

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11250

研究課題名(和文) 子宮内膜脱落膜化細胞でのオクタン酸産生機構と着床現象における役割の解明

研究課題名(英文) Mechanism of octanoic acid production and role in implantation in endometrial decidualized cells

研究代表者

梶原 健 (Kajihara, Takeshi)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：80286103

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)：子宮内膜脱落膜化細胞では中鎖脂肪酸の一つであるオクタン酸を産生していることが明らかとなった。オクタン酸は、胚の正常な発生に重要な脂肪酸であることが知られている。定量的PCRによる解析や、酸化活性解析により、子宮内膜脱落膜化細胞が中鎖脂肪酸を産生する機構には、長鎖脂肪酸の代謝による中鎖脂肪酸の産生と短鎖脂肪酸からの合成による中鎖脂肪酸の産生の両方向から行なっている可能性が示唆された。細胞浸潤実験では、培地へのオクタン酸添加により浸潤細胞数が増加傾向を示した。以上から、子宮内膜間質細胞は、脱落膜化による脂質代謝機構の調節により、胚の発生に重要なオクタン酸を産生していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

着床現象の成立には子宮内膜と胚との密接な相互作用が重要である。体外受精などの治療を受ける際に、形態的良好胚を繰り返し移植しても、着床・妊娠せず、その原因が子宮内膜側の胚を受容する能力の異常(着床不全)にあると考えられるケースが多数存在する。しかしこの着床不全に対する明確なエビデンスのある治療法がないため、現時点では、良好な胚をいかに選別するかに重点を置いた生殖補助医療が行なわれているのが状況となっている。本研究から得た結果は、非侵襲的な着床不全の診断マーカーや、子宮内膜環境の改善を目的とした新規治療法の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We clarified that octanoic acid, which is one of the medium chain fatty acids, was produced from endometrial decidualized cells. Octanoic acid is known to be a fatty acid important for normal embryonic development. The mechanism that endometrial decidualized cells produce medium-chain fatty acids was analyzed by quantitative PCR analysis and  $\beta$ -oxidation activity analysis. We demonstrated that the production of medium-chain fatty acids by endometrial decidualized cells may be carried out from both directions that the metabolism of long-chain fatty acids and the synthesis from short-chain fatty acids. In the trophoblast cell invasion experiment, the number of infiltrating cells tended to increase with the addition of octanoic acid to the medium. From these observation, it was revealed that endometrial stromal cells produce octanoic acid, which maybe important for embryo implanation, by regulating the lipid metabolism mechanism by decidualization.

研究分野：生殖医学

キーワード：オクタン酸 脂質代謝 子宮内膜 脱落膜化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 着床現象の成立には子宮内膜と胚との密接な相互作用が重要である。体外受精などの治療を受ける際に、形態的良好胚を繰り返し移植しても、着床・妊娠せず、その原因が子宮内膜側の胚を受容する能力の異常(着床不全)にあると考えられるケースが多数存在する。しかしこの着床不全に対する明確なエビデンスのある治療法がないため、現時点では、良好な胚をいかに選別するかに重点を置いた生殖補助医療が行なわれているのが状況となっている。このため、私たちは、今後は着床過程における子宮内膜の機能についての研究や子宮内膜と胚の相互作用についての研究が、着床不全や習慣性流産などの治療への臨床応用にとって重要であると考えた。

(2) 子宮内膜は、胚が着床するときに脱落膜化という分化過程を経て胚を受け入れる体制を整える。これまでに私たちは、子宮内膜の分化(脱落膜化)をヒト初代培養細胞で安定的に誘導する系を確立した。この誘導系で分化させた子宮内膜脱落膜化細胞を用い、脱落膜化を制御する因子として、転写因子である FOXO1 や microRNA542-3p が脱落膜化を制御する重要な因子であることを明らかとした。これらの研究で子宮内膜の機能については有用なデータが得られたが、子宮内膜と胚の相互作用についての分子メカニズムに関しては不明な点が多く、また、子宮内膜の機能の破綻がヒトの病態とどのように関連しているのかについても詳しくは分かっていない。

## 2. 研究の目的

最近報告された研究で、胚の正常な発育には、中鎖脂肪酸のひとつであるオクタン酸がエネルギー源として重要であることが明らかとされた。しかし、このオクタン酸の供給がどこからどの様に行なわれているかは明らかではなかった。そこで我々は胚(絨毛細胞)と直接接触する子宮内膜脱落膜細胞がオクタン酸の供給源になっていると推察し、細胞培養上清液中に分泌される遊離脂肪酸量をガスクロマトグラフィーにて網羅的に解析した所、前述したオクタン酸のみ脱落膜化細胞で産生されていることが明らかとなった。本研究ではこの予備データを発展させ、オクタン酸の脱落膜細胞での産生メカニズム、胚との相互作用を含む、着床に及ぼす影響、さらには着床不全の診断・治療への応用の可能性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究は、病院 IRB 委員会の承認を得て行った。良性疾患により子宮摘出を行った患者から同意を得て、常法にて子宮内膜間質細胞を分離・培養した。脱落膜化刺激は 8-bro-cAMP と MPA で行った。まず、脱落膜化分化をさせた細胞と、脱落膜化していないコントロール細胞を用い、培養上清中に含まれる脂肪酸の分子種とその濃度を LC-FTMS にて測定・比較した。また、脂質代謝に関連した酵素群の発現に関しては定量的 PCR にて検討し、ミトコンドリアの量的、形態学的変化に関しては蛍光及び電子顕微鏡にて観察を行った。また、絨毛細胞株(HTR-8/SVneo)を用いて、細胞浸潤能の評価を行った。

