

学内グラント 報告書

平成22-23年度 学内グラント終了時報告書

着床不全に対する新規治療法の開発とその臨床応用

研究代表者 梶原 健 (大学病院 産科・婦人科)

研究分担者 板倉 敦夫*

緒言

体外受精・胚移植周期においては排卵誘発・胚培養技術を含めた様々な部分で工夫がなされそれに伴い妊娠率も上昇してきたが、ここ数年間の妊娠率にはほぼ変化がなく、また形態良好胚を移植しても妊娠に至らない症例が散見される。この原因の大きな一つは着床期周辺の子宮内膜機能のメカニズムに関し未だ不明な点が多く、その部分に関する工夫がほとんどなされていないためである。そのため着床期周辺の子宮内膜機能のメカニズム一端を明らかにし、その知見より適切な治療法を開発することは不妊症治療における着床率改善、しいては妊娠率上昇のためには重要なポイントである。

ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)は受精後7日目以降の胞胚から分泌されており、一般に知られている黄体賦活作用による妊娠維持機構以外にも、子宮内膜組織にはLH/CG受容体が発現していることから、着床期周辺の子宮内膜細胞に対するhCGの直接的な作用、さらに胚と子宮内膜の相互作用も想定されている。しかし、hCGの子宮内膜に対する直接作用に関しては未だ不明な点も多い。

子宮内膜の脱落膜化は受精卵の着床、絨毛細胞の侵入、胎盤の形成に重要な過程であり、これまでに我々はこの過程においてフォークヘッド転写因子の一つであるFOXO1が重要な役割を果たしていることを明らかにした。脱落膜化障害は着床障害、しいては不妊および産科異常の原因となる可能性が考えられている。本研究では子宮内膜間質細胞(HESCs)培養系を用いhCGが及ぼす脱落膜化さらには各種転写因子の発現に対する影響、またその分子メカニズムに関して検討を行い、hCGのHESCsの脱落膜化過程に及ぼす有用性の有無とその分子メカニズムを*in vitro*のレベルで検討し、その臨床応用の可能性を探ることを目的とした。

材料と方法

1. ヒト子宮内膜間質細胞の分離・培養

手術で得られた標本から子宮内膜を採取し、間質細胞(HESCs)を分離・培養に用いた。既報の方法に従い、酵素処理後、子宮内膜組織を腺細胞と間質細胞に分離し、間質細胞をチャコール処理した10% FBS(DCC-FBS)、グルタミン、抗生物質を含んだDMEM/F12を用い、37℃、95% air、5% CO₂の条件下にて培養した。Confluentに達したHESCsは0.5 mM 8-bromo-cAMP(8-bro-cAMP)と10⁻⁶M medroxyprogesterone acetate(MPA)の両者にて脱落膜化刺激を行い、同時に0.01~1 IU/mlの遺伝子組み換えrecombinant hCG(rhCG)または尿由来urinary hCG(uhCG)を添加し培養した、4日間培養を行い、タンパク質を抽出した。なお培養液は2% DCC-FBS、グルタミン、抗生物質を含んだDMEM/F12を用いた。

2. タンパクの精製とWestern blot解析

分離・培養したHESCsよりNP-40 lysis buffer(1% nonidet P-40, 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 30 mM Na β -glycerophosphate, and protease inhibitors)を用いてタンパク質を抽出した。抽出したタンパク30 μ gを10% SDS-PAGEゲルにて泳動後、PVDF-membraneへブロッティングした。一次抗体として抗FOXO1抗体(Cell Signaling 社)、抗Cu, Zn-SOD1抗体(Santa Cruz 社)、抗Mn-SOD抗体(Santa Cruz 社)、抗LH/CG受容体抗体(Santa Cruz 社)、抗 α -Tubulin抗体(Santa Cruz 社)を用い、ECL Detection System(Amersham 社)により、それぞれのタンパク質を検出した。

