

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11110

研究課題名(和文)着床面における子宮内膜細胞局所的細胞死の合目的副次効果の解明

研究課題名(英文)Analysis of human endometrial cell apoptosis in interface of implantation

研究代表者

内田 明花 (UCHIDA, Sayaka)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：60445236

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)：ヒト着床における胚と子宮内膜上皮細胞の接触面において、子宮内膜上皮細胞は細胞死に陥る。細胞死に陥ることにより漏出が想定される子宮内膜上皮細胞の内容が、胚あるいは残存している子宮内膜上皮細胞に何らかの着床をエスコートする反応を誘導すれば合目的であるとの仮説証明を行った。細胞死を誘導した子宮内膜上皮細胞の培養上清を添加した結果、子宮内膜上皮細胞の細胞増殖能に変化は見られず、胚接着能をわずかに上昇させ、細胞運動能を亢進させる傾向を認めた。一方、機械的に破碎した子宮内膜上皮細胞内溶液を添加した場合、細胞増殖能、細胞接着能には変化はなかったが、細胞運動能はやはり亢進傾向にあった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで着床局面における子宮内膜上皮細胞の細胞死はあくまでも胚の陥入ルート形成のためと解釈されてきたが、細胞死によって着床局所に漏出する子宮内膜上皮細胞の内容が周囲に影響を及ぼす可能性がある。検討の結果、子宮内膜上皮細胞の増殖には影響を及ぼさないものの細胞運動には加速方向に影響しうることが判明した。また胚との接着能がやや上昇する結果が得られた。これらの結果は、胚接着後に細胞死に陥った子宮内膜上皮細胞の細胞内容は周囲にパラクライン様式で影響し、着床局面の子宮内膜上皮細胞の運動を促進し、胚の陥入ルート形成を加速させ、胚との接着能を高めることでより安定した着床成立に寄与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：It is well known that human endometrial epithelial cells (EECs) fall into apoptosis in interface between embryo and EECs.

To unveil effective role of EEC apoptosis, we tested the ability of cell adhesion, cell proliferation, and cell motility in EECs stimulated by EEC contents derived from Fas Ab-induced apoptosis and mechanical breaking. Apoptotic EEC contents showed no regulation of EEC proliferation, small up-regulation of cell adhesion against embryo, and acceleration of cell motility. Stimulation by EEC contents obtained from mechanical crushing induced significant acceleration of EEC motility, but not EEC proliferation and adhesion ability.

These results indicate that apoptotic EEC nearby implantation point probably assist successful implantation through up-regulation of EEC motion.

研究分野：産婦人科学 生殖医学

キーワード：着床 細胞死 子宮内膜上皮細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

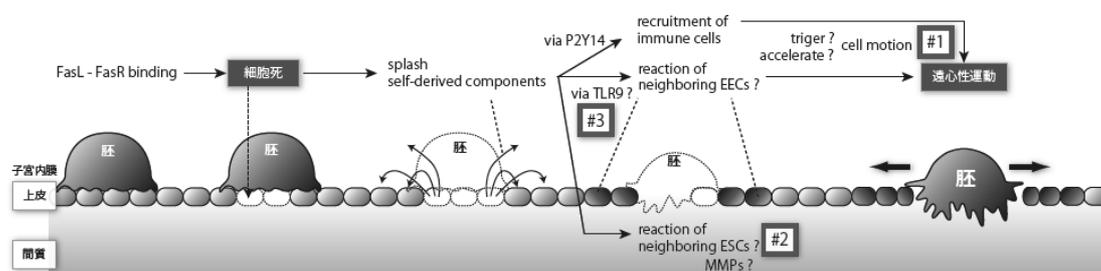
体外受精治療の失敗例の 70%は胚移植後に集中している。胚移植後の子宮内腔は不可侵の領域であり、この事実が着床研究の倫理的・技術的障壁となり着床機序研究を大いに阻んでいる。逆説的にみれば、この着床期間の機序の基礎的知見の集積は、ホルモン補充療法に限定されている現在の ART にとってブレイクスルーとなる新規治療法への基盤となりうる。

