

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390389

研究課題名(和文) 胚特異的糖鎖抗原を介した母体の胚認識および胚着床・胎盤形成誘導機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of maternal recognition through embryo-specific sugar antigen and its inducing mechanisms for embryo implantation and placentation

研究代表者

藤原 浩 (Fujiwara, Hiroshi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：30252456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は透明帯の分解産物が胚特異的な糖鎖構造を介して母体に胚存在の情報を伝達する仮説に基づき計画された。具体的には、透明帯の免疫細胞に対する作用および傍大動脈リンパ節への伝達様式を検討し、さらに末梢血免疫細胞と血小板の子宮内膜とtrophoblastへの作用およびlaeverinの免疫細胞への作用を解析した。その結果、マウス透明帯で活性化する細胞群が観察され、またlaeverinが妊娠初期から分泌されること、さらにHLA-Gとともに胚の免疫寛容獲得に関与している可能性が示され、laeverinが子宮組織に浸潤していく絨毛外栄養膜細胞からの新規の胚シグナルであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This project was based on the hypothesis that embryo transmits the information of their presence to maternal immune system using degenerated products of zona pellucida (Dp-ZP). In this study, we examined the effects of Dp-ZP on immune cell function and the transmitting system to para-aortic lymph nodes, and the effects of peripheral immune cells, platelets and laeverin on endometrial and trophoblast functions. As results, we found that murine zona pellucida could activate immune cells. In addition, we observed that laeverin was secreted from chorionic villi at very early stage, showing the possibility that it is related with induction of immune tolerance in concert with HLA-G. These findings suggest that laeverin is a novel embryonic signal secreted from extravillous trophoblast that invades the uterus.

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：糖鎖抗原 胚認識 胚着床 胎盤形成 免疫細胞

1. 研究開始当初の背景

哺乳類はその生殖戦略として子宮内で胎児を发育させる方法を選択したが、この母体への寄生とも言える現象を可能とするために、子宮内膜への胚侵入や胎盤の形成に至る一連の母体組織の再構築が必要となった。特に子宮内膜上皮細胞への胚の接着は必須の現象であり、一般に胚着床が可能な子宮内膜への分化には卵巣由来の性ステロイドが重要とされている。またヒト胚はひとたび子宮内膜上皮に接着した後にその浸潤能を亢進して子宮内膜間質内に埋没・侵入し、さらに胚由来の絨毛外栄養膜細胞 (extravillous trophoblast, EVT) が母体脱落膜組織へ侵入して母体の子宮内動脈の筋層と内皮を置換しながらこれを再構築するが、これら一連の組織再構築機序の詳細は未だに不明のままである。

一方で、妊娠が成立すれば排卵後に形成された黄体はさらに妊娠黄体へと変化し、プロゲステロン分泌を継続して胚の着床を維持するが、そのためには胚の存在の情報が黄体へ正確に伝達される必要がある。ヒトではその主役は HCG とされているものの、HCG のみでは妊娠黄体の維持機構が説明できないことが以前から指摘されてきた。しかしながら他の液性因子は同定されず、ヒト妊娠黄体の維持機構はミステリアスなテーマとして放置されていた。

このような背景のもとで本研究従事者らは発想を転換して血液中の細胞成分に着目し、末梢血中の免疫細胞が胚-母体間の相互応答に重要な役割を演じている可能性を提示した。またマウスの着床実験で免疫細胞が子宮内膜の分化を促進して胚を受け入れられる段階に誘導させることを明らかにした。さらにヒトにおいて *in vitro* で末梢血免疫細胞が子宮内膜の着床能を促進すること、HCG が免疫細胞の着床促進作用を増強することを見だし、これらの成果に基づいて体外受精治療にて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て臨床妊娠率を向上させることに成功した。以上より胚がまだ卵管内に存在する時より免疫細胞は妊娠成立の情報を既に認識しており、黄体や子宮などの遠隔臓器にその情報を伝達し、胚着床成立・維持に積極的に関与するという新しい概念が導き出された。

また本研究従事者らは HCG が単球からの IL-8 などの chemokine の産生を LH/HCG 受容体を介してではなく糖鎖受容体を介して亢進すること、その結果、絨毛外栄養膜細胞 (EVT) の浸潤を誘導することを明らかにし、HCG は LH/HCG 受容体を介した内分泌機構のみならず、糖鎖受容体を介して免疫細胞からも妊娠に有利な反応を引き出せるようになったより進化したホルモンであることを見いだした。これ

