

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592484

研究課題名(和文) ヒト着床における子宮内膜上皮細胞の運動動態の解明と新規着床支援療法の確立

研究課題名(英文) Analysis of human endometrial epithelial cell dynamics during implantation

研究代表者

内田 浩 (UCHIDA, HIROSHI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90286534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト着床の分子機序解明は、生殖補助医療の最大の障害となっている着床ロスの軽減に向けて渴望されている。従来、胚が子宮内膜の間質に陥入し妊娠が成立するには、通過すべき子宮内膜上皮細胞層が細胞死を引き起こすことで胚の陥入ルートを形成するとされてきた。本研究によって、着床期の子宮内膜上皮細胞層の破壊は細胞死によるだけでなく、子宮内膜上皮細胞の特異な遠心方向の運動によって構成されていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Knowledge of human implantation mechanism is essential for assisted reproductive technology. It is known that human endometrial epithelial cells fall into apoptosis and disappear for embryo passing through. This study demonstrated that a number of human endometrial epithelial cells efferent move away from the center of embryo attachment, in association with cell apoptosis of small number of endometrial epithelial cells during implantation in vitro.

研究分野：生殖医学

キーワード：生殖医学 着床 細胞運動 細胞接着

1. 研究開始当初の背景

めざましい技術革新をとげる生殖補助医療において、妊娠成立までのプロセスで最多のロスポイントは着床期にある。しかし、倫理的・技術的に着床期の子宮内腔への生体アプローチとは極めて制限的であり、その分子機序の解明にとって大きな壁となっている。しかしながら、このフェイズの分子機序解明は今後の生殖補助医療にとってブレイクスルーを生み出す重要な領域であり、新たな知見が渴望されている。

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で発現上昇する Glycodelin が、卵巣ステロイドホルモン依存性に発現を高め、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、さらに着床期のヒト子宮内膜上皮で上皮間充織転換 (EMT; Epithelio-Mesenchymal Transition) が観察されうることを明らかにしてきた (*Endocrinology* 2005, 2007, *Hum Reprod* 2007, *J Biol Chem* 2012) (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, 同平成 21~23 年度)。

本研究ではヒト着床において、胚の陥入ルートが形成されるのは子宮内膜上皮細胞層の細胞死によるものとされてきた、これまでの定説に加え、上皮間充織転換を介した子宮内膜上皮細胞層の集団的細胞運動が関与しているという仮説の立証を目的とした。

3. 研究の方法

ヒト着床研究に常時付随する倫理的・技術的研究制約を回避するために、ヒト細胞株 (子宮内膜上皮モデルとしてヒト子宮内膜腺癌細胞株 Ishikawa、胚モデルとして、ヒト絨毛がん細胞株 JAR の細胞塊 spheroid) を共培養して使用した *in vitro* 着床アッセイと基盤として、「ヒト着床期における胚陥入ルート形成の子宮内膜上皮細胞層のダイナミクス」を下記方法で検討した。

(1) *in vitro* 着床のリアルタイム観察

Keyence の蛍光顕微鏡 (BIOREVO® BZ-9000) を使用して、*in vitro* 着床アッセイ中の Ishikawa 細胞と JAR 細胞 spheroid の 24 時間の挙動をリアルタイムビデオで動画観察した。その際に、両細胞の挙動の違いを可視化するために、両者をそれぞれ異なった色調 (蛍光緑、蛍光赤) の好脂性着色色素 (細胞膜脂質に結合するため、細胞の外形を蛍光波長で可視化できる) でトレースした。

(2) 異種細胞間相互細胞運動の観察

(1)で観察したリアルタイムの子宮内膜上皮細胞のダイナミクスがヒト着床という特異な生命現象に限定される反応であるのかをを検証する目的で、接触する異種細胞を複数の細胞株に変換して、異種細胞間の相互反応を介した細胞運動の様子をリアルタイムに観察した。

(3) 細胞運動制御因子の検索

着床期のリアルタイムの細胞運動観察から得られた胚回避遠心運動を制御する分子の検索目的に、一般的な細胞運動を制御するとされる small GTPase である Rho family (Rho, Rac, Cdc42) および EMT 関与因子 (N-cadherin) を標的に種々阻害剤を用いて、胚回避遠心運動の違いを認めるか否かの定量解析を行った。

4. 研究成果

(1) *in vitro* 着床のリアルタイム観察

従来、ヒト着床において胚の子宮内膜間質細胞層への陥入 (= 子宮内膜上皮細胞層の通過) は、物理的・免疫学的にバリアを形成している子宮内膜上皮細胞層が、胚の接着後、胚下部においてローカルに細胞死に陥り、胚サイズの領域の子宮内膜上皮細胞層の欠落を引き起こすことで成立する、とされてきた。実際にリアルタイム観察してみると *in vitro* の本実験系においても、胚モデル (JAR spheroid) 直下の子宮内膜上皮細胞の一部が振動するような通常の細胞運動を停止し、細胞死に陥ったような状況が観察された。