3. アポトーシス細胞の検出

脱落膜化刺激を行ったHESCsに0.01~1 IU/mlのhCGを同時に添加した群と添加しない群を作製し4日間培養した。酸化ストレスとして100 mMの過酸化水素を添加し、さらに4時間培養しCell Death

*大学病院 産科・婦人科

Detection ELISA plus kit (Roche Diagnostics 社) を用いてアポトーシス細胞を検出した。

4. 蛍光免疫組織化学

ガラス・カバースリップ上でHESCs培養し、前述した方法で脱落膜化刺激を3日間行い、同時に0.1 IU/mLのhCGを添加した群と、添加していない群を作製した。100 mMの過酸化水素を添加しさらに4時間培養し、その後4%パラホルムアルデヒドにて2時間固定した。抗Bax抗体 (Santa Cruz 社)、抗Bcl-2抗体 (Dako 社) にて蛍光免疫組織化学法を用いその発現を検討した。

結 果

1. HESCsにおけるLH/CG受容体の発現

HESCsにおけるLH/CG受容体の発現は脱落膜化刺激を行うことにより、その発現は抑制されたが、rhCGを添加することにより回復してきた。

2. HESCsの形態に及ぼすhCGの影響

HESCsは形態学的には8-bro-cAMPとMPAによる刺激を行うと脱落膜化細胞に特有な大型の敷石状の形態を示していた。しかし脱落膜化刺激を行ったHESCsにrhCGを添加しても大きな形態学的な変化は示さなかった。

3. HESCs酸化ストレス抵抗性へのhCGの影響

以前我々が報告したのと同様に、脱落膜化刺激を行うことにより過酸化水素(酸化ストレス)にて誘導されるアポトーシス細胞は有意に減少した。さらに脱落膜化したHESCsにrhCGを添加することにより濃度依存性にアポトーシス細胞は減少した。これまでに我々が脱落膜化刺激により誘導され、脱落膜化機構に重要な役割を果たしていると報告してきた転写因子のひとつであるFOXO1は、8-bro-cAMPとMPAによる刺激によりその発現は誘導され、hCGを添加することにより、さらに濃度依存性にその発現は誘導された。またFOXO1の標的遺伝子で活性酸素消去酵素であるMn-SODも同様にrhCGを添加することにより濃度依存性にその発現が増強された。しかし他の活性酸素消去酵素のCu, Zn-SODおよびcatalaseの発現には変化はなかった。

一方、pro-apoptotic因子であるBaxはrhCGを添加することによりその発現は抑制されたが、anti-apoptotic因子であるbcl-2の発現はrhCGを添加することにより増強していた。

4. 製剤の由来によるhCGの影響の相違

現在hCGは製剤の由来が異なる遺伝子組み換え技術により作成されたrhCGと尿由来uhCGの2種類の製剤があるが、製剤による作用の差についても検討した。上述したように過酸化水素によって誘導されるアポトーシス細胞はrhCGの添加により減少したが、uhCGを添加すると逆に増加した。

考 察

脱落膜化HESCsはrhCG添加により(1)FOXO1を介したMn-SODの発現誘導(2)Baxの発現抑制、bcl-2の発現誘導、の2つのメカニズムを介して、酸化ストレス抵抗性が強化されることが明らかとなった。rhCGは子宮内膜に作用し、転写因子の発現を介して妊娠維持作用を果たし、その適切な使用が着床率を向上させる可能性が示唆された。