浮遊する異種細胞が、本来物理的にも免疫的にも内部組織を守護する上皮細胞バリアを貫通して内部へと侵入する例外的生体反応として、白血球の血管内皮通過と胚の子宮内膜上皮通過(着床)が許されている。ことに着床は侵入する浮遊異種細胞が生体最大の細胞塊(胚)であるがゆえに、子宮内膜上皮細胞層の着床局所での細胞死という機序でなされるという特異性がある(Galan et al 2000, Simon et al 2001)。一方、研究代表者の所属グループは、胚通過フェイズにおいて子宮内膜上皮細胞が、胚回避的に遠心方向の細胞運動を示すことを明らかにしてきた(Uchida et al J Biol Chem 2012)。迅速な胚回避運動に比して、細胞死による胚通過ルート形成はステップの多さから明らかに緩やかな生体反応と考えられる。すなわち細胞死に至った子宮内膜上皮細胞は細胞体が破壊に至り細胞体の圧縮となっても、巨大な胚を通過させるスペース形成には至らない。何らかの機序でリクルートされた免疫担当細胞によって圧縮あるいは破壊された細胞体が処理されて初めて胚形成ルート形成となりうる。しかしながら、着床面における子宮内膜上皮細胞の細胞死という画期的な発見報告で、その細胞死が胚通過ルート形成機序と断じられて以降、細胞死の意義は国内外を含めて解析されておらず、研究の進展は認められずにいる。

### 2. 研究の目的

われわれは遠心性の胚回避運動に比して明らかに迂遠な機序である子宮内膜上皮細胞の細胞死には胚通過ルート形成以外の意義があると考えている。細胞死に至った子宮内膜上皮細胞群は細胞死の破綻によって自己の細胞内容を局所的に放出することになる(図1)。研究代表者の研究グループは子宮内膜上皮細胞の自然免疫応答機序のひとつとして UDP-glucose の受容体である P2RY14 が子宮内膜上皮細胞膜に発現し、好中球のリクルートに重要な役割を果たすことを明らかにした(Arase et al J Immunol 2009)。細胞死によって破綻細胞内から UDP-glucose が漏出することで近隣生細胞上の P2RY14 を介したシグナル伝達の結果、IL-8 を介した好中球リクルートがなされることを示唆する報告である。類似の機序で「細胞死破綻細胞由来の細胞内容を起点とした隣接生細胞(子宮内膜上皮細胞・間質細胞)へのシグナル伝達があり、着床機序を支持する細胞運動あるいは細胞増殖などの細胞動態へ働きかける」という仮説を立てている(図1)。この仮説証明のために、(1) 子宮内膜細胞(上皮・間質とも)上に発現し、自己DNAを認識する Toll-like receptor (TLR)9 を介したシグナル伝達経路が存在すること、(2) その細胞死由来のシグナルによって子宮内膜上皮細胞においては遠心性細胞運動のトリガー機序あるいは促進機序が構成されていること、(3) 子宮内膜間質細胞においては胚侵入をアシストする細胞外基質分解酵素(matrix metalloproteinases; MMPs)の発現促進などの着床支援細胞反応が惹起されることの3点につき明らかにすることを目的とした。

【図1】ヒト着床における子宮内膜上皮細胞死とその後の子宮内膜細胞群への影響(仮説)



### 3. 研究の方法

ヒトの着床局面における子宮内膜上皮細胞の細胞死は、胚栄養膜細胞上の FasL と子宮内膜上皮細胞上の FasR との結合によって開始される。その細胞死によって破綻した子宮内膜上皮細胞から漏出する同細胞の細胞内容が周囲へ及ぼす影響を解析するにあたり、胚の非存在下に同様の細胞死を誘導し、破綻子宮内膜上皮細胞内容の回収を目指す。

