慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ヒト着床期子宮内膜細胞のEMTを介した細胞動態制御機構の解明
Sub Title	Analysis of human endometrial cell dynamics during human implantation
Author	内田, 浩(Uchida, Hiroshi) 丸山, 哲夫(Maruyama, Tetsuo) 升田, 博隆(Masuda, Hirotaka) 内田, 明花(Uchida, Sayaka) 日原, 華子(Hihara, Hanako)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	わが国の生殖補助医療における最大の懸案である伸び悩む着床率の向上に対してのヒト着床の機序解明の一端として、子宮内膜上皮に加えて間質細胞を含めた子宮内膜細胞群全体のEMTを中心とした相互反応的な細胞動態を解析した。これまで卵巣ステロイドホルモンおよびヒストン脱アセチル化阻害剤での誘導が可能であった子宮内膜上皮細 胞の形態変化、分化マーカータンパク質の発現上昇はTGFβや一部のインターロイキンで誘導できた。また、それらの液性因子の添加によって、子宮内膜上皮細胞の胚接着能、運動能に変化を認めた。一方でそれら着床に効果的に働くと考えられる一連の影響は卵巣ホルモンによる効果とは独立していた。 To improve the ratio of successful implantation in in vitro fertilization and embryo transfer, we investigated whether the orchestrated coordination between endometrial epithelial and stromal cells functions in human implantation, controlling epithelio-mesenchymal transition. We have reported that one of histone deacetylase inhibitors (SAHA) can induce the morphological change and up-regulation of differentiation marker proteins in human endometrial epithelial cells (EECs), as ovarian steroid hormones can do. In this study, we found that tumor growth factor beta and a kind of interleukins also could induce the morphological change and differentiation in EECs. Furthermore, the stimulants can also up-regulate the cell motility and the adhesion ability to embryo model of EECs. The effect which can assist successful implantation is independent on the regulation by ovarian steroid hormones and histone deacetylase inhibitor.
Notes	研究種目 : 基盤研究(C)(一般) 研究期間 : 2016 ~ 2018 課題番号 : 16K11109 研究分野 : 産婦人科学, 生殖医学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K11109seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月　 ４ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ１１１０９

研究課題名（和文）ヒト着床期子宮内膜細胞のEMTを介した細胞動態制御機構の解明

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

研究代表者
内田　浩（UCHIDA, Hiroshi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：９０２８６５３４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：わが国の生殖補助医療における最大の懸案である伸び悩む着床率の向上に対してのヒト着床の機序解明の一端として、子宮内膜上皮に加えて間質細胞を含めた子宮内膜細胞群全体のEMT を中心とした相互反応的な細胞動態を解析した。
　これまで卵巣ステロイドホルモンおよびヒストン脱アセチル化阻害剤での誘導が可能であった子宮内膜上皮細胞の形態変化、分化マーカータンパク質の発現上昇はTGFβや一部のインターロイキンで誘導できた。また、それらの液性因子の添加によって、子宮内膜上皮細胞の胚接着能、運動能に変化を認めた。一方でそれら着床に効果的に働くと考えられる一連の影響は卵巣ホルモンによる効果とは独立していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
　今回の研究で、卵巣ステロイドホルモンやヒストン脱アセチル化阻害剤の他にも、ヒト着床における子宮内膜上皮細胞と胚とのインタラクション（着床の初期段階）において、その進行をアシストしうる液性薬剤としてTGFβやある種のインターロイキンが候補になりえることがわかってきた。また、その効果が卵巣ステロイドホルモンによる効果とは別の経路を使っている可能性が示唆された。
　当初の目標としていた子宮内膜間質細胞も含めたインタラクションの解明や、EMTを引き起こすトリガー因子の解明にまでは至らなかったため、今後も継続研究を要するが、着床支援治療としてホルモン剤以外の選択肢を増やす可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：To improve the ratio of successful implantation in in vitro fertilization and embryo transfer, we investigated whether the orchestrated coordination between endometrial epithelial and stromal cells functions in human implantation, controlling epithelio-mesenchymal transition.
We have reported that one of histone deacetylase inhibitors (SAHA) can induce the morphological change and up-regulation of differentiation marker proteins in human endometrial epithelial cells (EECs), as ovarian steroid hormones can do. In this study, we found that tumor growth factor beta and a kind of interleukins also could induce the morphological change and differentiation in EECs. Furthermore, the stimulants can also up-regulate the cell motility and the adhesion ability to embryo model of EECs. The effect which can assist successful implantation is independent on the regulation by ovarian steroid hormones and histone deacetylase inhibitor.

