

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20890120
 研究課題名（和文） 着床不全不妊症に対する自己マクロファージを用いた治療法の検討
 研究課題名（英文） Investigation of a new treatment for implantation failure patients using peripheral monocytes
 研究代表者
 中村仁美（NAKAMURA HITOMI）
 大阪大学・医学部附属病院・特任臨床検査技師
 研究者番号：80467571

研究成果の概要（和文）：

月経周期の中で末梢血単球細胞はその性質を変化させ、共培養下において子宮内膜上皮細胞の胚接着因子の発現に影響を与える事が示唆された。月経周期の影響を除外するために男性末梢血単球細胞を用いた検討において、末梢血単球細胞は精漿およびプロゲステロンへの暴露によりその性質を変化させ、子宮内膜上皮における STAT3 を活性化し胚接着因子の発現を誘導する事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The uterine endometrium undergoes dramatic structural and functional changes to allow the embryo to attach and implant in early pregnancy. In mice, macrophages are recruited into the endometrium by exposure to seminal plasma and these cells appear able to influence local cell communication and tissue remodeling events to promote uterine receptivity for embryo implantation. Our previous study showed that U937 macrophages regulate embryo adhesion molecule expression in human endometrial cells via LIF-mediated STAT3 signalling. In this study, we utilized an in vitro model comprising peripheral blood monocytes (PBMC) and Ishikawa cells to further explore regulation of macrophage-uterine epithelial cell communication. The signaling characteristics of PBMCs are changed by exposure to ovarian steroid hormones in the menstrual cycle, as well as by male seminal plasma, and that these factors influence PBMC capacity to regulate uterine epithelial cell adhesion molecule expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：不妊症、着床、子宮、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

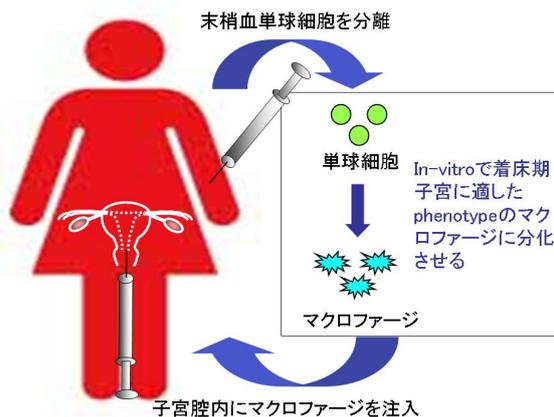
現在、多くの原因不明の不妊症が、着床不全によるものと考えられているが、その病態は未だ解明されていない。それだけでなく、生理的な着床現象の物質的基盤も解明されていないのが現状である。

これまでの我々の研究において、HVJ-E vector を用いたマウス子宮局所における生体内一過性遺伝子導入方法による検討により、着床期子宮における STAT3 活性が着床不全の診断および治療の分子標的と成り得る事を確認した。

しかしながら、HVJ-E ベクターを生殖医療に臨床応用するのは現実的には困難かと思われ、子宮局所で一過性に STAT-3 を活性化させる事ができるような何らかの担体を模索した。

妊娠は母体にとって免疫学的に異物 (semi-allograft) である胎児を拒絶せずに受け入れる事から始まる。胚の子宮への着床現象がその第一段階である。性交渉の際に子宮局所で精液との接触により子宮局所でマクロファージなどが誘導され、これがパートナー由来の免疫的な寛容を誘導することにより胚が着床し、その後妊娠を維持していくという仮説がある。実際に非配偶者の精子を用いた人工授精、第三者からの提供卵子または受精卵を用いた体外授精および代理母による妊娠では妊娠高血圧症候群の発症率が自然発生の妊娠に比べて高い事が知られている。

そこで自己末梢血の単球細胞を用いて、着床期直前の子宮局所にいるべきマクロファージを体外で再構築し、子宮にもどす、いわゆ



る ex-vivo の遺伝子治療のような事ができないという着想に至った。

2. 研究の目的

これまで我々は、子宮局所におけるマクロファージの役割を検討するために、ヒト子宮内

膜上皮細胞と PMA および LPS で刺激したヒト単球細胞の細胞株を用いて、共培養を行った。共培養下において、これらマクロファージが誘導する Leukemia Inhibitory Factor (LIF)-STAT-3 シグナル伝達を介してヒト子宮内膜上皮細胞における胚接着分子の発現を介して子宮の着床能を制御している事が示唆された。

