

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09304

研究課題名（和文）中隔子宮における流産メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of possible mechanism of miscarriage in women with septate uterus

研究代表者

竹下 俊行 (Takeshita, Toshiyuki)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：60188175

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：先天性子宮形態異常の一つである中隔子宮は流産や不育症との関連が指摘されているが、そのメカニズムは不明である。そこで本研究では、免疫学的解析手法を用いて中隔子宮と不育症、流産発症のメカニズム解明を試みた。子宮鏡下経頸管の中隔切除術により採取した子宮中隔部の組織を細断、これをフローサイトメトリーおよび免疫染色法を用いて免疫細胞群の解析を行った。その結果、子宮中隔部では正常子宮間質部に比べ、炎症性サイトカイン産生能を有するCD141+ 樹状細胞（DC）の割合が有意に低いことが明らかになった。中隔部ではケモカイン産生能が低く、CD141+ DCの集積不全が引き起こされ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

中隔子宮は流産や不育症の原因になると言われているが、そのメカニズムは明らかになっていなかった。本研究では免疫学的なアプローチによりそのメカニズムの一端を解明することができた。近年、適切な炎症は着床、妊娠初期に必要な事が報告されている。中隔子宮に対する手術療法の意義も明らかでなかったが、炎症性CD141+ DCsの欠如した中隔部を切除することは、本来起こるべき適切な炎症反応が起こらない部位を切除するという意味において、手術療法の妥当性を裏付けることになった。

研究成果の概要（英文）：Septate uterus is associated with spontaneous abortion. However, immunological mechanisms for miscarriage in patients with septate uterus remain completely unknown. Immune cells, dendritic cells (DCs), macrophages, T cells, natural killer cells, invariant natural killer cells, and chemokine receptors in US and uterine myometrium tissue (UMT) were analyzed using flow cytometry and immunohistochemical staining. The percentage of CD141+ DCs in US was significantly lower than that in UMT. Both US and UMT showed CCR1 and CCR5 expression on CD141+ DCs; however, the production of chemokines, MIP-1, RANTES, and MIP-3 was abundant in UMT-obtained viable cells. The accumulation of CD141+ DCs was lower in US than that in UMT. This phenomenon may be caused by low chemokine productions in US. Our findings support the benefit of surgical intervention for septate uterus—that is, the elimination of inappropriate implantation sites.

研究分野：産婦人科 不育症

キーワード：中隔子宮 不育症 流産 樹状細胞 ケモカイン ケモカインレセプター 子宮鏡下中隔切除術

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

#### ①不育症のリスク因子としての中隔子宮

子宮形態異常のひとつである中隔子宮は、不育症の主要なリスク因子の一つであることが知られている。内腔に「中隔」という物理的障害物、これにより子宮内の環境が妊娠継続に不向きになるということは直感的には理解しやすい。しかしながら、それでは「なぜ」流産が起こりやすいのか、そのメカニズムについては意外にもよくわかっていない。このように流産発症メカニズムが不明であるにも関わらず、実臨床では中隔子宮以外に不育症の明らかなリスク因子が認められない場合、手術を選択する事が多い。

#### ②中隔子宮における流産発症についてのこれまでの報告

報告は少ないものの、中隔子宮の流産原因に関していくつかの仮説が提唱されている。

- 1) 子宮内腔の狭小化
- 2) 頸管無力症の合併
- 3) 中隔部での不適切な血管分布

このうち、3)の仮説が最も広く受け入れられている。しかしながら中隔部の結合組織は血管分布に乏しく、中隔を覆う内膜のエストロゲン反応性が悪い（Candiani GB et al.(1983), Fedele L. et al.(1996)）とする報告がある一方、中隔部にはむしろ結合組織が少なく相対的に筋組織や血管が多くなり脱落膜化が阻害されるとの報告もある（Dabirashrafi H et al.(1995)）。Raga らは、中隔部を覆う子宮内膜には血管増殖因子の発現が少ないことを近年報告しており（Raga F. et al:Fertil Steril 2009）諸説混在しているのが現状である。

このように中隔子宮における流産メカニズムについては一定の見解がなく、また特に免疫学的考察に関する研究は殆どなされていない。

#### ③中隔子宮の外科的アプローチ

中隔子宮の外科的治療は、古くは開腹による Jones & Jones 手術などが行われてきたが、最近では子宮鏡下中隔切除術（TCR）が行われている。TCR にも中隔の中央部を切開する方法や中隔を切除する方法などがあり、術式は施設によって異なっている。多くの報告では手術療法の有用性が示されているが、無手術対照群を置いた RCT は行われておらず、今後も倫理的問題から RCT は困難であると予想される。そこで、手術症例を詳細に観察することにより最適な術式を探索することが求められる。

### 2. 研究の目的

そこで我々は、子宮中隔部に含まれる免疫細胞の解析を行い、流産発症の原因を解明することを目的とした。これにより、実臨床での手術療法の意義、有用性を明確にすることが可能になると考える。さらに手術療法におけるその適応、手法を仔細に解析することにより、中隔子宮を有する患者によりエビデンスに基づいた、適切な医療を提供することも目標とする。

### 3. 研究の方法

#### ①子宮中隔部に存在する各免疫細胞解析（*in vivo* 解析）

中隔部に存在する免疫細胞を同定するため、子宮鏡下中隔切除術により採取した中隔部の組織を細断、これら組織中の樹状細胞 (DCs)、マクロファージ、T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞など各免疫細胞をフローサイトメトリー (FACS) により同定、解析した (図 1)。さらに免疫組織染色により、これら免疫細胞の分布を解析した。なお子宮筋腫の適応で子宮全摘となった、肉眼的に正常と思われる正常子宮内膜/筋層 (間質部) を比較検討の対象とした。本研究における臨床検体では術前に中隔子宮手術では dienogest が、子宮筋腫手術では GnRHa が使用されており内膜は菲薄化していることが予想され、内膜の影響は限定されていると考えている。

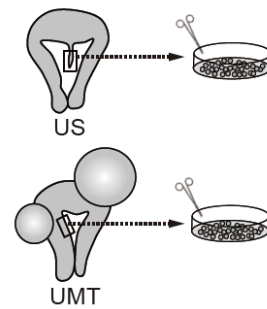


図1. ヒト検体サンプリング。子宮鏡下中隔切除術により採取した中隔部 (Uterine septa: US) の組織を細断、細胞を分離してFACS解析した。また子宮筋腫の適応で子宮全摘となった、肉眼的に正常と思われる正常子宮内膜/筋層 (間質部, uterine myometrium tissue: UMT) を比較検討の対象とした

### ②子宮中隔部および正常間質部から分離した細胞の培養実験 (ex vivo 実験)

手術により得られた子宮中隔部および正常間質部を細断し生細胞を分離、これを 24 時間培養し細胞内ケモカイン産生 (MIP-1 $\alpha$ 、RANTES、MIP-3 $\beta$ ) を測定を行った。

### ③Dienogest の影響 (ex vivo 実験)

中隔子宮の術前治療として、全例でホルモン製剤である dienogest (ディナゲスト) が使用されている。この影響を調べるため、上記②の培養系に dienogest を添加し、ケモカイン産生への影響の有無を検討した。

## 4. 研究成果

### ①正常子宮間質部に比較して、子宮中隔部では CD141 陽性樹状細胞の集積が低い

子宮中隔部および正常間質部から免疫細胞を分離、各免疫細胞の分画を検討したところ、正常子宮間質部に比べ、中隔部では CD141 陽性 DCs の集積が有意に低いことが認められた (図 1)。これは免疫組織染色でも確認された (図 2)。この CD141 陽性 DCs は炎症性サイトカインである IL-12 産生や cross presentation 能力を有する、いわゆる Th1 傾向をもつ DC 亜群として知られている。すなわち子宮中隔部では、炎症を惹起し得る炎症性の樹状細胞が非常に少ないことが示された。

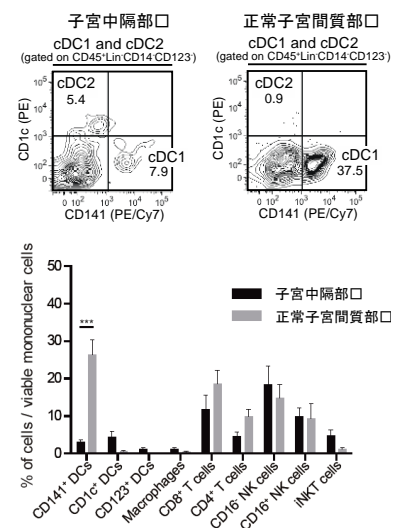


図2. 子宮中隔部 (US) と正常子宮間質部 (UMT) の免疫細胞解析 (FACS)。 □

### ②正常子宮間質部と子宮中隔部では、ケモカインレセプター CCR1、CCR5 の発現は同等である

上記の子宮中隔部における CD141 陽性樹状細胞の低集積の原因を検索するため、この CD141 陽性樹状細胞上のケモカイン受容体の検索をおこなった。するとケモカイン CCR1 や CCR5 の発現は子宮中隔部、正常間質部ともに同等に認められた (図