研究分野：産婦人科学　生殖医学

キーワード：着床　上皮間充織転換　EMT　子宮内膜上皮細胞　子宮内膜間質細胞

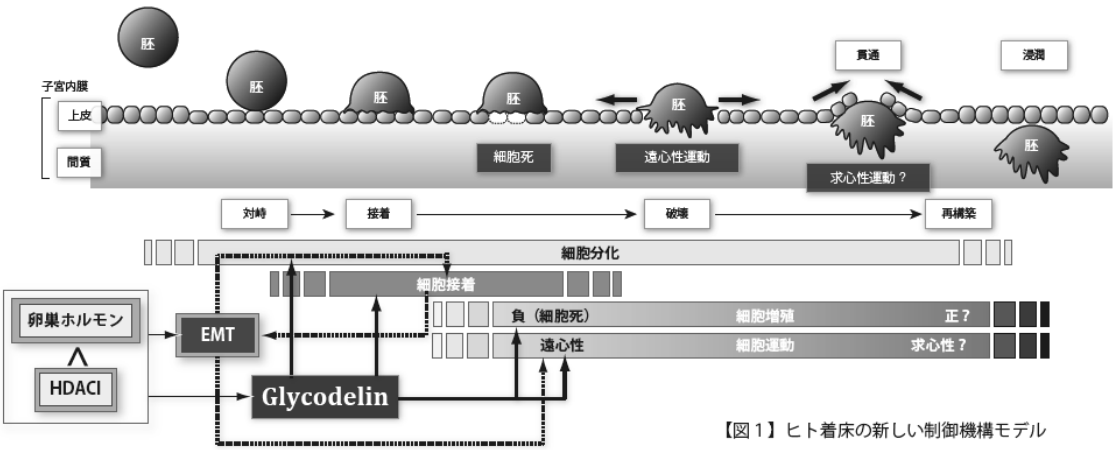
様　式　C－１９、F－１９－1、Z－１９、CK－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

現在の体外受精では90%を越える受精率と30%程度の着床率との間に埋めがたいギャップが存在し、着床のロスが妊娠率を大きく限定している。ヒト着床機構の解明が臨床成績の底上げに直結すると期待されているものの、倫理的・技術的にアプローチの難しい研究分野で、受精機構の解明と比して立ち後れているのが現状である。これまでに国内外において、ヒト着床研究は、着床期の胚と子宮内膜間質の関係について着目され、胚細胞の接着と侵入機序を中心に解析されてきた経緯がある。一方で、胚が着床の最初のプロセスでアクセスする子宮内膜上皮細胞との関連研究は比較的乏しく、一部の接着分子の解明と、胚陥入のために細胞死によって子宮内膜上皮細胞層が一時的に破壊されることが明らかになっているにとどまる。

２．研究の目的

我々はヒト着床の各ステップにおいて、子宮内膜上皮細胞のふるまいが、卵巣ステロイドホルモン、あるいはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によって誘導されるGlycodelin によって制御されることを明らかにするとともに、子宮内膜上皮細胞の運動が上皮間充織転換（Epithelial Mesenchymal Transition; EMT）と呼ばれる特異な現象を通じて制御されていることを明らかにすることで、新しいヒト着床制御機構を描いてきた（図１）。



【図１】ヒト着床の新しい制御機構モデル

そこで、子宮内膜上皮に加えて間質細胞を含めた子宮内膜細胞群全体のEMT を中心とした相互反応的な細胞動態と、特にそのトリガーを明らかにすることで、新たな着床支援治療プランの確立を目指すことを目的とした。

