

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670695

研究課題名(和文)子宮の胚受容能獲得に寄与する新規分子の同定

研究課題名(英文)Elucidation of novel factors contributing to the acquisition of uterine receptivity

研究代表者

廣田 泰 (HIROTA, YASUSHI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40598653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：着床は子宮体部の子宮内膜で起こり、子宮頸部や頸管部分では起こりにくい。子宮体部と子宮頸部のプロゲステロン(P)のシグナルの違いがあるのではないかと考えて、野生型マウス子宮体部と頸部の着床直前の分子変化を比較した。子宮頸部では子宮体部に比較してmicroRNA-200aが増加によるプロゲステロン受容体(PR)発現低下とStat5低下が認められ、Stat5低下はP代謝酵素20-HSD増加が認められた。PR低下と局所のP代謝促進により、子宮頸部ではPシグナルが低下し着床しない可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The embryo does not normally implant in the cervix but in the uterus. Stromal proliferation and epithelial differentiation, what we here call the proliferation/differentiation switching (PDS), occurs in the receptive uterus. We found that progesterone (P) signaling induces PDS and successful implantation in the receptive uterus, while elevated microRNA-200a leads to the reduction of PR expression and the promotion of P metabolism, and further non-responsiveness of PDS in the cervix. These findings indicate that P signaling deficiency by microRNA-200a confers cervical non-responsiveness to embryo implantation.

研究分野：産婦人科学、生殖医学、生殖生物学

キーワード：着床 胚受容能 子宮 プロゲステロン プロゲステロン受容体 妊娠

1. 研究開始当初の背景

着床とは妊卵と子宮壁との間の器質的な結合が成立した状態であり、妊娠の起点ともいえる現象である。着床の場では、遺伝的に異なる細胞が結合するため極めて例外的な生物現象が起こっている。卵と子宮内膜との接触がある特定の条件においてのみ着床が成立することから、両者の時間空間的に精妙な協調作用が必要とされる。着床の研究はこれまで主として形態学的な観察に終始し、その機序は未だ明らかでない。着床研究は生命科学の見地から興味深いだけでなく、臨床生殖医学の見地からもその成果は不妊治療への応用や避妊法の開発という点で現代社会からの要求が高まっている分野である。

多様な細胞の混在する子宮内膜は、エストロゲン (E) と黄体ホルモンとして知られるプロゲステロン (P) という 2 つのステロイドホルモンによって一時的に着床に適した状態になる。ヒトおよびマウスでは胚の受容期に P 上昇と軽度の E 上昇がみられる。E および P は核内受容体であるエストロゲン受容体 (ER) および P 受容体 (PR) を介して遺伝子の転写調節を行う。P は「妊娠ホルモン」とも呼ばれ、PR を介して、子宮内膜の胚受容能、着床、脱落膜化 (子宮内膜間質細胞の分化)、妊娠維持に関わる遺伝子を活性化する。ヒトの不妊症診療では、着床期に P の血中濃度が低い黄体機能不全の症例や体外受精・胚移植の症例に対する P 製剤の投与が行われ、臨床的な観点でも着床における P の有効性は知られている。子宮内膜に胚受容能を付与する P の作用に関与する分子のいくつかは同定されてきたが、その作用経路は未だ十分に解明されていない。

PR 機能は PR シャペロン複合体によっても調節を受ける。複合体構成因子のうち、PR コシャペロン FKBP52 には、複合体の立体構造を調節し P と PR の結合を強化することで PR 機能を最大限に保つ働きがある。PR 複合体は、受容体単量体、シャペロン蛋白 Hsp90 二量体、p23 および Hsp90 との結合に必要な TPR 配列を含む 4 つのコシャペロンのうちの 1 つで構成される。FKBP52 はその 4 つのコシャペロンの一つであり、Hsp90 と PR の両者に結合し PR 複合体の構造を安定化させることで P と PR の結合を強化し、P-PR シグナルを増強する。一方 FKBP52 欠損時においては PR の下流のシグナルは低下するが、両者の結合自体は最低限保たれているので、シグナルは低下するものの最低限保たれている。そのため大量 P を投与することによってシグナルを増強することができる。FKBP52 欠損のメスマウスは、排卵および卵巣からの P 分泌などの卵巣の表現型が正常である一方、子宮では P 応答能が低下するため、相対的にエストロゲン作用が増強し、着床直前の適切な子宮内膜の分化・増殖の状態が得られず、着床障害をきたす。この着床障害は P の補充により救済される。さらに、FKBP52

