

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861508

研究課題名(和文) 習慣流産と関与するヒト子宮脱落膜細胞の子宮NK細胞とレチノイド代謝経路の解析

研究課題名(英文) Analysis of uterine natural killer cells and retinoid metabolism pathway during decidualization of human endometrial stromal cells

研究代表者

黒田 恵司 (Kuroda, Keiji)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60459162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠において、子宮内膜が脱落膜細胞に変化した後に、受精卵が着床し妊娠が成立する。この時、子宮内膜間質細胞の子宮NK細胞から放出されるサイトカインにより、新生血管を形成し着床や妊娠維持に関わることがわかっており、子宮NK細胞の異常高値は反復した妊娠不成立や流産の原因となる。我々は子宮NK細胞を制御する、11 HSD1/GR/MRシグナル経路を明らかにし、かつMRを介したレチノイド代謝経路が子宮内膜脱落膜化における細胞分化とアポトーシス過程を制御していることを明らかにした。また子宮内膜の細胞分化と考えられてきた脱落膜化過程は、細胞分化だけでなくアポトーシス過程も重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In pregnancy, decidual transformation of human endometrial stromal cells (HESCs) is essential for embryo implantation. Uterine natural killer (uNK) cells in HESCs induce angiogenesis at implantation, but aberrant elevated uNK cell levels are associated with reproductive failure including recurrent pregnancy loss. We identified that 11 HSD1/GR/MR signaling pathway regulated uNK cells and MR-dependent retinoid (vitamin A) metabolism pathway in primary HESC cultures decidualized in vitro. The wholesale reprogramming of the retinoid signaling, transport, and metabolism pathways in decidualizing HESCs may be critical in limiting exposure of the implanting conceptus in early pregnancy. Furthermore, optimal decidual transformation of primary cultures may involve not only cell differentiation also apoptosis or senescence of specific subpopulations.

研究分野：生殖医療

キーワード：子宮内膜 脱落膜化 妊娠 習慣流産 レチノイド 子宮NK細胞 レスベラトロール サーチュイン

1. 研究開始当初の背景

ヒトの妊娠において、子宮内膜が脱落膜細胞に変化(脱落膜化)した後に、受精卵が着床し妊娠が成立する。一般的に受精卵の約30%が着床前に喪失され、更に30%が着床直後に淘汰される。また更に妊娠後10-20%が、妊娠初期に流産する。妊娠女性の2-5%に3回以上繰り返す流産(習慣流産)を認め、2011年度厚生労働省研究班の報告でも、その半分以上が未だ原因不明である。流産の研究はマウスなどの流産の少ない種での動物研究が難しく、また体外受精が一般的な治療となった今日、受精卵による研究は進んできたが、子宮内膜とその後の脱落膜細胞の研究は未解明な点が多いままであり、そのため治療法も未だ確立されていない。

近年、妊娠と子宮NK細胞の関連性が報告され、子宮NK細胞から放出される様々なサイトカインにより、新生血管を形成し着床や妊娠維持に関わることが示されてきた(Moffett-King, Nat Rev Immunol. 2002)。一方で子宮内膜間質細胞における子宮NK細胞の異常高値が、反復した妊娠不成立や流産の原因となると考えられている(Quenby et al, Hum Reprod. 2009)。最近、習慣流産症例に対するグルココルチコイド、特にプレドニゾロンの投与の有効性が報告され、グルココルチコイドが異常高値の子宮NK細胞を抑制し、妊娠初期流産を予防すると考えられている(Quenby et al, Fertil Steril. 2005, Quenby et al, Human Reprod. 2009)。グルココルチコイドは不活性型であるコルチゾンと活性型のコルチゾールを含み、11 HSDが互いを触媒する。11 HSD1は主にコルチゾンを活性化しコルチゾールにし、11 HSD2はコルチゾールを不活化する(Cortisol-Cortisone interconversion、図1)。我々は、ヒト子宮内膜の *in vitro* の脱落膜化過程において、11 HSD1の著名な発現と酵素活性の上昇を認め、着床部位においてコルチゾールが生成され、その結合受容体であるグルココルチコイド受容体(GR)とミネラルコルチコイド受容体(MR)の遺伝子ネットワークの存在を明らかにした。特にコルチゾン製剤であるプレドニゾロンは11 HSD1により活性化されコルチゾールとなり、GRと結合し子宮内膜脱落膜化におけるエピジェネティックな問題による流産を改善し、一方でMRと結合し、MR依存性酵素であるDHRS3を通して、脱落膜細胞の脂肪滴内レチノイド貯蓄経路が制御されることが示された(Kuroda et al 2012)。また臨床における習慣流産患者群と対象群、10例ずつを比較し、習慣流産患者の

