

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592413

研究課題名(和文) 子宮腔内液性因子に注目した着床不全の病態解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Development of treatment and pathogenesis of implantation failure with a focus on the uterine cavity humoral factor

研究代表者

井上 治 (Osamu, Inoue)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10464976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、子宮腔内のCD9に注目し、CD9の子宮内膜における役割を明らかにすることを目的とした。

卵におけるCD9発現のみをレスキューしたトランスジェニックマウス(CD9-/-TG)では、分娩後の子宮内膜は上皮で覆われておらず、広範な癒着が認められた。子宮腔液の液性因子を測定したところ、野生型マウスと比較しCD9-/-TGではVEGFが減少しており、CD9欠損はVEGF産生に障害を及ぼす可能性が考えられた。そこでCD9-/-TGの子宮腔にVEGFを投与すると、子宮内膜の再上皮化が観察され、CD9は子宮内膜上皮細胞からのVEGFの分泌に寄与し、子宮内膜修復過程に重要な役割を働いていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：CD9 is a 24-kD membrane protein, which is localized on endosomes and exosomes as well as cell membranes. Cd9-deficient mouse eggs are unable to fuse with sperm. In this study, we intended that we focused on CD9 of the uterine cavity, and to clarify the role of CD9 in the endometrium. In transgenic mice that were rescued only CD9 expression in the zona pellucida (CD9-/-TG), endometrium of postpartum were not covered with the epithelium, were found extensive adhesions. After measurement of the humoral factors of the uterus cavity fluid, VEGF was decreased in CD9-/-TG compared with wild-type mice, so it was thought that loss of CD9 might interfere with VEGF production. When VEGF was injected in the uterine cavity of CD9 knockout mice, the endometrium was re-epithelialization. CD9 contributed to secretion of VEGF from endometrial epithelial cells, and these results provided the first evidence that CD9-mediated VEGF secretion plays a role in re-epithelialization of 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：CD9 子宮腔 子宮内膜 液性因子 MMP 不妊症 着床不全 炎症

1. 研究開始当初の背景

本邦では少子化が深刻な社会問題となり、生殖補助医療の果たす役割が益々大きくなっている。生殖補助医療による妊娠率改善のためには、良好な胚を繰り返し移植しているにもかかわらず着床に至らない、反復着床不全の症例に対する病態解明と検査・治療法の開発が急務である。浜谷らは胚性着床因子の網羅的解析を行い、HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor) が子宮内膜から分泌されるだけでなく、胚盤胞からも提示されることが着床に重要であることを見出した (Hamatani T, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004)。しかし、多くの反復着床不全症例で胚に原因はなく、子宮の受容性あるいは胚と子宮のクロストークの異常によるものと推測されている。

着床期子宮腔内に存在する液性因子の検討としては、Ledeé-Bataille らが子宮腔内洗浄液における TNF (tumour necrosis factor) と LIF (leukemia inhibitory factor) に関する検討で、LIF 濃度の低い方が妊娠率は高いと報告している (Lédée-Bataille N, et al. Hum Reprod 2007)。また、稲垣らは子宮腔内の各種サイトカイン濃度と MMPs 活性について調べ、反復着床不全患者においては IL-1beta 濃度と MMP-2, MMP-9 の活性が高いことを報告した (Inagaki N, et al. Hum Reprod. 2003)。その後、zymography を用いて MMPs の活性を半定量スコアリングすることで、着床環境のバイオマーカーとなる可能性が示唆されている (Inagaki N, et al. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2003)。

CD9 は細胞膜を 4 回貫通するという特異な構造を持つ tetraspanin family に属するタンパクであるが、身体中に非常に広汎に発現しており、細胞の接着、増殖、分化など様々な機能に関わっている。生殖の分野においても、CD9 欠損雌マウスが不妊となることより、CD9 が妊娠にも必須のタンパクであることが明らかになった (Miyado K, et al. Science. 2000)。その後、宮戸らのさらなる検討で、正常な野生型雄マウスの精子を用いても CD9

欠損雌マウスの卵との間では受精が起こらないこと、すなわち未受精卵から分泌顆粒として放出される CD9 の作用を欠くと、精子は透明帯を通過できても卵細胞膜に融合できないことが示された (Miyado K, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008)。

