

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09762

研究課題名(和文)着床率向上のための子宮内膜への有効な機械的刺激方法の確立と機序解明

研究課題名(英文) Establishment and of effective mechanical stimulation of the endometrium to improve implantation based on elucidation of the mechanism

研究代表者

内田 浩(Uchida, Hiroshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：90286534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：体外受精における不成功例の7割以上は胚移植後の妊娠不成立による。そのため、成功率向上を自途に移植前の意図的子宮内操作が行われているものの、その効果の機序は不明であった。これまでは擦過による破壊に対する即応的な修復作用により局所的な代謝が上昇することで子宮内膜の受容能が高まると想像されていたが、今回の解析により、胚の接着を起点とした子宮内膜上皮細胞(一部間質細胞)の細胞死によって漏出した同細胞の内溶液により、子宮内膜上皮細胞の胚接着能、進展能を高めるとともに、子宮内膜上皮、間質双方の胚侵入ルートを修復するような求心性の細胞運動を促進させ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

生殖補助医療において、妊娠率向上のために胚移植前に実施される子宮内膜擦過術は、その機序は不明であった。これまでは擦過による破壊に対する即応的な修復作用により局所的な代謝が上昇することで子宮内膜の受容能が高まると想像されていたが、本研究により、その機序の一旦は胚接着を合図に始まる子宮内膜細胞の細胞死によって表出する細胞内溶液が胚の接着、侵入および、侵入後の子宮内膜組織の修復にまで支援的に働くことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：About 70% of all IVF failures are due to pregnancy failure after embryo transfer. Therefore, intentional intrauterine manipulation has been performed prior to transfer to improve the success rate, but the mechanism of this effect has remained unclear. It has been assumed that the receptivity of the endometrium is enhanced by an increase in local metabolism due to an immediate restorative action in response to abrasion-induced destruction. This study revealed that the endosolutesis of the endometrial epithelial cells (and a part of stromal cells) leaked by apoptosis of cells initiated by the adhesion of the embryo, supports the adhesive and invasion ability of the embryo, furthermore, the endometrial cell solution enhances the efferent cell movement that restores the embryonic invasion route.

研究分野：reproduction

キーワード：implantation

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

今や不妊症治療の中核を担う体外受精における不成功例の7割以上は胚移植後の妊娠不成立が占めている。その原因の大部分は受精卵の染色体異常によるものとされ、着床前遺伝子診断 (Preimplantation Genetic Test; PGT) の技術が確立された。しかし、革新的な技術である PGT の導入後もわが国における体外受精による妊娠率の飛躍的な向上は認められているわけではない。PGT の他にも乾燥血小板、SEET 法などさまざまな手法が胚移植成績の向上のために実施されている。それらの手法の中に、子宮内膜擦過法 (スクラッチ法) があり、わずかながら着床率改善に効果があるとされている。子宮内膜擦過法は他の方法と比べ、生物マテリアルや薬物を使用しない点において、安全性、経済性などで優れた手技であるものの、マウス、ヒトともにその効果の機序はいまなお不明である。子宮内膜への機械的刺激が着床へ及ぼす正の効果の機序解明は、より適切なタイミングや方法での子宮内腔操作の確立へつながり、着実な着床支援効果をもたらすものと思われる。

### 2. 研究の目的

ヒト着床の現場である子宮内膜では胚の侵入のために、子宮内膜細胞が細胞死に陥ることが知られており、胚の侵入経路の構成にとっても合理的な生体反応である。子宮内膜への人工的な擦過による損傷が着床率の向上に寄与する機序として、細胞死を通じた子宮内膜細胞の破壊によって漏出する子宮内膜細胞内容が着床に対して正の効果を発揮するという仮説を立てた。子宮内膜細胞は表層の上皮細胞とその下層にあたる間質細胞の2種類で構成されており、着床である胚の接着から侵入に至る過程で、はじめに上皮細胞層にルートを構築し、その後間質細胞層へと侵入していくことになるため、着床への破壊された細胞内容の効果があるとすれば、上皮細胞由来と間質細胞由来とで効果の表出にタイムラグがあることも想定される。そのため、胚との相互作用を解析する上で、子宮内膜細胞由来の細胞内容と、間質細胞由来の細胞内容を個別あるいは複合的に解析し、子宮内膜擦過による胚移植成績の向上の機序が子宮内膜細胞の破壊による細胞内容の漏出によることを明らかにするとともに、より効果的な擦過方法を検討するために、上皮細胞、間質細胞双方の効果を詳細に解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) 子宮内膜細胞破壊による細胞内容の抽出法の確立

細胞死によって漏出が想定される細胞液の採集として、子宮内膜上皮細胞モデル (Ishikawa 細胞)、子宮内膜間質細胞モデル (TEHC) からホモジナイズ法あるいはビーズ破砕法により回収を図った。

