

## 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25年 5月30日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791517

研究課題名（和文）着床・妊娠成立におけるアディポサイトカインの意義

研究課題名（英文）Implication of adipocytokines in implantation and establishment of pregnancy

## 研究代表者

竹村 由里（TAKEMURA YURI）

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：00453697

研究成果の概要（和文）：脂肪細胞由来の生理活性物質アディポサイトカインの異常は、子宮内膜での炎症反応の制御異常を介して着床を障害する可能性が考えられた。アディポサイトカインの1つであるアディポネクチン受容体の子宮内膜における発現は月経周期の着床期に有意に増加し、着床期子宮内膜のアディポネクチン受容体およびリン酸化 AMP キナーゼ (AMPK) の発現は不妊症患者では正常女性に比べ低下している傾向が認められ、アディポネクチンやメトホルミンによる AMPK リン酸化が着床に促進的に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The imbalance of adipocytokines, adipocyte-derived cytokines, has the potential to impair implantation and establishment of pregnancy through abnormality in the control of inflammatory response in the human endometrium. The expression of adiponectin, one of adipocytokines, receptors was increased in the endometrium in the implantation period and the expressions of adiponectin receptors and AMPK phosphorylations were decreased in the endometrium of infertile women in the implantation period compared with fertile women, suggesting that adiponectin and metformin-induced AMPK phosphorylation may play a facilitatory role in the implantation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：着床、子宮内膜、アディポサイトカイン、AMP キナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 着床現象と着床障害を解明することの重要性

子宮内膜における受精卵の着床は、一種の炎症反応と考えられており、様々な物質によ

り時間的空間的に緻密に制御されている。この炎症反応の調節障害により、着床現象が障害され不妊症を引き起こすと考えられるが、この機序は未だ明らかではない。現在、着床障害は増加傾向にあり、体外受精、顕微授精

などの生殖補助医療 (assisted reproductive technology; ART) を用いても妊娠に至らない難治性の不妊症を引き起こす点で問題となっている。少子化は我が国の存亡に関わる重大な問題であり、妊娠を望む全ての夫婦に応えるために、着床障害の解明は喫緊の課題であると考えられる。

#### (2) 内分泌器官としての脂肪とアディポサイトカイン

脂肪組織は、以前は単なるエネルギー貯蔵器官と考えられていたが、脂肪組織・細胞に関する研究がこの 10 年で飛躍的に進展し、脂肪組織は内分泌器官と認識されるようになり、脂肪細胞由来の生理活性物質をアディポサイトカインと呼ぶ新たな概念が定着した。代表的なアディポサイトカインには、TNF (tumor necrosis factor)- $\alpha$ 、レプチン、アディポネクチン (adiponectin)、レジスチン、MCP (monocyte chemoattractant protein)-1 などがある。中でも、アディポネクチンは、善玉アディポサイトカインとして注目を集めており、各分野でその作用に強い期待が寄せられている。アディポサイトカインの血中濃度は、全身の脂肪細胞の量によって決まるのではなく、脂肪細胞の合成能や分泌能、すなわち脂肪細胞機能によって決定される。

#### (3) 肥満・やせはアディポサイトカイン異常を起こすと同時に不妊となる

肥満・やせのどちらの体重異常も、生殖機能を低下させ、不妊となることが知られている。これまで、BMI (body mass index, 体格指数) は卵巣の機能に影響を与え、肥満・極度のやせでは排卵障害を起こすために不妊となると考えられてきたが、最近では体外受精症例での検討が進み、受精率や移植胚数、胚の質に大きな違いがないにも関わらず、胚移植後の妊娠率や出産率は、BMI の異常があると成績が悪くなることがわかり、BMI 異常が、子宮内の着床環境を悪化させる可能性が示唆されている。体外受精や顕微授精は、適切な卵巣刺激を施すことで、卵子の成熟や受精卵を得ることは可能にするが、子宮内の着床環境までを整えることは困難であるため、着床障害の治療にはなり得ない。肥満・やせといった代謝障害があると、アディポサイトカインの異常が起こるが、その異常が子宮内膜に影響を及ぼして着床障害を引き起こすのではないかと考えている。