らの新しい知見は最近になってその重要性が認識されて来た。

一般に子宮内膜は異生物の侵入を排除する。したがって母体が胚着床を誘導するためには、自己でない同種の個体「胚」が卵管内で発生している段階から子宮内膜を胚の侵入を受け入れられる状態に変化させる必要がある。これまでどのようにして着床前の胚を母体が正確に認識できるのかは不明であったが、本研究従事者らは精子が同種の卵を認識する際に key となる透明帯に着目し、受精から胚発生で放出される透明帯の分解産物が免疫系を介して母体への胚シグナルとなるという発想に至り、これを新しい仮説として提示した。

2. 研究の目的

以上の研究成果に基づいて胚の寄生成立の過程を見直すと、母体は trophoblast を免疫的に寛容状態として扱うのみならず、1) 非自己であるが同種の個体であることを認識し、2) さらに正常に発生しつつある胚由来の細胞であることも確認し、3) その上で trophoblast と協調して母体組織の再構築を完遂しているとの発想に至った。免疫寛容に関しては HLA-G の役割が解明されつつあるが、正常に発生しつつあるヒト胚由来の細胞であることを積極的に母体に伝達する方法は HCG 以外は明らかにされておらず、その全容は解明されていない。そこで本研究はこの課題を新たな視点から解決することを目的として計画された。

一方で、これまでに、1) 透明帯や HCG には胚特異的な糖鎖構造が存在して免疫系にシグナルを伝達する可能性がある、2) 免疫系と内分泌系が協調して相互応答に関与している、3) 末梢循環系の細胞成分が胚-母体間の相互応答に関与している、4) 卵管・子宮底部から下腸管膜動脈リンパ節群への情報伝達経路がヒトで存在する、5) 本研究者が同定した laeverin は EVT から特異的に分泌される糖蛋白であり *in vitro* で免疫細胞の選択的な増殖と apoptosis を誘導する、6) 膜結合型 laeverin は血管内皮系幹細胞の新しいマーカーの可能性があり、等の情報を得ている。そこで本研究ではこれらの advantage を生かし3年間で以下の5項目を明らかにすることを目標に挙げた。(I) 透明帯および HCG の糖鎖の免疫細胞に対する作用を明らかにする。(II) 卵管・子宮底部から傍大動脈リンパ節への免疫シグナル伝達様式を明らかにする。(III) 末梢血免疫細胞と血小板の子宮内膜分化と trophoblast の浸潤への作用を明らかにする。(IV) EVT から特異的に分泌される糖蛋白 laeverin の免疫細胞への作用を明らかにする。(V) これらの項目を解析した結果を用いて、1) 透明帯や血小板を利用した着床不全の治療法、2) 習慣流産の診断と治療法、3) 胎盤形成不全の早期診断と治療法の開発など、臨床応用可能なプロトコルを検討して

最終年度にはそれを提言することを目標とした。

3. 研究の方法

まず初年度は GFP 導入マウスを用いて胚を認識する免疫細胞を同定し、ロゼット形成を阻害する抗透明帯機能抗体を作成する。また免疫細胞および血小板の子宮内膜上皮細胞や trophoblast への作用機構を遺伝子発現の視点から解析する。一方で r-laeverin を用いて新たな抗体を作成して分泌型 laeverin の測定系を確立し、laeverin のヒト免疫細胞に対する作用機序を解析する。またこの抗体を用いて laeverin 陽性の幹細胞を同定し、同時進行でノックアウトマウス遺伝子 construct を作成する。次年度以降はヒトの傍大動脈リンパ節細胞と透明帯を感作した dendritic 細胞を用いて免疫細胞間情報伝達の機能実験をおこなう。また抗透明帯機能抗体を免疫疾患マウスに投与して不妊症や自己免疫疾患治療への応用の可能性を検討し、抗体が認識する糖鎖部位を同定して糖鎖の構造解析を行う。一方で遺伝子導入マウスをかけあわせて laeverin のノックアウトマウスを作成し、その表現型の解析をおこなう。また同時に産科疾患患者の血清値を測定して、最終年度末にはこれらの知見をまとめて産婦人科疾患の診断法と治療法の開発の検討を行なう。