そこで本研究では、自己のマクロファージを用いて子宮局所の STAT3 活性を一時的に誘導する事を治療戦略として、STAT3 を標的分子とした着床不全に対する新しい治療法の開発をめざし、ヒト着床期直前の子宮局所のマクロファージを体外で再構築する事を目的とした基礎検討を行った。

3. 研究の方法

サンプル採取：

大阪大学医学部附属病院 産婦人科不妊外来を受診した生殖年齢の排卵のある女性より卵胞期(月経開始より 1-2 日目)、排卵期(LH+1-2 日目)および着床期(LH+9 日目)に、およびボランティアの男性より、インフォームドコンセントを得た上でヘパリン採血した末梢血を本研究に用いた。排卵の確認は超音波エコー下で卵胞の確認および尿中 LH の確認により行った。精漿は同様に大阪大学医学部附属病院 産婦人科不妊外来を受診した患者よりインフォームドコンセントのもとに提供された精液のうち、精子濃度および運動率が正常であるものを遠心分離し、プールしたものを本研究に用いた。サンプルの提供に関わるすべての方法は大阪大学医学部附属病院倫理委員会の基準に従った。

末梢血単球細胞の培養：

末梢血より分離した単球細胞は 12 Well Cell Culture Cluster (Corning Coster, NY, USA) に 5×10^5 cells/ml の末梢血単球細胞を 800 μ l ずつ培養し、10 nM 17β -Estradiol (Nacalai)、 10^{-8} M または 10^{-6} M Progesterone (Nacalai) を添加し、48 時間 37°C、5%CO₂ インキュベーターにて培養を行った。ヒト子宮頸癌の細胞株 (Ect1) における精漿の添加実験にて 10% の精漿の添加により有意なサイトカイン産生が認められる事が報告されている (Sharkey DJ, et al., Mol Hum Reprod 13 (7): 491-501, 2007.)。プールした 80 μ l の精漿を培養単球細胞に添加し 24 時間後に培養液にて洗浄し、子宮内膜上皮細胞との共培養に用いた。

子宮内膜上皮細胞との培養：

これまでの本グループの検討において、ヒト子宮内膜上皮細胞株である Ishikawa 細胞、HEC-1A 細胞、RL95-2 細胞およびヒト子宮内

膜上皮細胞初期培養細胞における胚接着因子の発現を比較したところ、Ishikawa 細胞が最もヒト子宮内膜上皮細胞初期培養細胞の胚接着因子の発現パターンに近い事がわかった(Nakamura H. unpublished data)。そこで本研究では、子宮内膜上皮細胞として human glandular origin uterine epithelial-like cell from Asian High differentiated uterine endometrial adenocarcinoma である Ishikawa 細胞を用いた。1.0 x 10⁵ cell (2.5×10⁵ cells/ml x 400 μl) の Ishikawa 細胞を Transwell®clear insert (12 mm diameter, 0.4 μm pore size, Corning Coster Cat#3460, NY, USA) に共培養の 24 時間前に播き、37°C、5%CO₂ インキュベーターで培養を行った。単球細胞は添加した 17β-Estradiol、progesterone、精漿を完全に除去し、800 μl の培養液で再懸濁し、Ishikawa 細胞を培養したインサート well を重ね、単球細胞と Ishikawa 細胞の細胞同士が直接接触しないようにして 48 時間共培養を行った。

STAT3 活性の検討：

子宮内膜上皮細胞における STAT3 活性の検討のために、4 つの繰り返し m67 high-affinity binding site をもつ luciferase reporter plasmid と internal control として Renilla luciferase control reporter vector (herpes simplex virus thymidine kinase; HSV-TK promoter; Promega, Madison, WI) を Lipofectamine™ LTX and PLUS™ Reagents (Invitrogen, San Diego, CA) を用いて Ishikawa 細胞に遺伝子導入した。共培養 24 時間および 48 時間後、Ishikawa 細胞を回収の後、Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) を用いて、Renilla luciferase および luciferase の dual luciferase assay を行った。