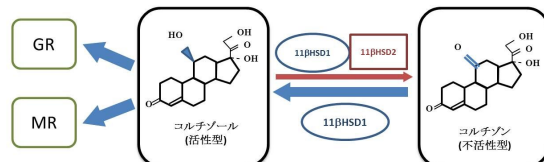


図1. Cortisol-Cortisone interconversion  
11βHSD: 11βヒドロキシステロイド脱水素酵素, GR: グルココルチコイド受容体, MR: ミネラルコルチコイド受容体. グルココルチコイドはコルチゾンとコルチゾールを含み、11βHSDが互いを触媒し、11βHSD1は主にコルチゾンを活性化しコルチゾールにし、11βHSD2はコルチゾールを不活化する。

子宮脱落膜細胞にお

いて11 HSD1とMRの発現レベルが有意に低下していることを明らかにし、11 HSD1/GR/MR経路が習慣流産と強く関与していることが示唆された。

2. 研究の目的

多くの習慣流産症例では子宮内膜細胞の子宮NK細胞数が正常妊孕能女性と比較し、有意に高く、11 HSD1、MRの発現が低下している。これらのことから、GRを受容体に持つ子宮NK細胞の異常高値は、不適切な子宮内膜脱落膜化に伴う11 HSD1/GR/MRシグナル経路の発現の低下による子宮NK細胞の制御が不足していることが予想される。また11 HSD1/GR/MRシグナル経路はMRを通して、細胞分化や免疫寛容と関わるレチノイド代謝経路を制御し、更には子宮内膜脱落膜化をコントロールしていることが示唆される。

習慣流産は肉体的にも精神的にも患者のダメージが大きいのにも関わらず、その治療法は未だ確立されていない。この研究により、子宮内膜脱落膜化の新たなメカニズムを明らかにし、更には原因不明と考えられていた子宮内膜由来の習慣流産の発生機序を検討することが可能であり、流産に苦しむ患者の治療を可能にすることを目的とした。

3. 研究の方法

インフォームドコンセントし同意を得た患者より、採取した黄体期のヒト子宮内膜細胞の一部を免疫染色し、子宮内膜間質細胞のうちCD56陽性細胞<5%を子宮NK細胞密度正常とした。子宮NK細胞密度高値例(n=18)と正常例(n=18)を11 HSD1, GR, MRで染色し、組織マイクロアレイで解析した。また *in vitro* の初期培養後、cAMP + プロゲステロン + コルチゾンを添加し脱落膜化させた細胞を回収し、分子解析を行った。子宮NK細胞と11 HSD1, GR, MRやMR依存性のレチノイド関連遺伝子の発現を確認した。

採取した子宮内膜を *In vitro* を培養した後、cAMP + プロゲステロン + コルチゾンを添加し、更にレチノイン酸 (retinoic acid: RA) やレチナル (retinaldehyde: Rald) を添加し、脱落膜化させ細胞を回収、レチノイド関連遺伝子や脱落膜化マーカー (PRL, IGFBP1, 11 HSD1) の分子解析を行い、非添加群と比較検討を行った。

ブドウなどに含まれるレスベラトロールはSirtuin (SIRT)1を活性化し、レチノイン酸シグナルを含む様々な分子経路を介し、細胞老化や酸化ストレスを抑制する。脱落膜化過程でレスベラトロールを添加し、レチノイン酸シグナル関連遺伝子および脱落膜マ

