

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592412

研究課題名(和文)着床不全に対する新規治療法の開発とその臨床応用

研究課題名(英文)Development of new therapeutic strategy and clinical application for implantation failure

研究代表者

梶原 健(KAJIHARA, TAKESHI)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80286103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：ヘパリンの着床周辺期子宮内膜に及ぼす影響を明らかにするため、子宮内膜間質細胞(HESCs)脱着膜化機構に与える影響を検討した。培養上清中のPRL値は、ヘパリンを添加すると上昇した。また過酸化水素を添加することにより誘導されるアポトーシス細胞は、ヘパリンを添加すると減少した。FOXO1とMn-SODの発現はヘパリンを添加するとさらにその発現は増強した。anti-apoptotic因子のbcl-2の発現もヘパリンの添加により濃度依存性に増強した。以上の結果よりヘパリンはHESCsの脱着膜化を促進し、さらには酸化ストレス抵抗性を高め、その適切な使用が着床率を向上させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A recent clinical trial demonstrated a beneficial effect of heparin administration in the luteal phase on implantation rate as well as the live birth rate in women with repeated implantation failure. However, the precise effects of heparin on decidualization process remain uncertain. Addition of heparin at various concentrations to decidualized HESCs caused a dose-dependent increase of PRL secretion. Decidualized HESCs treated with heparin dose-dependently prevented the cell death rate induced by oxidative stress. Heparin augmented both FOXO1 and SOD2 protein expression. These results demonstrate that heparin-treated decidualized HESCs acquired resistance to oxidative stress by induced expression of FOXO1 and SOD2, suggesting that heparin may improve the uterine environment for successful implantation.

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 不妊症

### 1. 研究開始当初の背景

生殖補助医療の発展により、それまでブラックボックスであった妊娠成立過程において、受精・分割を経た胚が得られるようになり、その過程が可視化されるようになりその分子メカニズムに関して多数の知見が得られている。しかし未だブラックボックスである着床現象には未解明な部分が多く、着床不全の治療法に関しては確立したものはない。この着床現象には胚と子宮内膜のそれぞれの調和のとれた成熟・分化が必要であり、これまでに我々のグループは子宮内膜の分化、即ち脱落膜化に注目し研究を継続的に行ってきた。本研究ではこれまでに我々が明らかとした脱落膜化メカニズムの知見を基に、着床不全に対する治療法の確立を目的とした研究を行った。ヘパリンはこれまでに抗リン脂質抗体症候群などの凝固異常を合併した妊婦や習慣性流産や子宮内発育遅延などの産科合併症症例に対して投与が行われ一定の効果を示してきた。また明らかな凝固異常がない習慣性流産の症例にヘパリンが投与されその臨床効果も報告されている。そのためそのヘパリンの作用機序は現在一般的に知られている抗凝固作用以外にも、抗炎症作用や免疫制御作用等が想定されている。

### 2. 研究の目的

また近年のデータでは反復着床不全例に対して黄体期にヘパリンを投与する事により着床率の上昇さらには生産率の上昇が報告され、ヘパリンの着床期周辺の直接的作用が想定されている。ヘパリンの絨毛細胞への直接作用が *in vitro* で報告されているが、脱落膜への直接作用に関する報告は少ない。本研究ではヘパリンの脱落膜化細胞への直接的な作用を培養細胞にて検討し、着床不全症例に対する有効性に関して基礎的に証明を行い、さらにはその細胞内メカニズムを明らかにする事により、これまで経験学的に使用されていた着床不全症例に対するヘパリン投与に関してその分子生物学的メカニズムを明らかとし、これまで経験学的に行われてきたこの治療に対して科学的根拠を持たせる事を目的とする。

