

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19618

研究課題名(和文)子宮内膜における幹細胞劣化による生物学的・機能的細胞老化誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of mechanism of stem cell aging in endometrium

研究代表者

加藤 聖子(kato, kiyoko)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：10253527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,600,000円

研究成果の概要(和文)：若年と加齢マウス子宮よりRNAを抽出し、RNAシーケンス法で加齢に伴い発現が変化した各遺伝子の発現を網羅的に解析し、炎症に関連する遺伝子を3つ同定した。これらはヒト子宮内膜においても加齢に伴い発現が増加した。また着床不成功例・成功例の子宮内膜から樹立したヒト子宮内膜初代培養細胞を用いて幹細胞や老化細胞の比率や各サイトカインの機能を解析し、着床不成功例では成功例に比べて細胞老化の誘導、細胞周期でG0/G1期の増加、CDKN2A・CDKN1A遺伝子の発現増加、炎症性サイトカインの発現増加、幹細胞マーカーの発現抑制が認められ、子宮内膜の生物学的あるいは機能的老化に炎症が関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢とともに不妊症の数が増加してくる。多くの場合、卵の老化が原因とされているが、若い年代でも不妊患者は一定の割合で存在し着床障害の関与が示唆されるが、その詳細は不明である。本研究は、マウスやヒトでの子宮内膜を用いて、加齢による生物学的老化と細胞老化誘導という機能的老化の面から解析したところ、いくつかの共通した炎症性サイトカインの関与がみとめられた。この結果を生殖医療の研究・治療応用につなげていくことは学術的および社会的にも意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Gene expression in uteri obtained from C57BL/6 mice at 5, 8 and 60-75 (aged) weeks of age, was analyzed in duplicate by RNA-sequencing and compared. Three genes expressing the pro-inflammatory cytokines were identified as markers for uterine aging. Protein expression levels of these genes in their 40's were significantly higher than those for patients in their 20's. Human endometrial stromal cells (hESCs) were isolated from endometrial tissues sampled at oocyte retrieval during the proliferative phase from women undergoing infertility treatment. hESCs from non-receptive patients exhibited significantly higher ( $p < 0.01$ ) proportions of senescent cells, mRNA expressions of CDKN2A and CDKN1A transcripts ( $p < 0.01$ ), and expressions of genes encoding the senescence-associated secretory phenotype ( $p < 0.05$ ). hESCs from receptive patients had significantly higher ( $p < 0.01$ ) mRNA expressions of ABCG2 and ALDH1A1 transcripts.

研究分野：産婦人科 生殖内分泌

キーワード：子宮内膜 細胞老化 幹細胞 不妊症 炎症 サイトカイン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 子宮内膜は、受精卵の着床の場である。年齢が上がるにつれ、不妊や流産の数が増加してくる。この原因は卵の老化で説明されているが、生殖医療の現場では、若い年齢層でも卵の質は悪くないのに、妊娠に至らない原因不明のケースに遭遇し、子宮内膜の機能不全による着床環境の障害が疑われる。着床は胚盤胞の外側を構成する栄養外胚葉が子宮内膜上皮に接着し、分化した栄養膜細胞が子宮内膜間質に浸潤していく現象で、サイトカインネットワーク、ホルモン、各種 MMP、増殖因子や免疫細胞などの関与が報告されている。

(2) 我々は Hoechst33342 の取り込みの低い分画の細胞 (Side-population: SP 細胞) を用いて正常子宮内膜に SP 細胞が存在し、幹細胞様の性質を示すこと (Hum Reprod. 2007)、子宮内膜幹細胞には ER が高発現していることを明らかにした (J Stem Cell Res Ther 2012)。また、Estrogen Receptor (ER) の機能が阻害されると、p53-p21 経路の作用により細胞老化が誘導されることを報告している (Oncogene 1997, J Biol Chem 2002)。最近、老化細胞が、炎症性サイトカインなどを分泌し、癌をはじめとする種々の疾患に関与することが報告されている (Senescence-associated secretory phenotype : SASP)。我々はエストロゲン低下に伴う加齢による子宮内膜幹細胞の枯渇・劣化・老化およびその細胞からの分泌因子が、胚や絨毛細胞の浸潤能に影響を与え着床不全を引き起こし不妊症の原因となっている可能性を考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、子宮内膜幹細胞維持機構と周囲微小環境 (ニッチ) の破綻による幹細胞の劣化が細胞老化を誘導し、誘導された細胞老化には加齢による生物学的老化と年齢には依存しない機能的老化があると考え、着床不全の病態を子宮内膜の細胞老化に伴う絨毛細胞の子宮内膜への侵入阻害という視点でとらえ、着床における子宮内膜の果たす役割をマウスモデルとヒト子宮内膜を用いて解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) マウスモデルを用いた解析 (生物学的老化)

