

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591894
 研究課題名（和文）末梢血免疫細胞の胚着床促進機構の分子生物学的解析とそれを応用した不妊治療法
 研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanisms and further development of a new therapy for infertile patients with repeated implantation failure using autologous peripheral blood mononuclear cells
 研究代表者
 吉岡 信也（YOSHIOKA SHINYA）
 京都大学・医学研究科・非常勤講師
 研究者番号：90333575

研究成果の概要：

本研究により子宮内膜分化不全が原因となる着床障害の患者に対して、従来の内分泌学的なアプローチとは別に、患者本人の末梢血免疫細胞を用いた新しい治療法が開発され、実用化された。また本研究は、原因不明の着床障害患者に対する免疫機能異常を含んだ病態解明とその診断法および治療法の開発に新しい展開を導いた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：免疫細胞療法、不妊症、体外受精、着床不全、子宮内膜

1. 研究開始当初の背景

ヒト体外受精胚移植法の確立に伴ってしばらくは目覚ましい発展をとげてきた不妊症治療であるが、近年においては妊娠生産率の改善をみない状態が長く続いている。このように停滞の続く体外受精胚移植法の妊娠率を向上させる試みとして、胚培養技術の向上に伴い blastocyst 移植が多くの施設で施行されるようになり、一定の成果が挙げたが、妊娠率の飛躍的な改善にはつながらなかった。このような経緯から、形態良好胚を繰り返して移植しても妊娠成立をみない、いわゆる「着床障害」が大きくクローズアップされる

ようになり、妊娠率の向上を妨げている一番大きな問題点として認識されるようになった。

このような着床障害を原因とする不妊患者に対しては、古くから内分泌学的治療が試みられてきたが、残念ながらその大半は内分泌学的治療に対して子宮内膜が不応性であり、そのような症例では有効な診断法と治療法がなく患者に長期の精神的・肉体的・経済的な苦痛を強いているのが現状であり、ヒト着床の詳細な機構の解明とそれに基づいた新しい治療法の開発が急務とされる。その治療法の開発には従来のホルモン作用を介する治療法とは異なった全く新しい観点から

のアプローチが不可欠であると考えられた。

2. 研究の目的

一般に妊娠の成立・維持に対する免疫系の役割に関しては、胎児を拒絶することなく子宮内寄生を寛容する機序に注目が集められていたが、本研究担当者らは、免疫系細胞、特に末梢血免疫系細胞がヒト妊娠黄体の分化と機能維持にむしろ積極的に関与していることを見いだしてきた。着床現象においても、免疫系細胞は胚の存在を認識して機能を変え、子宮内膜の分化や胚の浸潤に対して促進的な役割を果たしていることを明らかにしてきた。

そこで本研究では基礎的研究の成果に基づき新しい着床不全症例に対する治療法を開発することを目的として計画された。

3. 研究の方法

本研究は、胚からのシグナル（妊娠成立の情報）を得た末梢血中の免疫細胞が、子宮内膜および胚発生に作用して胚着床に有利な環境を構築するという概念に基づいている。

まず基礎的な研究としては (1) どのような因子によって自己リンパ球に効率よく胚着床促進作用が誘導できるのか、(2) どの細胞成分がこの促進作用を担っているのか、(3) 胚に対する着床促進作用は免疫細胞自身が産生するどのような液性因子によってもたらされるのか、(4) 自己リンパ球によって子宮内膜上皮および間質細胞にどのような分化誘導がもたらされるのか、(5) HCG の免疫細胞に対する作用において働くレクチン-グリカン系の具体的な分子は何か、(6) 胚の子宮内膜接着および上皮間侵入に関与する内膜上皮に発現している接着および反発誘導因子に対して、免疫細胞はどのように作用するのか、について検討した。

また臨床的な研究としては京都大学倫理委員会の承認の下、着床不全症例に対する新たな治療法として、自己のリンパ球を採卵時に分離し、2日間胚からのシグナルであるhCG添加下に培養後、これを胚盤胞移植の3日前に子宮内膜に局所投与して子宮内膜を着床可能な状態へ誘導するプロトコルを開発し、着床不全患者に対して試みた。

4. 研究成果

上記の治療の結果、39歳以下でかつ形態良好な胚盤胞を移植できた症例について検討すると、本研究で開発した自己リンパ球を用いた新しい方法により妊娠率、着床率ともに改善した。

また卵巢過剰刺激症候群発症の新しいメ

カニズムとして HCG に反応した免疫細胞が VEGF を産生し、病態を悪化させている可能性を初めて提唱することとなった。

これらの自己リンパ球を用いた治療法は臨床応用で有意な成果を挙げることが示されたが、現在この方法を応用して、ウシの体外受精においても画期的な妊娠率の向上が示されている。今後農学の分野においても詳しく検討されることが期待される。

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 14 件)

① Takao Y, Fujiwara H, Yoshioka S, Fujii S, Ueda M. Monoamine oxidase A is highly expressed by the human corpus luteum of pregnancy. *Reproduction* 136: 367-375, 2008 査読有り

② Furukawa K, Fujiwara H, Sato Y, Zeng BX, Fujii H, Yoshioka S, Nishi E, Nishio T. Platelet is a novel regulator for neovascularization and luteinization during human corpus luteum formation *Endocrinology* 148: 3056-3064, 2007 査読有り

