

胚を活性誘導するヒト子宮内膜上皮の接着分子の同定と
その発現機構の分子生物学的解析

(研究課題番号 15591743)

平成 15 年度ー平成 16 年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)(2))

研究成果報告書



研究代表者 小阪謙三

(京都大学医学研究科助手)

胚を活性誘導するヒト子宮内膜上皮の接着分子の同定と
その発現機構の分子生物学的解析

(研究課題番号 15591743)

平成 15 年度～平成 16 年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)(2))

研究成果報告書

平成 17 年 5 月

研究代表者 小阪謙三

(京都大学医学研究科助手)

はしがき

本研究は平成 15, 16 年度文部科学省科学研究費補助金（基盤研究（C）（2））の助成のもとに行われた。当初の研究目的に対する一定の成果が得られ、現在さらに研究を継続中である。本報告書を発刊するに当たり、2年間にわたり御協力を頂いた関係各位に心よりお礼申し上げます。

課題番号 15591743

研究課題

胚を活性誘導するヒト子宮内膜上皮の接着分子の同定とその発現機構の分子生物学的解析

研究組織

研究代表者：小阪謙三（京都大学医学研究科助手）

研究分担者：吉岡信也（京都大学医学研究科助手）

研究分担者：樋口壽宏（京都大学医学研究科助手）

研究分担者：藤原 浩（京都大学医学研究科講師）

研究経費（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	1,500	0	1,500
平成 16 年度	1,500	0	1,500
総計	3,000	0	3,000

研究発表

(1) 学会誌等

Kosaka K, Fujiwara H, Tatsumi K, Yoshioka S, Higuchi T, Sato Y, Nakayama T, Fujii S.

Human peripheral blood mononuclear cells enhance cell-cell interaction between human endometrial epithelial cells and BeWo-cell spheroids.

Hum Reprod. 2003 Jan;18(1):19-25.

Fujiwara H, Tatsumi K, Kosaka K, Sato Y, Higuchi T, Yoshioka S, Maeda M, Ueda M, Fujii S.

Human blastocysts and endometrial epithelial cells express activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166).

J Clin Endocrinol Metab. 2003 Jul;88(7):3437-43.

Fujiwara H, Yoshioka S, Tatsumi K, Kosaka K, Satoh Y, Nishioka Y, Egawa M, Higuchi T, Fujii S.

Human endometrial epithelial cells express ephrin A1: possible interaction between human blastocysts and endometrium via Eph-ephrin system.

J Clin Endocrinol Metab. 2002 Dec;87(12):5801-7.

Higuchi T, Fujiwara H, Egawa H, Sato Y, Yoshioka S, Tatsumi K, Itoh K, Maeda M, Fujita J, Fujii S.

Cyclic AMP enhances the expression of an extravillous trophoblast marker, melanoma cell adhesion molecule, in choriocarcinoma cell JEG3 and human chorionic villous explant cultures.

Mol Hum Reprod. 2003 Jun;9(6):359-66.

Fujiwara H, Higuchi T, Yamada S, Hirano T, Sato Y, Nishioka Y, Yoshioka S, Tatsumi K, Ueda M, Maeda M, Fujii S.

Human extravillous trophoblasts express laeverin, a novel protein that belongs to membrane-bound gluzincin metallopeptidases.

Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jan 23;313(4):962-8.

Egawa M, Yoshioka S, Higuchi T, Sato Y, Tatsumi K, Fujiwara H, Fujii S.

Ephrin B1 is expressed on human luteinizing granulosa cells in corpora lutea of the early luteal phase: the possible involvement of the B class Eph-ephrin system during corpus luteum formation.

J Clin Endocrinol Metab. 2003 Sep;88(9):4384-92.