#### 2) in vitro 着床モデルを利用した着床率への細胞内容添加による効果解析

ヒト絨毛がん細胞株 JAR を spheroid 形成したものを胚モデルとして使用し、一定時間子宮内膜上皮細胞飽和培養あるいは子宮内膜間質細胞飽和培養に添加し、その着床率 (接着個数/添加個数)、着床面積 (JAR spheroid の展退面積) 細胞内容液非添加群、添加群とで比較解析を行なった。

#### 3) in vitro 着床モデルを利用した細胞内容添加による子宮内膜細胞の運動能への影響解析

子宮内膜上皮あるいは間質の細胞内溶液をそれぞれ上皮細胞、間質細胞の飽和細胞に添加し、非添加群との間さ、飽和細胞にスクラッチして作成した創傷の閉鎖時間を比較することで細胞運動能の医療的解析を行なった (創傷治癒アッセイ)。

#### 4) 子宮内膜上皮細胞、間質細胞の相互作用の解析

トランスウェルを用いた非接触型の共培養系を用いて、子宮内膜上皮細胞と間質細胞とが interact する環境下での、細胞内溶液添加による細胞運動能、胚接着能、胚接着面積の変化を定量解析した。

### 4. 研究成果

1) 子宮内膜細胞破壊による細胞内容の抽出法の確立

採集効率の高さから以降はホモジナイズ法で実施した。

2) in vitro 着床モデルを利用した着床率への細胞内容添加による効果解析

| 胚接着対象  | 添加細胞内容 | 着床率  | 着床面積 |
|--------|--------|------|------|
| 子宮内膜上皮 | 子宮内膜上皮 | UP   | UP   |
| 子宮内膜間質 | 子宮内膜間質 | N.S. | N.S. |

子宮内膜上皮細胞層への胚モデルの接着は、その数（着床率）、展退面積（着床面積）いずれも有意差をもって正の効果を示した（細胞内容非添加群との比較）。

それに対して、子宮内膜間質細胞層への胚モデルの接着は子宮内膜間質細胞の内溶液を添加しても胚モデルの個数（着床率）、展退面積ともに変化は認めなかった。

3) in vitro 着床モデルを利用した細胞内容添加による子宮内膜細胞の運動能への影響解析

| 解析対象   | 添加細胞内容 | 運動能 |
|--------|--------|-----|
| 子宮内膜上皮 | 子宮内膜上皮 | UP  |
| 子宮内膜間質 | 子宮内膜間質 | UP  |

運動能は着床能とは異なり、子宮内膜上皮細胞、間質細胞いずれでも内溶液による、それぞれの細胞の運動能を高める結果となった（細胞内容非添加群との比較）。

着床において子宮内膜上皮細胞層、間質細胞層ともに、胚の侵入ルートの構築は上述の通り細胞死による空間占有細胞の消失のほかに、胚の接着以降、遠心性のあたかも胚の侵入ルートを構成するような細胞運動が観察され、細胞死と胚回避的な細胞運動の両者によってなされることが知られている。

一方で本研究では細胞運動能を創傷治癒アッセイで解析している。創傷治癒アッセイにおける細胞運動はスクラッチによって形成された非細胞占有領域を、創傷辺縁の細胞を中心とした細胞集団が細胞増殖とともに埋め尽くすように求心的に移動する運動を反映している。

本解析結果は、細胞死あるいは遠心性細胞運動によって構成された胚の侵入ルートを胚の通過後にバリアとして修復する生体反応として合目的であり、子宮内膜間質深くまで埋没した胚が妊娠組織を形成するステップにおいて、不用意に脱落することを予防する意味においても妊娠継続に有利に働く反応と解釈できる。

4) 子宮内膜上皮細胞、間質細胞の相互作用の解析

| 胚接着対象  | 共培養    | 着床率  | 着床面積 | 運動能  |
|--------|--------|------|------|------|
| 子宮内膜上皮 | 子宮内膜間質 | N.S. | N.S. | N.S. |
| 子宮内膜上皮 | 子宮内膜間質 | N.S. | N.S. | N.S. |
| 子宮内膜間質 | 子宮内膜上皮 | N.S. | N.S. | N.S. |
| 子宮内膜間質 | 子宮内膜上皮 | N.S. | N.S. | N.S. |

子宮内膜上皮細胞と間質細胞との cross-talk を検証するために、上記 2)3)と同様の解析をトランスウェル共培養（非接触）で、着床率、着床面性、運動能に違いがでるのか検討したところ（単独培養との比較）、非接触系であったためか、両者相互の作用は正負ともに認めなかった。

| 胚接着対象  | 添加細胞内容 | 着床率  | 着床面積 | 運動能  |
|--------|--------|------|------|------|
| 子宮内膜上皮 | 子宮内膜上皮 | UP   | UP   | UP   |
| 子宮内膜上皮 | 子宮内膜間質 | N.S. | N.S. | N.S. |
| 子宮内膜間質 | 子宮内膜上皮 | UP   | UP   | UP   |
| 子宮内膜間質 | 子宮内膜間質 | N.S. | N.S. | UP   |