### 3. 研究の方法

同意を得て採取した子宮内膜から HESCs を分離培養し、脱落膜化刺激として 8-bromo-cAMP と medroxyprogesterone acetate (MPA) を添加し、さらに 0.5~50 µg/ml のヘパリンを同時添加し培養した。培養上清中のプロラクチン (PRL) 濃度を測定し、また脱落膜化刺激によって誘導される転写因子である FOXO1、活性酸素消去酵素である Mn-SOD の発現についてウェスタンブロットにより検討した。この培養系に、酸化ストレスとして過酸化水素を添加し、アポトーシス細胞を測定し、ヘパリンの酸化ストレス抵抗性に与える影響について検討し

た。誘導されるアポトーシスは、ELISA 法により測定した。

### 4. 研究成果

脱落膜化マーカーである培養上清中の PRL 値は、脱落膜化刺激によりその濃度が上昇し、ヘパリンを添加するとさらに上昇した。また過酸化水素を添加することにより誘導されるアポトーシス細胞は、ヘパリンを添加すると濃度依存性に減少した。FOXO1 と Mn-SOD の発現は脱落膜化刺激により誘導され、高濃度のヘパリンを添加するとさらにその発現は増強した。anti-apoptotic 因子の bcl-2 の発現もヘパリンの添加により濃度依存性に増強した。以上の結果からヘパリンは HESCs の脱落膜化を促進し、さらには酸化ストレス抵抗性を高め、その適切な使用が着床率を向上させる可能性が示唆された。

### 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 9件)

1 Kajihara T, Tanaka K, Oguro T, Tochigi H, Prechapanich J, Uchino S, Itakura A, Sućurović S, Murakami K, Brosens JJ, Ishihara O. Androgens modulate the morphological characteristics of human endometrial stromal cells decidualized *in vitro*. *Reprod Sci* 査読あり 2014,21(3):372-80.

DOI: 10.1177/1933719113497280.

2 Prechapanich J, Kajihara T, Fujita K, Sato K, Uchino S, Tanaka K, Matsumoto S, Akita M, Nagashima M, Brosens JJ, Ishihara O. Effect of a dienogest for an experimental three-dimensional endometrial culture model for endometriosis. *Med Mol Morphol*. 査読あり 2013 Oct 20. [Epub ahead of print]

3 Kajihara T, Brosens JJ, Ishihara O. The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy. *Med Mol Morphol* 査読あり 2013,46(2):61-8.

DOI: 10.1007/s00795-013-0018-z.

4 梶原 健、高井 泰、岡垣竜吾、田谷順子、石原 理 わが国の生殖補助医療における卵子・胚凍結の現状 *HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY* 査読なし 2013,20(2): 149-54.

5 梶原 健 早発閉経 今日の臨床サポート (小西郁生監修) 査読なし 2013

<http://preview.clinicalsup.jp>

6 Kajihara T, Tochigi H, Prechapanich J, Uchino S, Itakura A, Brosens JJ, Ishihara O. Androgen signaling in decidualizing human endometrial stromal cells enhances resistance to oxidative stress. *Fertil Steril* 査読あり 2012,97(1):185-91.

DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.10.017.  
7 Kajihara T, Tochigi H, Uchino S, Itakura A, Brosens JJ, Ishihara O. Differential effects of urinary and recombinant chorionic gonadotropin on oxidative stress responses in decidualizing human endometrial stromal cells. Placenta 査読あり 2011,32(8):592-7.  
DOI: 10.1016/j.placenta.2011.05.002.  
8 Kajihara T, Uchino S, Suzuki M, Itakura A, Brosens JJ, Ishihara O. Human chorionic gonadotropin confers resistance to oxidative stress-induced apoptosis in decidualizing human endometrial stromal cells. Fertil Steril 査読あり 2011,;95(4):1302-7.  
DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.05.048.  
9 梶原 健, 岡垣竜吾, 石原 理 ARTにおける適正な移植胚数 産婦人科治療 査読なし 2011,102:489-494.  
〔学会発表〕(計 13 件)  
1 梶原 健, 小黒辰夫, 田中嘉代子, 内野聡美, 栃木秀乃, 石原 理 子宮内膜脱落膜化細胞における脂肪滴産生に対するアンドロゲンの直接的影響 第45回日本臨床分子形態学会総会・学術集会(福岡) 2013.9.13-14  
2 Kajihara T, Ishihara O, Brosens J Androgens modulate the morphological and biological characteristics of human endometrial stromal cells decidualized in vitro. The 29<sup>th</sup> Annual Meeting of ESHRE (LONDON) 2013.7.7-10  
3 梶原 健, 菊地真理子, 鈴木元晴, 岡垣竜吾, 板倉敦夫, 石原 理 フィブリンゲル3次元培養システムを用いた子宮内膜症 in vitro モデルの超微形態学的研究とその応用 第65回日本産科婦人科学会学術講演会(札幌) 2013.5.10-12  
4 梶原 健, 内野聡美, 石原 理 子宮内膜脱落膜化細胞に対するアンドロゲンの形態・機能的な影響 第86回日本内分泌学会学術総会(仙台) 2013.4.25-27  
5 梶原 健, 栃木秀乃, 岡垣竜吾, 板倉敦夫, 石原 理 アンドロゲンにより子宮内膜間質細胞の脱落膜化変化は形態的・機能的に促進される 第30回日本受精着床学会総会・学術講演会(大阪) 2012.8.30-31  
6 Prechanich P, Kajihara T, Tochigi H, Ishihara O Heparin prevents programmed cell death induced by oxidative stress in human decidualized endometrial stromal cells. 第56回日本生殖医学会・学術講演会(横浜) 2011.12.8-9  
7 梶原 健, 内野聡美, 栃木秀乃, 石原 理 アンドロゲンは子宮内膜脱落膜化細胞に対して形態的・機能的にも影響を与える 第56回日本生殖医学会・学術講演会(横浜) 2011.12.8-9  
8 梶原 健, 鈴木元晴, 板倉敦夫, 石原 理

非典型的な画像所見を呈した子宮頸部筋腫の一例 第12回子宮筋層・内膜症病変生検研究会(久留米) 2011.11.25

9 Kajihara T, Prechanich J, Tochigi H, Ishihara O. Differential effects of urinary and recombinant chorionic gonadotropin on oxidative stress responses in decidualizing human endometrial stromal cell. 16<sup>th</sup> World Congress on In Vitro Fertilization (Tokyo) 2011.9.10-13

10 Prechanich J, Kajihara T, Tochigi H, Ishihara O. Heparin prevents programmed cell death induced by oxidative stress in human decidualized endometrial stromal cells. 16<sup>th</sup> World Congress on In Vitro Fertilization (Tokyo) 2011.9.10-13

11 梶原 健, 小黒辰夫, 田中嘉代子, 内野聡美, 栃木秀乃, 石原 理 子宮内膜脱落膜化細胞に対するアンドロゲンの直接的影響 第43回日本臨床分子形態学会総会・学術集会(大阪) 2011.9.9-10

12 梶原 健, 石原 理 子宮内膜脱落膜化細胞へのhCGの直接作用はレコンピナントと尿由来で異なる 第63回日本産科婦人科学会総会・学術集会(大阪) 2011.8.29-31

13 梶原 健, 栃木秀乃, 板倉敦夫, 石原 理 ヘパリンは子宮内膜間質細胞の脱落膜化を促進する 第64回日本産科婦人科学会総会・学術集会(神戸) 2011.8.29-31

〔図書〕(計 1 件)

1 梶原 健, 石原 理 多嚢胞性卵巣症候群(PCOS) 今日の不妊診療(鈴木秋悦編集) p88-92 医歯薬出版株式会社, 2013, 336

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梶原 健 (KAJIHARA Takeshi)  
埼玉医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：80286103

### (2) 研究分担者

板倉 敦夫 (ITAKURA Atsuo)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号：70262897

### (3) 連携研究者

石原 理 (ISHIHARA Osamu)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70176212