子宮内膜における胚接着因子の発現の評価 (Quantitative RT-PCR)：

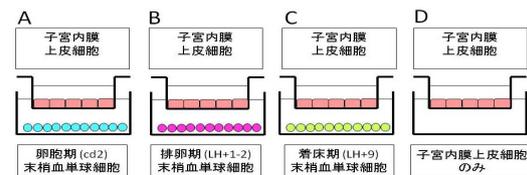
共培養 48 時間後の Ishikawa 細胞より、TRIZOL® (Invitrogen) を用いて RNA を抽出し、1 μg の RNA より SuperScriptIII® (Invitrogen) を用いて Singlestranded cDNA を作製した。1 μl の cDNA 及び 2×SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) にて real time PCR を行った。プライマーの設計は Primer Express® Software 2.0 (Applied Biosystems) を用いて行い、PCR 産物に対してシーケンスを行いそれぞれの特異的な配列であることを確認した。また希釈した cDNA を用いて real time PCR を行い、PCR による増幅が濃度依存的に直線性をもって増加する事を確認した。

4. 研究成果

月経周期において末梢血単球細胞の性質は変化するか？

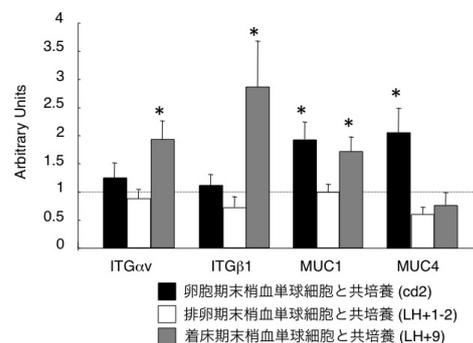
自己末梢血単球細胞を子宮内膜に STAT3 活性を誘導するようなマクロファージに体外で再構築して子宮腔内に導入するには、月経周期の中のいつ採血したらよいのだろうか。つまり、月経周期の中でホルモンの影響により、末梢血単球細胞のその性質は変化するのだろうか。月経周期の中で末梢血単球細胞が共培養下において子宮内膜上皮細胞の胚接着因子の発現に影響を与えるのかどうか検討を行った。

インフォームドコンセントの下生殖年齢の排卵の確認された女性より提供された、(i) 卵胞期、(ii) 排卵期および (iii) 着床期に採取した末梢血より単球細胞を分離し、これを Transwell®clear insert を用いて Ishikawa 細胞と共培養を行い、子宮内膜上皮細胞における胚接着因子であるインテグリン(α4, αv, β1, β3)、Mucin 1 (MUC1)、MUC4 の mRNA 発現について検討をおこなった。



コントロールとして常に Ishikawa 細胞のみを培養したものを用い、コントロールにおける各 mRNA 発現を 1 とした時の各条件における mRNA 発現量を解析した (Figure 1)。排卵期の末梢血単球細胞との共培養により子宮内膜上皮細胞の胚接着因子の mRNA の発現に変化が認められなかったのに対して、着床期に採取した末梢血単球細胞との共培養により子宮内膜上皮におけるインテグリン

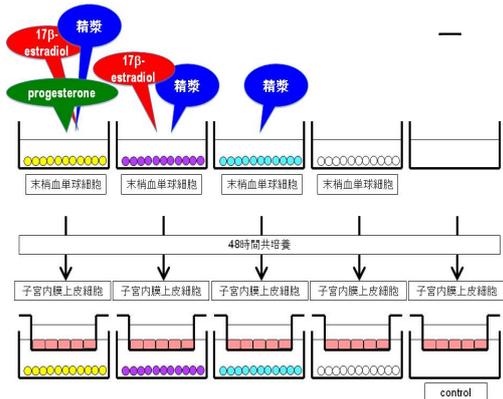
Figure 1



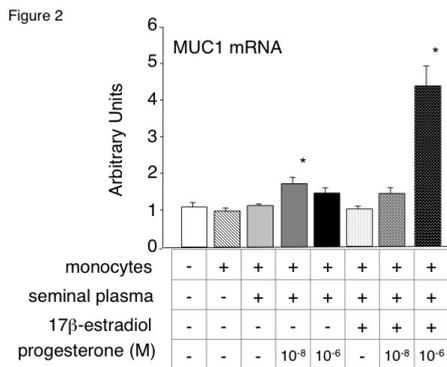
αv および β1、MUC1 の mRNA 発現が有意に上昇する事が認められた。卵胞期の末梢血単球細胞との共培養により子宮内膜上皮における MUC1、MUC4 の mRNA 発現が有意に上昇する事が認められた。これら結果から、末梢血中の単球細胞が月経周期におけるホルモンの影

響をうけその性質を変化させる事が示唆された。しかしながら、卵胞期と着床期とどちらがよいのか、つまり末梢血単球細胞がプロゲステロンの影響をどれほど受けて、その結果共培養下において子宮内膜上皮細胞の胚接着因子の発現を変化させるのか明らかではない。そこで次のような検討を行った。

