

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09446

研究課題名(和文) ヒト胚着床における末梢血単核球の促進的作用メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the promotive mechanism of peripheral blood mononuclear cells in human embryo implantation

研究代表者

堀江 昭史 (Horie, Akihito)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：30535836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：着床不全(IF)モデルマウスを用いて、PBMC投与により誘発される着床期子宮内膜の変化と、hCGの有無による本治療の効果の違いを検討した。妊娠初期の妊娠率、着床部位の数と大きさを計測し、さらに着床直前の子宮を採取し、RNA-seqで解析した。結果として妊娠率、着床部位数、正常サイズの着床部位数は、IFモデルで有意に減少し、培地、PBMC、PBMC-hCG群では改善した。RNA-seqデータから、PBMC投与は子宮内膜の調節異常遺伝子であるエストロゲン活性化遺伝子の過剰発現を改善した。加えてPBMC投与は局所グルココルチコイド受容体発現を増加させ、炎症関連遺伝子の発現を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回検討した変化はPBMC-hCG群でより顕著であり、妊娠転帰と一致していた。胚着床前のPBMCの子宮内投与は、IFマウスモデルにおいて胚着床を促進し、hCGは妊娠転帰を促進した。本研究における結果によりPBMCによる子宮内膜に対する作用機序を解明する一助となった。今後PBMCがhCGによりどのように変化して、着床効果を示すかの検証を行っていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Using a mouse model of implantation failure (IF), we examined the changes in the endometrium during the implantation phase induced by PBMC administration and the difference in the effect of this treatment with and without hCG. The pregnancy rate, number and size of implantation sites were measured in early pregnancy, and uteri were collected just before implantation and analyzed by RNA-seq. Results showed that pregnancy rate, the number of implantation sites, and the number of normal-sized implantation sites were significantly decreased in the IF model and improved in the medium, PBMC, and PBMC-hCG groups; RNA-seq data showed that PBMC administration improved overexpression of estrogen activator gene, a dysregulated gene in the endometrium. In addition, PBMC administration increased local glucocorticoid receptor expression and suppressed the expression of inflammation-related genes.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：PBMC 難治性着床不全

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生殖補助医療において形態良好胚を3回以上移植しても妊娠に至らない反復着床不全(RIF)症例が存在し、治療上の課題となっている。近年、PGT-A等の着床前診断により胚側の要因については診断が可能となったが、正常染色体数の胚を複数回移植しても着床しない症例が存在する。子宮内膜および免疫異常などの母体側の要因については子宮内膜炎の治療、免疫抑制剤の使用など様々な治療が試みられているが、原因不明の着床不全に対しては有効な治療法が確立されていない。当院では自己末梢血リンパ球(PBMC)を子宮内に投与するPBMC療法をRIF患者に対して臨床研究として行ってきており、生児獲得率の上昇を認めている。近年の成績の検討ではRIF患者における凍結胚盤胞移植においてPBMC療法併用ET群と通常ET群で妊娠率：29.5% vs 11.1% ( $p < 0.05$ )、生児獲得率：26.2% vs 6.6% ( $p < 0.01$ )と胚移植成績は有意に上昇し、流産率には有意差は見られず、PBMC療法を行ったRIF患者の累積妊娠率は54.8%であった。海外でもPBMC療法に関する同様の治療効果が複数報告されており、RIFに対する免疫療法として最も信頼性の高い治療として認識されている。しかし、その作用機序や有効な患者群については十分に判っていない。

### 2. 研究の目的

当院では反復着床不全(RIF)患者に対して末梢血単核球(PBMC)療法を行っており、生児獲得率の上昇を認めている。PBMC療法は着床不全症例に対する有効な治療法ではあるが、その作用機序や有効な患者群については十分に判っていない。そこで、PBMC療法の着床改善作用の機序を明らかにするため、マウス胚着床不全モデルを用いてPBMC療法の効果および子宮内膜への作用を解析した。

### 3. 研究の方法

プロゲステロン・グルココルチコイド受容体拮抗薬であるRU486を用いた着床不全マウスを用いてin vivoでのPBMC療法の効果について検討した。妊娠1.5日目に(1)培養液(hCG含有)または同系統マウスより分離したPBMC(2)24時間培養後、(3)hCG添加24時間培養後)を子宮内投与し、妊娠7.5日目の各群の妊娠率・着床数を検討した。また、胚着床前である妊娠3.5日目夕方の子宮を回収し、治療有無による組織像の検討および子宮のRNA-seqによる遺伝子発現の比較解析を行った。

