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上皮細胞層の破壊/再構築機序の解明
Sub Title	Analysis of reconstruction mechanism of endometrial epithelial cell sheet during human implantation
Author	日原, 華子(Hihara, Hanako) 丸山, 哲夫(Maruyama, Tetsuo) 内田, 浩(Uchida, Hiroshi) 升田, 博隆(Masuda, Hirotaka) 内田, 明花(Uchida, Sayaka)
Publisher	
Publication year	2020
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	ヒト着床は胚の接着以降、子宮内膜上皮細胞、間質細胞の細胞集団としての特異な細胞動態を必要としている。すなわち胚が子宮内膜間質層にまで到達するためには、本来外来物からのバリアとして機能する子宮内膜上皮細胞層を外来物である胚が通過しなくてはならない。これまでそのメカニズム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が、今回の一連の解析によって、細胞死に加えて子宮内膜上皮細胞群の、胚接着ポイントから遠心性の特異な細胞運動に支持されていることが明らかとなった。またこの特異な細胞集団運動は卵巣ステロイドホルモンや一部の特殊薬剤によって制御されうることがあわせて明らかとなった。 During human implantation, embryo have to adhere and migrate into maternal endometrial tissue. For successful pregnancy, construction of embryo-penetrating route in endometrial epithelial cell barrier is required. In in vitro implantation assay system, the unique and reasonable preparation of embryo-penetrating route is performed by massive efferent motion of endometrial epithelial cells in association with endometrial epithelial cell apoptosis. The characteristic efferent cell motion is regulated by ovarian steroid hormones and can be accelerated by a kind of histone deacetylase inhibitors. Moreover, the acceleration ratio is higher in cells near the embryo attachment point compared to cells far from the central point.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2017～2019 課題番号：17K11251 研究分野：生殖医学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K11251seika

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　２ 年　 ６ 月　 ５ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ１１２５１

研究課題名（和文）ヒト着床期子宮内膜上皮細胞層の破壊／再構築機序の解明

研究課題名（英文）Analysis of reconstruction mechanism of endometrial epithelial cell sheet during human implantation

研究代表者
日原　華子（HIHARA, Hanako）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：８０６２６４５８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト着床は胚の接着以降、子宮内膜上皮細胞、間質細胞の細胞集団としての特異な細胞動態を必要としている。すなわち胚が子宮内膜間質層にまで到達するためには、本来外来物からのバリアとして機能する子宮内膜上皮細胞層を外来物である胚が通過しなくてはならない。これまでそのメカニズム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が、今回の一連の解析によって、細胞死に加えて子宮内膜上皮細胞群の、胚接着ポイントから遠心性の特異な細胞運動に支持されていることが明らかとなった。またこの特異な細胞集団運動は卵巣ステロイドホルモンや一部の特殊薬剤によって制御されうることがあわせて明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
女性ホルモン剤投与による生殖補助医療の成功率上昇のメカニズムの一端を示している可能性がある。また、妊娠反応は認めても臨床的妊娠にはいたらないごくごく初期の流産（化学的流産）は、胚接着後間もない胚ー子宮内膜の相互反応の破綻ととらえることができるが、胚接着から胚陥入までの超初期段階の妊娠メカニズムとして子宮内膜上皮細胞の特異な細胞動態の解明は、今後の異常状態の理由（メカニズムのいかなる破綻か）の解明検討をあわせて臨床妊娠率向上にむけての新たな治療戦略の理論的基盤に発展していくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：During human implantation, embryo have to adhere and migrate into maternal endometrial tissue. For successful pregnancy, construction of embryo-penetrating route in endometrial epithelial cell barrier is required. In in vitro implantation assay system, the unique and reasonable preparation of embryo-penetrating route is performed by massive efferent motion of endometrial epithelial cells in association with endometrial epithelial cell apoptosis. The characteristic efferent cell motion is regulated by ovarian steroid hormones and can be accelerated by a kind of histone deacetylase inhibitors. Moreover, the acceleration ratio is higher in cells near the embryo attachment point compared to cells far from the central point.