エストロゲンおよびプロゲステロン、精漿添加した末梢血単球細胞の共培養下における子宮内膜上皮細胞の接着因子発現に与える影響

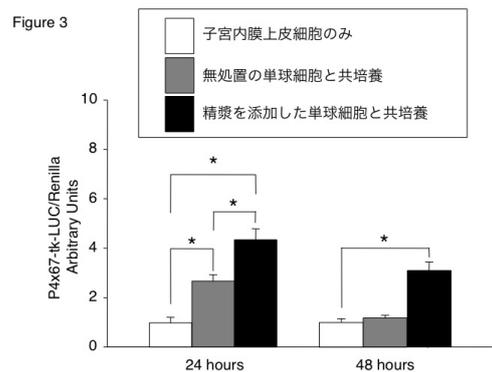


月経周期におけるホルモンの影響を除外するために、男性より採取した末梢血単球細胞を用いて、精漿およびホルモンへの暴露によりその性質を変化させるのか、共培養下における子宮内膜上皮細胞の胚接着因子の発現に与える影響を検討した。精子濃度および運動率が正常であるプールした精漿、プロゲステロンおよびエストロゲンを単球細胞に添加した。その後、洗浄しこれらを除外した上で子宮内膜上皮細胞との共培養を行った。前実験にて、着床期末梢血単球細胞との共培養にてインテグリン αv および $\beta 1$ の mRNA 発現が有意に上昇したものの、フローサイトメーターを用いた検討において差が認められなかったため (data not shown)、今回は胚接着因子として MUC1 に着目し、検討を行った。エストロゲン存在下に高濃度のプロゲステロン (10^{-6} M) を添加し、さらに精漿を添加し



た単球細胞との共培養により子宮内膜上皮細胞の MUC1 の発現の有意な上昇を認めた (Figure 2)。プロゲステロンおよび精漿のみを添加したエストロゲン非添加群では低濃度のプロゲステロン (10^{-8} M) を添加した群で MUC1 mRNA 発現が有意に上昇が認められた。

エストロゲンおよびプロゲステロン、精漿添加した末梢血単球細胞の共培養下における子宮内膜上皮細胞のSTAT3 活性に与える影響
 エストロゲン存在下に高濃度 (10^{-6} M) プロゲステロンおよび精漿を添加した男性末梢血単球細胞との共培養により子宮内膜上皮細胞の MUC1 発現が有意に上昇する事が認められた (Figure 2)。そこでこの条件下における子宮内膜の STAT3 活性について検討を行った。子宮内膜上皮細胞における STAT3 活性の検討を行った (Figure 3)。共培養 24 時間後においては、無処置の単球細胞との共培養およびエストロゲン存在下にプロゲステロンおよび精漿を添加処置した単球細胞と共培養により、子宮内膜上皮細胞の STAT3 活性は有意な上昇が認められた (Figure 3)。また、エストロゲン存在下にプロゲステロンおよび精漿を添加処置した単球細胞と共培養した子宮内膜上皮細胞では、無処置の単球細胞と共培養を行った子宮内膜上皮細胞と比較して、有意に STAT3 活性の上昇が認められた。共培養 48 時間後では、エストロゲン存在下にプロゲステロンおよび精漿を添加処置した単球細胞と共培養した子宮内膜上皮細胞のみが、コントロールに比べて有意な STAT3 活性の上昇が認められた。このことから、エストロゲン存在下にプロゲステロンおよび精漿を末梢血単球細胞に添加する事により、共培養下で子宮内膜上皮細胞の STAT3 活性を上昇させる事が示唆された。また、共培養による STAT3 活性のピークが共培養 24 時間後に



ある事が示唆された。

まとめ：
 今回の結果から、末梢血単球細胞をエストロゲン存在下でプロゲステロンを添加した上で精漿をさらに添加する事により、子宮内膜

上皮細胞に STAT3 活性を誘導し、MUC1 を誘導する事が示唆された。

ヒト以外の哺乳動物においても精液の暴露の後、子宮局所においてマクロファージが誘導される。マウス交配後 48 時間以内に子宮においてマクロファージが非妊娠時の約 2.5 倍誘導される。その後いったん減少し、着床期である交配後 5 日目からその後交配後 8 日目において再び着床部位におけるマクロファージは 35-40%増加する。リンパ球や多核白血球が着床期以降の妊娠中には着床部位においてその増加が認められないのに対してマクロファージは分娩前までその増加が認められる。このことからマクロファージが胎児と母体の免疫学的な調整に関わっている事が示唆される。マクロファージの局在は主に子宮内膜上皮細胞 (luminal および glandular epithelium) 直下の間質にあり、着床期では胚の接着面近辺に局在する。マクロファージは着床部位における脱落膜細胞の 20-30%を占め、妊娠期間中にわたり placental bed に存在する。これらの事から、マクロファージは父性由来の免疫情報を母体に伝える役割と着床期における tissue remodeling の役目を担っている事が考えられる。