同じく非接触共培養系において、細胞内溶液を添加した際の着床率、着床面積、運動能を非添加群と比較したところ、cross-talk によりお互いの細胞層へ正の効果을及ぼすと予想していたが、有意差を示したのは、子宮内膜間質細胞への子宮内膜上皮細胞内溶液の添加群であり、逆の組み合わせにおいては子宮内膜間質細胞内溶液は、子宮内膜上皮細胞の接着能や運動能へ、有意な影響を及ぼさない結果となった。

| 胚接着対象  | 共培養    | 添加細胞内容 | 着床率  | 着床面積 | 運動能  |
|--------|--------|--------|------|------|------|
| 子宮内膜上皮 | 子宮内膜間質 | 子宮内膜上皮 | UP   | UP   | UP   |
| 子宮内膜上皮 | 子宮内膜間質 | 子宮内膜間質 | N.S. | N.S. | N.S. |
| 子宮内膜間質 | 子宮内膜上皮 | 子宮内膜上皮 | UP   | UP   | UP   |
| 子宮内膜間質 | 子宮内膜上皮 | 子宮内膜間質 | N.S. | N.S. | UP   |

非接触共培養液で有意な変化を認めなかった結果を反映して、細胞内溶液を添加してみても、細胞内容添加と共培養との相乗効果のようなものは示さず、単独培養と同様の結果となった。

これらの結果を総合的に論考すれば、ヒト着床における子宮内膜上皮細胞、間質細胞の細胞死による胚侵入ルート構築は同時に、胚通過後のルートを上皮細胞層、間質細胞層ともに速やかな修復を促すための効果を両細胞層に働きかけると考えられる。

また、子宮内膜上皮細胞内溶液は、子宮内膜上皮細胞、子宮内膜間質細胞双方の胚への接着能を高め、胚の進展面積を効率的にサポートしていることが示された。これは子宮内膜上皮細胞層を通過し、胚が子宮内膜間質細胞とのコミュニケーションを開始する際に、破壊された子宮内膜上皮細胞から胚の接着、侵入に有利になるような働きかけがなされるということを示していると考えられ合目的な設計になっていると言える。

作用している細胞内溶液の成分の同定など、今後解明されるべき点は多く残されているものの、胚接着を起点とした子宮内膜細胞の細胞死が胚侵入ルートの空間的構築にとどまらず、胚動態を間接的にもサポートしている可能性を示唆している点は学術的にも興味深い結果を思われる。さらに、その機序を基として、子宮内膜細胞（とくに上皮細胞）の擦過により、事前に子宮内膜の胚受容能を高めるであろうことは、本解析結果から十分に予測しうることであり、臨床における胚移植前の子宮内膜擦過が妊娠成立に寄与する可能性を示唆しているものと思われる。さらに、その擦過標的は表層の子宮内膜上皮細胞のみで十分であり、子宮内膜間質細胞まで深部にわたり擦過する必要性は低いことが示され、擦過による出血で負の効果をもたらすようりは、表層のみの軽微な擦過のみで十分な効果が期待されることを示唆する解析結果と考える。

今回の解析系がトランスウェルを用いた非接触系であるため、生体内での構成と同様に、文字通り隣接した共培養系であれば、子宮内膜上皮細胞と間質細胞との cross-talk による効果は *in vitro* であっても、また異なる結果を示す可能性は残されている。しかしながら、細胞シートを用いた子宮内膜上皮細胞層と間質細胞層を重層化させての実験系の構築は、研究期間内では達成できず、結果を得ることはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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<br>Takao T, Masuda H, Kajitani T, Miki F, Miyazaki K, Yoshimasa Y, Katakura S, Tomisato S, Uchida S, Uchida H, Tanaka M, Maruyama T. | 4. 巻<br>13      |
| 2. 論文標題<br>Sorafenib targets and inhibits the oncogenic properties of endometrial cancer stem cells via the RAF/ERK pathway.                | 5. 発行年<br>2022年 |
| 3. 雑誌名<br>Stem Cell Res   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1186/s13287-022-02888-y   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-       |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号）                        | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号）                  | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 丸山 哲夫<br><br>(Maruyama Tetsuo)<br><br>(10209702) | 慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授<br><br><br>(32612) |    |
| 研究分担者 | 内田 明花<br><br>(Uchida Sayaka)<br><br>(60445236)   | 慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師<br><br><br>(32612)  |    |

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 |
|---------|---------|