

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09529

研究課題名(和文) 子宮内膜免疫寛容の転写制御機構を解明する

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms in transcriptional regulation on immune tolerance of the human endometrium

研究代表者

村田 紘未 (MURATA, Hiromi)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：00460832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脱落膜における子宮ナチュラルキラー細胞とヒト子宮内膜間質細胞の分子相互作用を解明するために、間質細胞が分泌する免疫チェックポイント分子であるガレクチン9(LGALS9)の発現に着目した。脱落膜化間質細胞において、LGALS9発現は転写制御因子Heart and neural crest derivatives expressed transcript 2(HAND2)およびForkhead box O1(FOXO1)のリン酸化によって制御されており、リン酸化FOXO1の増加によってLGALS9の発現抑制が解放され、さらにHAND2によってLGALS9の発現が上昇することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LGALS9はHepatitis A virus cellular receptor 2(HAVCR2)を介して子宮ナチュラルキラー細胞を抑制する。脱落膜化過程でヒト子宮内膜間質細胞が分泌するLGALS9と子宮ナチュラルキラー細胞膜上のHAVCR2とが相互作用することによって、抗炎症または免疫寛容に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。またヒト子宮内膜における内分泌機構が免疫機構を制御する分子メカニズムの一端を解明することができた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular interaction between uterine natural killer cells and human endometrial stromal cells (ESCs) in the human decidua, we focused on the expression of galectin 9 (LGALS9), an immune checkpoint molecule secreted by ESCs. We found that Heart and neural crest derivatives expressed transcript 2 (HAND2) and Forkhead box O1 (FOXO1) phosphorylation, the important transcriptional factors in decidualized stromal cells, regulate LGALS9 expression. Furthermore, it is showed that increased phosphorylated FOXO1 unleashed the suppression of LGALS9 expression, and HAND2 more increased LGALS9 expression.

研究分野：産婦人科

キーワード：脱落膜化 子宮内膜間質細胞 LGALS9

1. 研究開始当初の背景

ヒト子宮内膜は排卵後黄体から分泌されるプロゲステロンの作用をうけ脱落膜化する。分泌期から妊娠初期脱落膜における細胞間相互作用は、胚・栄養膜細胞の子宮内膜への浸潤に必要不可欠であり、胚着床およびその後の胎盤形成に影響を及ぼす。脱落膜化の異常は癒着胎盤や妊娠高血圧腎症などの産科合併症につながることから、脱落膜における細胞間相互作用の解明は喫緊の課題である。

子宮内膜を構成する細胞には腺細胞、間質細胞、免疫細胞、血管内皮細胞があり、その中でも子宮ナチュラルキラー (NK) 細胞は分泌期から妊娠初期子宮内膜の主要な免疫細胞である。脱落膜化したヒト子宮内膜間質細胞 (Endometrial stromal cells: ESC) は IL15 ならびに免疫チェックポイント分子であるガレクチン 9 (LGALS9) を合成・分泌し、それらが子宮 NK 細胞の分化と抗炎症を促していることが報告されている。これまでに申請者らは、プロゲステロンによってヒト ESC で誘導される転写制御因子 Heart and neural crest derivatives expressed transcript 2 (HAND2) を見だし、その遺伝子破壊が IL15 発現低下を引き起こすことを明らかにした。また、クロマチン免疫沈降 PCR 法とルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、HAND2 が IL15 発現を直接制御していることを示した。一方、子宮 NK 細胞は、ESC が分泌する LGALS9 の受容体 Hepatitis A virus cellular receptor 2 (HAVCR2) を発現しており、脱落膜化における子宮 NK 細胞と ESC の分子相互作用を解明するために、ヒト子宮内膜の LGALS9 の発現動態に着目した。

2. 研究の目的

子宮 NK 細胞の分化や機能はいかに制御されているのか、その分子メカニズムを解明するために、脱落膜化過程におけるヒト子宮内膜間質細胞の LGALS9 の発現動態と転写制御機構を明らかにすることを研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究は関西医科大学倫理委員会によって承認されており、口頭および文書による説明と同意を得たのちに検体を採取した。正常月経周期のある女性 41 人から婦人科良性腫瘍に対する子宮摘出術直後に子宮内膜を採取し、RNA を抽出/パラフィン包埋ホルマリン固定し保存、あるいは ESC の初代培養実験に供した。