#### (4) アディポネクチンおよび子宮内膜におけるアディポネクチン受容体の発現とその意義

アディポネクチンは、インスリン感受性増加等の作用を持ち、肥満・脂肪萎縮で低下するアディポサイトカインで、特異的受容体 AdipoR1 と AdipoR2 を介して、AMP キナーゼ (AMPK) を活性化し作用を発揮する。AMPK は、あらゆる真核生物の細胞に発現しており、細胞および全身のエネルギー維持に重要な調節因子である。AMPK は、インスリン感受性増加作用を持つ糖尿病治療薬メトフォルミン (metformin) の作用発現にも関わっている。アディポネクチンは、抗糖尿病作用の他に、抗炎症、抗血管新生等の様々な作用を持つことが知られている。

私達はこれまでに、ヒト子宮内膜に月経周期を通じてアディポネクチン受容体である AdipoR1・AdipoR2 が発現しており、分泌期中期すなわち着床の時期にその発現が高まること、アディポネクチン受容体が刺激されると AMPK のリン酸化を介して抗炎症などの作用を発揮し、着床期の生殖生理に関わっている可能性があることを突き止めた。すなわち、アディポネクチンの分泌が十分にあり、AMPK がリン酸化により活性化されていることが、子宮内膜にとって望ましい状態であると考えられる。

#### (5) 着床・妊娠成立におけるアディポサイトカインの意義

子宮内膜症は、生殖年齢の女性の約 10 % に発生し、月経痛や不妊症を引き起こす慢性増殖性炎症性疾患である。私達が現在行っている ART による妊娠例の妊娠予後を調べた検討で、子宮内膜症患者では前置胎盤症例が統計学的有意に増加していた。前置胎盤は、胎盤の子宮内膜での付着部位の異常であり、一種の着床障害として説明できる。すなわち、子宮内膜症患者では血中アディポネクチン濃度が低下しており、このために着床障害が惹起されている可能性がある。ヒト胎盤において、アディポネクチン受容体が存在し、アディポネクチンが局所産生されていることから、アディポネクチンが胎盤の形成に影響を及ぼしていることが示唆されている。また、私達はこれまでに、血管障害による胎盤形成不全によって主に妊娠後期に高血圧や蛋白尿を引き起こす妊娠高血圧症候群における検討でも、アディポネクチンの関与を示唆する結果を得ており、着床・妊娠成立においてアディポネクチンなどのアディポサイトカインが重要な役割を果たしているのではないかと考えている。

## 2. 研究の目的

子宮内膜への受精卵の適切な着床は、妊娠の成立・維持に必須である。着床障害は、難治性不妊症の主因であり、増加傾向にある。着床は、炎症反応を中心に、様々な物質により時間的空間的に緻密に制御されているが、未だ不明な点が多い。一方、肥満・やせのどちらの体重異常も、生殖機能を低下させ、不妊となることが知られている。肥満・やせといった代謝障害は、脂肪細胞由来の生理活性物質アディポサイトカインの産生・分泌異常を惹起し、子宮内膜での炎症反応の制御異常などを介して着床を障害することが示唆されている。本研究では、着床・妊娠成立におけるアディポサイトカインの役割を明らかにし、着床障害の機序解明と治療につなげたい。

着床、妊娠成立におけるアディポサイトカインの意義を解明し、着床障害の治療につなげることを目的として、以下の検討を行うこととした。

### (1) 子宮内膜におけるアディポサイトカインの機能についての検討

子宮内膜は、ホルモンの影響を受けながら、月経周期を通じて、ダイナミックに変動している。排卵の約1週間後にあたる分泌期中期は、受精卵が子宮内膜に着床する時期にあたり、着床期というが、この時期の受精卵と子宮内膜の炎症反応様の相互作用が着床に不可欠と考えられている。