しかし、胚モデル直下の子宮内膜上皮細胞層の大部分は、胚接着部位を中心点として遠心方向 (胚モデル回避方向) に細胞運動していた。

この遠心方向の細胞運動の速度を、子宮内膜上皮細胞層欠落領域を着床経過時間で除することで求めたところ、通常培地で実施した場合と比べて、卵巣ステロイドホルモン (エストラジオール、プロゲステロン) 添加群において有意に高速化していた。さらにこれまでの研究で *in vitro* 着床を亢進させることを明らかにしてきた薬剤 (ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤) では、卵巣ホルモン以上に高速化させることを見いだした。

(2) 異種細胞間相互細胞運動の観察

in vitro 着床アッセイの共培養細胞株を種々の細胞株に変更したところ、胚モデル接触に開始する胚モデル回避運動は、子宮内膜上皮細胞モデルである Ishikawa に限定された現象ではなく、子宮内膜間質細胞株 tHESC でも観察された。その回避運動の特徴的な詳細な運動形態は上皮である Ishikawa と間質である tHESC とでは異なるパターンが示されたものの、胚モデルを回避する遠心方向に運動するという点では一致していた。また、同じく子宮内膜上皮細胞株である HEC1B では Ishikawa ときわめて類似した動きを呈した。

さらに子宮内膜頸部細胞株である HeLa あるいは卵巣細胞株 CHO 細胞でも胚回避遠心運動は認められた。これらは胚モデルの接触により、子宮内腔以外でも接着、陥入のトリガーがひかれることを示唆しており、異所性妊娠の成立を反映しているものと考えられた。また、遠心運動のパターンは細胞腫により特徴を呈するものが散見され、そのパターンの違いには、胚の陥入フェイズにおける個々の細胞組織が協調しながらも独自の合理的な動きを制御している可能性を示唆していると考察している。

(3) 細胞運動制御因子の検索

予想に反して、細胞運動制御因子とされる Rho family small GTPase の阻害剤添加実験では、有意な胚回避遠心運動の亢進や遅延を認めなかった。また、EMT 制御によって胚遠心回避運動のトリガーが設定されていると仮説をたて検証したが、N-cadherin の機能は胚遠心回避運動には必須であることを示唆するデータが得られた。

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)

*corresponding author

英文論文

Miyazaki K, Miki F, Uchida S, Masuda H, Uchida H, Maruyama T*: Serum estradiol level during withdrawal bleeding as a predictive factor for intermittent ovarian function in women with primary ovarian insufficiency. **Endocr J**. 2015; 62(1): 93-99. 査読有 .
DOI: 10.1507/endocrj.EJ14-0189.

Uchida S, Uchida H, Maruyama T*, Kajitani T, Oda H, Miyazaki K, Kagami M, Yoshimura Y: Molecular analysis of a mutated FSH receptor detected in a patient with spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. **PLoS One**. 2013; 8(9): e75478. 査読有 .
DOI: 10.1371/journal.pone.0075478.

Kajitani T, Maruyama T*, Asada H, Uchida H, Oda H, Nishikawa-Uchida S, Miyazaki K, Arase T, Ono M, Yoshimura Y: Possible involvement of nerve growth factor in dysmenorrhea and dyspareunia associated with endometriosis. **Endocr J**. 2013; 60(10): 1155-1164. 査読有 .
DOI: 10.1507/endocrj.EJ13-0027

Maruyama T*, Miyazaki K, Uchida H, Uchida S, Masuda H, Yoshimura Y: Achievement of pregnancies in women with

primary ovarian insufficiency using close monitoring of follicle development: case reports. **Endocr J**. 2013; 60(6): 791-797. 査読有 .

DOI: 10.1507/endocrj.EJ13-0031

Maruyama T*, Miyazaki K, Masuda H, Ono M, Uchida H, Yoshimura Y: Human uterine stem/progenitor cells: Implications for uterine physiology and pathology. **Placenta**. 2013; 27: S68-S72. 査読有 .

DOI: 10.1016/j.placenta.2012.12.010.

[平成 25 年度日本生殖医学会学術奨励賞] Miyazaki K, Maruyama T*, Masuda H,

Yamasaki A, Uchida S, Oda H, Uchida H, Yoshimura Y: Stem cell-like differentiation potentials of endometrial side population cells as revealed by a newly developed in vivo endometrial stem cell assay. **PLoS One**. 2012; 7(12): e50749. 査読有 .

DOI: 10.1371/journal.pone.0050749.

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**. 2012; 27(3): 787-794. 査読有 .

DOI: 10.1093/humrep/der441.

[平成 24 年度日本生殖医学会学術奨励賞] Uchida H*, Maruyama T,

Nishikawa-Uchida S, Oda H, Miyazaki K, Yamasaki A, Yoshimura Y: Studies using an in vitro model show evidence of involvement of epithelial-mesenchymal transition of human endometrial epithelial cells in human embryo implantation. **J Biol Chem**. 2012; 287(7): 4441-4450. 査読有 .
DOI: 10.1074/jbc.M111.286138.