- (1) ヒト子宮内膜組織における LGALS9 の発現変化を、定量 PCR 法ならびに *in situ hybridization*/免疫組織化学染色によって検討した。
- (2) 初代培養ヒト ESC を 12 日間メドロキシプロゲステロン酢酸エステル (medroxyprogesterone acetate: MPA) で刺激することにより脱落膜化を誘導し、脱落膜化 ESC の LGALS9 遺伝子発現量の経時的变化を定量 PCR 法にて検討した。
- (3) 子宮内膜脱落膜化の重要な転写制御因子である HAND2 および Forkhead box O1 (FOXO1) による LGALS9 の発現制御機構を検討するために、HAND2/FOXO1 抗体を用いたクロマチン免疫沈降 PCR 法を行った。
- (4) ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、HAND2/FOXO1 による LGALS9 遺伝子発現制御領域の活性変化を調べた。
- (5) 脱落膜化 ESC における FOXO1 の転写制御機構を明らかにするために、脱落膜化過程における FOXO1 のリン酸化を Phos-tag ウェスタンブロットを用いて検討した。

4. 研究成果

ヒト子宮内膜組織において LGALS9 の遺伝子発現は、増殖期後分泌期早期に減少し、分泌期中期以降増殖期と同程度に回復した (図 1)。さらに、増殖期および分泌期中期 ESC における LGALS9 発現を *in situ hybridization* ならびに免疫組織化学染色法にて同定した。

培養 ESC に対する MPA 脱落膜化処理によって LGALS9 および FOXO1 発現は増加した (図 2_a,b)。ヒト第 17 染色体上の LGALS9 遺伝子と KSR1 遺伝子の間の 3773bp の遺伝子間領域は種を超えて保存されており、MPA 刺激でこの領域の転写活性の増大が認められた (図 2_b)。クロマチン免疫沈降 PCR 法を用いて、培養 ESC で FOXO1 が LGALS9 の発現制御領域へ直接結合することを示した (図 3_a)。さらにルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて培養 ESC における LGALS9 遺伝子発現制御領域の活性は FOXO1 によって抑制され、HAND2 によって増加することを見出した (図 3_b,c)。

脱落膜化 ESC における LGALS9/FOXO1/HAND2 発現の経時的变化を定量 PCR にて検討したところ、LGALS9 発現は刺激 1 日に有意に減少したが、12 日後には有意に増加した。HAND2 の発現は MPA 刺激 12 日間にわたって有意に増加し続けた。FOXO1 は MPA 刺激 1 日後に有意に増加し一旦停滞した後、6 日後に再び有意に増加した (図 4_a)。Phos-tag ウェスタンブロ

ットを用いて脱落膜化過程における FOXO1 のリン酸化を検討したところ MPA 刺激 3 日でリン酸化状態は変わらなかったが、刺激 12 日目に有意にリン酸化の増加を認めた (図 4_b)。FOXO1 はリン酸化によって核から細胞質に移行することから、転写制御活性が抑制される。すなわち脱落膜化 ESC では FOXO1 リン酸化によって LGALS9 の発現抑制が解放され、さらに、HAND2 によって発現が促されると考えられた。