(2) 口頭発表

19th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology

平成 15 年 6 月 29 日-7 月 2 日、マドリッド (スペイン)

1. HCG stimulates human monocytes to produce interleukin-8 via a different pathway from LH/HCG receptor system

Hiroshi Fujiwara, Kenzo Kosaka, Keiji Tatsumi, Shinya Yoshioka, and Shingo Fujii

2. Possible involvement of Eph-ephrin system in the interaction between human blastocysts and endometrium

Keiji Tatsumi, Hiroshi Fujiwara, Kenzo Kosaka, Yukiyasu Sato, Yoshihiro Nishioka, Miho Egawa, Toshihiro Higuchi, Shinya Yoshioka and Shingo Fujii

3. Human blastocysts and endometrial epithelial cells express activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166)

Shinya Yoshioka, Keiji Tatsumi, Kenzo Kosaka, Hiroshi Fujiwara and Shingo Fujii

9th Meeting of the International Federation of Placenta Associations (IFPA 2003)

平成 15 年 9 月 24 日-9 月 27 日、マインツ (ドイツ)

1. Acquisition of melanoma cell adhesion molecule expression attenuates cAMP-induced hCG production in human choriocarcinoma cell BeWo

Toshihiro Higuchi, Hiroshi Fujiwara, Yukiyasu Sato, Yoshihiro Nishioka, and Shingo Fujii

2. Chemokine receptors on human extravillous trophoblasts

Yukiyasu Sato, Toshihiro Higuchi, Shinya Yoshioka, Hiroshi Fujiwara, and Shingo Fujii

3. Carboxypeptidase-M is expressed on human extravillous trophoblasts: Possible involvement in trophoblasts invasion

第 55 回日本産科婦人科学会学術講演会 平成 15 年 4 月 12 日-15 日、福岡

会長指定シンポジウム 2 子宮内膜機能の調節機構-着床機構の視点から-

1. 胚との相互作用における着床期子宮内膜の機能変化とその分子機構の解析

巽 啓司

一般演題

1. Trophoblast の浸潤における RANTES とその受容体 CCR1 の役割

佐藤幸保、樋口壽宏、吉岡信也、西岡良泰、藤原 浩、藤井信吾

2. ヒト着床過程における子宮内膜上皮への胚接着に対する Eph-ephrin 系の関与について

西岡良泰、巽 啓司、吉岡信也、小阪謙三、佐藤幸保、藤原 浩、藤井信吾

3. ヒト顆粒膜細胞への ephrin B1 の発現と黄体形成期におけるその意義

江川美保、吉岡信也、樋口壽宏、佐藤幸保、西岡良泰、藤原 浩、藤井信吾

第 80 回近畿産婦人科学会内分泌・生殖研究部会 平成 14 年 6 月 16 日 大阪

当科において腹腔鏡下手術が適応となった不妊症症例における術後妊娠率と子宮内膜症の関連についての検討

小阪謙三、吉岡信也、江川美保、西岡良泰、佐藤幸保、巽 啓司、樋口壽宏、藤原 浩、藤井信吾

第 56 回日本産科婦人科学会学術講演会 平成 16 年 4 月、東京

一般演題

1. ヒト胚及び子宮内膜上皮における activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166) の発現