#### (1) anti-Fas Ab coated beads (Fas beads) の作成

その添加によって FasR(CD95)を持つ細胞を細胞死に至らしめる anti-Fas Ab coated polystyrene beads を既報(Sawai & Domae 2010)の通りに作成する。その際に FasR 刺激性の抗体(CH-10)と阻害性抗体(ZB4)を用い細胞死誘導 beads と細胞死阻害 beads を作成する。また、beads の回収、投与位置制御を念頭に magnetic beads への coating も行う。Beads の coating 技術は研究代表者の所属研究グループも保有している(Uchida et al J Exp Med 2001)。

## (2) Fas beads 添加による子宮内膜上皮細胞の細胞死誘導

(1)で作成した細胞死誘導 beads と細胞死阻害 beads を培地に添加し、子宮内膜上皮細胞株 Ishikawa の細胞死誘導の有無を固定せずに real time に観察可能な FLICA in vitro Apoptosis Detection Kit を用いて細胞死の誘導効率を定量化する。また磁性体を用いて抗 FasR 抗体 magnetic beads による標的場所誘導性の細胞死誘導の可否を検証する。

## (3) Fas beads 添加細胞死誘導後の破綻子宮内膜上皮細胞内容の回収

(2)で得た至適添加量・時間をもとに Fas beads を添加し、Ishikawa 細胞の細胞死を誘導し、培地 (conditioned medium; CM) を回収し、「細胞死によって破綻した子宮内膜上皮細胞の細胞内容の漏出 (endometrial epithelial cell contents splashed by apoptosis; apoptotic EECC)」とする。

対象として、スクレイパーによる機械的破壊 (mechanical EECC)、ソニケーターによる超音波破壊 (sonic EECC) による Ishikawa 細胞内容含有培地も対象として準備する。得られた各種 EECC (apoptotic, mechanical, sonic)を用いて、EECC によって隣接する細胞死に至っていない alive の子宮内膜上皮細胞の細胞機能への影響を引き続き解析する。

## (4)子宮内膜上皮細胞の細胞増殖機能解析

細胞増殖能の変化を、MTT を用いた細胞増殖定量キットで定量比較する。

着床局面での細胞増殖能の変化を、in vitro implantation assay を実施した上で、細胞増殖の局所的变化を Click-iT Plus EdU Alexa Fluor Kit で蛍光可視化する。

## (5) EECC 添加による子宮内膜上皮細胞の細胞機能解析

単独細胞としての浸潤能を trans-well migration assay で定量比較する。

細胞集団としての運動能を wound healing assay で定量比較する。

着床局面での遠心性運動能を real time in vitro implantation assay で定量比較する。

EECC 添加による子宮内膜上皮細胞の細胞増殖機能解析。

## 4. 研究成果

### (1) anti-Fas Ab coated beads (Fas beads) の作成

既報通りの作出に成功した。beads の回収、投与位置制御を念頭にした magnetic beads への coating にも成功した。

### (2) Fas beads 添加による子宮内膜上皮細胞の細胞死誘導

(1)で作成した細胞死誘導 beads による子宮内膜上皮細胞モデル Ishikawa の細胞死が確かに誘導されることを蛍光顕微鏡で確認できた。ただし、誘導率が低く (~10%) 添加 beads 量を増やすと 30%程度までは細胞死誘導率を高められたが、一定の量を超える beads 添加は細胞体そのものの負担になるようで、培養中に apoptosis ではなく細胞が死滅していくため、低誘導率ながら本法で後述の解析を進めた。

細胞死誘導性の抗体コートビーズでの解析系が上記の細胞死誘導率にとどまったため、細胞死阻害抗体による有為な細胞死阻害効果判定は得られず、細胞死阻害抗体系による解析はペンディングとした。

