

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：21K09468

研究課題名（和文）胚着床における子宮内膜由来のエクソソームの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of endometrial-derived exosomes involved in embryo implantation

研究代表者

佐藤 幸保（Sato, Yukiyasu）

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：00508236

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）：ヒト子宮内容液から分離したsEVについてプロテオーム解析を用いて排卵期と着床期を比較した。着床期群で有意に発現量が上昇していたタンパクは140個であり、着床期群にはcell growth、cell migration、cell adhesionなどのtermが含まれていた。sEVの着床への影響を調べるため、Hormone 処置したIshikawa細胞由来のsEVがiPS細胞から誘導したcytotrophoblast細胞(nCT細胞)への影響を検討し、sEVおよびsEVに含まれるgalectin-3はnCTのapoptosisを促進し、cell fusionを促進することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討で子宮内容液における、特にEVが胚の着床に関わっていることが示唆された。特にgalectin-3に着目して研究を行ったが、galectin-3以外の蛋白にも着床に関与する因子があることが示唆されるため、EVのどのような因子が着床に強く関わっているのか、さらなる検討が必要である。また、それらの因子に着目することで、今後難治性着床障害患者の検査や治療に寄与することが期待される。本研究については、現在論文投稿準備中である。

研究成果の概要（英文）：Proteomic analysis of sEV isolated from human uterine fluid was used to compare the ovulation and implantation phases. To examine the effect of sEV on implantation phase, we compared the expression of sEV derived from between estrogen and estrogen/progesterone hormone-treated Ishikawa cells, we examined the effect of sEV derived from Ishikawa cells on cytotrophoblast cells (nCT cells) induced from iPS cells. We found that sEV and galectin-3 contained in sEV promoted nCT apoptosis and cell fusion.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：sEV 子宮内容液

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

small extracellular vesicle (sEV)は細胞が分泌する脂質二重膜で囲まれた直径 200nm 未満の膜小胞で、micro RNA やタンパクなどを含有していることから、細胞間情報伝達に関与していると考えられている。ヒト子宮内容液中にも sEV は存在し、*in vitro* モデルにおいて子宮内膜細胞が分泌する sEV が trophoblast 細胞の接着や浸潤を促進するという報告もあるが、胚着床における sEV の機能実態は未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

ヒト子宮内容液から分離した sEV について、プロテオーム解析を用いて排卵期と着床期を比較し、胚と子宮内膜のクロストークに関与しうるタンパクが存在を確認し、その機能について検討する。

3. 研究の方法

採卵周期の女性における採卵日（排卵期群）もしくは採卵日から 5 日後（着床期群）の子宮内洗浄液を、それぞれ 5 サンプルずつ採取した。子宮内洗浄液からサイズ排除クロマトグラフィー法で分離した sEV からタンパクを抽出し、液体クロマトグラフ質量分析計でタンパクの同定及び定量を行い、排卵期群と着床期群で比較解析を行った。また、sEV を用いた着床実験を行うため、Ishikawa 細胞と iPS 細胞から誘導した cytotrophoblast 細胞(nCT 細胞)による接着実験を行った。

4. 研究成果

排卵期群で 2041 個、着床期群で 1386 個の sEV 内タンパクが同定され、有意に発現変動を示したタンパクは 318 個であった。このうち排卵期群に比べて着床期群で有意に発現量が上昇していたタンパクは 140 個であり、低下していた蛋白は 178 個であった。DAVID を用いて gene ontology 解析を行ったところ、着床期に関与する cell growth、cell migration、cell adhesion

などの term が含まれていた。これらの蛋白のうち、どの蛋白が着床に関わっているのかを示すためには、*in vitro* の実験が必要となるが、まず、胚着床モデルを検証する必要がある。そこで着床モデルで一般的に用いられる Ishikawa 細胞とそれらの細胞を黄体期様にホルモン処置し、Ishikawa 細胞を mimic しているのかを qPCR で検討したところ、子宮内膜上皮細胞と同等の DPP4 , LIF、SPP1 などが上昇していることを確認した。つづいて、ホルモン処置した Ishikawa 細胞由来の sEV が、着床期の子宮内洗浄液中の sEV を mimic するようなタンパクの発現変化が起こっているのかを proteome 解析にて確認した。結果として、黄体期において発現量が上昇していた蛋白は 44 個あり、減少していた蛋白は 24 個であった。そこでヒトの子宮内腔に分泌される sEV と Ishikawa 細胞から分泌される sEV 中の蛋白分子のうち、ヒト子宮内膜における着床期と共通して up regulation していた Galectin-3 に着目した。Galectin-3 は接着、増殖、アポトーシスなどの細胞プロセスに関与していることがわかっている。また、Galectin-3 は cytotrophoblast のアポトーシスと細胞融合を促進することがわかっているため、cytotrophoblast として、iPS 細胞から誘導した naïve cytotrophoblast (nCT) を用いて実験を行った。ホルモン処置をした Ishikawa 細胞から分泌された sEV を nCT と共培養することによる影響を検討したが、E-Ishikawa-sEV 添加群よりも E+P-Ishikawa-sEV 添加群で有意に nCT の cell fusion が促進した。また、同様に Galectin-3 の nCT への影響を検討したが、同様に cell fusion が促進した。また、Galectin-3 を knockdown した Ishikawa 細胞を用いた sEV では nCT の cell fusion は促進しなかった。

結論

今回の検討で着床期に子宮内溶液中に分泌される sEV が胚の cell fusion を促進し、その sEV 中の Galectin-3 が胚の CT の cell fusion を促進したことから、子宮内容液に含まれる EV 中の蛋白が胚の着床に関わっていることが示唆された。今後胚着床 3D モデルを構築したうえで、sEV の機能を詳細に検証することで、難治性着床障害患者の検査や治療に寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小原 勉, 堀江 昭史, 池田 愛紗美, 下仲 慎平, 矢内 晶太, 中北 麦, 北脇 佳美, 寒河江 悠介, 奥宮 明日香, 万代 昌
2. 発表標題 small extracellular vesicleのプロテオーム解析から検出された排卵期から着床期への子宮内変化
3. 学会等名 14. 第41回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小原 勉, 堀江 昭史, 中村 充宏, 今北 幸, 池田 愛紗美, 下仲 慎平, 矢内 晶太, 北脇 佳美, 奥宮 明日香, 万代 昌紀
2. 発表標題 子宮内膜癌細胞株由来と子宮内洗浄液由来のsmall extracellular vesicleにおけるタンパクプロファイルの比較
3. 学会等名 日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2023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	堀江 昭史 (Horie Akihito) (30535836)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	
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
---------	---------