③ Kosaka K, Fujiwara H, Yoshioka S, Fujii S. Vascular endothelial growth factor production by circulating immune cells is elevated in ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 22: 647-1651, 2007 査読有り

④ Zeng BX, Fujiwara H, Sato Y, Nishioka Y, Yamada S, Yoshioka S, Ueda M, Higuchi T, Fujii S. Integrin $\alpha 5$ is involved in fibronectin-induced human extravillous trophoblast invasion. *J Reprod Immunol* 73:1-10, 2007 査読有り

⑤ Fujiwara H. Membrane-bound peptidases regulate human extravillous trophoblast invasion. *Trophoblast Res* 21:S70-S75, 2007 査読有り

⑥ Maruyama M, Hattori A, Goto Y, Ueda M, Maeda M, Fujiwara H, Tsujimoto M. Laeverin/aminopeptidase Q, a novel bestatin-sensitive leucine aminopeptidase belonging to the M1 family of

aminopeptidases. J Biol Chem 282: 20088-20096, 2007 査読有り

⑦ Nishio K, Kawaguchi S, Fujiwara H. Emergence of highly neurofilament-immunoreactive zipper-like axon segments at the transection site in scalpel-cordotomized adult rats. Neuroscience 155: 90-103, 2008 査読有り

⑧ 藤井 治子、藤原 浩
胚着床による制御機構；細胞間に反発力を誘導する Eph-ephrin シグナルの関与
Hormone Frontier in Gynecology 14 : 2-5、2007 査読無し

⑨ 藤原 浩 免疫細胞を用いた着床率向上の試み 日本産科婦人科学会雑誌 60 巻 N399-402、2008 査読無し

⑩ 藤原 浩、高尾由美、小西郁生 免疫細胞を用いた着床率の向上 産婦人科治療 98 巻 140-146、2009 査読無し

⑪ 藤原 浩 血液細胞を介した新しい胚-母体間の相互応答機構とそれを応用した着床不全患者に対する治療法の開発 日本産科婦人科・新生児血液学会誌 18 巻 115-120、2009 査読無し

⑫ Fujiwara H. Do circulating blood cells contribute to maternal tissue remodeling and embryo-maternal cross-talk around the implantation period? Mol Hum Reprod 15:335-343, 2009 査読有り

⑬ Fujiwara H, Araki Y, Toshimori K. Is the zona pellucida an intrinsic source of signals activating maternal recognition of the developing mammalian embryo? J Reprod Immunol 2009, in press. 査読有り

⑭ Ideta A, Sakai S, Nakamura Y, Urakawa M, Hayama K, Tsuchiya K, Fujiwara H, Aoyagi Y. Administration of bovine peripheral blood mononuclear cells into the uterine horn improve pregnancy rate following embryo transplantation. Ani Reprod Sci 2009, in press. 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

① Fujiwara H. Immune cell contribution to systemic crosstalk between mother and embryo around implantation period. The 1st International workshop on Reproductive Biology: "Recent Progresses in Reproductive Biology" SKLAB 2008 平成 20 年 10 月 10 日 Beijing, China

② 藤原 浩 周産期免疫、常態と病態、着床誘導機構について 日本産婦人科・新生児血液学会 第 18 回学術集会平成 20 年 6 月 28 日 福岡

③ 藤原 浩 難治性着床不全、不育症に対する治療の試み：自己血液細胞の応用 日本生殖免疫学会 第 23 回学術集会平成 20 年 12 月 6 日 富山

④ Fujiwara H. Systemic crosstalk between mother and embryo around implantation period by immune and endocrine systems. The 112nd Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists 2007.3.27 (Osaka) (日米合同シンポジウム)

⑤ 藤原 浩 細胞膜結合型ペプチダーゼによるヒト絨毛外栄養膜細胞浸潤の制御機構 第 12 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会学術講演会シンポジウム 平成 19 年 8 月 4 日 大阪千里

⑥ 藤原 浩 着床機構に関する Overview 第 3 回生殖再生医学会シンポジウム 着床に関する理論と実践 平成 20 年 3 月 30 日 東京

⑦ 藤原 浩 免疫細胞を用いた着床率向上の試み 第 60 回日本産科婦人科学会学術集会 卒後研修プログラム 3. ART の最近の話題 平成 20 年 4 月 14 日 横浜

[図書] (計 2 件)

① 藤原 浩：排卵・月経の機序 産婦人科学テキスト 倉智博久、吉村泰典編、中外医学社、2007 (分担執筆)

② 藤原 浩：月経困難症の取り扱い スーパーローテート・マニュアル 朝倉 啓文、小西 郁生、末岡 浩、田中 忠夫、堤 治編、金原出版、52-55、2007 (分担執筆)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

特許登録番号 2004-326314

名称 絨毛外栄養膜細胞特異的蛋白質

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 信也 (YOSHIOKA SHINYA)
京都大学・医学研究科・非常勤講師
研究者番号：90333575

(2) 研究分担者

藤原 浩 (FUJIWARA HIROSHI)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：30252456

西 英一郎 (NISHI EIICHIRO)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：30362528

高尾 由美 (TAKAO YUMI)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：20447957