#### 4 . 研究成果

脂肪酸の網羅的解析では、脱落膜化群で中鎖脂肪酸の一つであるオクタン酸の量のみが 1.3 倍に増加した。定量的 PCR による解析では、脱落膜化群で中鎖脂肪酸の合成に関与する ACSM5 の発現が 20 倍に上昇し、中鎖脂肪酸の分解に関与する ACADM の発現が 0.6 倍に低下した。また、酸化の基質となるアシル CoA の、ミトコンドリア内への取り込みを促進する CPT1 の発現は、0.2 倍に低下した。長鎖脂肪酸の一つであるパルミチン酸の分解を指標とした

酸化活性解析では、脱落膜化群で活性が 1.4 倍に上昇した。蛍光および電子顕微鏡での観察実験では、脱落膜化群でミトコンドリア数の増加と形態変化を認めた。細胞浸潤実験では、培地へのオクタン酸添加により浸潤細胞数が増加傾向を示した。

子宮内膜間質細胞では、脱落膜化によりミトコンドリア内の脂質代謝が調節され、オクタン酸が増加し、ミトコンドリアの動態に変化を生じることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tamaru Shunsuke, Kajihara Takeshi, Mizuno Yosuke, Mizuno Yumi, Tochigi Hideno, Ishihara Osumu	4. 巻 -
2. 論文標題 Endometrial microRNAs and their aberrant expression patterns	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-020-00252-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamaru Shunsuke, Kajihara Takeshi, Mizuno Yumi, Takano Natsuko, Tochigi Hideno, Sato Tomomi, Ishihara Osamu	4. 巻 52
2. 論文標題 Heparin prevents oxidative stress-induced apoptosis in human decidualized endometrial stromal cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 209 ~ 216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-019-00220-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tochigi Hideno, Kajihara Takeshi, Mizuno Yosuke, Mizuno Yumi, Tamaru Shunsuke, Kamei Yoshimasa, Okazaki Yasushi, Brosens Jan J, Ishihara Osamu	4. 巻 7
2. 論文標題 Loss of miR-542-3p enhances IGFBP-1 expression in decidualizing human endometrial stromal cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 40001 ~ 40001
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep40001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶原 健、田丸俊輔、栃木 秀乃、石原 理
2. 発表標題 子宮内膜間質細胞では脱落膜化によりオクタン酸が増加しミトコンドリア動態に変化が生じる
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田丸俊輔、水野由美、梶原 健、岸 美裕子、佐藤智美、小黒辰夫、石原 理
2. 発表標題 脱落膜化子宮内膜間質細胞における脂肪酸代謝調節機構の解明とオクタン酸の役割
3. 学会等名 第51回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶原 健、水野由美、田丸俊輔、斎藤良平、佐藤 毅.
2. 発表標題 細胞伸展（メカニカルストレッチ）は形態学的、生化学的にも子宮内膜脱落膜化過程を制御する
3. 学会等名 第51回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野由美、水野洋介、梶原 健、石原 理
2. 発表標題 ペルオキシソーム機能の低下を示すTysnd1欠損マウスは細胞質残余を伴う奇形精子を呈する
3. 学会等名 第51回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野由美、水野洋介、梶原 健、石原 理
2. 発表標題 ペルオキシソーム軽度脂質代謝異常マウスの雄性不妊発症メカニズムの解析
3. 学会等名 第37回受精着床学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山縣 洸, 水野由美, 梶原 健, 栃木秀乃, 田丸俊輔, 石原 理.
2. 発表標題 子宮内膜脱落膜化細胞から分泌されるエクソソームの精製とその役割
3. 学会等名 第37回日本受精着床学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸美裕子, 水野由美, 齋藤良平, 梶原 健, 石原 理
2. 発表標題 胚と子宮内膜の相互作用に重要な中鎖脂肪酸の同定
3. 学会等名 第59回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水野由美, 梶原 健, 岸美裕子, 田丸俊輔, 佐藤智美, 小黒辰夫, 石原 理
2. 発表標題 子宮内膜細胞の脱落膜化と胚の着床における中鎖脂肪酸の役割
3. 学会等名 第50回 臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水野由美, 水野洋介, 梶原 健, 石原 理
2. 発表標題 ペルオキシソームの軽度機能低下による表現型とその発症メカニズムについて
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶原 健、水野由美、岸美裕子、田丸俊輔、佐藤智美、石原 理
2. 発表標題 子宮内膜間質細胞が脱落膜化する際に産生される中鎖脂肪酸の同定とその役割
3. 学会等名 第23回日本生殖内分泌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栃木秀乃、齋藤良平、梶原 健、石原 理
2. 発表標題 子宮内膜脱落膜細胞で産生される中鎖脂肪酸の網羅的解析
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶原 健、木村真智子、石原 理
2. 発表標題 miR-542-3p の過剰発現は子宮内膜症性間質細胞の脱落膜化機構を抑制する
3. 学会等名 第69 回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤良平、梶原 健、水野由美、石原 理
2. 発表標題 miR-542-3pの過剰発現は子宮内膜症性間質細胞の脱落膜化機構を抑制する
3. 学会等名 第49回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 産婦人科疾患の罹患可能性の判定を補助する方法、産婦人科疾患の罹患可能性を診断するためのデータを収集する方法、及び産婦人科疾患の診断用キット	発明者 水野由美、梶原健、 田丸俊輔、三井智 美、栗崎智美	権利者 埼玉医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-152478	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	石原 理  (Ishihara Osamu)  (70176212)	埼玉医科大学・医学部・教授   (32409)	
連携 研究者	水野 由美  (Mizuno Yumi)  (20584014)	埼玉医科大学・医学部・客員講師   (32409)	