欠損マウスに対して少量の P を投与した際には着床が救済されるものの、その後の妊娠は継続できず流産してしまう。しかし大量の P を投与した際には、正常な妊娠・分娩が可能になる。このように FKBP52 欠損マウスは子宮の P に対する反応が低下した状態を有するモデルマウスとして、P 研究には有用な *in vivo* の系であるといえる。

2. 研究の目的

P が子宮に胚受容能をもたらし、さらに子宮が着床を誘導する機構の解明を目指して本研究を計画した。本研究では、着床、特に子宮の胚受容能獲得における P の作用機序についてのマウスモデルを用いて検討した。

3. 研究の方法

本研究では、

- (1) まず、FKBP52 欠損マウスを用いてプロテオミクス解析を行い、P 依存的に誘導される因子を同定、その機能解析を行った。
- (2) 次に、子宮頸部と体部の着床能の違いに着目し、野生型マウス子宮を用いて着床前の細胞増殖に着目した研究を行った。

4. 研究成果

- (1) FKBP52 欠損マウスの子宮を用いたプロテオミクス解析から、P 依存的に子宮内膜間質に誘導される galectin-1 という糖結合性蛋白分子が見出された。さらに、galectin-1 の補充によって FKBP52 欠損マウスでおこる P 機能が低下したため起こる流産を抑制できることが判明した。着床直前の子宮内膜では、上皮の細胞増殖が止まって細胞分化が開始し、間質の細胞増殖が開始することが知られており、各種の着床不全マウスモデルの結果から、この子宮内膜の分化-増殖状態の劇的な変化が子宮の胚受容能の指標になると考えられている。FKBP52 欠損マウスにおいてこの子宮内膜の分化-増殖の変化が欠失しており、P 補充によりこの変化が認められるようになることが判明し、P 依存的な変化であることが明らかとなった。
- (2) 着床は子宮体部の子宮内膜で起こり、子宮頸部や頸管部分では起こりにくい。子宮体部と子宮頸部の P シグナルの違いがあるのではないかと考えて、野生型マウス子宮体部と頸部の着床直前の分子変化を比較した。子宮頸部では子宮体部に比べて PR シグナルが低下しており、micro RNA (miR)-200a によって PR 発現が抑制されていることが明らかになった。miR-200a は Stat5 低下を介して P 代謝酵素である 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (20 α -HSD) を増加させることが報告されており、本研究でも子宮頸部での Stat5 低下と 20 α -HSD 増加が確認

された。これらの検討から、子宮頸部では子宮体部に比較して miR-200a が増加しており、PR 低下と局所での P 代謝促進を介して、P シグナルが低下している可能性が示された。さらに、子宮体部の子宮内膜において着床直前に miR-200a 発現が低下することが明らかとなった。

galectin-1 は T 細胞、特に Th1 細胞のアポトーシスを誘導し Th2 免疫寛容を誘導すること、galectin-1 欠損マウスではストレス誘導性の流産が増加することが知られていることから、P が galectin-1 を介して Th2 優位の妊娠維持に有利な免疫環境を誘導している可能性が示唆される。

着床期子宮内膜においては miR-200a 低下によって P シグナルが強化されている可能性が示唆された。本研究により、子宮における micro RNA を介した新たな P シグナル調節による着床の分子機構が明らかになった。

P および PR による時間・空間的な分子調節の詳細を明らかにすることで、子宮の胚受容能を規定しているしくみの全貌が明らかになると思われる。今後の研究により、ヒトにおける不妊治療への応用や新たな避妊法の開発に結び付けたいと考えている。

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 15 件)