また、マウスを用いた Liu らの報告では、CD9 は *in vitro* で胚発育を促進するものの、*in vivo* では胚の着床を阻害することが示唆された。さらに、着床の過程で胚盤胞を取り囲む脱落膜細胞に、CD9 の著明な集積が認められている (Liu WM, et al. J Mol Endocrinol. 2006)。このように、妊娠の成立、特に着床も CD9 の関与が示唆されるため、本研究では、子宮内膜より分泌されると考えられる CD9 を着床環境のバイオマーカーの候補として選択した。実際に既に行った基礎実験では、マウスおよびヒトの子宮内膜に CD9 が発現していることが示され、子宮腔内洗浄液中にも着床期子宮腔内に CD9 が存在することがウェスタンブロットにより確認されていた。

2. 研究の目的

本研究は、着床期の子宮腔内に存在する液性因子に注目して、着床不全の病態解明・治療に新たな可能性を見出すことにより、生殖補助医療の発展に寄与することを目的とする。子宮内洗浄液を用いて子宮の着床能を評価する試みは全く新しいものであり、着床環境のバイオマーカーの発見と非侵襲的で低コストである検査の開発に繋がると期待される。本研究では、子宮腔内の CD9 に注目し、着床環境バイオマーカーとしての有用性と、着床に関わる分子機構について検討する。

3. 研究の方法

CD9 ノックアウトマウスに、透明帯 Zp3 プロモーター下に CD9 配列を組み込んだ transgene を入れて、卵における CD9 発現のみをレスキューしたトランスジェニックマウス (CD9^{-/-}-TG) を作成した。CD9^{-/-}-TG では、卵細胞以外の組織における CD9 発現は欠損し

たままである。CD9-/-TG と野生型雄マウスを交配させると1回目の分娩は問題なく、産仔も順調に発育し、異常を認めなかった。しかし、1回目の分娩を終えた後、それ以降の妊娠が障害されることがわかった。そこで、野生型と CD9-/-TG マウスの分娩後子宮内膜について組織学的に比較検討した。また、マウス正常子宮内膜における CD9 の存在を確認するために、内膜の免疫染色・免疫電顕、さらに内腔液のイムノプロットングを行った。ヒトでも同様に着床期子宮腔洗浄液についてイムノプロットングを行い、CD9 の存在を確認するとともに、子宮内腔洗浄液中の CD9 の有無と患者背景の関連について検討した。次に、マウス子宮 CD9 に協調して働く液性因子を見出すために、野生型と CD9-/-TG マウスの子宮内腔液に含まれる液性因子について multiplex suspension array を用いて網羅的に検討した。

4 . 研究成果

CD9-/-TG マウスでは、分娩後に子宮内膜の再生が障害され上皮で覆われないため、子宮内腔に広範な癒着が認められた。そのため、CD9 は子宮内膜上皮の修復に重要であると考えられた。次にマウス子宮内膜の免疫染色では CD9 の上皮に限局した発現が認められたが、子宮内腔側表面には発現しておらず、一方で子宮内腔液のイムノプロットングにて CD9 の存在が確認された。免疫電顕では子宮内膜微絨毛周囲の分泌顆粒に CD9 が認められた。CD9 は子宮内膜上皮表面で機能するのではなく、内腔に分泌されて機能することが示唆された。また、ヒトにおいても子宮内腔洗浄液より CD9 が確認されたが、CD9 が確認できない症例もみられた。D&C 既往、内膜菲薄化、反復着床不全のある症例で、CD9 が陰性化していた。次にマウス子宮内腔液について multiplex suspension array で網羅的に液性因子を測定したところ、CD9-/-TG マウスにおいて G-CSF と VEGF に著明な低

下を認めた。野生型マウスの子宮内腔液を抗 CD9 抗体で免疫沈降したところ VEGF が高濃度に含まれ、CD9 と VEGF に相互作用が示唆され、CD9 が VEGF の分泌に寄与している可能性が考えられた。そこで、CD9-/-TG マウスの分娩後子宮内腔に VEGF 投与したところ、再上皮化が観察され、子宮内膜の修復障害が VEGF によりレスキューされた。