細胞死誘導抗体コート磁性体ビーズを用いた標的部位誘導性の細胞死効果は目論み通りビーズ集中部での細胞死誘導を認めた。

### (3) Fas beads 添加細胞死誘導後の破綻子宮内膜上皮細胞内容の回収

Fas beads を添加し、Ishikawa 細胞の細胞死を誘導した培地 (conditioned medium; CM) (endometrial epithelial cell contents splashed by apoptosis; apoptotic EECC)、スクレイパーによる機械的破壊 (mechanical EECC)、ソニケーターによる超音波破壊 (sonic EECC) による in vitro での着床率効果への影響を検討した。

In vitro implantation assay において胚モデルの子宮内膜上皮細胞モデルへの接着率は apoptotic EECC によってのみ、わずかな着床率向上効果を認めたが、mechanical EECC や sonic EECC では着床率に何ら影響を及ぼさなかった。

### (4)子宮内膜上皮細胞の細胞増殖機能解析

機械的破碎で得られた mechanical EECC、sonic EECC はもとより、細胞死誘導の apoptotic EECC であっても、その投与によって子宮内膜上皮細胞の細胞増殖機能には何ら変化を与えなかった。

### (5) EECC 添加による子宮内膜上皮細胞の細胞機能解析

単独細胞としての浸潤能を trans-well migration assay で定量比較

細胞集団としての運動能を wound healing assay で定量比較

着床局面での遠心性運動能を real time in vitro implantation assay で定量比較

EECC 添加による子宮内膜上皮細胞の細胞増殖機能解析

上記(3)までの解析検討に大幅に時間を費やしたため、(5)の解析進行中に期間終了を迎えた。統計解析が不十分の状態であるが、preliminaryな結果においては、apoptotic EECC 添加によって、子宮内膜上皮細胞の trans-well migration、wound healing assay 双方での細胞運動機能評価については、いずれも亢進する傾向がある。一方、in vitro implantation assay においては、着床率（接着率）に変化は認めないものの、着床後の胚モデルの伸展面積は拡大傾向であり、子宮内膜上皮細胞の着床における遠心性（接着胚モデルから遠ざかる方向の）運動を亢進していることを示唆する結果が得られている。

以上、限られたデータからの推測にとどまるものの、胚の接着を起点に発動する子宮内膜上皮細胞の細胞死は、同時に起こる子宮内膜上皮細胞の遠心性の胚回避的な細胞運動を促進する可能性が高く、胚の子宮内膜間質細胞層への陥入をアシストするかのごとく反応であり、着床を成立させるに合目的な反応があることを示唆していると考えられる。

現在、計画遅延していた解析項目を順次実施しており、当初仮説の証明は現実的なものと判断している。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Furuya M, Masuda H, Hara K, Uchida H, Sato K, Sato S, Asada H, Maruyama T, Yoshimura Y, Katabuchi H, Tanaka M, Saya H: ZEB1 expression is a potential indicator of invasive endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2017; 96(9): 1128-1135. 査読有  
doi: 10.1111/aogs.13179.

Uchida S, Maruyama T, Kagami M, Miki F, Hihara H, Katakura S, Yoshimasa Y, Masuda H, Uchida H, Tanaka M: Impact of borderline-subclinical hypothyroidism on subsequent pregnancy outcome in women with unexplained recurrent pregnancy loss. *J Obstet Gynaecol Res.* 2017;43(6): 1014-1020. 査読有  
doi: 10.1111/jog.13319.

Masuda H, Endo T, Yoshimasa Y, Uchida H, Nakabayashi A, Maruyama T, Tanaka M: A case of hysteroscopic resection of cervical pregnancy after successful treatment with systematic methotrexate. *J Obstet Gynaecol.* 2016; 36(7): 865-866. 査読有  
doi:10.1080/01443615.2016.1174837.

Uchida H, Maruyama T, Masuda H, Uchida S, Miki F, Hihara H, Katakura S, Yoshimasa Y, Tanaka M: How to create an embryo penetration route. *Am J Reprod Immunol.* 2016; 75(3): 326-332. 査読有  
doi: 10.1111/aji.12476.