1. Haraguchi H, Saito-Fujita T, Hirota Y, Egashira M, Matsumoto L, Matsuo M, Hiraoka T, Koga K, Yamauchi N, Fukayama M, Bartos A, Cha J, Dey SK, Fujii T, Osuga Y. Mol Endocrinol. 査読有, Vol.28, 2014, pp.1108-1117, DOI: 10.1210/me.2014-1097.
2. Cha J, Bartos A, Egashira M, Haraguchi H, Saito-Fujita T, Leishman E, Bradshaw H, Dey SK, Hirota Y. Combinatory approaches prevent preterm birth profoundly exacerbated by gene-environment interactions. J Clin Invest. 査読有, Vol.123, 2013, pp.4063-4075, DOI: 10.1172/JCI70098.
3. Santoso EG, Yoshida K, Hirota Y, Aizawa M, Yoshino O, Kishida A, Osuga Y, Saito S, Ushida T, Furukawa KS. Application of detergents or high hydrostatic pressure as decellularization processes in uterine tissues and their subsequent effects on in vivo uterine regeneration in murine models. PLoS One. 査読有, Vol.9, 2014, pp. e103201. DOI: 10.1371/journal.pone.0103201.
4. Urata Y, Osuga Y, Akiyama I, Nagai M, Izumi G, Takamura M, Hasegawa A, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Yoshino O, Koga K, Kozuma S. J Clin Endocrinol Metab. 査読有, Vol.98, 2013, pp. 1583-1590. DOI: 10.1210/jc.2012-3475.
5. Urata Y, Koga K, Hirota Y, Akiyama I, Izumi G, Takamura M, Nagai M, Harada M, Hirata T, Yoshino O, Kawana K, Fujii T, Osuga Y. IL-18 increases expression of tryptophan 2,3-dioxygenase and stimulates tryptophan catabolism in endometrioma stromal cells. Am J Reprod Immunol. 査読有, Vol.72, 2014, pp.496-503. DOI: 10.1111/aji.12282.
6. Hirata T, Izumi G, Takamura M, Saito A, Nakazawa A, Harada M, Hirota Y, Koga K, Fujii T, Osuga Y. Efficacy of dienogest in the treatment of symptomatic adenomyosis: a pilot study. Gynecol Endocrinol. 査読有, Vol.30, 2014, pp.726-729, DOI: 10.3109/09513590.2014.926882.
7. Miyashita M, Koga K, Takamura M, Izumi G, Nagai M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Fujii T, Osuga Y. Dienogest reduces proliferation, aromatase expression and angiogenesis, and increases apoptosis in human endometriosis. Gynecol Endocrinol. 査読有, 2014 Vol.30, pp.644-648, DOI: 10.3109/09513590.2014.911279.
8. Akiyama I, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Takamura M, Harada M, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Fujii T, Saito S, Kozuma S. The role of bone morphogenetic protein 6 in accumulation and regulation of neutrophils in the human ovary. Reprod Sci. 査読有, Vol.21, 2014, pp.772-777, DOI: 10.1177/1933719113518988.
9. Akiyama I, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Harada M, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Fujii T, Saito S, Kozuma S. Bone morphogenetic protein 7 increased vascular endothelial growth factor (VEGF)-A expression in human granulosa cells and VEGF receptor expression in endothelial cells. Reprod Sci. 査読有, Vol.21, 2014, pp. 477-482, DOI: 10.1177/1933719113503411.
10. Egashira M, Hirota Y. Uterine receptivity and embryo-uterine interactions in embryo implantation: lessons from mice.

Reprod Med Biol. 査読有, Vol.12, 2013, pp. 127-132, DOI: 10.1007/s12522-013-0153-1.