３．研究の方法

全ての研究プログラムで行うin vitro implantation assay は国内外の着床研究で採用されている実験系であり（Hohn et al. 2000, Li et al. 2003）、我々も実績をもつ（Hum Reprod 2007, J Biol Chem 2012）系である。具体的にはヒト子宮内膜腺癌細胞株Ishikawa、子宮内膜間質細胞株tHESC を飽和培養したものをそれぞれ子宮内膜上皮細胞･間質細胞モデルとする。一方、胚モデルとしては、ヒト絨毛癌細胞株JAR をspheroid形成させたものを子宮内膜細胞と共培養することで利用する。可視化はlipophilic な蛍光色素トレーサーによる。

候補液性因子：増殖因子（EGF, FGF2, PDGF, HGF, IGF, TGFβ）、サイトカイン（IL-1β, IL-6, IL-8）

対照群：無添加、卵巣ステロイドホルモン添加（17βestradiol + Progesterone）、HDACI（Suberoylanilide Hydroxamic Acid; SAHA [Zolinsa®]）添加

上記液性因子添加培地を用いた、(A)子宮内膜上皮細胞単独培養、(B)子宮内膜間質単独培養、(C)in vitro 着床アッセイ（胚–上皮）、(D)in vitro 着床アッセイ（胚–間質）の４種の培養系

で解析を行う。(A,B)は排卵後、胚対峙までの受容能獲得期間（LH+0～5）を想定し、(C,D)は胚対峙から侵入までの着床期間（LH+5～7：５日間の事前薬物添加後に胚モデルと共培養）を想定している。

(a) 細胞形態変化・細胞骨格変化の観察
顕微鏡観察で細胞の形態変化（位相差）、アクチン細胞骨格観察（蛍光物質つきphalloidin 観察）を各液性因子投与群において実施した。

(b) 分化マーカータンパク質の発現量変化
分化マーカータンパク質の発現量変化を上皮細胞（Glycodelin, LIF）、間質細胞（Prolactin、IGFBP-1）に対して RT-PCR 法、western blotting 法を用いて解析した。

(c) 転写因子発現量の変化
EMT の特徴のひとつである転写因子(Snail1, Snail2[Slug])の発現量変化を RT-PCR 法、western blotting 法を用いて、定性的・定量的解析を行った。

(d) EMT/MET マーカータンパク質の発現量変化
上皮マーカー（E-cadherin、cytokelatin）、間葉マーカー（N-cadherin、vimentin）のタンパク質発現量変化を生化学的（western blotting 法）、細胞学的（蛍光免疫染色法）に解析した。

(e) 胚接着率の定量解析
受容能の獲得を反映する胚モデルの接着率を定量的に解析する。同時に陥入・侵入効率を反映する胚モデルの伸展面積についても定量解析を実施した。

(f) 細胞運動解析
細胞運動能力の変化を wound healing assay、migration assay、invasion assay を用いて定量解析した。

(g) 細胞運動の real-time 解析
着床アッセイでの実際の細胞運動の様子を real-time 蛍光顕微鏡を用いてトレースし、経時的な細胞運動の変化および、胚モデルの伸展の加速度を定量評価した。

(h) トリガー因子間の関係解析
上記 (a)~(g)の解析によって、EMT/MET のトリガーとして有効と評価された刺激性液性因子群は受容体が異なることから、独立した着床促進効果を持つことが予想される。そのため、有効因子を種々の組み合わせで添加し、相加効果・相乗効果が得られるのか否かにつき細胞運動機能解析を実施した。

４．研究成果

(a) 細胞形態変化・細胞骨格変化の観察
細胞の形態変化として、子宮内膜上皮細胞モデルは EMT 様変化と呼べるほどの変化はいずれの群においても認められなかった。紡錘用の間質細胞型の形状をとるというよりも、むしろ平坦化・扁平化する傾向が認められ（卵巣ステロイドホルモン・HDACI）、同様の傾向が増殖因子群よりもインターロイキン群および TGFβで認められた。
細胞骨格については、アクチン繊維の観察を実施したが、こちらは EMT 様変化（cortical actin から actin stress fiber への変化）がインターロイキン群と TGFβを中心に観察された。特に in vitro implantation assay の系において、胚モデル接着領域近傍においてその傾向が認められた。