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 6 件)

- (1) Kawano N, Miyado K, Yoshii N, Kanai S, Saito H, Miyado M, Inagaki N, Odawara Y, Hamatani T, Umezawa A. Absence of CD9 reduces endometrial VEGF secretion and impairs uterine repair after parturition. *Sci Rep* 2014;4:4701. doi: 10.1038/srep04701 査読有り
- (2) Sugawara K, Hamatani T, Yamada M, Ogawa S, Kamijo S, Kuji N, Akutsu H, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A. Derivation of human decidua-like cells from amnion and menstrual blood. *Sci Rep* 2014; 4: 4599. doi: 10.1038/srep04599 査読有り
- (3) Okumura N, Akutsu H, Sugawara T, Miura T, Takezawa Y, Hosoda A, Yoshida K, Ichida JK, Yamada M, Hamatani T, Kuji N, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A. β -Catenin functions pleiotropically in differentiation and tumorigenesis in mouse embryo-derived stem cells. *Plos One* 8(5):e63265, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0063265 査読あり

- (4) Yoshii N, Hamatani T, Inagaki N, Hosaka T, Machiya R, Inoue O, Yoshimura Y, Odawara Y. Successful Implantation After Controlling Matrix Metalloproteinase Activity in Uterine Cavity Flushing. *Reprod Biol Endocrinol* 37, 2013. doi: 10.1186/1477-7827-11-37 査読あり
- (5) 久慈直昭, 山田満稔, 井上治, 福永朝子, 小川誠司, 菅原かな, 奥村典子, 浜谷敏生, 吉村泰典. ART 妊娠児の長期予後研究 周産期医学 8,2012 年 42 巻 8 号 Page991-1000 査読なし
- (6) Hamatani T. Human spermatozoal RNAs Fertil Steril. 2012 97:275-81. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.12.035. 査読あり
- (7) 久慈直昭, 井上治, 福永朝子, 菅原かな, 小川誠司, 奥村典子, 山田満稔, 浜谷敏生, 吉村泰典. ART(生殖補助医療) 精子・卵子・卵巣の凍結保存とその安全性 産婦人科治療 102,2011 年 不妊診療のすべて Page.495-500 査読なし
- (8) 久慈直昭, 井上治, 福永朝子, 菅原かな, 小川誠司, 奥村典子, 内田明花, 山田満稔, 佐藤卓, 浜谷敏生, 吉村泰典. 不妊治療後の妊娠とその予後 産婦人科治療 10,2011 年 Page.375-382 査読なし
- 〔学会発表〕(計 14 件)
- (1) 菅原かな, 浜谷敏生, 小川誠司, 山田満稔, 山田朝子, 上條慎太郎, 竹本崇史, 戸田里実, 若松修平, 久慈直昭, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 吉村泰典. ヒト間葉系幹細胞から子宮内膜間質様細胞への分化誘導. 第 58 回 日本生殖医学会, 神戸, 2013 年 11 月 15-16 日
- (2) 小川誠司, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 山田満稔, 奥村典子, 菅原かな, 井上治, 山田朝子, 上條慎太郎, 久慈直昭, 吉村泰典. 着床前期胚において特異的に発現する新 SCAN-zinc finger 遺伝子 Zfp371 の解析. 第 58 回 日本生殖医学会, 神戸, 2013 年 11 月 15-16 日
- (3) 上條慎太郎, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 小川誠司, 菅原かな, 片岡典子, 山田満稔, 久慈直昭, 吉村泰典. 着床前期特異的新規遺伝子 Kzpi を欠失させた胚性幹細胞 (ES 細胞) の機能解析. 第 58 回 日本生殖医学会, 神戸, 2013 年 11 月 15-16 日
- (4) 若松修平, 山田満稔, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 竹本崇史, 戸田里実, 上條慎太郎, 小川誠司, 菅原かな, 久慈直昭, 吉村泰典. キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析法 (CE-TOFMS) を用いたマウス着床前期胚培養液のメタボローム解析. 第 58 回 日本生殖医学会, 神戸, 2013 年 11 月 15 日
- (5) 浜谷敏生, 山田満稔, 高梨和美, 平山明由, 阿久津英憲, 福永朝子, 小川誠司, 菅原かな, 篠田幸作, 曾我朋義, 久慈直昭, 梅澤明弘, 富田勝, 吉村泰典. キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析法 (CE-TOFMS) を用いたマウス着床前期胚培養液のメタボローム解析. 第 54 回 日本卵子学会大会, 東京, 2013 年 5 月 25 日
- (6) 菅原かな, 浜谷敏生, 小川誠司, 山田満稔, 奥村典子, 福永朝子, 井上治, 上條慎太郎, 久慈直昭, 梅澤明弘, 青木大輔, 吉村泰典. ヒト間葉系幹細胞 から子宮内膜間質細胞への分化誘導. 第 65 回 日本産科婦人科学会学術講演会, 札幌, 2013 年 5 月 10 日
- (7) 小川誠司, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 山田満稔, 奥村典子, 菅原かな, 井上治, 福永朝子, 梅澤明弘, 久慈直昭, 青木大輔, 吉村泰典. 着床前期胚において特異的に発現する新規 SCAN-zinc finger 遺伝子 Zfp371 の解析. 第 65 回 日本産科婦人科学会学術講演会, 札幌, 2013 年 5 月 10 日
- (8) 井上治, 浜谷敏生, 進伸幸, 山上亘, 阪埜浩司, 内田 浩, 丸山 哲夫, 久慈 直昭, 末岡 浩, 青木 大輔, 吉村 泰典. 若年性子宮体癌/複雑型子宮内膜異型増殖症に対する妊孕性温存療法後の生殖医療に関する検討 日本生殖医学会, 徳島 2012 年 11 月 8-9 日