〔学会発表〕(計7件)

Tetsuo Maruyama, Satomi Katakura, Tomoka Takao, Toru Arase, Yushi Yoshimasa, Shoko Tomisato, Sayaka Uchida, Hiroataka Masuda, Hiroshi Uchida, Mamoru Tanaka: P2RY is involved in the migration and invasion of human extravillous trophoblast. Society for Reproductive Investigation 66th Annual Scientific Meeting (SRI2019). 2019年.

升田博隆, 古谷正敬, 丸山哲夫, 高尾知佳, 内田 浩, 内田明花, 吉政佑之, 片倉慧美, 吉村泰典, 片淵秀隆, 田中 守: 子宮内膜幹細胞と上皮間葉転換をターゲットとした非内分泌的な子宮内膜症の新規治療. 第23回日本生殖内分泌学会. 2018年.

升田博隆, 古谷正敬, 丸山哲夫, 内田 浩, 内田明花, 吉村泰典, 佐谷秀行, 片淵秀隆, 田中 守: 子宮内膜症の各病態における上皮間葉転換状態の解析と子宮内膜症における ZEB1 の浸潤性マーカーとしての可能性. 第35回日本受精着床学会. 2017年.

Hiroataka Masuda, Masataka Furuya, Tetsuo Maruyama, Hironori Asada, Hidetaka Katabuchi, Hideyuki Saya, Mamoru Tanaka: Differential epithelial-mesenchymal transition status between types of endometriosis and adenomyosis. 33rd Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE2017). 2017年.

Hiroataka Masuda, Masataka Fuyuya, Tetsuo Maruyama, Hironori Asada, Hideyuki Saya, Mamoru Tanaka: Differential status of epithelial-mesenchymal transition in each endometriotic lesion: ZEB1 as a potential indicator of endometriotic invasiveness. 13th World Congress on Endometriosis (WCE2017). 2017年.

Sayaka Uchida, Tetsuo Maruyama, Maki Kagami, Fumie Miki, Hanako Hihara, Shoko Tomisato, Satomi Katakura, Yushi Yoshimasa, Hiroataka Masuda, Hiroshi Uchida, Mamoru Tanaka, Daisuke Aoki: Impact of subclinical hypothyroidism on subsequent pregnancy outcome in women with unexplained recurrent pregnancy loss. 第 69 回日本産科婦人科学会 International Session. 2017 年.

Hiroataka Masuda, Masataka Furuya, Hironori Asada, Tetsuo Maruyama, Hiroshi Uchida, Sayaka Uchida, Yasunori Yoshimura, Hidetaka Katabuchi, Hideyuki Saya, Mamoru Tanaka, Daisuke Aoki: Differential status of epithelial-mesenchymal transition in endometriosis and adenomyosis: ZEB1 as a potential indicator of endometriotic invasiveness. 第 69 回日本産科婦人科学会 International Session. 2017 年.

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：丸山 哲夫  
ローマ字氏名：(MARUYAMA, Tetsuo)  
所属研究機関名：慶應義塾大学  
部局名：医学部  
職名：准教授  
研究者番号(8桁)：10209702

研究分担者氏名：内田 浩  
ローマ字氏名：(UCHIDA, Hiroshi)  
所属研究機関名：慶應義塾大学  
部局名：医学部  
職名：講師  
研究者番号(8桁)：90286534

研究分担者氏名：升田 博隆  
ローマ字氏名：(MASUDA, Hiroataka)  
所属研究機関名：慶應義塾大学  
部局名：医学部  
職名：講師  
研究者番号(8桁)：80317198

研究分担者氏名：日原 華子  
ローマ字氏名：(HIHARA, Hanako)  
所属研究機関名：慶應義塾大学  
部局名：医学部  
職名：助教  
研究者番号(8桁)：80626458

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。