

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592108

研究課題名（和文）：ヒト着床におけるカドヘリンを介した子宮内膜腺上皮細胞層の再構築機序の解明

研究課題名（英文）：Cadherin mediated reconstitution mechanism of human endometrial epithelial cells during implantation

研究代表者：

内田 浩（UCHIDA HIROSHI）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90286534

研究成果の概要（和文）：ヒト子宮内膜の上皮細胞層は妊娠の場としての子宮内腔を防御する重要なバリアであるが、着床における受精卵の侵入によって一時的に破壊される。その修復機構は必須であるが、機構は知られていない。本研究によって、その機構にカドヘリン分子の変化を中心とした上皮間充織転換という細胞の運動能を変化させる現象が関与していることを明らかにした。生殖医療戦略に有益な妊娠成立の初期機構の一端の解明である。

研究成果の概要（英文）：Human endometrial epithelial cell (EEC) layer, which is structural and immunological barrier, is temporally disrupted by penetration of fertilized egg in the process of pregnancy, however the reconstruction mechanism of disrupted EEC layer is largely unknown. This study demonstrated that epithelial mesenchymal transition is involved in the mechanism in association with redistribution of N-cadherin. These results are useful for the new strategy of assisted reproductive technology.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：生殖医学、着床

1. 研究開始当初の背景

近年の技術進歩は高率な受精を可能としたものの、ブラックボックスとも言える子宮内腔でのヒト着床の分子機序の解明は立ち遅れ、胚移植による妊娠率の向上を阻んでいる。いくつかの接着因子による着床の胚と子宮内膜との接着機構が報告されているものの、接着以後、胚の伸展、陥入へと続く複合的多段階生体现象であるヒト着床において、全貌解明にはなお時間を要している。

胚の陥入によって一時的に破壊された子宮内膜腺上皮細胞層は、本来物理的・免疫学的に重要なバリアの役割を担っている。妊娠成立には semi-allograft である胚を受容するために免疫寛容が惹起されており感染防御能が低下しているため、早急な修復が要求されるものと推定される。したがってフィブリン様物質による充填と以後の緩徐な細胞増殖によって閉鎖されるという教科書的記載が機構の全てではないと思われた。

2. 研究の目的

われわれはこれまで着床期に特異的にヒト子宮内膜腺上皮に発現する Glycodelin に着目し着床の分子機序の解析を行い、卵巣ステロイドホルモンに発現誘導される Glycodelin が、分化・増殖・運動・接着の細胞の基本機能を介して、子宮内膜腺上皮細胞の接着・胚侵入のための上皮層崩壊・胚陥入後の上皮層再構築に促進的に機能することを明らかにしてきた (Endocrinology 2005, 2007, Hum Reprod 2007) (科学研究費補助金基盤研究 C 一般 平成 16~17 年度, 同平成 18~19 年度)。

本研究では Glycodelin 誘導性の機構の他に、生体内で細胞運動が亢進する発生や癌転移などで着目される上皮間充織転換 (Epithelio-Mesenchymal Transition; EMT) が本機構の基盤と着想し、主要分子として EMT で発現が左右される N-cadherin を解析対象とした。

3. 研究の方法

「胚陥入による被破壊子宮内膜腺上皮細胞層 (EEC) の再構築は、腺上皮細胞の運動能亢進による迅速な生体反応」であり、その生体反応の基盤は上皮間充織転換 (EMT) に裏打ちされると仮定し、E-cadherin 主体の堅固な上皮組織形態の EEC から、胚陥入によって欠損した細胞層がフリースペースとなって自由な細胞運動の場を提供することで、N-cadherin の発現上昇による運動機能の亢進した間充織細胞様の性格を持つ EEC に至るという分子機序の想定を証明するために、ヒト着床モデルにおける、(1)cadherin switch の起動、(2)EMT の惹起、(3) EMT 惹起による EEC 運動能の変化、(4) EMT 維持進行のための N-cadherin 機能発現の必要性、(5)EMT の着床 (接着) への影響の 5 点につき検討した。

全ての研究プログラムで行う in vitro 着床アッセイは国内外の着床研究で採用されている実験系であり、ヒト子宮内膜腺癌細胞株 Ishikawa を飽和培養したものを EEC モデルとした。一方、胚モデルとしては、ヒト絨毛癌細胞株 JAR を spheroid 形成させたものを Ishikawa 細胞と共培養することで利用した。