(9) 小川誠司, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 山田満稔, 奥村典子, 菅原かな, 井上治, 福永朝子, 梅澤明弘, 久慈直昭, 青木大輔, 吉村泰典. 着床前期胚発生に関わる新規遺伝子 Zfp1 の発現解析 第 64 回日本産科婦人科学会, 大阪, 2012 年 4 月 13 日

(10) 浜谷敏生, 山田満稔, 阿久津英憲, 小川誠司, 菅原かな, 奥村典子, 福永朝子, 井上治, 梅澤明弘, 久慈直昭, 青木大輔, 吉村泰典. 着床前期初期から発現し多分化能細胞に特異的に発現する新規転写因子 Kzpi の機能解析 第 64 回日本産科婦人科学会, 大阪, 2012 年 4 月 13 日

(11) 浜谷敏生, シンポジウム: 卵巣機能異常に起因する不妊治療の最前線: マウス卵の加齢メカニズム 第 56 回日本生殖医学会学術講演会 横浜 2011 年 12 月 9 日

(12) Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Fukunaga T, Kuji N, Umezawa A, Yoshimura Y. Age-associated alteration of Telomere Biology in mouse oocytes. The 67th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM) Orland, USA 18-22, October 2011

(13) Inoue O, Kuji N, Fukunaga T, Ogawa S, Sugawara K, Yamada M, Hamatani T, Hanabusa H, Yoshimura Y, Kato S. Processing of semen from HIV- 1-positive male and its use in the IVF-ICSI procedure clinical efficacy The 27th Annual meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology Stockholm, Sweden 3-6, Jul 2011

(14) 近澤奈々, 浜谷敏生, 山田満稔, 阿久津英憲, 奥村典子, 小川誠司, 菅原かな, 井上治, 福永朝子, 久慈直昭, 吉村泰典. 着床前期および未分化維持に関わる新規 C2H2- zinc finger 遺伝子の解析 第 52 回日本哺乳動物卵子学会, 栃木, 2011 年 5 月 11 日

〔図書〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
なし

取得状況(計 0 件)
なし

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
井上 治 (Inoue Osamu)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 10464976

(2) 研究分担者
浜谷 敏生 (Hamatani Toshio)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 60265882

(3) 連携研究者
宮戸 健二 (Miyado Kennzi)
独立行政法人国立成育医療研究センター
・生殖・細胞医療研究部・室長
研究者番号: 60324844