ーカー (PRL, IGFBP1) の発現を分子解析し、非添加群と比較検討した。

#### 4. 研究成果

異常増加した子宮 NK 細胞密度は、in vivo での 11 HSD1 と MR の発現低下を認めたが、GR との関与は認めなかった。また子宮 NK 細胞密度高値例は in vitro で初期培養、脱落膜化後、脱落膜マーカー (PRL, IGFBP1, 11 HSD1) と MR 依存性レチノイド代謝酵素 (DHRS3, RETSAT) の発現低下を認めた。子宮 NK 細胞の調節サイトカインである IL11 と IL15 の発現は、子宮 NK 細胞密度と相関は認めなかった。

GR を持つ子宮 NK 細胞は、グルココルチコイドにより制御されることは明らかである。11 HSD1 を介したコルチコイドシグナリングの発現低下が子宮 NK 細胞の異常増加を誘起することが示唆され、また MR を介してレチノイド貯蓄経路と関与する酵素の発現の欠如や、脱落膜化異常を導き、流産と関与する可能性が示唆された。

子宮内膜脱落膜化過程で RA/RaId 添加により脱落膜化マーカーは濃度依存性に抑制された。また脱落膜化とともに細胞内 RA と RaId 濃度の著大な低下を認め、また RA の細胞内結合蛋白 CRABP2、FABP5 の発現も有意に低下していた。RA 核内受容体は脱落膜化により、アポトーシスの誘導を担う RAR の発現が減少する一方で、細胞分化を促進する PPAR $\beta$ / $\delta$  が著名に発現していた (図 2)。更に RA/RaId 添加で CRABP2 と RAR の発現の増加を認めたが、細胞分化と関与する FABP5、PPAR $\beta$ / $\delta$  は変化を認めなかった (図 3)。レチノイド代謝に関与する遺伝子は脱落膜化変化とともに RaId をレチノールへ還元する酵素 DHRS3 とレチノール輸送蛋白 RBP4 が上昇し、RaId 添加により更に著大な発現を認めた。また RA 不活化酵素 CYP26A1 は脱落膜化で発現が増強し、RA/RaId 添加で明らかな変化を認めなかった。

これらのことから、子宮内膜脱落膜細胞に

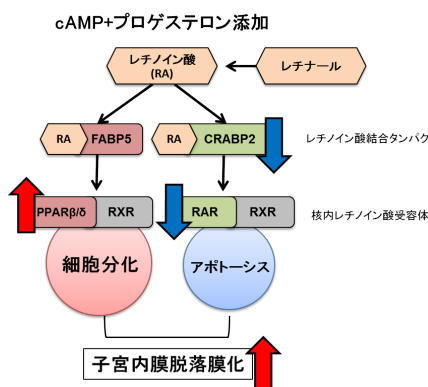


図2: レチノイン酸シグナルと子宮内膜脱落膜化  
レチノイン酸は、FABP5により、核内へ移送され、PPAR $\beta$ / $\delta$ とRXRの複合体と結合し、細胞分化を誘導する。一方でCRABP2と結合したレチノイン酸はRAR-RXR複合体と核内で結合し細胞をアポトーシスに導く。cAMP+プロゲステロンを添加すると細胞分化が促進し、アポトーシス過程が抑制され、子宮内膜脱落膜化が起こる。

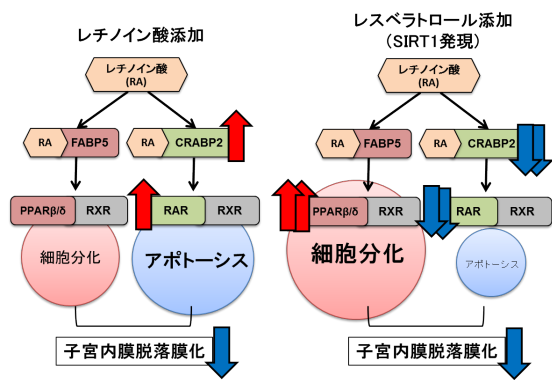


図3: 子宮内膜脱落膜化におけるレチノイン酸シグナル  
レチノイン酸添加によりアポトーシスを誘導するCRABP2-RARシグナルが著名に発現し、脱落膜化マーカーの発現が抑制される。またレスベラトロールの添加によるSIRT1の発現により、細胞分化誘導に関わるPPAR $\beta$ / $\delta$ の発現が増加し、アポトーシス過程に関わるCRABP2およびRARの発現は抑制される。しかし、子宮内膜脱落膜化は抑制される。