研究分野：生殖医学

キーワード：着床

※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。

１．研究開始当初の背景

現在の体外受精治療において、排卵誘発から妊娠成立に達するまでの数多いステップのうち、最大のロストポイントは胚移植後のステップであり、その期間の支援治療はホルモン補充に限定されている。治療法の選択肢に乏しいのは、ヒト着床が齧歯類のそれとは異なり特異な点が少なくない上に、解析法の倫理的・物理的制約によってヒトの着床研究が進みづらいためである。そもそも着床という生命現象は、本来接着能を持たないはずの上皮細胞の apical side が異種細胞を接着するという特異な現象であり、研究者の興味対象は、胚の子宮内膜上皮細胞への接着フェイズと、子宮内膜間質細胞層への侵入フェイズが中心となっている。しかしながら、胚が子宮内膜組織へ侵入するにあたり、そのスタート時点とエンドポイントである子宮内膜上皮細胞層の破壊・再構築は、知見に乏しい現状である。

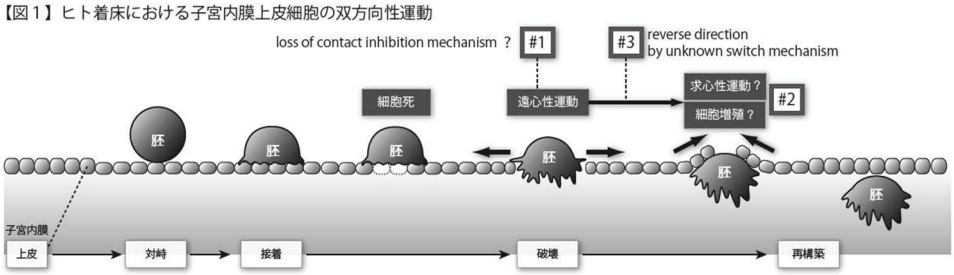
２．研究の目的

生殖補助医療の伸び悩む妊娠率向上のためには、解明の遅れる着床期の機序解析が必須である。ヒト着床の初期段階で胚が通過する際に、細胞死と特徴的な遠心性細胞運動によって、本来外部からの異物侵入を許さない子宮内膜上皮細胞層が破壊され胚侵入ルートが構築されることが、申請者のグループを含めた研究知見から明らかにされてきたが、その特異な現象の制御機序は不明である。その一方で破壊された子宮内膜上皮細胞層にとって侵入胚を中心とした超初期の妊娠組織を守護するための再構築は急務となるはずであるが、その再構築機序は未知の領域である。本研究では、子宮内膜上皮細胞層の再構築が破壊とは逆方向の求心性運動と細胞増殖の複合的機序によるという仮説証明を目的とした。

細胞は周辺細胞と水平方向に隣接した際に、増殖および運動を停止するという現象が観察される(contact inhibition of cell growth or locomotion)。これによって適正な細胞密度が保たれることになるのであるが、実際に in vitro の解析系で観察された子宮内膜上皮細胞の着床時の運動は、明らかにこの contact inhibition of cell locomotion の大原則に抵触しながらも、さらに細胞密度を高めることに構わずに、遠心性のものであった。残念ながらこの特異な運動機能の分子機序はまったく不明である。さらに、子宮内膜上皮細胞層は、外力や微生物の侵入に対して、物理学的・免疫学的にバリアであるべき構造であるので、胚の通過によって破綻した子宮内膜上皮細胞層の再構築も可及的速やかになされるべきものと想定されるものの、この機序に関しても研究報告は国内外含めてなされていない。いわば、ヒト着床における胚通過の際の子宮内膜上皮細胞の細胞動態解析は研究の空白地帯となっている。

本研究では、下記機序の解明を目的とした。
#1. ヒト着床における子宮内膜上皮細胞層の破壊をになう遠心性運動の制御機構
#2. 胚通過後の子宮内膜上皮細胞の細胞層シート再構築の機序（求心性運動および細胞増殖機構の有無）
#3. 遠心性運動から求心性運動への正反対方向への運動方向変換機序

