satellite Symposium on Endometrial Receptivity and Blastocyst Implantation. Inamori Hall, Kyoto University 07.25/2009
- (12) Kimura, T. Mouse model of human infertility: transient and local inhibition of endometrial STAT-3 activation results in implantation failure. 5th International Conference on the Female Reproductive Tact Frauenchiemsee, Germany 05.17/2009
- (13) Nakamura H, Jasper MJ, Aplin JD, Kimura T,

Robertson SA. Macrophage regulation of embryo adhesion molecule in human endometrial epithelial cells. 5th International Conference on the Female Reproductive Tact Frauenchiemsee, Germany 05.17/2009

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

(1)

名称: 子宮着床能の測定方法及び測定装置

発明者: 中村仁美、木村正、細野剛良

権利者: 大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2010 -260006

出願年月日: 2010. 11. 22

国内外の別: 国内

(2)

名称: 子宮着床能の測定方法、測定装置及び測定装置の作動方法

発明者: Hitomi Nakamura, Tadashi Kimura, Takayoshi Hosono

権利者: Osaka University

種類: 特許

番号: PCT/JP2011/076900

取得年月日: 2011. 11. 20

国内外の別: 国外

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

中村 仁美 (NAKAMURA HITOMI)

大阪大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号: 80467571

細野 剛良 (HOSONO TAKAYOSHI)

大阪電気通信大学・医療福祉工学科・教授

研究者番号: 60294104

筒井 建紀 (TSUTSUI TATEKI)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号: 00294075

香山 晋輔 (KOYAMA SHINSUKE)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 30528005

(3) 連携研究者

なし