(1)cadherin switch の起動

in vitro 着床アッセイにおいて無添加、卵巣ホルモン添加、Glycodelin 発現を誘導するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACI) 添加の条件化で、E-cadherin および N-cadherin の発現動態を western blot 法および蛍光免疫

細胞染色法を用いて解析した。

(2)EMT の惹起

上記条件化で EMT の発現マーカーである cytokeratin (上皮)、vimentin (間充織) につき EEC での発現変化を蛍光免疫細胞染色法で検討した。

(3)EMT 惹起による EEC 運動能の変化

EEC の運動能変化による細胞層欠損の変化を、欠損と平行に動く胚モデルの伸展につき面積計測をもって解析した。

(4)EMT 維持進行のための N-cadherin 機能発現の必要性

上記(1)~(3)で得られた現象の N-cadherin 依存性を検討するため、N-cadherin 機能阻害抗体 FA-5 の追加添加を行い検討した。

(5) EMT の着床 (接着) への影響

上記条件下における EEC モデルと胚モデルとの接着率を同時に検討した。

4. 研究成果

(1)cadherin switch の起動

胚モデルとの共培養、あるいは卵巣ホルモン、HDACI といった着床促進物質の添加の双方で、EEC モデルにおける E-cadherin の発現減弱および N-cadherin の発現増強 (いわゆる cadherin switch と呼ばれる EMT に特徴的な現象) が起こることを western blot 法、蛍光免疫細胞染色法の両法で明らかにした。

また、N-cadherin の EEC モデルでの発現は、胚モデルからの距離依存的であり、胚モデルに近い EEC の方が有意に高い N-cadherin 発現を示すという同心円状のユニークな発現パターンを示した。

(2)EMT の惹起

(1)の条件下で間充織マーカーである vimentin の有意な発現上昇が認められた。また胚モデルの接着面の周囲でその傾向は顕著で、胚モデルとの接着が EMT 惹起のひとつのトリガーとなりうる可能性を示唆した。

(3) EMT 惹起による EEC 運動能の変化

胚モデルの伸展面積の経時的増大は、卵巣ホルモン添加あるいは HDACI 添加により有意差をもって加速した。これら液性因子による刺激が EEC の欠損速度を高め、胚の侵入を促す可能性を示唆した。

(4) EMT 維持進行のための N-cadherin 機能発現の必要性

上記(1)~(3)の各現象は N-cadherin の機能阻害抗体 FA-5 の添加により全てキャンセルされた。このことは胚モデル接着あるいは卵巣ホルモンや HDACI の液性因子刺激に端を発する EMT を介した着床モデル現象が N-cadherin 機能を必須とすることを示唆した。

(5)EMT の着床（接着）への影響

一方で、卵巣ホルモンや HDACI 添加で有意に上昇する着床率は、N-cadherin 機能阻害抗体 FA-5 を添加しても、変化を認めなかった。すなわち EMT は接着後の EEC 動態には深く関与するものの、胚と EEC との接着自体にはあまり関与していないことを示した。

以上の結果から、ヒト着床において胚と EEC との接着および卵巣ホルモンの上昇という環境因子の双方がトリガーとなり、EEC における局所的な EMT が惹起され、EEC の運動能が亢進することで胚の子宮内膜への陥入を促進的に支援している機構が存在しうることを明らかにした。

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7件)

Uchida H, Maruyama T, Nishikawa Uchida S, Oda H, Miyazaki K, Yamasaki A, Yoshimura Y: Involvement of epithelial mesenchymal transition of human endometrial epithelial cells in human embryo implantation: evidence from studies using in vitro model. J Biol Chem 査読無 2012; 287: 4441-4450

Kagami M, Maruyama T, Koizumi T, Miyazaki K, Nishikawa Uchida S, Oda H, Uchida H, Fujisawa D, Ozawa N, Schmidt L, Yoshimura Y: Psychological adjustment and psychosocial stress among Japanese couples with a history of recurrent pregnancy loss. Hum Reprod 査読有 2012; 27: 787-794