11. Hirota Y. Endometrial cellular senescence contributes to preterm birth. *Inflam Regen.* 査読有, Vol.34, 2014, pp. 64-68, DOI: 10.2492/inflammregen.34.064.
12. 松尾光徳, 廣田泰. プロテオミクスを用いた妊娠成立・維持機構の研究. *HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY.* 査読無, Vol.22, 2015, pp. 11-17, DOI: なし
13. 藤田知子, 廣田泰. 着床における黄体ホルモン(プロゲステロン)の作用. *医学のあゆみ.* 査読無, Vol.248, 2014, pp. 914-915, DOI: なし
14. 廣田泰, 藤田知子, 大須賀穰, 藤井知行. 着床期子宮におけるプロゲステロンの作用機構. *日本生殖免疫学会誌.* 査読無, Vol.29, 2014, pp. 6-11, DOI: なし
15. 廣田泰. 加齢と炎症 免疫老化と細胞老化による加齢炎症のニッチ形成. 別冊 *BIO Clinica* 慢性炎症と疾患. 査読無, Vol.2, 2013, pp. 40-46, DOI: なし

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 廣田泰. Decidual cellular senescence contributes to preterm delivery. 46th International Congress on Pathophysiology of Pregnancy / 35th Japan Society for the Study of Hypertension in Pregnancy. (招待講演). 2014年9月19日, 新宿京王プラザホテル(東京).
2. 江頭真宏, 廣田泰, 藤田知子, 原口広史, 松本玲央奈, 松尾光徳, 平岡毅大, 大須賀穰, 藤井知行. 分娩後子宮に存在する老化細胞の除去機構と次回妊娠への影響. 第29回日本生殖免疫学会. 2014年12月13日, 東京大学伊藤謝恩ホール(東京).
3. 江頭真宏, 廣田泰, 藤田知子, 原口広史, 松本玲央奈, 松尾光徳, 平岡毅大, 大須賀穰, 藤井知行. 分娩後子宮に存在する老化細胞のクリアランス機構と子宮機能への影響. 第35回日本炎症・再生医学会. 2014年7月2日, 万国津梁館(名護).
4. 江頭真宏, 廣田泰, 藤田知子, 原口広史, 松本玲央奈, 松尾光徳, 大須賀穰, 藤井知行. マウス妊娠子宮に出現する老化細胞のクリアランス機構. 第87回日本内分泌学会学術総会. 2014年4月26日, 福岡国際会議場(福岡).
5. 廣田泰. 妊娠成立に関わるプロゲステロン・シグナルの意義とその調節機構.

第87回日本内分泌学会学術総会(招待講演).

- 2014年4月24日, 福岡国際会議場(福岡).
6. 廣田泰. 黄体ホルモンによる子宮内膜の機能調節と着床. 第29回日本生殖免疫学会(招待講演). 2014年12月12日, 東京大学伊藤謝恩ホール(東京).
7. Hirota Y. MicroRNA-200a confers progesterone signaling deficiency making the cervix unfavorable to embryo implantation. Gordon Research Conference on Mammalian Reproduction (招待講演). 2014年8月13日, New London (USA).
8. 廣田泰. Defective decidualization with cellular senescence and its outcome. The 9th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility (招待講演). 2013年11月16日, 神戸国際会議場(神戸).
9. 廣田泰. プロゲステロン・シグナルと着床~マウスモデルから得た新しい知見. 第31回日本受精着床学会(招待講演). 2013年8月9日, 別府国際コンベンションセンター(別府).
10. 廣田泰. 細胞老化シグナルを介した早産の発生機構に着目した新しい治療アプローチについての提案. 第41回日本臨床免疫学会(招待講演). 2013年11月28日, 海峡メッセ下関(下関).

〔図書〕(計 1 件)

1. 廣田泰. 監修: 武谷雄二, 上妻志郎, 藤井知行, 大須賀穰. メジカルビュー社. プリンシプル産科婦人科学 1 婦人科編. 2014. 総ページ数 920 頁.

〔その他〕

1. ホームページ: <http://square.umin.ac.jp/kyobgyn/>
2. Haraguchi H, et al. *Mol Endocrinol* 論文が、*Nature Reviews Endocrinology* の Research Highlight で紹介された(*Nature Reviews Endocrinology* 10, 445, 2014)。
3. 第29回日本生殖免疫学会での江頭真宏らの演題が学会賞および最高得点演題賞を受賞した。

6. 研究組織

- (1)研究代表者
廣田 泰 (HIROTA, Yasushi)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 40598653