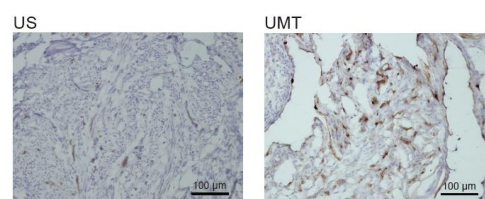


図3. 子宮中隔部 (US) と正常子宮間質部 (UMT) の免疫組織染色。■ 茶色: CD141 陽性細胞。 □

4)。ただし CCR7 の発現は両者ともに認めなかった。

### ③正常子宮間質部に比較して、子宮中隔部ではケモカイン産生 (MIP-1 $\alpha$ 、RANTES、MIP-3 $\beta$ ) が低い

上記のごとく、CD141 陽性樹状細胞上に発現するケモカインレセプターには子宮中隔部と正常間質部に有意な差を認めなかった。そこで CCR1、CCR5 や CCR7 のリガンドはケモカイン MIP-1 $\alpha$ 、RANTES、MIP-3 $\beta$  である事を勘案し、それぞれの組織から生細胞を分離し 24 時間培養後のこれらケモカイン産生を検討したところ、子宮中隔部からのいずれのケモカイン産生は、正常子宮間質部に比して有意に低いものとなった (図 5、MIP-1 $\alpha$  に関しては有意差はないものの低下傾向あり)。すなわち正常子宮間質部に比して子宮中隔部ではケモカイン産生が低く、CD141 陽性樹状細胞が集積しにくい環境である可能性が示唆された。

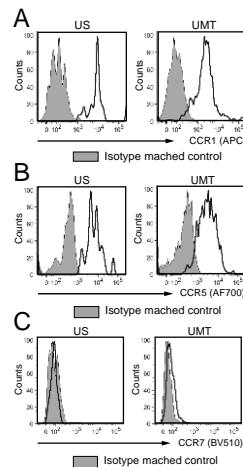


図4. 子宮中隔部 (US) と正常子宮間質部 (UMT) の CD141 陽性細胞上のケモカインレセプター発現。□

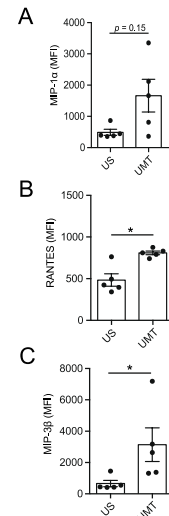


図5. 正常子宮間質部 (UMT) から分離した生細胞の 24 時間培養による細胞内ケモカイン産生。

また CD141 陽性細胞上には CCR7 の発現は認めなかったものの、そのリガンドである MIP-3 $\beta$  産生は正常子宮間質部において有意に高かった (図 5C)。一般に CCR7 は炎症を惹起する M1 タイプマクロファージマーカーとしても知られている。我々は、この MIP-3 の産生は、着床時に必要な炎症を惹起する M1 マクロファージの遊走に関与するのではないかと考えている。

### ④Dienogest は培養系におけるケモカイン産生に影響を及ぼさない

本研究で行われた TCR では、全例で術前でホルモン製剤である dienogest が使用されている。この影響を調べるため、上記の培養系に dienogest を添加し同じく各ケモカイン産生を検討した。その結果、dienogest の有無、濃度に関わらずケモカイン産生能は変化せず、本研究で行ったタイムスケールの範囲では dienogest はケモカイン産生に寄与しないことが認められた (図 6)。

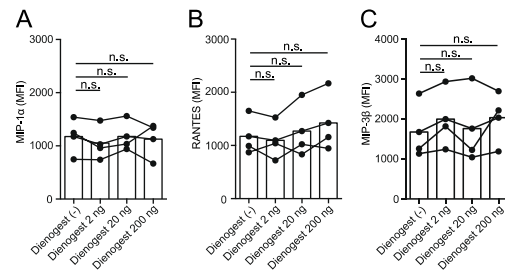


図6. 正常子宮間質部 (UMT) から分離した生細胞の、dienogest との 24 時間共培養による細胞内ケモカイン産生の変化。

### ⑤本研究より得られた知見

以上の結果より、子宮中隔部ではケモカイン産生低下に伴う炎症性 CD141 陽性 DCs の低集積が生じていることが示唆された。さてこの結果により、中隔子宮と流産発症はどのように結びつけられるのであろうか？

一般に、妊娠中の母体免疫寛容には炎症性サイトカインの抑制、Th1/Th2 バランスの Th2 偏向、制御性 T 細胞の機能亢進といった抗炎症作用が必要であり、過剰な炎症環境は流産や早産を引き起こすことが知られている。実際、流産症例では Th1 や Th17 亢進による過剰炎症は流産を引き起こすと考えられている。しかしながら近年、着床や母体側への絨毛細胞浸潤といった妊娠初期のイベントにはある程度の炎症、すなわち「抗炎症作用」のみではなく「適切な炎症」も必要と考えられるようになってきた (Yong-Hong Zhang et al. *Front. Immunol.* 2017, Nava Dekel et

al. *Am J. Reprod. Immunol.* 2014)。すなわち過剰な炎症は流産を始めとする妊娠合併症を引き起こすものの、妊娠の成立、維持には適切な時期に適切な程度の炎症も必要であると考えられる。そもそも排卵、着床、そして分娩のプロセスには適切な炎症が必要であり、特に妊娠という短期間でこのような絶妙なバランス変化が要求される。

興味深いことに、実際ヒト子宮中隔部で着床した胚をエコーにて観測したところ、有意に流産が多い事も示されている (Luigi Fedele, et al. *AJR Am J Roentgenol.* 1989)。このような背景により、我々の研究で得られた子宮中隔部における CD141 陽性 DCs の低集積は、子宮中隔部では適切な炎症を惹起できず流産発症の「場」になる可能性があるかと推察している。手術療法はこのような妊娠継続に不適切な場を取り除く事になり、今回の我々の研究結果は手術療法の意義を支持するものになり得ると考えている。

なお、本研究期間後、現在手術療法における適応、手技、臨床的データも蓄積しており、論文発表の準備も行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Negishi Y1,2, Kato M2, Ono S2, Kuwabara Y2, Morita R1, Takahashi H1, Takeshita T2.	4. 巻 e13241
2. 論文標題 Distribution of dendritic cells in the septate uterus: An immunological perspective.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Reprod Immunol.	6. 最初と最後の頁 e13241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/aji.13241	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 Ono Shuichi, Kuwabara Yoshimitsu, Matsuda Shigeru, Yonezawa Mirei, Watanabe Kenichiro, Akira Shigeo, Takeshita Toshiyuki	4. 巻 45
2. 論文標題 Is hysteroscopic metroplasty using the incision method for septate uterus a risk factor for adverse obstetric outcomes?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 634 ~ 639
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.13884	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4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Toshiyuki Takeshita, M.D., Ph.D., Shuichi Ono, M.D., Ph.D.,
2. 発表標題 Is hysteroscopic metroplasty using the incision method for septate uterus a risk factor for adverse obstetric outcomes?
3. 学会等名 ESGE_28th Annual Congress（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiyuki Takeshita1, Ph.D. Yasuyuki Negishi 1,2, Masahiko Kato1, Shuichi Ono1, Hidemi Takahashi
2. 発表標題 Immunological aspect of uterine septum in women with recurrent pregnancy loss
3. 学会等名 ISIR 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤雅彦、第33回日本生殖免疫学会、2018/11/24-25, 国内.
2. 発表標題 中隔子宮における免疫細胞の分布～免疫学的知見よりみた中隔子宮と不育症の関係
3. 学会等名 第30回日本生殖免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshiyuki Takeshita
2. 発表標題 18.Hysteroscopic Metroplasty for Septate Uterus
3. 学会等名 Asia-Pacific Association for Gynecologic Endoscopy and Minimally Invasive Therapy(19th) 2018/11 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 竹下 俊行、藤井 知行、山田 秀人	4. 発行年 2020年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 248
3. 書名 不育症	

〔産業財産権〕

〔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	桑原 慶充  (Kuwabara yoshimitsu)  (40373013)	日本医科大学・医学部・准教授    (32666)	

6. 研究組織（つづき）

	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	根岸 靖幸  (Negishi Yasuyuki)  (50644580)	日本医科大学・医学部・准教授    (32666)	
研究分担者	小野 修一  (Ono Shuichi)  (80465301)	日本医科大学・医学部・講師    (32666)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関