(b) 分化マーカータンパク質の発現量変化
既知の誘導因子（HDACI > 卵巣ステロイドホルモン）と比較して、インターロイキン群と TGFβにおいて、程度にばらつきはあるものの子宮内膜上皮細胞における誘導分子マーカータンパク質を認めた。子宮内膜間質細胞においては、TGFβ添加により分化誘導マーカータンパク質の発現変化が認められた。

(c) 転写因子発現量の変化
ある程度の予想通り、TGFβおよびインターロイキン群において、子宮内膜上皮細胞での EMT 関連転写因子の発現上昇を認めたが、子宮内膜間質細胞においてはその逆の発現低下を有意に認める結果は得られなかった。

(d) EMT/MET マーカータンパク質の発現量変化

インターロイキン群と TGFβ群において、卵巣ステロイドホルモンや HDACI 添加と同様に程度の差はあるものの、EMT に特徴的なマーカータンパク質発現変化（cadherin switch; E-cadherin 発現低下および N-cadherin 発現上昇）を認めた。

(e) 胚接着率の定量解析

in vitro implantation assay による胚モデルの接着率定量比較において、子宮内膜上皮細胞では卵巣ステロイドホルモン、HDACI とともに、TGFβ群において接着率の上昇を認めた。インターロイキン群においては、そのサブタイプによって効果は別れた。一方で子宮内膜間質細胞と胚モデルとの接着率比較では子宮内膜上皮細胞とは異なる因子群で接着率の上昇を認めた。

(f) 細胞運動解析

さまざまな液性因子投与による子宮内膜上皮細胞・子宮内膜間質細胞の細胞運動機能を wound healing assay と cell migration assay で定量比較したところ、TGFβ群が卵巣ステロゲオホルモン、HDACI とともに子宮内膜上皮細胞の運動機能更新の特性を示した。子宮内膜間質細胞の運動特性としては、投与液性因子により更新と抑制の双方のパターンを示した。

(g) 細胞運動の real-time 解析

上記の細胞運動機能解析のうち、wound healing assay をリアルタイムに観察したところ、in vitro implantation assay 中の細胞運動の速度は投与液性因子によって様々であり、TGFβ群インターロイキン群は濃度依存的に速度を増す傾向にあったが、HDACI 投与群ほどの加速を見いだすにはいたらなかった。

(h) トリガー因子間の関係解析

上記の結果から有望と考えられた TGFβとインターロイキンとを HDACI あるいは卵巣ステロイドホルモンと同時に添加し、細胞運動機能計測を実施したところ、相加的効果がありうることを見いだした。ただしその効果は子宮内膜上皮細胞に対してのものであり、子宮内膜間質細胞については効果がばらつき、特定の相加効果、相乗効果の判定には至らなかった。

以降計画していた、子宮内膜上皮細胞・間質細胞同時培養による２種細胞間の interaction によるさらなる細胞運動機能への肯定的効果の検討、着床のフェイスにおける EMT から MET への転換時期・機構の検討などに関しては、上記解析の遅れの影響により実施に至らなかった。

現段階における収集データからは、少なくとも in vitro において、ヒト着床モデルでは、卵巣ステロイドホルモンに依存することなく、HDAC および TGFβ、インターロイキンの存在下において、（接着後の胚の子宮内膜への侵入を含めた）着床成功率を高める可能性が色濃く示唆されるとともに、その機序の主体は子宮内膜上皮における EMT がかぎを握っていることを明らかにしつつある。時間が足りずに未完となっている解析を継続し、液性因子カクテル投与による効果的な着床改善のためのアシスト療法の確立を目指す。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 3 件）

① Furuya M, Masuda H, Hara K, **Uchida H**, Sato K, Sato S, Asada H, Maruyama T, Yoshimura Y, Katabuchi H, Tanaka M, Saya H: ZEB1 expression is a potential indicator of invasive endometriosis. Acta Obstet Gynecol Scand. 2017; 96(9): 1128-1135. 査読有
doi: 10.1111/aogs.13179.