【図１】ヒト着床における子宮内膜上皮細胞の双方向性運動



３．研究の方法

ヒト着床での胚陥入において、特異的な遠心性運動と引き続く求心性運動機序が存在し、合理的な子宮内膜上皮細胞層の破綻・再構築が行われているという仮説を証明するために、2D/3D 培養系を用いた in vitro 着床アッセイ（ヒト子宮内膜上皮細胞として同細胞株 Ishikawa、ヒト胚モデルとしてヒト絨毛がん細胞株 JAR の spheroid を利用）を行い、着床期の子宮内膜上皮細胞動態を real-time に観察する。

さらに遠心性／求心性運動それぞれのフェイズにおける候補制御因子の発現パターン、活性パターンを生化学的・免疫細胞学的に解析することで、特異な子宮内膜上皮細胞動態の制御機構を明らかにする。加えて、その機序をコントロールしうる液性因子を卵巣ステロイドホルモンの他に探索する。

(1) 子宮内膜上皮細胞の遠心性運動における制御因子の解明

2D real time in vitro 着床アッセイを用いて、ヒト着床モデルでの子宮内膜上皮細胞層の運動状況を可視化、数値化し促進因子、抑制因子を検討する。

制御候補因子：卵巣ステロイドホルモン（17β-estradiol and/or Progesterone）、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（HDACI）

(2) 子宮内膜上皮細胞の遠心性運動における contact inhibition of cell locomotion ルールの逸脱機序の解明

生体内で細胞群は新陳代謝の過程で細胞欠損によって組織構成を乱す空隙が生じた際に、細胞増殖によって空隙充填が完了するまでの間、一時的な細胞サイズの拡大で一過性に空隙を埋める傾向にある。また成長に応じてボディサイズを増加させる過程も細胞増殖のみでなく細胞サイズの拡大機能をあわせることで賄っている。この細胞サイズの調整機構の中心的役割を果たすシグナル伝達経路として Hippo pathway が知られている。contact inhibition of cell growth/locomotion を支配する Hippo pathway の一時的な破綻あるいは緊急回避的な特殊反応が、すでに隣接細胞で充填された子宮内膜上皮細胞層で例外的に遠心性運動を許しているという仮説検討のため、下記培養を行う。

培養条件：無添加、あるいは卵巣ステロイドホルモン添加

① JAR spheroid（胚モデル）の添加前後での Hippo pathway 主要構成分子群（Mst1/2, SAV1, Lats1/2, YAP/TAZ）の発現解析：胚モデルの添加前後での Hippo pathway 構成分子群の発現量変化を経時的に比較検討する（RT-PCR 法、western blotting 法、蛍光免疫細胞染色法）。

② JAR spheroid（胚モデル）の添加前後での Hippo pathway リン酸化分子（YAP/TAZ）のリン酸化変化解析：Hippo pathway の活性度を検討するため、Hippo pathway のリン酸化の程度を生化学的（western blotting 法）、免疫細胞学的（リン酸化特異抗体染色）に経時的に解析する。

③ JAR spheroid（胚モデル）の添加前後での Hippo pathway – actin 細胞骨格制御系分子群（CD44, Kibra）の発現解析：上皮細胞の運動ではアクチン細胞骨格の構造変化が要求されるが、Hippo pathway 制御性のアクチン細胞骨格変化を司る中心分子である CD44-Kibra の発現変化を生化学的、免疫細胞学的に解析する。

④ Hippo pathway 阻害剤（Verteporfin [YAP inhibitor], 9E1 [Mst1 inhibitor]）実験

Hippo pathway 阻害剤を培地に添加した上で、in vitro 着床アッセイにおける子宮内膜上皮細胞の運動を real-time 顕微鏡で観察する。

(3) 胚通過後の子宮内膜上皮細胞層再構築の機序（求心性運動および細胞増殖機構の有無）

胚陥入によって破壊された子宮内膜上皮細胞層の再構築機序として、求心性運動と細胞増殖の両反応の有無を下記解析で検討する。培養系には子宮内膜上皮細胞層の下層にマトリゲルあるいは子宮内膜間質細胞（細胞株 tHESC）層をセットした 3D 培養系による in vitro 着床アッセイを使用する。