着床の過程には apposition、adhesion、penetration および trophoblast invasion がある。この最初の過程である胚と子宮内膜の接着の際に子宮内膜上皮においては多くのサイトカインや growth factor などの産生、それからインテグリンやムチンなど胚接着因子の発現が認められる。接着因子と抗接着因子の働きにより子宮内膜は制御され、着床のための限られた短い時間、いわゆる”implantation window” までの間には防御壁の役割をし、implantation window の時期に胚の接着を助ける。胚接着因子としてインテグリン ($\alpha 1$, $\alpha 4$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$)、MUC1 などがよく知られている。MUC1 については anti-adhesion molecule として考えられてきたが、MUC1 が selectin ligand を持つ事が報告されてから、MUC1 が接着因子として働くのではと考えられるようになった。マウスでは MUC1 のタンパクおよび mRNA レベルともに着床期子宮内膜上皮において減少する。それとは対照的にヒトでは MUC1 のタンパクおよび mRNA レベルともに着床期子宮内膜上皮細胞においてその発現レベルは上昇し、習慣性流産や原因不明不妊症、さらに intrauterine device (IUD) を使用している女性では妊孕性のある女性に比べ MUC1 発現が有意に低下している事が報告されている。近年、原因不明の不妊症における MUC1 発現の polymorphism が報告されており、MUC1 が着床に重要な役割をしていると注目されている。

自己末梢血の単球細胞を用いて、着床期直前

の子宮局所にいるべきマクロファージを体外で再構築し、子宮腔内に注入するという戦略は自己単球細胞を用いるので、感染症などのリスクも低く、より実現化に近いと言える。今後さらに in-vitro の検討をした上で in-vivo の検討が待たれる。

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 6 件)

(すべて査読あり)

- 1 Tskitishvili, E., Nakamura, H., Kinugasa-Taniguchi, Y., Kanagawa, T., Kimura, T., Tomimatsu, T., Shimoya, K. **Temporal and spatial expression of tumor-associated antigen RCAS1 in pregnant mouse uterus.***Am J Reprod Immunol* (2010) 63(2) : 137-143.
- 2 Kimura T, Ogita K, Kumasawa K, Koyama S, Tsutsui T, Nakamura H. **Two Multipotential Transcription Factors, NE-kappaB and STAT3, play Critical and Hierarchal Roles for Implantation.** *Indian J Physiol Pharmacol.*, (2010)54 (5):27-32.
- 3 中村仁美, 木村 正:
妊娠子宮局所におけるマクロファージの役割;医学のあゆみ(2010) 233 (2) : 141-145
- 4 Tabata, C., Ogita, K., Sato, K., Nakamura, H., Qing, Z., Negoro, H., Kumasawa, K., Temma-Asano, K., Tsutsui, T., Nishimori, K., Kimura, T. Calcineurin/NFAT pathway: a novel regulator of parturition.*Am J Reprod Immunol.* (2009)62(1): 44-50.
- 5 中村仁美, 香山晋輔, 谷口武, 荻田和秀, 熊澤恵一, 張慶, 筒井建紀, 古山将康, 杉野法広, 田村博史, 金田安史, 木村正;
着床期子宮局所における STAT-3 活性の役割; 生殖内分泌学会雑誌(2009) 14: 35-40.
- 6 筒井建紀, 中村仁美, 荻田和秀, 香山晋輔, 古山将康, 木村正 :
着床不全の原因検索とそれに関連する遺伝子に関する話題—過性遺伝子導入法を用いた着床不全マウスでの検討—;産婦人科の実際(2008)57(2):217-226.