① 本研究では、マウス子宮より子宮内膜腺上皮・間質を分離し、それぞれの組織から初代培養細胞を樹立し、加齢に伴い発現が変化した各遺伝子の発現を解析するとともに幹細胞の特性や老化細胞出現率を解析し重要な遺伝子を絞り込んでいく。

それぞれの初代培養細胞に老化に強く関与することが示された遺伝子を導入、あるいは抑制し、生物学的特性の変化を解析し、最も重要な遺伝子・pathway を同定する。

#### 2) ヒト臨床検体を用いた解析 (機能的老化)

① 着床不成功例・成功例の子宮内膜から樹立したヒト子宮内膜初代培養細胞を用いて幹細胞や老化細胞の比率や各サイトカインの機能の解析を進めるとともに、マウスにおいて加齢により発現が変化する遺伝子と比較し共通の遺伝子・pathway を同定する。

上記で同定された遺伝子・サイトカインの発現を臨床検体 (子宮内膜・血液) を用いて解析し、最も着床率と関連のあるマーカーを同定する。ヒト絨毛細胞株を同定された各種サイトカイン存在下で培養し増殖能・浸潤能・遊走能を解析し、至適培養条件を検討し受精卵培養法の開発につなげる。

### 4. 研究成果

#### (1) マウスモデルを用いた解析 (生物学的老化)

若年マウスと老齢マウスの子宮を比較し、網羅的解析により老化のマーカーと成り得る遺伝子を抽出し、ヒト子宮内膜を用いて加齢により発現が変化する遺伝子を同定した。

5 週齢、8 週齢、60 週齢を超える野生型マウスから子宮を摘出し、total RNA を抽出し RNA-seq で網羅的に解析した。抽出した発現変動遺伝子について、検証実験として 20 歳代 10 例、40 歳代 10 例のヒト子宮のサンプルを用いて、抽出した発現変動遺伝子の蛋白発現について組織免疫化学染色を用いて定量的に解析した。定量的解析には ImageJ およびそのプラグイン IHC profiler の clour deconvolution を用いて輝度値を比較した。マウス子宮から抽出した total RNA の RNA-seq 解析により、代表的な発現変動遺伝子を 3 つ同定した。この全ての遺伝子群が炎症に関連していた。また、これらの遺伝子がコードする全てのタンパクがヒトの 20 歳代に比べ 40 歳代での子宮内膜上皮に発現が亢進しており、マウスとヒトで加齢により増加していく遺伝子に共通性がみられた。また、パスウェイ解析では加齢により複数の細胞周期・細胞分裂に関連する経路が抑制されていた。以上の結果は現在論文投稿し revise 中である。

#### (2) ヒト臨床検体を用いた解析 (機能的老化)

不妊治療における採卵時 (増殖期) に採取したヒト子宮内膜細胞から子宮内膜間質細胞を分離し初代培養した細胞を用いた。胚移植後に妊娠反応が陽性であった症例 (妊娠群) と陰性であった症例 (非妊娠群) において複数の細胞老化誘導のマーカー (SA-β-Gal 染色, 細胞周期解析, 遺伝子発現, SASP 因子) を解析した。

妊娠群と非妊娠群の年齢を含めた患者背景は同等であったが、非妊娠群の子宮内膜間質細胞では妊娠群と比較して SA-β-Gal の発現が亢進しており細胞老化が誘導されていることを明らか

にした (図 1)。

細胞周期の解析では G0/G1 期の集積、S 期の減少がみられた。培養細胞の real-time PCR による遺伝子発現解析により非妊娠群の子宮内膜間質細胞では妊娠群と比較して細胞老化に關与する *CDKN1A*(p21)と *CDKN2A*(p16)の発現の有意な上昇がみられた (図 2)。

また、サイトカイン遺伝子発現を解析すると、*IL-6*、*CXCL8*、*IL-17A*、*CCL2*などの炎症性サイトカイン遺伝子発現の上昇がみられた (図 3)。さらに組織幹細胞マーカーの *ABCG2* および *ALDH1* の発現が低下がみられ (図 4)、子宮内膜幹細胞の減少が示唆された。