和文論文

内田 浩, 丸山哲夫, 田中 守: 目で見る母児境界面の生理と病理. **HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY** 2015; 22(1): 4-7. 査読無 .

<https://www.m-review.co.jp/ecart>

[学会発表](計 11 件)

国際学会

[Pfizer President's Presenter Award] Kaoru Miyazaki, Yuki Ueno, Hiroataka Masuda, Hiroshi Uchida, Tetsuo Maruyama: Decellularization of the rat uterus yielded scaffold capable of tissue regeneration without immune rejection upon allotransplantation. 62nd Society for

Reproductive Investigation (SRI). March 25-28, 2015, San Francisco, USA.

Hiroshi Uchida: Human endometrial epithelial cells in motion during implantation. Embryo Implantation and Pregnancy: Intricacies and strategies for its Success. March 9-11, 2015, New Delhi, India.

Kaoru Miyazaki, **Tetsuo Maruyama**, **Hiroataka Masuda**, Naoko Hida, **Hiroshi Uchida**, Yasunori Yoshimura:
Reconstruction and regeneration of the rat uterus through novel decellularization and recellularization techniques. 12nd International Society for Stem Cell Research (ISSCR). June 18-21, 2014, Vancouver, Canada.

国内学会

宮崎 薫, 上野友輝, 升田博隆, **内田 浩**, **丸山哲夫**: 同種異系移植されたラット子宮の脱細胞化マトリックスは、免疫拒絶を受けることなく組織再生を促進する。第 14 回日本再生医療学会 (神奈川県横浜市・パシフィコ横浜) 2015 年 3 月 19-21 日

太田邦明, 佐藤健二, 飯野孝太郎, 宮崎 薫, 小川誠司, 佐藤 卓, 升田博隆, **内田 浩**, 浜谷敏生, **丸山哲夫**, 末岡 浩, 田中 守: 経卵管采式卵管鏡 (Salpingoscopy) による卵管内環境のイメージング ~ 受精・胚成長に必要な卵管内生殖環境の新しい評価法を目指して ~。第 59 回日本生殖医学会 (東京都新宿区・京王プラザホテル) 2014 年 12 月 4-5 日

安康真由香, 佐藤健二, 升田博隆, 太田邦明, 宮崎 薫, 小川誠司, 佐藤 卓, **内田 浩**, 浜谷敏生, **丸山哲夫**, 末岡 浩, 田中 守: 完全中隔子宮に対する子宮鏡下手術の新しい試み 頸部中隔切断の有用性。第 59 回日本生殖医学会 (東京都新宿区・京王プラザホテル) 2014 年 12 月 4-5 日

三木史恵, **内田 浩**, 宮崎 薫, 太田邦明, 内田明花, 升田博隆, **丸山哲夫**, 田中 守: 卵巣過剰刺激症候群に対する内分泌学的加療により卵巣出血を来した一例。第 15 回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会 (埼玉県さいたま市・ラフレさいたま) 2014 年 9 月 5-6 日

三木史恵, **丸山哲夫**, 内田明花, 各務真紀, 升田博隆, **内田 浩**, 吉村泰典: 不育症診療における化学妊娠の取り扱いに

関する検討。第 32 回日本受精着床学会 (東京都新宿区・ハイアットリージェンシー東京) 2014 年 7 月 31 日-8 月 1 日

内田明花, **丸山哲夫**, 三木史恵, 各務真紀, 宮崎 薫, 升田博隆, **内田 浩**, 吉村泰典: 原因不明不育症女性における潜在性甲状腺機能低下症の検討。第 87 回日本内分泌学会 (福岡県福岡市・福岡国際会議場) 2014 年 4 月 24-26 日

内田明花, **丸山哲夫**, 三木史恵, 各務真紀, 宮崎 薫, 升田博隆, **内田 浩**, 吉村泰典, 青木大輔: 原因不明不育症には潜在性甲状腺機能低下症の亜集団が存在する。第 66 回日本産科婦人科学会 (東京都千代田区・国際フォーラム) 2014 年 4 月 18-20 日

各務真紀, **丸山哲夫**, 小泉智恵, 越川和子, 菅沼真樹, 内田明花, 宮崎 薫, 升田博隆, **内田 浩**, 吉村泰典: 不育症学級を活用した不育症患者夫婦へのメンタルヘルスケアの有効性に関する検討。第 66 回日本産科婦人科学会 (東京都千代田区・国際フォーラム) 2014 年 4 月 18-20 日

〔図書〕(計 1 件)

内田 浩 他: 医学出版, 生殖医療ポケットマニュアル 2014, 100-124.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 浩 (UCHIDA, Hiroshi)
慶應医義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 90286534

(2) 研究分担者

丸山 哲夫 (MARUYAMA, Tetsuo)
慶應医義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 10209702

升田 博隆 (MASUDA, Hiroataka)
慶應医義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 80317198

(平成 24 年 11 月 1 日付で分担者に追加)