明坂治子、巽啓司、吉岡信也、樋口壽宏、小阪謙三、佐藤幸保、西岡良泰、江川美保、藤原浩、藤井信吾

第 49 回日本不妊学会総会 平成 16 年 9 月 2 日—4 日、旭川

一般演題

1. ヒト extravillous trophoblast における ephrin A1 の発現とその意義

西岡良泰、藤原浩、佐藤幸保、ZengBing-xiang, 巽啓司、明坂治子、吉岡信也、樋口壽宏、藤井信吾

2. ヒト extravillous trophoblast に発現する integrin $\alpha 5$ の生理学的意義の検討

ZengBing-xiang, 藤原浩、佐藤幸保、西岡良泰、巽啓司、明坂治子、吉岡信也、樋口壽宏、藤井信吾

第 22 回受精着床学会学術講演会 平成 16 年 9 月 2 日—4 日、旭川

一般演題

ephrin A1 分子のヒトおよびマウス blastocyst における発現とその生理的意義

明坂治子、巽啓司、吉岡信也、樋口壽宏、小阪謙三、佐藤幸保、西岡良泰、藤原浩、藤井信吾

<世界体外受精会議記念賞受賞>

第 1 回日本不妊学会関西支部集談会

一般演題

ヒトおよびマウス blastocyst への ephrin A1 発現と胚着床における生理的意義

明坂治子、巽啓司、吉岡信也、小阪謙三、江川美保、ZengBing-xiang、布留川和美、藤原浩、藤井信吾

研究成果

1. ヒト子宮内膜上皮細胞の培養、BeWo 細胞塊の作成およびマウス胚盤胞の調整と、接着モデルの作成と供給 (担当 小阪・吉岡)

患者の同意を得て婦人科手術時に採取された子宮から得た種々の月経周期の内膜組織を酵素処理して細胞浮遊液を作成した。これからメッシュ法および重力沈降法により子宮内膜上皮細胞を分離し単層培養した。BeWo 細胞を培養液中で緩徐に震盪し、細胞塊を作成した。PMSG-hCG による過排卵処理後雄マウスと交配させて得られた妊娠 4 日目の雌マウス子宮より胚盤胞を回収した。得られた BeWo 細胞塊またはマウス胚盤胞を観察し、子宮内膜上皮細胞の接着能を評価した。

2. hCG の添加培養により PBMC から分泌される因子の検討 (担当 樋口)

hCG 添加下で PBMC を培養し、mRNA を抽出した。これを hCG 非添加下で培養した PBMC より抽出した mRNA と一対としてマイクロアレイ法にて発現遺伝子の差異を検討した。発現に差のあった遺伝子 IL-8, VEGF に関して定量的 RT-PCR 法および培養液中の分子活性で確認した。

3. 接着能を獲得したヒト子宮内膜上皮細胞に誘導される遺伝子群の同定

(担当 小阪・樋口)

PBMC 非接触共培養下で接着能を獲得する子宮内膜上皮培養細胞と PBMC 非共培養下で同条件で培養した子宮内膜上皮細胞よりそれぞれ抽出した mRNA を一対としてマイクロアレイ法にて発現遺伝子の差異を検討したが、残念ながら、われわれの注目していた分子の発現の差異は確認されなかった。

4. hCG 添加培養した PBMC による子宮内膜上皮細胞の接着能獲得に関与する因子の検討 (担当 小阪・藤原)

子宮内膜上皮培養系に上記 2 で同定した各種因子を添加して培養し、また実際に胚接着モデルを用いて PBMC を共培養したときと同様に子宮内膜上皮細胞の接着能獲得機構に関わる液性因子の同定を目指したが残念ながら液性因子の同定には至らなかった。

5. ヒト子宮内膜上皮細胞に誘導される分子発現とその局在の検討 (担当 吉岡・藤原)

3. で同定された分子に対して、抗体がある場合にはヒト子宮内膜組織におけるその蛋白発現と局在を免疫染色にて調べ、子宮内膜上皮細胞の細胞膜上に発現しているかどうかを確認する予定であったが、同定にまでは至らなかった。

6. 絨毛癌由来細胞株またはマウス胚盤胞における接着分子発現の検討 (担当 樋口・藤原)

BeWo 細胞株あるいはその他の絨毛癌由来細胞株およびマウス胚盤胞の栄養膜細胞において ALCAM, Eph-ephrin 系各種分子および 3. で同定された子宮内膜上皮培養細胞上の分子と結合するリガンド分子の発現を免疫染色、フローサイトメトリーまたは定量的 PCR 法にて確認したところ、マウス胚盤胞に ALCAM, ephrin A1, その他の発現が確認された。

7. ヒト子宮内膜上皮細胞と接着した絨毛癌由来細胞株またはマウス胚盤胞の浸潤能の bio-assay 系の確立 (担当 小阪・吉岡)

従来行ってきた invasion assay 系のマトリゲル上でヒト子宮内膜上皮細胞を培養した。そこに絨毛癌由来細胞株の細胞塊およびマウス胚盤胞を載せて培養し、子宮内膜上皮細胞と接着した後にマトリゲル中を浸潤して小孔より脱出してきた細胞数を計測することにより浸潤能を評価した。