図1

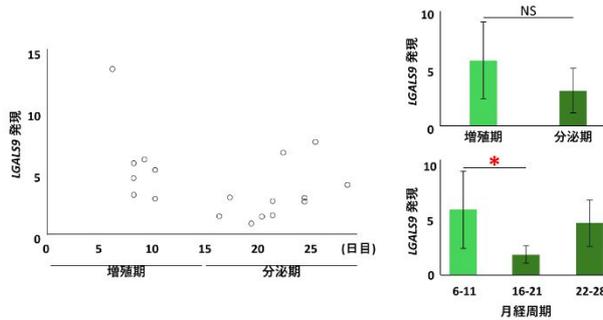


図2

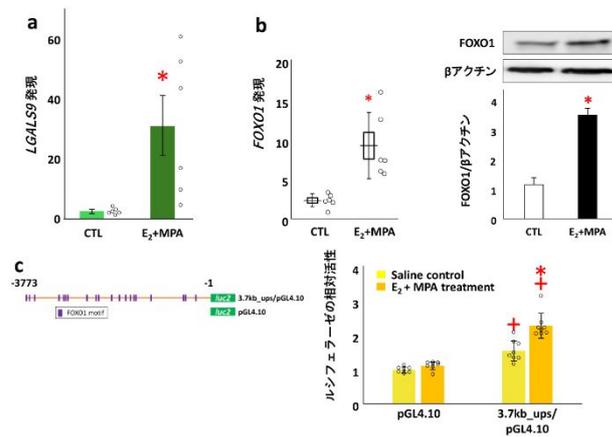


図3

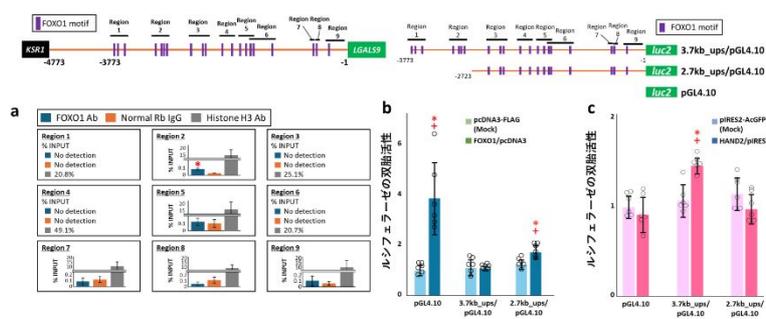
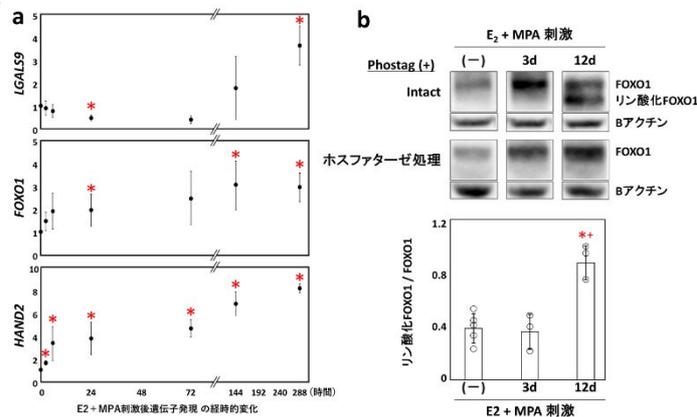


図4



図：文献 Murata H, et al. Mol Hum Reprod. 2021 から改変

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hisamatsu Yoji, Murata Hiromi, Tsubokura Hiroaki, Hashimoto Yoshiko, Kitada Masaaki, Tanaka Susumu, Okada Hidetaka	4. 巻 43
2. 論文標題 Matrix Metalloproteinases in Human Decidualized Endometrial Stromal Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Issues in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 2111～2123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cimb43030146	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 村田 紘未、田中進、岡田英孝	4. 巻 30(3)
2. 論文標題 子宮内膜免疫細胞の動態と機能	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY	6. 最初と最後の頁 203-208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murata Hiromi, Tanaka Susumu, Okada Hidetaka	4. 巻 12
2. 論文標題 The Regulators of Human Endometrial Stromal Cell Decidualization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1275～1275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom12091275	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Murata Hiromi, Tanaka Susumu, Okada Hidetaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Immune Tolerance of the Human Decidua	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 351～351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm10020351	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Murata Hiromi, Tanaka Susumu, Hisamatsu Yoji, Tsubokura Hiroaki, Hashimoto Yoshiko, Kitada Masaaki, Okada Hidetaka	4. 巻 27
2. 論文標題 Transcriptional regulation of <i>LGALS9</i> by HAND2 and FOXO1 in human endometrial stromal cells in women with regular cycles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Human Reproduction	6. 最初と最後の頁 gaab063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/molehr/gaab063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 村田紘未, 服部葵, 安原由貴, 中尾朋子, 小野淑子, 岡田英孝
2. 発表標題 脱落膜化子宮内膜間質細胞におけるLGALS9の転写制御機構の解明
3. 学会等名 日本産科婦人科学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 村田紘未, 田中進, 岡田英孝	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 臨床免疫・アレルギー科	

〔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	岡田 英孝 (OKADA Hidetaka) (80330182)	関西医科大学・医学部・教授 (34417)	

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	田中 進 (TANAKA Susumu) (30399472)	長崎県立大学・看護栄養学部・教授 (27301)	

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