② Uchida S, Maruyama T, Kagami M, Miki F, Hihara H, Katakura S, Yoshimasa Y, Masuda H, **Uchida H**, Tanaka M: Impact of borderline-subclinical hypothyroidism on subsequent pregnancy outcome in women with unexplained recurrent pregnancy loss. J Obstet Gynaecol Res. 2017;43(6): 1014-1020. 査読有
doi: 10.1111/jog.13319.

③ **Uchida H**, Maruyama T, Masuda H, Uchida S, Miki F, Hihara H, Katakura S, Yoshimasa Y, Tanaka M: How to create an embryo penetration route. Am J Reprod Immunol. 2016; 75(3): 326-332.査読有
doi: 10.1111/aji.12476.

〔学会発表〕（計 7 件）

① 升田博隆，古谷正敬，丸山哲夫，高尾知佳，**内田　浩**，内田明花，吉政佑之．片倉慧美，吉村泰典，片渕秀隆，田中　守：子宮内膜幹細胞と上皮間葉転換をターゲットとした非内分泌的な子宮内膜症の新規治療．第 23 回日本生殖内分泌学会．2018 年．

② 升田博隆，古谷正敬，丸山哲夫，**内田　浩**，内田明花，吉村泰典，佐谷秀行，片淵秀隆，田中　守：子宮内膜症と上皮間葉転換の関連の解明および上皮間葉転換阻害剤薬のもつ新規子宮内膜症治療薬としての可能性の検討．第 36 回日本受精着床学会．2018 年．

③ Hirotaka Masuda, Masataka Furuya, Tetsuo Maruyama, Fumie Miki, Satomi Katakura, Yushi Yoshimasa, Sayaka Uchida, **Hiroshi Uchida**, Tomoka Takao, Hidetaka Katabuchi, Mamoru Tanaka, Daisuke Aoki: Anovel approach to treat emdometriosis via targeting epithelial-mesenchymal transition. 第 70 回日本産科婦人科学会．2018 年．

④ 升田博隆，古谷正敬，丸山哲夫，**内田　浩**，内田明花，吉村泰典，佐谷秀行，片渕秀隆，田中　守：子宮内膜症の各病態における上皮間葉転換状態の解析と子宮内膜症における ZEB1 の浸潤性マーカーとしての可能性．第 35 回日本受精着床学会．2017 年．

⑤ Hirotaka Masuda, Masataka Furuya, Tetsuo Maruyama, Hironori Asada, Hidetaka Katabuchi, Hideyuki Saya, Mamoru Tanaka: Differential epithelial-mesenchymal transition status between types of endometriosis and adenomyosis. 33rd Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE2017). 2017 年．

⑥ Hirotaka Masuda, Masataka Fuyuya, Tetsuo Maruyama, Hironori Asada, Hideyuki Saya, Mamoru Tanaka: Differential status of epithelial-mesenchymal transition in each endometriotic lesion: ZEB1 as a potential indicator of endometriotic invasiveness. 13th World Congress on Endometriosis (WCE2017). 2017 年．

⑦ Hirotaka Masuda, Masataka Furuya, Hironori Asada, Tetsuo Maruyama, **Hiroshi Uchida**, Sayaka Uchida, Yasunori Yoshimura, Hidetaka Katabuchi, Hideyuki Saya, Mamoru Tanaka, Daisuke Aoki: Differential status of epithelial-mesenchymal transition in endometriosis and adenomyosis: ZEBI as a potential indicator of endometriotic invasiveness. 第 69 回日本産科婦人科学会 International Session .2017 年．

６．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：丸山　哲夫
ローマ字氏名：(MARUYAMA, Tetsuo)
所属研究機関名：慶應義塾大学
部局名：医学部
職名：准教授
研究者番号（8 桁）：10209702

研究分担者氏名：升田　博隆
ローマ字氏名：(MASUDA, Hirotaka)
所属研究機関名：慶應義塾大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（8 桁）：80317198

研究分担者氏名：内田　明花
ローマ字氏名：(UCHIDA, Sayaka)
所属研究機関名：慶應義塾大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号（8 桁）：60445236

研究分担者氏名：日原　華子
ローマ字氏名：(HIHARA, Hanako)
所属研究機関名：慶應義塾大学
部局名：医学部

職名：助教
研究者番号（8 桁）：80626458

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。