8. 接着因子の結合による絨毛癌由来細胞またはマウス胚盤胞の活性化の検討 (担当 小阪・藤原)

ALCAM あるいは Eph-ephrin 系分子が発現している絨毛癌由来細胞株およびマウス胚盤胞に対して、それぞれシグナル伝達をおこすことが報告されているリガンド分子を細胞膜上で結合させた。特に Eph-ephrin 系については recombinant Eph あるいは ephrin を添加して抗体で凝集させることによりシグナル伝達をおこした。次に 7. で作成した bio-assay 系を用いて絨毛癌由来細胞株やマウス胚盤胞の栄養膜細胞の浸潤能の変化を観察し、これらの細胞が浸潤能を獲得したかどうかを評価した。さらにこれらの細胞において cAMP などの細胞内伝達物質や各種プロテアーゼ活性の変化を検討し、接着因子の結合による胚の活性化を分子レベルで評価する予定であったが胚の活性化に関しては分子レベルでの同定には至っていない。次に 7. で作成した bio-assay 系を用いて絨毛癌由来細胞株やマウス胚盤胞の栄養膜細胞の浸潤能の変化を観察し、さらにこれらの細胞において cAMP などの細胞内伝達物質や各種プロテアーゼ活性の変化を検討し、接着因子の結合による胚の活性化を分子レベルで評価する予定であったが、cAMP などの細胞内伝達物質や各種プロテアーゼ活性の変化を確認するにいたらなかった。

9. 絨毛癌由来細胞株への同定された遺伝子の導入による機能変化の検討

(担当 樋口・藤原)

3. で同定された着床能を獲得したヒト子宮内膜上皮細胞に誘導される分子のうち 6. で同定されたりガンド分子が発現していない場合には絨毛癌由来細胞株にリポフェクション法にて 6. で同定された遺伝子を導入して 8. と同様の invasion assay を施行し浸潤能の変化やプロテアーゼ活性の変化を観察する予定であったが、3. で有力分子が同定されなかったた

め検討に至らなかった。

10. 実験結果の総合的評価

本研究で明らかとなったヒト子宮内膜上皮細胞と胚の接着機構、および胚活性化機構について総合的に整理すると、子宮内膜上皮細胞には ALCAM, ephrinA1 などの接着に密接に関わる分子が発現していることが確認された。また、マウス胚盤胞にも、ALCAM, ephrinA1 などの接着に密接に関わる分子が発現していることが確認された。これらの接着分子は、ヒト子宮内膜上皮細胞や胚の細胞膜表面に発現して子宮内膜上皮に接着した胚の活性化をおこし、胚着床現象において重要な物質である可能性が十分に考えられる。胚着床機構の解明さらには難治性着床障害の治療法開発の可能性に繋がるものと考えられる。

以上の結果より、子宮内膜上皮細胞には ALCAM, ephrinA1 などの接着に密接に関わる分子が発現していることが確認された。また、マウス胚盤胞にも、ALCAM, ephrinA1 などの接着に密接に関わる分子が発現していることが確認された。これらの接着分子は、ヒト子宮内膜上皮細胞や胚の細胞膜表面に発現して子宮内膜上皮に接着した胚の活性化をおこし、胚着床現象において重要な役割を担う物質であると考えられる。残念ながら子宮内膜上皮細胞に発現する分子の胚へのシグナルの流れは明らかにできなかったが、これら接着分子の同定は、胚着床機構の解明さらには難治性着床障害の治療法開発の可能性に繋がるものと考えられる。また、さらなる解析により、子宮内膜上皮細胞に発現するこれら分子あるいは新しく同定される分子の胚へのシグナルの流れが明らかにされ、胚着床機構の解明、難治性着床障害の治療法開発の可能性も期待される。

なお、本項に述べられている研究成果の詳細については本書の後半にまとめられている発表論文をご参照頂きたい。