[学会発表] (計 15 件)

- 1 Nguyen TM, Nakamura H. Tsutsui T, Kimura T, **Progesterone and estrogen receptors regulate the STAT3 activity in uterus during implantation.**第 1 3 5 回日本生殖医学関西支部集談会、第 4 0 回関西アンドロロジーカンファレンス、大阪市立大学医学部,3.13/10

- 2 根來英典、中村仁美、松崎高志、黒田俊一、熊澤恵一、筒井建紀、木村正、**Bio-nanocapsule(BNC)を用いた子宮に対する drug delivery system の開発**, 第24回日本生殖免疫学会総会・学術集会, 京王プラザホテル, 11.28/'09
- 3 中村仁美, Nguyen TM, 細野剛良, 木村正, **子宮の着床機能を評価するための生理的パラメーターの検索**, 第24回日本生殖免疫学会総会・学術集会, 京王プラザホテル, 11.27/'09
- 4 宇津木裕貴、中村仁美、Jasper MJ、Robertson SA, 香山晋輔、田畑知沙、筒井建紀、木村正、**着床期子宮局所におけるマクロファージの再構築**, 第24回日本生殖免疫学会総会・学術集会, 京王プラザホテル, 11.27/'09
- 5 中村仁美 :
(シンポジウム) **分子標的治療をめざした in-vivo gene transfer system を用いた着床不全の病態の解析**, 第27回日本受精着床学会総会・学術講演会 国立京都国際会館 8.7/'09
- 6 Nakamura H, Hosono T, Minato K, Nguyen TM, Kimura T. **Investigation of uterine parameters to evaluate the prospects of uterine receptivity.**, IUPS Satellite Symposium on Endometrial Receptivity and Blastocyst Implantation, Inamori Hall, Kyoto University, 7.25/'09
- 7 Kimura T, Nakamura H, Tsutsui T, **Endometrial STAT-3 activation and implantation failure.**, IUPS Satellite Symposium on Endometrial Receptivity and Blastocyst Implantation, Inamori Hall, Kyoto University, 7.25/'09
- 8 Nakamura H, Jasper MJ, Aplin JD, Kimura T, Robertson SA, **Macrophage regulation of embryo adhesion molecule expression in human endometrial cells.** 5th International Conference on the Female Reproductive Tact Frauenchiemsee, Germany, 5.17/'09
- 9 Kimura T, Nakamura H, Tsutsui T, **Mouse model of human infertility: Transient and local inhibition of endometrial STAT3 activation results in implantation failure.**, 5th International Conference on the Female Reproductive Tact Frauenchiemsee, Germany, 5.17/'09
- 10 中村仁美, Jasper MJ, Aplin JD, 香山晋輔、荻田和秀、熊澤恵一、筒井建紀、木村正、Robertson SA, **マクロファージによる着床期子宮内膜における胚接着分子の制御**, 第61回日本産婦人科学会学術講演会, 国立京都国際会館 4.4/'09
- 11 中村仁美、香山晋輔、谷口 武、荻田和秀、熊澤恵一、張 慶、筒井建紀、古山将康、杉野法広、田村博史、金田安史、木村 正、
(シンポジウム) **一過性遺伝子導入方法を用いた着床現象の検討**, 第23回日本生殖免疫学会, 富山国際会議場, 12.7/'08
- 12 中村仁美、香山晋輔、谷口 武、荻田和秀、熊澤恵一、張 慶、筒井建紀、古山将康、杉野法広、田村博史、金田安史、木村 正、**着床期子宮局所における STAT-3 活性の役割**, 第13回日本内分泌学会, 大阪国際会議場, 11.29/'08
- 13 中村仁美、Jasper MJ, Aplin JD, 香山晋輔、荻田和秀、熊澤恵一、張 慶、筒井建紀、木村正、Robertson SA., **着床期子宮内膜におけるマクロファージの役割**, 第53回日本生殖医学会総会・学術講演会, 神戸国際会議場, 10.24/'08
- 14 香山晋輔、中村仁美、谷口 武、荻田和秀、熊澤恵一、張 慶、筒井建紀、金田安史、木村 正、**子宮局所における一過性遺伝子導入方法を用いた着床不全マウスモデルの作製**, 第53回日本生殖医学会総会・学術講演会, 神戸国際会議場, 10.24/'08
- 15 中村仁美, 香山晋輔、荻田和秀、谷口武、筒井建紀、金田安史、木村正 **子宮局所における一過性遺伝子導入方法を用いたヒト不妊症のマウスモデルの作製**, 第24回日本DDS学会, 六本木アカデミーヒルズ 40, 6.29-30/'08.

6. 研究組織 大阪大学医学部附属病院

(1) 研究代表者

中村仁美 (NAKAMURA HITOMI)

大阪大学・医学部附属病院・特任臨床検査技師

研究者番号 : 80467571

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :