

令和元年6月14日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11094

研究課題名(和文) 着床不全症例における子宮内膜への低反応レベルレーザーの効果と機序に関する研究

研究課題名(英文) The effect of low level laser therapy on endometrial function and management of implantation failure

研究代表者

河野 康志 (KAWANO, YASUSHI)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：40274758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜における low level laser therapy (LLLT) の応用の可能性について検討した。子宮内膜間質細胞ならびに脱落膜化細胞では PAR-1 tethered ligand の添加で ERK-1/2 のリン酸化、ケモカイン産生の増加ならびに細胞走化性の促進が確認された。さらに LLLT の照射により ERK のリン酸化が認められた。子宮内膜の脱落膜化により細胞機能が変化し、生理活性物質の産生調節に関与し、着床機構に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。LLLT 照射においても ERK を活性化したことより、物理的刺激による細胞内情報伝達分子の活性化が着床不全の治療に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

着床不全症例に対して、脱落膜化による細胞内情報伝達系の活性化が妊娠成立に重要であることが確認できたが、低反応レベルレーザーも同様の細胞内情報伝達系の活性化を引き起こすため、着床不全の治療に応用できる可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effect of low level laser therapy (LLLT) on endometrial function, the kinase activation via protease-activated receptor (PAR)-1 in endometrial stromal cells (ESCs) and decidual cells (DSCs) were investigated.

Following stimulation by PAR-1 tethered ligand, the activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK), production of chemokines and increasing of cellular motility were detected. LLLT also activated the ERK. Our findings demonstrate a new role for PAR-1 in in vitro decidualization with increased chemokine production and cell migration. LLLT may also contribute to improve the implantation failure with activation of intracellular signal transduction.

研究分野：生殖医学

キーワード：着床 不妊症

## 様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生殖補助医療における体外受精・胚移植の妊娠率は約 20~30%であり、良好胚を移植しても着床しない、いわゆる着床障害症例が存在する。胚盤胞は正常月経周期では 20 日目から 24 日目 (day LH+7 から day LH+11) に着床し、子宮内膜が胚を受け入れられる期間は限られている。この期間を implantation window といい、初期胚が胚盤胞へと分化するのに同調するように排卵後から分泌期にかけて子宮内膜の分化も起こる。また、生理活性物質も産生され、血管新生制御因子、ケモカイン・サイトカイン産生およびプロスタグランジン産生が胚の着床・妊娠維持においてネットワークを形成し、生殖現象に関与していると考えられる。

### 2. 研究の目的

低反応レベルレーザー治療とは、レーザーエネルギーが組織や細胞生存閾値を下回った範囲内において引き起こされる光生物学的活性化を利用する治療であり、細胞レベルでの代謝の活性化、末梢血行の改善、疼痛の緩和等に臨床応用されている。低反応レベルレーザー治療を不妊治療に応用した臨床成果も近年報告されつつあるが、本治療の具体的な作用機序の詳細は明らかではない。子宮内膜において女性ホルモンや黄体ホルモンによって活性化される様々な酵素や細胞内情報伝達系が子宮内膜の形態学的および機能的分化にどのような役割を演じているかについて検討し、さらに、子宮内膜での低反応レベルレーザー治療の効果と作用機序について解明したいと考えている。さらに、脱落膜化による細胞機能の変化が妊娠維持や流産および不育症などの生殖現象にどのように関わっているかを調べ、不妊症の治療に結びつけることが可能かどうかを検討し、新たな着床障害の治療法の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 正常子宮内膜組織の採取

子宮筋腫に対する子宮全摘出術時に、患者より文書による同意を得て正常子宮内膜組織を採取した。なお、本事業の内容を含む一連の研究は、平成16年6月に大分大学医学部ヒトゲノム研究倫理審査委員会に基づく許可を受けている。採取した組織より、蛋白を抽出した。

#### (2) 子宮内膜上皮細胞ならびに間質細胞の分離、培養と脱落膜化

上述の方法で採取した子宮内膜組織より我々がこれまで行ってきた方法で子宮内膜上皮細胞ならびに間質細胞を分離、培養した。これらのprimary culture による細胞を用いて、in vitro の実験を行った。

#### (3) 低反応レベルレーザー照射による細胞内情報伝達系の解析

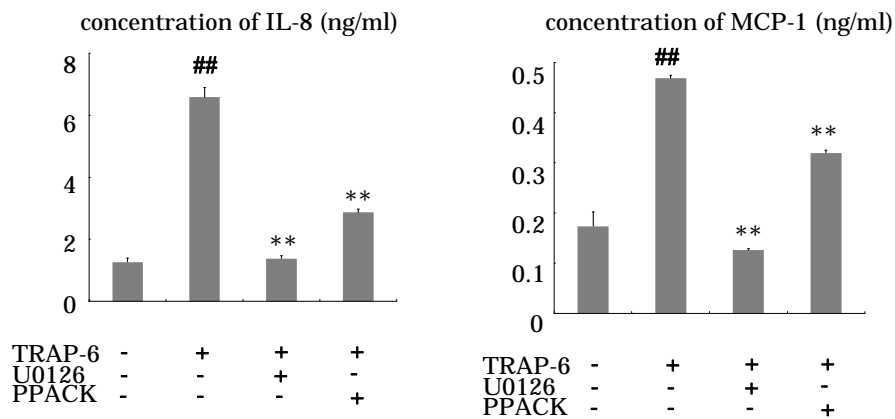
物理的刺激である LLLT を用いて、顆粒膜細胞に対する影響を検討した。子宮内膜間質細胞に対して、830nm の波長をもつ GaAlAs 半導体による LLLT (60mW) を照射して ERK のリン酸化を Western immunoblot 法により検討した。

### 4. 研究成果

(1) 子宮内膜間質細胞を培養し dibutyryl (db)-cAMP と medroxy-progesterone (MPA) で刺激し、脱落膜化(DSC)を誘導した。脱落膜化を確認後に、PAR-1のtetherd ligand (100 μM)を添加したところ、PAR-1 を介してmitogen-activated protein kinase (MAPK)であるERKの時間依存的

なリン酸化が認められ、特にERKは特に強いリン酸化がみられた。また、これらの酵素は、それぞれ特異的な阻害剤の添加でリン酸化が抑制された。また、培養上清中のケモカイン (interleukin-8, growth-regulated oncogene、monocyte- chemoattractant protein-1) をELISA法を用いて定量したところ、PAR-1を介して産生量が増加した(図1)。次に、それぞれ特異的な阻害剤をPAR-1のtetherd ligand とともに添加したところ、それらの産生は抑制された (## $P < 0.01$  vs control. \*\* $P < 0.01$  vs TRAP-6)。

(図1)

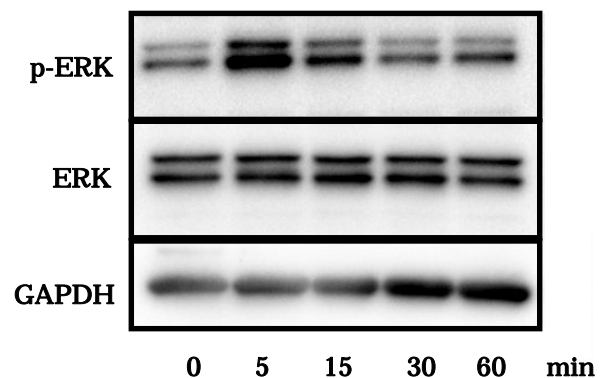
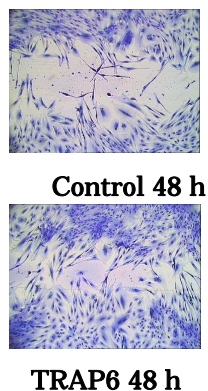


(2) PAR-1を介した子宮内膜細胞の走化性を検討するため、in-vitro wound repair assayを行った。細胞をスクラッチし24時間、48時間の細胞の修復をみたところ、48時間後の細胞において、脱落膜化細胞の修復率は上昇し、それはTRAP-6添加によりさらに促進した(図2)。

(3) 子宮内膜間質細胞における低反応レベルレーザー照射の影響を検討するため、子宮内膜間質細胞に対して、830nmの波長をもつGaAlAs半導体によるLLLTLT (60mW)を照射して、経時的にERKの活性化を検討したところ、照射後5分で強いリン酸化が認められた(図3)。

(図2)

(図3)



今回の結果から、分化した脱落膜化細胞ではPAR-1の発現が増加し、その下流のERK1/2を活性化させた結果、IL-8やMCP-1の産生を増加させることが確認できた。着床部位にはケモカインの産

生により白血球が遊走され、免疫細胞の分布の変化がおこる。走化性の検討の結果からは、matrix metalloproteinase-1が増加することで細胞外マトリックスを分解、改変し、走化性が促進されることにより、妊娠成立に向けた栄養膜細胞の浸潤に貢献すると考えられる。これらの変化は脱落膜組織において着床ならびに妊娠維持に向けての調節の一旦を担っている可能性が示唆された。

また、今回検討した低反応レベルレーザー照射においてもERKを活性化したことより、子宮内膜において物理的刺激による細胞内情報伝達分子の活性化が着床不全の治療に応用でき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2件)

### 1. Goto K, Kawano Y, et al.

Decidualization modulates a signal transduction system via protease-activated receptor-1 in endometrial stromal cells.

Am J Reprod Immunol 査読有 2018; 80: e13036. DOI: 10.1111/aji.13036

### 2. 河野康志、他.

不妊症における LLLT の作用機序

日本レーザー医学会誌 査読有 2016; 37: 98-105.

[学会発表](計3件)

### 1. 河野康志、他

シンポジウム：レーザーと生殖医療の関わり 生殖細胞を取り巻く環境への LLLT の効果  
第30回日本レーザー治療学会 2018年6月24-25日 国際ファッションセンター(東京都墨田区)

### 2. 後藤香里、河野康志、他.

脱落膜化子宮内膜間質細胞のプロテアーゼ活性化型受容体 (PAR-1) を介した細胞機能調節  
第32回日本生殖免疫学会 2017年12月2-3日 日本大学医学部(東京都板橋区)

### 3. 後藤香里、河野康志、他.

ヒト子宮内膜における脱落膜化に伴う生理鵜活性物質の変化

第34回日本受精着床学会 2015年9月15-16日 プリンスホテル(長野県軽井沢町)

[図書](計 0 件)

〔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  
なし

#### 6. 研究組織

(1)研究分担者：榎原 久司（NARAHARA HISASHI）

大分大学・医学部産科婦人科・教授

研究者番号： 6 0 2 1 1 4 4 7

(2)研究分担者：奈須 家栄（NASU KAEI）

大分大学・医学部地域医療支援システム産婦人科分野・教授

研究者番号： 3 0 2 7 4 7 5 7