⑤ 求心性運動の観察
胚と子宮内膜上皮細胞のモデルをそれぞれ蛍光色素でトレースし、real-time 顕微鏡観察を行い、胚モデル陥入後の子宮内膜上皮細胞の求心性運動の様子を解析する。
⑥ 細胞増殖の解析
子宮内膜上皮細胞の細胞増殖の程度を、生細胞のまま蛍光染色し定量化するキット（Click-iT Plus EdU Alexa Fluor Imaging kit; ThermoFisher）を使用し、in vitro 着床アッセイ中の real-time 顕微鏡観察で求心性運動と細胞増殖とのバランスを観察する。

(4) 子宮内膜上皮細胞層の細胞動態制御因子の探索
(1)˜ (3) の実験系によって得られる特異な子宮内膜上皮細胞の動態を規定する刺激因子を卵巣ステロイドホルモン以外に見いだすため、着床に種々のステップで関与すると報告されている液性因子群（サイトカイン、増殖因子、脱アセチル化酵素阻害剤）を培地に添加することで、特異運動の再現を卵巣ホルモン非存在下で試み、卵巣ホルモン添加群と比較してその促進効果を検証する。

４．研究成果

(1) 子宮内膜上皮細胞の遠心性運動における制御因子の解明
2D real time in vitro 着床アッセイにおいて、卵巣ステロイドホルモン添加、HDACI 添加いずれにおいても子宮内膜上皮細胞層の遠心性運動の促進因子としての特性が明らかとなった。

(2) 子宮内膜上皮細胞の遠心性運動における contact inhibition of cell locomotion ルールの逸脱機序の解明
2D n vitro 着床アッセイを用いた検討では、着床フェイズにおける明らかな Hippo pathway の関与を示唆するデータは得られなかった（Hippo pathway 主要構成分子群の発現量の有意な増減なし。Hippo pathway リン酸化分子（YAP/TAZ）のリン酸化に有意な経時的変化を認めず）。
そのため、JAR spheroid（胚モデル）の添加前後での Hippo pathway – actin 細胞骨格制御系分子群（CD44, Kibra）の発現解析および、Hippo pathway 阻害剤（Verteporfin [YAP inhibitor], 9E1 [Mst1 inhibitor]）を培地に添加した上で、in vitro 着床アッセイにおける子宮内膜上皮細胞の運動を real-time 顕微鏡で観察する検討は中止した。

(3) 胚通過後の子宮内膜上皮細胞層再構築の機序（求心性運動および細胞増殖機構の有無）
胚と子宮内膜上皮細胞のモデルをそれぞれ蛍光色素でトレースし、real-time 顕微鏡観察を行い、胚モデル陥入後の子宮内膜上皮細胞の求心性運動の様子を解析した結果、2D 培養系で若干の求心性運動を認めたものの、胚モデルを完全に被覆するほどの求心性運動の観察はなされなかった。一方、3D 培養系での検討では、2D 培養系を上回る被覆効果を観察できた。その被覆速度も遠心性運動と同様に卵巣ステロイドホルモン添加、HDACI 添加によって加速された。
その際に、子宮内膜上皮細胞の細胞増殖の程度を定量化したところ、24 時間の着床アッセイの期間中着床領域における細胞増殖はほとんど認めず、着床エリアでの子宮内膜細胞は運動細胞か細胞死に陥った細胞で構成されていた。

(4) 子宮内膜上皮細胞層の細胞動態制御因子の探索
卵巣ステロイドホルモン以外の (1)˜ (3) の実験系によって得られる特異な子宮内膜上皮細胞の動態を規定する刺激因子として HDACI にその効果を認めたが、サイトカイン、増殖因子の関与はその因子によってバラエティに富む結果となり、一連のフェイズを総合的に統御するものとしては HDACI のみであった。