### 4. 研究成果

着床不全マウスモデル(IF)での妊娠率15%に対し、同モデルに培養液(hCG)、PBMC、hCG添加PBMC(PBMC-hCG群)を投与した各群の妊娠率は(1)69%、(2)61%、(3)69%と上昇した。PBMC-hCG群

では着床数が最も多く、正常大の発育を示す着床部数が有意に増加した。治療の有無による組織形態の変化は認めなかった。IF モデルにおいて、PBMC の子宮内投与が胚着床を改善する分子機序を明らかにするため、妊娠 3.5 日目におけるそれぞれの着床部における RNA-seq による遺伝子発現解析を行った。PBMC-hCG 群では、503 個の DEG が検出され、IF 群と比較して 209 個の遺伝子がアップレギュレートされ、294 個の遺伝子がダウンレギュレートされた。一方、PBMC 群では IF 群と比較して 118 個の DEG しか検出されなかった。また、主成分分析 (PCA) では、PBMC 群は PBMC-hCG 群と IF 群の間に分布し (補足図 2) IF 群と重なっていた。このことから、PBMC 群の妊娠マウスは、部分的に PBMC-hCG 群の妊娠マウスと同様の遺伝子発現を有していることが示唆された。IF 群対コントロール群および PBMC-hCG 群対 IF 群の全 DEG を用いた GO 解析では、サイトカイン活性、妊娠、脱分化、ERK1/ERK2 カスケード、グルココルチコイドへの応答、GPCR (ClassA/1) に関連する遺伝子は、2 つのグループ比較で共通して有意に変化していた。これらの機能に関与する遺伝子の大部分は、PBMC-hCG 投与によって改善された。さらに、DEG の上流分子解析から、エストラジオールの下流にある遺伝子、LPS、IFN、IL-6、NF BIA、免疫細胞刺激物質などは、コントロール群に比べて IF 群で活性化され、IF 群に比べて PBMC-hCG 群で抑制されることが示された。これらの結果から、IF モデルで活性化された子宮内膜のエストロゲン活性化遺伝子および炎症関連遺伝子は、PBMC-hCG 投与により抑制されたことが示唆された。また、炎症反応の制御に関与すると考えられているグルココルチコイド受容体 (GR) 遺伝子の発現を評価したところ、GR 遺伝子 (Nr3c1) の RNA レベルは、IF 群と比較して PBMC 群および PBMC-hCG 群で上昇していた。

#### 結論

子宮内 PBMC 投与が、着床期における子宮内膜の異常な遺伝子発現を是正し、過剰なエストロゲン制御遺伝子活性と炎症を抑制することにより、胚の着床を改善することを初めて証明した。このデータは、PBMC 療法が子宮内膜のホルモンバランスの乱れによる胚受容性の低下を改善するのに有効であることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshimi KITAWAKI, Akihiro YANAI, Tsutomu OHARA, Baku NAKAKITA, Yusuke SAGAE, Asuka OKUNOMIYA, Akihito HORIE, Masaki MANDAI
2. 発表標題 Elucidation of the Mechanism of Intrauterine Administration of Peripheral Blood Mononuclear Cells(PBMC) Treatment for Recurrent Implantation Failure.
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北脇佳美、矢内晶太、小原勉、中北麦、寒河江悠介、奥宮明日香、堀江昭史、万代昌紀
2. 発表標題 着床不全マウスモデルにおけるPBMC療法の子宮内環境改善作用の検討
3. 学会等名 第40回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北脇、下仲、池田、矢内、小原、中北、寒河江、奥宮、堀江、万代
2. 発表標題 マウス胚着床不全モデルにおいて、PBMC（末梢血単核球）子宮内投与はエストロゲン作動性遺伝子群の発現異常を改善する
3. 学会等名 日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2022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
研究分担者	藤原 浩  (Fujiwara Hiroshi)  (30252456)	金沢大学・医学系・教授    (13301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	奥宮 明日香  (Okunomiya Asuka)  (70893791)	京都大学・医学研究科・助教     (14301)	

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