本研究の遂行においては遺伝子解析、蛋白解析、糖鎖解析、ノックアウトマウス作成など、各専門分野の高度な技術と知識が必要のため、それぞれの専門家を研究計画に加えた。具体的には研究分担者の河崎が血液幹細胞の分離・培養、cell sorting を、服部が laeverin 蛋白の機能解析を、荒木が卵管機能と免疫細胞の糖鎖機能解析とノックアウトマウスの作成を、さらに金沢大学の京と高倉が不死化細胞作成などの遺伝子解析および導入実験を担当した。また受精に関わる透明帯抗原に関しては千葉大学大学院医学研究院形態形成学の年森 清隆教授に、EPF のアッセイに関しては岩手大学動物医科系の松原 和衛准教授にアドバイスをいただいた。なお産婦人科臨床は研究代表者の藤原が不妊治療一般を担当し、実験領域はヒト PBMC の培養実験さらに単クローン抗体作成、黄体細胞と子宮内膜細胞の機能実験、マウスの飼育と胚の採取、胚着床実験を研究協力者の大学院生および研究支援者の補助のもとに藤原と佐藤が遂行した。

4. 研究成果

これらの研究の成果として、マウス透明帯を免疫細胞に作用させた場合に dendritic cell および T cell の中に活性化する細胞群が観察され、その作用に透明帯の糖鎖構造が関係する可能性が示された。また laeverin が様々な糖鎖構造を有する糖タンパクであり、妊娠の極めて初期の段階から分泌されていること、さらに dendritic cell の分化を

誘導し、HLA-G とともに胚の免疫寛容誘導にも関与している可能性が新たに示された。これらの知見は laeverin が母体組織に浸潤していく絨毛外栄養膜細胞からの新規の胚シグナルであることを示唆しており、生殖生理学的見地から重要な発見と位置づけられる。さらに透明帯の免疫細胞に対する作用および傍大動脈リンパ節への免疫シグナル伝達様式を明らかにし、laeverin の免疫細胞への作用を解析することにより、透明帯を利用した着床不全の治療法や胎盤形成不全の早期診断と治療法の開発に貢献できることが期待される。

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 14 件)

1. Zhang X, Kyo S, Nakamura M, Mizumoto Y, Maida Y, Bono Y, Takakura M, Fujiwara H. Imatinib sensitizes endometrial cancer cells to cisplatin by targeting CD117-positive growth-competent cells. *Cancer Lett*. 査読有 345:106-14, 2014.
2. Fujiwara H*, Nishioka Y, Matsumoto, H Suginami K, Horie A, Tani H, Matsumura N, Baba T, Sato Y, Araki Y, Konishi I: Eph-ephrin A system regulates human choriocarcinoma-derived JEG-3 cell invasion. *Int J Gynecol Cancer*. 査読有 23,576-82:IS, 2013.
3. Yoshitake H, Yokoi H, Ishikawa H, Maruyama M, Endo S, Nojima M, Yoshida K, Yoshikawa H, Suzuki F, Takamori K, Fujiwara H, Araki Y*: Overexpression of TEX101, a potential novel cancer marker, in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biomarkers* 査読有 2:141-8. 2012-2013.
4. Taki M, Sato Y*, Kakui K, Tatsumi K, Fujiwara H, Konishi I: Management of fetal death with placenta previa. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 査読有 25:196-9, 2012.
5. Tanaka S, Ueno T*, Sato F, Chigusa Y, Kawaguchi-Sakita N, Kawashima M, Fujisawa N, Yoshimura K, Teramukai S, Fujiwara H, Fujita M, Toi M: Alterations of circulating