着床におけるアディポサイトカインの役割を調べるために、子宮内膜におけるアディポサイトカイン受容体の生理的発現変化、不妊の有無による発現の違いを検討する。

### (2) 子宮内膜におけるメトフォルミンの着床障害改善作用に関する検討

AMPKは、エネルギー維持の調節因子であるとともに炎症反応の調節作用も持つ。私達のこれまでの研究で、子宮内膜にアディポネクチンやエストロゲンを投与するとAMPKのリン酸化を認めることから、着床期の子宮内膜のエネルギー維持や炎症反応の調節にはAMPKが関与していると考えた。メトフォルミンは、インスリン抵抗性改善作用を持つ副作用の少ない糖尿病治療薬で現在広く使用されており、AMPKを介して作用し、インスリン抵抗性改善作用の他に、抗炎症作用や癌抑制効果、ステロイド合成調節作用を持つことが報告されている。多嚢胞性卵巣症候群での治療実績から、メトフォルミンは、血清CRP値を低下させ炎症を抑制すること、妊娠中の服

用で催奇形性がないことがわかっており、不妊症女性に対して安全に使用できる薬剤である。

子宮内膜細胞の初代培養系を用いて、メトフォルミンがAMPK発現・リン酸化を介して着床にどのように影響するかを検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 子宮内膜におけるアディポサイトカインの機能についての検討

着床におけるアディポサイトカインの役割を調べるために、子宮内膜組織におけるアディポネクチンのリガンドと受容体の月経周期における発現変化、特に着床期における発現を検討した。不妊女性と正常女性での発現比較も行った。アディポサイトカインが着床に関与しているとする、着床期の発現が不妊女性と正常女性で異なるのではないかと推察され、それを検証するための実験である。

#### ① 子宮内膜におけるアディポサイトカインおよびアディポサイトカイン受容体の生理的発現変化に関する検討

良性婦人科疾患のために手術を受ける患者より書面によるインフォームドコンセントを得た上で、子宮内膜組織を採取した。採取した各種月経周期の子宮内膜組織に対して、抗体を用いて、アディポサイトカインのリガンドと受容体の発現を免疫組織化学染色法で検討した。

#### ② 不妊症の有無による子宮内膜のアディポサイトカインおよびアディポサイトカイン受容体の発現の差異に関する検討

同様に採取した子宮内膜組織に対して、抗体を用いて、アディポサイトカインのリガンドと受容体の発現を免疫組織化学染色法で検討し、不妊症の有無で比較した。

### (2) 子宮内膜におけるメトフォルミンの着床障害改善作用に関する検討

子宮内膜組織および子宮内膜細胞の初代培養系を用いて、メトフォルミンがAMPKの発現およびリン酸化を介して着床にどのように影響するかを検討した。子宮内膜細胞にメトフォルミンを投与しAMPKの発現およびリン酸化を調べた。

#### ① メトフォルミンによる子宮内膜細胞におけるAMPKのリン酸化の検討

子宮内膜組織より子宮内膜上皮細胞・間質細胞を分離培養した。得られた子宮内膜細胞に種々の濃度および時間でメトフォルミンを添加し、AMPKの発現およびリン酸化を

Western blot 法を用いて調べ検証した。

② 不妊症の有無による子宮内膜組織における AMPK の発現の差異に関する検討

子宮内膜組織に対して、AMPK抗体およびリン酸化AMPK抗体を用いて、AMPKおよびリン酸化AMPKの発現を免疫組織化学染色法で検討し、不妊症の有無で比較した。AMPKのリン酸化が着床に関与しているとする、着床期子宮内膜のリン酸化AMPKの発現は不妊症患者では正常女性に比べ低下するのではないかと推察され、それを検証するための実験である。

#### 4. 研究成果

子宮内膜への受精卵の着床は、妊娠の成立・維持の第一歩である。体外受精、顕微授精などの高度生殖補助医療を用いても妊娠に至らない難治性不妊症の原因となる着床障害は、解明すべき喫緊の課題である。着床は、炎症反応を中心に様々な物質により時間的・空間的に緻密に制御されており、肥満・やせのどちらの体重異常も生殖機能を低下させ不妊となる。肥満・やせといった代謝障害は、脂肪細胞由来の生理活性物質であるアディポサイトカインの産生・分泌異常を惹起し、子宮内膜での炎症反応の制御異常などを介して着床を障害することが示唆されている。メトフォルミンは、アディポサイトカインの1つであるアディポネクチンと同様にAMPKを介して作用する糖尿病治療薬で、インスリン抵抗性改善作用の他に、抗炎症作用や癌抑制効果、ステロイド合成調節作用を持つ。本研究では、着床・妊娠成立におけるアディポサイトカインの役割とメトフォルミンの作用を明らかにし、着床障害の機序解明と治療につなげたい。