以上の結果はヒト着床における子宮内膜上皮細胞の挙動に関する知見として国内外を問わず類似の報告はないため、胚陥入を通じた子宮内膜上皮細胞層の破壊と再構築における機序解明の基盤となる観察事実である。制御因子の一部は判明したものの、それらの因子の作用機序はいまだ不明である点、破壊フェイズの観察はほぼ完全になされたものの、再構築フェイズの観察がいまだ不十分である点、得られた基礎的な子宮内膜上皮細胞の特異なふるまいが着床障害で実際に障害されているのか、さらにそれの機序の促進因子を投与した際に実際に障害機序が回復しうるのかといった臨床へのフィードバックはいまだ着手されていない点は今後の課題であるとともに本研究の展開要素として位置付けられるものと考える。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Furuya M, Masuda H, Hara K, Uchida H, Sato K, Sato S, Asada H, Maruyama T, Yoshimura Y, Katabuchi H, Tanaka M, Saya H	４．巻 96
２．論文標題 ZEB1 expression is a potential indicator of invasive endometriosis	５．発行年 2017年
３．雑誌名 Acta Obstet Gynecol Scand	６．最初と最後の頁 1128-1135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/aogs.13179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Uchida S, Maruyama T, Kagami M, Miki F, Hihara H, Katakura S, Yoshimasa Y, Masuda H, Uchida H, Tanaka M	４．巻 43
２．論文標題 Impact of borderline-subclinical hypothyroidism on subsequent pregnancy outcome in women with unexplained recurrent pregnancy loss	５．発行年 2017年
３．雑誌名 J Obstet Gynaecol Res	６．最初と最後の頁 1014-1020
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.13319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Miki F, Maruyama T, Miyazaki K, Takao T, Yoshimasa Y, Katakura S, Hihara H, Uchida S, Masuda H, Uchida H, Nagai T, Shibata S, Tanaka M	４．巻 100
２．論文標題 The orientation of a decellularized uterine scaffold determines the tissue topology and architecture of the regenerated uterus in rats	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Biol Reprod	６．最初と最後の頁 1215-1227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioz004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計5件（うち招待講演　0件／うち国際学会　2件）

１．発表者名 Hirotaka Masuda, Masataka Furuya, Tetsuo Maruyama, Hironori Asada, Hidetaka Katabuchi, Hideyuki Saya, Mamoru Tanaka
２．発表標題 Differential epithelial-mesenchymal transition status between types of endometriosis and adenomyosis
３．学会等名 33rd Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE2017)（国際学会）
４．発表年 2017年

１．発表者名
Hirotaka Masuda, Masataka Fuyuya, Tetsuo Maruyama, Hironori Asada, Hideyuki Saya, Mamoru Tanaka

２．発表標題
Differential status of epithelial-mesenchymal transition in each endometriotic lesion: ZEB1 as a potential indicator of endometriotic invasiveness

３．学会等名
13th World Congress on Endometriosis (WCE2017)（国際学会）

４．発表年
2017年

１．発表者名
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

２．発表標題
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

３．学会等名
第35回日本受精着床学会

４．発表年
2017年

１．発表者名
Hirotaka Masuda, Masataka Furuya, Hironori Asada, Tetsuo Maruyama, Hiroshi Uchida, Sayaka Uchida, Yasunori Yoshimura, Hidetaka Katabuchi, Hideyuki Saya, Mamoru Tanaka, Daisuke Aoki

２．発表標題
Differential status of epithelial-mesenchymal transition in endometriosis and adenomyosis: ZEBI as a potential indicator of endometriotic invasiveness

３．学会等名
第69回日本産科婦人科学会International Session

４．発表年
2017年

１．発表者名
Sayaka Uchida, Tetsuo Maruyama, Maki Kagami, Fumie Miki, Hanako Hihara, Shoko Tomisato, Satomi Katakura, Yushi Yoshimasa, Hirotaka Masuda, Hiroshi Uchida, Mamoru Tanaka, Daisuke Aoki

２．発表標題
Impact of subclinical hypothyroidism on subsequent pregnancy outcome in women with unexplained recurrent pregnancy loss

３．学会等名
第69回日本産科婦人科学会

４．発表年
2017年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室ホームページ http://www.obgy.med.keio.ac.jp/research/03rep-endo.php

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	丸山　哲夫 (MARUYAMA Tetsuo) (10209702)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授 (32612)	
研究分担者	内田　浩 (UCHIDA Hiroshi) (90286534)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	
研究分担者	升田　博隆 (MASUDA Hirotaka) (80317198)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師（非常勤） (32612)	
研究分担者	内田　明花 (UCHIDA Sayaka) (60445236)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教 (32612)	