- endothelial cell and endothelial progenitor cell counts around the ovulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 査読有 97:4182-92, 2012.
6. Horie A, Fujiwara H*, Sato Y, Suginami K, Matsumoto H, Maruyama M, Konishi I, Hattori A: Laeverin/aminopeptidase Q induces trophoblast invasion during human early placentation. *Hum Reprod.* 査読有 27:1267-76, 2012.
 7. Fujii H, Fujiwara H*, Horie A, Suginami K, Sato Y, Konishi I: EphrinA1 stimulates cell attachment and inhibits cell aggregation through the EphA receptor pathway in human endometrial carcinoma-derived Ishikawa cells. *Hum Reprod.* 査読有 26:1163-7, 2011.
 8. Fujii 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.* 査読有 26:299-306, 2011.
 9. Okitsu O*, Kiyokawa M, Oda T, Miyake K, Sato Y, Fujiwara H: Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells increases clinical pregnancy rates in frozen/thawed embryo transfer cycles of patients with repeated implantation failure. *J Reprod Immunol.* 査読有 92: 82-7, 2011.
 10. Kitahara T, Sato Y*, Kakui K, Tatsumi K, Fujiwara H, Konishi I: Management of retained products of conception with marked vascularity. *J Gynecol Obstet Res.* 査読有 37:458-64, 2011.
 11. Hosono K, Matsumura N*, Matsuda N, Fujiwara H, Sato Y, Konishi I: A case of successful recovery from delayed amniotic fluid embolism with prolonged cardiac resuscitation. *J Gynecol Obstet Res.* 査読有 37:1122-5, 2011.
 12. Izumi Y, Sato Y*, Kakui K, Tatsumi K, Fujiwara H, Konishi I: Prenatal treatment of meconium peritonitis with urinary trypsin inhibitor. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 査読有 37:366-8, 2011.
 13. Sumi A, Sato Y*, Kakui K, Tatsumi K, Fujiwara H, Konishi I: Prenatal diagnosis of anterior sacral meningocele. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 査読有 37:493-6, 2011.
 14. Sato Y*, Izumi Y, Minegishi K, Komada M, Yamada S, Kakui K, Tatsumi K, Mikami Y, Fujiwara H, Konishi I: Prenatal findings in congenital leukemia: a case report. *Fetal Diagn Ther.* 査読有 29:325-30, 2011.
- 〔学会発表〕(計 23 件)
1. 藤原 浩:
京都産婦人科医会期末特別講演会
2014.3.29 (京都)
「骨盤腔の開放と後腹膜腔の展開を再考する-生殖機能の再建を目指して-」
(特別講演)
 2. 藤原 浩:
石川県第 3 回周産期医療研修会
2014.1.16 (金沢)
「ヒト胎盤形成機構
-妊娠初期に何が起きているのか-」
(特別講演)
 3. 藤原 浩:
第 149 回和歌山市産婦人科部会研修
2014.1.11 (和歌山)
「骨盤腹膜の展開を再考する -受精と着床の場(胚のオアシス)の再建を目指して-」
(特別講演)
 4. 藤原 浩:
第 58 回日本生殖医学会学術講演会
2013.11.16 (神戸)
シンポジウム 8 Modern ART 不成功例不妊カップルに対するトータルケア
「着床障害への対応」
(シンポジウム)
 5. 藤原 浩:
関東連合産科婦人科学会総会・学術集会
2013.10.27 (浜松)
ワークショップ 2
「生殖医療: ベットサイド・ベンチサイド」
基礎から臨床への応用 -内分泌・免疫・神経系ネットワークによる胚着床誘導機構-

(ワークショップ)