おける RA/RaId は RAR を介し脱落膜化を抑制することが示された。細胞内 RA や RaId が減少し、細胞分化である脱落膜過程を制御し、一方で余剰な RaId は DHRS3 や RBP4 を介して細胞外で着床などに働く可能性が示唆された。

レスベラトロールの添加により子宮内膜間質細胞の SIRT1 発現が亢進した。またレスベラトロール添加により、子宮内膜脱落膜化過程において PPAR $\beta$ / $\delta$  の発現増加 (細胞分化の誘導) と CRABP2-RAR シグナル (アポトーシスの誘導) の発現抑制を認め、2 つのレチノイン酸シグナルを制御していた。しかし、脱落膜化マーカーである PRL、IGFBP1 の発現は著名に抑制された (図 3)。

これらのことから、レスベラトロールは SIRT1 遺伝子およびレチノイン酸シグナルを介し、細胞分化を誘導しアポトーシスを抑制していたが、着床に重要な子宮内膜脱落膜化を抑制していた。子宮内膜の細胞分化と考えられてきた脱落膜過程はアポトーシス経路も重要であることが示唆された。

#### 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1件)

Kuroda K, Venkatakrisnan R, James S, Sucurovic S, Mulac-Jericic B, Lucas ES, Takeda S, Shmygol A, Brosens JJ, Quenby S. Elevated Peri implantation Uterine Natural Killer Cell Density in Human Endometrium Is Associated With Impaired Corticosteroid Signaling in Decidualizing Stromal Cells. J Clin Endocrinol Metab. 2013; 98: 4429-37. 査読あり

他、投稿予定あり

(学会発表)(計14件)

黒田恵司、尾崎理恵、北出真理、熊切順、板倉敦夫、竹田省、ヒト子宮内膜間質細胞

胞内レチノイン酸、レチナール濃度の減少が  
脱落膜化過程を制御する、第 88 回日本内分  
泌学会学術講演会、ホテルニューオータニ、  
東京、2015 年 4 月

Rie Ozaki, Keiji Kuroda, Mari Kitade,  
Jun Kumakiri, Makoto Jinushi, Azusa Shinjo,  
Noriko Kato, Yuko Ikemoto, Satoru Takeda,  
Decrease in intracellular retinoic acid  
regulates decidual transformation of  
human endometrial stromal cells,  
IFFS/JSRM international meeting, パシフ  
エコ横浜、神奈川 横浜、2015 年 4 月

Rie Ozaki, Keiji Kuroda, Tsutomu  
Fujimura, Akemi Matsumoto, Atsuo Itakura,  
Jan J Brosens, Satoru Takeda,  
Decidualization of human endometrial  
stromal cells regulates cellular and  
extracellular retinoic acid levels at  
implantation, ESHRE annual meeting, ポル  
トガル リスボン、2015 年 6 月

黒田恵司、天然型プロゲステロン製剤に  
期待する着床や流産への効果、最適な不妊治  
療カンファレンス、赤坂エクセルホテル東急、  
東京、2015 年 6 月（招待講演）

黒田恵司、生殖医療における天然型プロ  
ゲステロン製剤の新たな可能性 子宮内膜  
の研究データを基に、第 33 回日本受精着  
床学会総会・学術講演会、TFT ホール、東京、  
2015 年 11 月（招待講演）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒田 恵司 (KURODA, Keiji)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：60459162

### (2) 研究協力者

尾崎 理恵 (OZAKI, Rie)  
順天堂大学・医学部・大学院生

落合 阿沙子 (OCHIAI, Asako)  
順天堂大学・医学部・大学院生

池本 裕子 (IKEMOTO, Yuko)  
順天堂大学・医学部・大学院生