Ono M, Kajitani T, Uchida H, Arase T, Oda H, Nishikawa Uchida S, Masuda H, Nagashima T, Yoshimura Y, Maruyama T: OCT4 expression in human uterine myometrial stem/progenitor cells. Hum Reprod 査読有 2010; 25: 2059-2067

Masuda H, Matsuzaki Y, Hiratsu E, Ono M, Nagashima T, Kajitani T, Arase T, Oda H, Uchida H, Asada H, Ito M, Yoshimura Y, Maruyama T, Okano H: Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial

regeneration. PLoS One 査読有 2010; 5: e10387

Uchida H, Maruyama T, Kagami M, Oda H, Nishikawa S, Kajitani T, Asada H, Yoshimura Y: Epigenetic Treatment in Assisted Human Embryo Implantation. J Mam Ova Res 査読有 2009; 26: 116-121

Arase T, Uchida H, Kajitani T, Ono M, Tamaki K, Oda H, Nishikawa S, Kagami M, Nagashima T, Masuda H, Asada H, Yoshimura Y, Maruyama T: The UDP-glucose receptor P2RY14 triggers innate mucosal immunity in the female reproductive tract by inducing IL-8. J Immunol 査読有 2009; 182: 7074-7084

Sugawa F, Wada Y, Maruyama T, Uchida H, Ishizuka B, Ogata T: Premature ovarian failure and androgen receptor gene CAG repeat lengths weighted by X chromosome inactivation patterns. Fertil Steril 査読有 2009; 91: 649-652

[学会発表](計9件)

内田 浩, 丸山哲夫, 内田明花, 山崎彰子, 宮崎 薫, 吉村泰典: ヒト着床における子宮内膜上皮の細胞死によらない新たな胚陥入促進機序-N-cadherin 依存性細胞運動-: 第16回日本生殖内分泌学会学術総会 2011.11.19

Uchida H, Maruyama T, Uchida-Nishikawa S, Miyazaki K, Yoshimura Y. (2011) Epithelial-mesenchymal transition mediates the displacement of endometrial epithelial cells away from the site of embryo implantation. World Congress of Reproductive Biology, Cairns, Australia. 2011.10.9-12

内田 浩, 丸山哲夫, 内田明花, 小田英之, 宮崎 薫, 各務真紀, 青木大輔, 吉村泰典: ヒト着床モデルにおける胚伸展のための子宮内膜上皮動態の分子機序解析-Rho family 低分子量 G タンパク質の機能関与-: 第63回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 2011.8.29-31

内田 浩, 丸山哲夫, 西川明花, 小田英之, 宮崎 薫, 各務真紀, 吉村泰典: ヒト着床における子宮内膜上皮細胞動態-卵巣ホルモンと低分子量 G タンパク質の関与-: 第84回日本内分泌学会学術総会 2011.4.21-23

内田 浩(シンポジウム): ヒト着床における子宮内膜腺上皮の複合的機能の分子制御: 第62回日本産科婦人科学会学術講演会 2010.4.24

内田 浩, 丸山哲夫, 小田英之, 西川明花, 梶谷 宇, 宮崎 薫, 各務真紀, 吉村

泰典：ヒト着床における N-cadherin によるホルモン依存的子宮内膜上皮細胞層の再構築：第 83 回日本内分泌学会学術総会 2010.3.25-28

Uchida H, Maruyama T, Arase, T, Ono M, Kajitani, T, Kagami, M, Oda, H, Nishikawa, S, Yoshimura Y; N-Cadherin and RhoA Have Opposite Effects on the Regulation of Endometrial Epithelial Cell Migration during Implantation. in 57th Society for Gynecologic Investigation, Orland, Florida, USA .2010.3.24-27

内田 浩（シンポジウム）：ヒト着床における子宮内膜上皮細胞とグリコデリン：日本ヒト細胞学会 2009.8.22

内田 浩（シンポジウム）：着床時子宮内膜上皮のダイナミクスと分子制御：第 27 回日本受精着床学会総会・学術講演会 2009.8.7

6 . 研究組織

(1)研究代表者

内田 浩 (UCHIDA HIROSHI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：90286534

(2)研究分担者

丸山 哲夫 (MARUYAMA TETSUO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：10209702