6. 藤原 浩:
埼玉県産婦人科医会手術・感染症研究会
2013.9.21 (浦和)
「骨盤後腹膜腔の開放を再考する-受精と着床の場 (オアシス) の機能再建-」
(特別講演)
7. 藤原 浩:
京都・金沢 STI エキスパートミーティング 2013.6.28 (金沢)
「母体による胚の認識機構-胚の寄生と感染症は表裏一体か-」
(特別講演)
8. 藤原 浩:
第 41 回北陸産科婦人科学会学術講演会
2013.6.8 (新潟)
「乳癌患者の卵巣機能に関する諸問題」
(特別講演)
9. 藤原 浩:
ナースのための ART 医学セミナー2013年 2013.5.26 (東京)
「着床をめぐるトピックス」
(教育講演)
10. 藤原 浩:
第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会
2013.5.10 (札幌)
クリニカルカンファレンス2 (生殖)
難治性不妊と治療 1) 生理学的見地から
11. Fujiwara H, Nishioka Y, Matsumoto H, Suginami K, Horie A, Tani H, Matsumura N, Baba T, Sato Y, Araki Y, Konishi I: Eph-ephrin A system is a new candidate to regulate choriocarcinoma invasion.
IGCS Regional Meeting on Gynecologic Cancers
2013. April 11-13, Bali Indonesia
12. 藤原 浩:
平成 24 年度 日本家畜臨床感染症研究会 2012.12.7 (福岡)
「母体による胚認識機構」
(教育講演)
13. 藤原 浩:
第 30 回日本受精着床学会学術講演会
2012.8.30 (大阪)
ART 基礎シリーズ講義 (3)
「初期発生から着床」
(教育講演)
14. Fujiwara H:
Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells improves implantation rates.
4th Japan-Korea ART conference 2012
2012.3.23. Osaka, Japan (Invited Lecture)
15. 藤原 浩:
平成 23 年度 日本獣医師会獣医学術学会年次大会
シンポジウム「胚の死滅による妊娠喪失」
「自己免疫細胞を用いた不妊治療 -着床期胚の生存を高める試み-」2012.2.3 (札幌)
(シンポジウム)
16. 藤原 浩:
第 11 回東海不妊内分泌研究会
母体循環系の細胞成分を介した新しい胚の着床誘導機構 2012.1.28 (静岡)
17. 藤原 浩:
第 17 回日本臨床エンブリオロジスト学会ワークショップ・学術講演会
教育講演「ヒト胚着床機構の概要と新しい知見」2012.1.8 (京都)
(教育講演)
18. 藤原 浩:
第 56 回日本生殖医学会学術講演会
シンポジウム 2 「免疫細胞による着床誘導機構」2011.12.8 (横浜)
(シンポジウム)
19. Fujiwara H:
Novel local regulatory mechanisms for human embryo attachment and invasion. The 4th International Conference of Repeated Implantation Failure
2011.11.12. Guangzhou, China (Special Lecture)
20. 藤原 浩:
第 125 回近畿産科婦人科学会学術集会
教育講演「着床不全の基礎と臨床」
2011.11.6 (大阪)
(教育講演)
21. 藤原 浩:
第 104 回日本繁殖生物学会大会
「内分泌-免疫系を介した胚シグナルによる着床誘導機構」2011.9.14 (盛岡)
(招請講演)
22. Fujiwara H:
Improvement of implantation rates using autologous peripheral blood mononuclear cells.

16th World Congress on In Vitro Fertilization
2011.9.12. Tokyo, Japan (Invited Lecture)

23. Fujiwara H :
Circulating immune cells can promote embryo
implantation. 31th Annual Meeting of The
American Society for Reproductive Immunology
2011.5.20. Salt Lake City, U.S.A. (Invited
Lecture)

〔図書〕(計 3 件)

1. Fujiwara H*, Sato Y, Ideta A, Aoyagi Y, Araki Y,
Imakawa K: 'Immune regulation of human
embryo implantation by circulating blood cells'
The Human Embryo Ed. Yamada S. In Tech,
Chapter 4, 61-72, 2012.
2. 藤原 浩:「卵子学」森 崇英 編
京都大学学術出版会、第 15 章 月経周
期の調節「黄体機能の内分泌・免疫調節」
699-709, 2011
3. 藤原 浩:「卵子学」森 崇英 編
京都大学学術出版会、第 22 章 卵子関
連卵巣腫瘍「胚細胞の形質維持転写因子
と胚細胞腫瘍」1112-1117, 2011

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤原 浩 (FUJIWARA, Hiroshi)
金沢大学・医学系・教授

研究者番号：30252456

(2)研究分担者

今川 和彦 (IMAGAWA, Kazuhiko)
東京大学・農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：00291956

佐藤 幸保 (SATO, Yukiyasu)
京都大学・医学(系)研究科(研究院)・
助教
研究者番号：00508236

西 英一郎 (NISHI, Eiichiro)
京都大学・医学(系)研究科(研究院)・
准教授
研究者番号：30362528

藤田 潤 (FUJITA, Jun)
京都大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号：50173430

服部 明 (HATTORI, Akira)
京都大学・薬学研究科(研究院)・准教授
研究者番号：50300893

荒木 慶彦 (ARAKI, Yoshihiko)
順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・
准教授
研究者番号：70250933

(3)連携研究者

()

研究者番号：