図 1

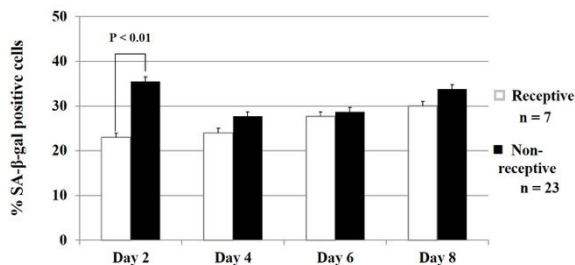


図 2

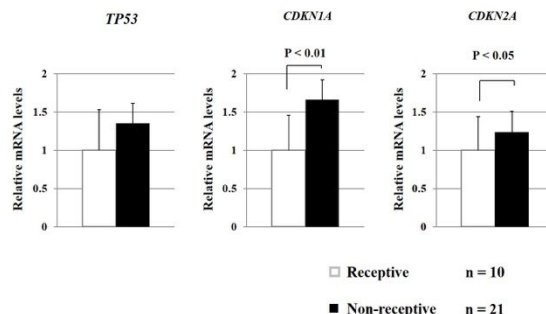


図 3

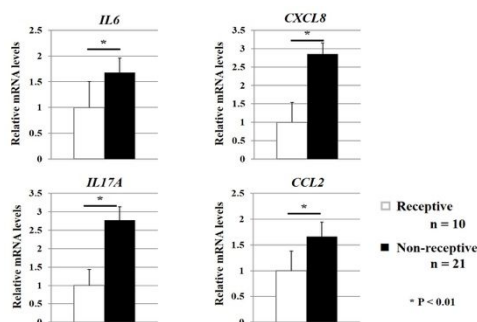
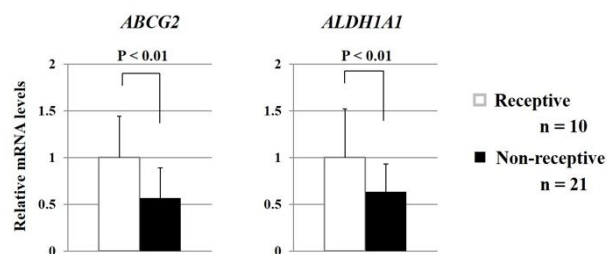


図 4



以上より、非妊娠群の子宮内膜間質細胞では妊娠群と比較して炎症性サイトカインを分泌し SASP を介して、細胞老化を誘導し、幹細胞の減少を起こしていることが示された。本研究の結果は *Biology of Reproduction* に投稿し採択され、in press の状態である。

< 引用文献 >

Hiroyuki Tomari, Teruhiko Kawamura, Kazuo Asanoma, Katsuko Egashira, Keiko Kawamura, Ko Honjo, Yumi Nagata and Kiyoko Kato. Contribution of senescence in human endometrial stromal cells during proliferative phase to embryo receptivity *Biology of Reproduction*, 2020, 1–10 doi:10.1093/biolre/ioaa044

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomari Hiroyuki, Kawamura Teruhiko, Asanoma Kazuo, Egashira Katsuko, Kawamura Keiko, Honjo Ko, Nagata Yumi, Kato Kiyoko	4. 巻 -
2. 論文標題 Contribution of senescence in human endometrial stromal cells during proliferative phase to embryo receptivity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	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） 10.1093/biolre/ioaa044	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 Ohmaru-Nakanishi T, Asanoma K, Fujikawa M, Fujita Y, Yagi H, Onoyama I, Hidaka N, Sonoda K, Kato K	4. 巻 188(3)
2. 論文標題 Fibrosis in Preeclamptic Placentas Is Associated with Stromal Fibroblasts Activated by the Transforming Growth Factor Beta 1 (TGFB1) Signaling Pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Pathol	6. 最初と最後の頁 683-695
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2017.11.008.	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 Egashira K, Hiasa K, Yokota N, Kawamura T, Matsushita T, Okugawa K, Yahata H, Son-oda K, Kato K	4. 巻 97(11)
2. 論文標題 Infertility after abdominal trachelectomy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Obstet Gynecol Scand	6. 最初と最後の頁 1358-1364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/aogs.13429.	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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤 聖子	
2. 発表標題 女性の一生を診る	
3. 学会等名 第34回日本女性医学学会学術集会（招待講演）	
4. 発表年 2019年	

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----