(1) 子宮内膜におけるアディポサイトカインの機能についての検討

着床におけるアディポサイトカインの役割を調べるために、良性婦人科疾患のために手術を受ける患者より書面によるインフォームドコンセントを得た上で、子宮内膜組織を採取し、子宮内膜におけるアディポサイトカイン受容体の生理的発現変化、不妊の有無による発現の違いを検討した。

① 子宮内膜におけるアディポサイトカインの月経周期を通じた発現変化についての検討

採取した各種月経周期の子宮内膜組織に対して、アディポサイトカインのリガンドと受容体の抗体を用いて、それらの発現を免疫組織化学染色法で検討した。アディポネクチン受容体の発現は月経周期の分泌期中期す

なわち着床の時期に有意に増加しており、アディポネクチンが着床を促進する方向に作用している可能性が示唆された。

② 不妊症の有無による子宮内膜のアディポサイトカインおよびアディポサイトカイン受容体の発現の差異についての検討

同様にして採取した子宮内膜組織に対して、アディポサイトカインのリガンドと受容体の抗体を用いて、それらの発現を免疫組織化学染色法で検討し、不妊症の有無で比較した。不妊症例の検体が少なく有意な発現の差異は得られていないが、不妊症例ではアディポネクチン受容体の発現が低下している傾向を認めた。

(2) 子宮内膜におけるメトフォルミンの着床障害改善作用に関する検討

子宮内膜におけるメトフォルミンの着床障害改善作用について調べるために、子宮内膜組織および細胞を用いて、メトフォルミンが AMPK の発現およびリン酸化を介して着床にどのように影響するかを検討した。

① 子宮内膜におけるメトフォルミンの AMPK リン酸化の検討

子宮内膜組織より子宮内膜上皮細胞・間質細胞を分離培養し、得られた細胞にメトフォルミンを添加し、AMPK の発現およびリン酸化を Western blot 法を用いて確認したところ、月経周期のいずれにおいてもメトフォルミンによる AMPK のリン酸化を認めた。

② 不妊症の有無による子宮内膜のリン酸化 AMPK の差異についての検討

不妊症の有無による AMPK の発現の差異を調べるために、子宮内膜組織に対して、AMPK 抗体およびリン酸化 AMPK 抗体を用いて、AMPK およびリン酸化 AMPK の発現を免疫組織化学染色法で検討し、不妊症の有無で比較した。着床期子宮内膜のリン酸化 AMPK の発現は不妊症患者では正常女性に比べ低下している傾向が認められ、AMPK のリン酸化が着床に促進的に関与している可能性が示唆された。

ヒト子宮内膜におけるアディポサイトカインの機能の検討を行っているのは、世界で私達だけである。アディポサイトカインは、着床における子宮内膜機能解明へ向けた新しい着眼点であり、着床とアディポサイトカインの関係が明らかになれば、着床障害による不妊症に対する新たな治療戦略につながると考える。着床障害は既存の不妊治療では打開できていないため、メトフォルミンを着床障害改善薬として臨床応用することができれば、その需要は計り知れないと考える。

## 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9件)

- ① 竹村由里、若手の最新研究紹介コーナー、産科と婦人科、査読無、80、2013、376-378
- ② Takemura Y, Osuga Y, et al. Increased risk of placenta previa is associated with endometriosis and tubal factor infertility in assisted reproductive technology pregnancy. Gynecol Endocrinol 査読有 2013;29:113-115 DOI: 10.3109/09513590.2012.706669
- ③ 竹村由里、大須賀穰、アディポネクチン／AdipoR と子宮内膜および子宮内膜症、治療学、査読無、44、2010、1255-1259

[学会発表] (計10件)

- ① Yuri Takemura, Akihisa Fujimoto, Yutaka Osuga, et al. Endometriosis and risk of placenta previa in pregnancies after assisted reproductive technology. ESHRE 2010, 26th Annual Meeting, June 27-30, 2010, Rome, Italy

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹村 由里 (TAKEMURA YURI)  
帝京大学・医学部・助教  
研究者番号：00453697

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

大須賀 穰 (OSUGA YUTAKA)  
東京大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：80260496