研究成果リスト

1. 論文発表

- 1) 梶原健, 石原理. ホルモン療法による着床率の向上. 臨床婦人科産科 2010;64:858-61.
- 2) Brosens JJ, Hodgetts A, Feroze-Zaidi F, Sherwin JR, Fusi L, Salker MS, Higham J, Rose GL, Kajihara T, Young SL, Lessey BA, Henriët P, Langford PR, Fazleabas AT. Proteomic analysis of endometrium from fertile and infertile patients suggests a role for apolipoprotein A-I in embryo implantation failure and endometriosis. Mol Hum Reprod 2010;16:273-85.
- 3) Kajihara T, Uchino S, Suzuki M, Itakura A, Brosens JJ, Ishihara O. Human chorionic gonadotropin confers resistance to oxidative stress-induced apoptosis in decidualizing human endometrial stromal cells. Fertil Steril 2011;95:1302-7.
- 4) Kajihara T, Tochigi H, Uchino S, Itakura A, Brosens JJ, Ishihara O. Differential effects of urinary and recombinant chorionic gonadotropin on oxidative stress responses in decidualizing human endometrial stromal cells. Placenta 2011;32:592-7.
- 5) Kajihara T, Tochigi H, Prechapanich J, Uchino S, Itakura A, Brosens JJ, Ishihara O. Androgen signaling in decidualizing human endometrial stromal cells enhances resistance to oxidative stress. Fertil Steril 2012;97:185-91.

2. 学会発表

- 1) Kajihara T, Ishihara O. Decidualized HESCs treated with rhCG become resistant to cell death induced by oxidative stress, IFSS2010 20th World Congress on Fertility and Sterility, 平成22年9月, Munnich
- 2) 梶原健, 中山真人, 鈴木元晴, 難波聡, 三木明徳, 岡垣竜吾, 板倉敦夫, 石原理. 子宮内膜脱落膜化細胞の酸化ストレス抵抗性獲得メカニズムの検討, 第62回日本産科婦人科学会総会・学術集会, 平成22年4月, 東京
- 3) 梶原健. 着床不全の病態と治療法の可能性 -hCG療法を中心に(シンポジウム), 第142回日本生殖医学会関東連合地方部会, 平成22年6月, 栃木

- 4) 梶原健, 栃木秀乃, 石原理. 脱落膜化細胞へのhCGの直接作用はレコンビナントと尿由来で異なる, 第28回日本受精着床学会総会・学術講演会, 平成22年7月, 横浜
 - 5) 梶原健, 栃木秀乃, 内野聡美, 石原理. 脱落膜化細胞へのhCGの直接作用は製剤の由来により異なる, 第55回日本生殖医学会・学術講演会, 平成22年11月, 徳島
 - 6) Kajihara T, Prechanich J, Tochigi H, Ishihara O. Differential effects of urinary and recombinant chorionic gonadotropin on oxidative stress responses in decidualizing human endometrial stromal cell, 16th World Congress on In Vitro Fertilization, 平成23年9月, Tokyo
 - 7) Prechanich J, Kajihara T, Tochigi H, Ishihara O. Heparin prevents programmed cell death induced by oxidative stress in human decidualized endometrial stromal cells, 16th World Congress on In Vitro Fertilization, 平成23年9月, Tokyo
 - 8) Prechanich J, Kajihara T, Tochigi H, Uchino S, Ishihara O. Heparin prevents programmed Cell Death Induced by Oxidative Stress in Human Decidualized Endometrial Stromal cells, 第56回日本生殖医学会学術講演会・総会, 平成23年12月, 横浜
 - 9) 梶原健, 栃木秀乃, 板倉敦夫, 石原理. 子宮内膜脱落細胞へのhCGの直接作用はレコンビナントと尿由来で異なる, 第63回日本産科婦人科学会学術講演会, 平成23年8月, 大阪
 - 10) 梶原健, 小黒辰夫, 田中嘉代子, 内野聡美, 栃木秀乃, 石原理. 子宮内膜脱落膜化細胞に対するアンドロゲンの直接的影響, 第43回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 平成23年9月, 大阪
 - 11) 梶原健, 栃木秀乃, 内野聡美, 石原理. アンドロゲンは子宮内膜脱落膜化細胞に対して形態的・機能的にも影響を与える, 第56回日本生殖医学会学術講演会・総会, 平成23年12月, 横浜
- ### 3. 受賞
- IFFS2010 (国際不妊学会) Poster Prize. Kajihara T, Ishihara O. Decidualized HESCs treated with rhCG become resistant to cell death induced by oxidative stress