

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293358

研究課題名(和文) 胚由来の胚着床誘導因子(胚シグナル)の同定と臨床応用への試み

研究課題名(英文) Identification of embryo-derived implantation-inducing factors (embryonic signals) and their clinical application

研究代表者

藤原 浩(Hiroshi, Fujiwara)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：30252456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究従事者らはこれまで母体の免疫細胞が胚からのシグナルを受けて機能を変化させ、黄体と子宮内膜の分化を促進して胚の着床を誘導することを見出してきた。本研究では胚のシグナルとして透明帯およびHCGホルモンの糖鎖構造が重要であることを提言し、さらにヒト絨毛細胞が特異的に産生する laeverin が新しい胚シグナルである可能性を示した。これらの成果は新しい視点からの着床不全に対する治療法の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that maternal immune systems change their function to induce corpus luteum and endometrial differentiation, leading to embryo implantation. This project further demonstrated the importance of zona pellucida and HCG as embryonic signals and proposed that laeverin, which is specifically produced by human extravillous trophoblast, is a new candidate for embryonic signals. We hope that these findings will contribute to developing a new therapy for patients with repeated implantation failure.

研究分野：産婦人科学

キーワード：胚シグナル 透明帯 HCG Laeverin 免疫寛容 着床

1. 研究開始当初の背景

本研究従事者らはこれまで母体の免疫細胞が胚からのシグナルを受けて機能を変化させ、子宮内膜の分化を促進して胚の着床を誘導することを見出し、着床不全患者に対する自己免疫細胞を用いた治療法を開発してきた。また胚のシグナルとして透明帯および HCG ホルモンの糖鎖構造が重要であることを提言し、さらにヒト絨毛細胞が特異的に産生する糖蛋白分子 (laeverin と命名) を発見してこの分子が新しい胚シグナルである可能性を示してきた。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究では透明帯、HCG および laeverin にさらに焦点をあて、免疫細胞へのシグナルの key となる糖鎖を含む分子構造を同定するとともに、それらの免疫系細胞に対する機能を解析し、自己免疫細胞療法の改善のみならず、新しい視点から着床不全に対する治療法を開発すること、さらに胚による免疫寛容誘導機構を臓器移植学などの他科領域にも応用することを目的として計画された。

3. 研究の方法

これまでの検討で、1) 透明帯や HCG には胚特異的な糖鎖構造が存在して免疫系にシグナルを伝達する可能性がある、2) 免疫系と内分泌系が協調して相互応答に関与している、3) 末梢循環系の免疫細胞が胚-母体間の相互応答に関与している、4) 卵管・子宮底部から下腸管膜動脈リンパ節群への情報伝達経路がヒトで存在する、5) 本研究者らが同定した laeverin は EVT から特異的に分泌される糖蛋白であり in vitro で免疫細胞の選択的な増殖と apoptosis を誘導する、6) 膜結合型 laeverin は血管内皮系幹細胞の新しいマーカーの可能性があり、等の情報を得ている。また一方で研究分担者の京と高倉らは RB 蛋白の活性化を防ぐ遺伝子操作 (HPV E6/E7 遺伝子の導入) とテロメア伸張酵素テロメラーゼ (hTERT) の導入により、世界で初めて正常子宮内膜上皮細胞を不死化することに成功している (Kyo et al. *Am J Pathol*, 2003)。そこで本研究ではこれらの advantage を生かし以下の 6 項目を遂行する。

(I) 透明帯および HCG の糖鎖の免疫細胞に対する作用を明らかにする。(II) EVT から特異的に分泌される糖蛋白 laeverin の免疫細胞への作用および血液幹細胞に対する役割を明らかにする。(III) 卵管・子宮底部から傍大動脈リンパ節への免疫シグナル伝達様式を明らかにする。(IV) 免疫細胞へのシグナルとなる透明帯および HCG の糖鎖構造を同定し、mimic する合成ペプチドをスクリーニングする。(V) Trophoblast の不死化細胞株を

作成し、既に不死化されている子宮内膜上皮細胞も用いて免疫細胞の子宮内膜の分化と trophoblast の浸潤に対する誘導機構を明らかにする。(VI) 上記の解析結果から、透明帯や HCG の糖鎖構造を用いた着床不全の治療法および臓器移植での免疫寛容誘導法の開発など、臨床への応用を検討する。

4. 研究成果

免疫系に情報伝達する胚シグナルとしてこれまで着目してきた透明帯および HCG の key となる糖鎖を含む分子構造について解析をすすめた結果、マンノースで抑制される分子構造が重要である可能性が示された。一方で、recombinant-laeverin によって dendritic cell が活性化されること、また絨毛の器官培養中に分泌型の laeverin が存在することが明らかとなり、laeverin が胚による免疫寛容誘導機構に関与する液生因子である可能性が示唆された。

今後継続的に透明帯および HCG の糖鎖の免疫細胞に対する作用を明らかにし、また laeverin の免疫細胞への作用および血液幹細胞に対する役割を明らかにして卵管・子宮底部から傍大動脈リンパ節への免疫シグナル伝達様式を明らかにする必要が課題として残された。

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 25 件)

1. Suginami K, Sato Y, Horie A, Matsumoto H, Tani H, Mizumoto Y, Ono M, Matsuoka A, Kyo S, Araki Y, Konishi I, Fujiwara H. Platelet-derived microparticles and soluble factors differentially regulate human endometrial epithelial cell movement. *Am J Reprod Immunol*. 2017 Feb 7. doi: 10.1111/aji.12641. [Epub ahead of print] 査読有

2. Matsuoka A, Sasaki H, Sugimori C, Hirabuki S, Hoshihara T, Fujiwara H. Acquired hemophilia A manifesting as plasma transfusion-uncontrolled severe bleeding 2 weeks after chorioamnionitis-induced abortion. *J Obstet Gynaecol Res*. 2017 Feb 2. doi: 10.1111/jog.13270. [Epub ahead of print] 査読有

3. Bono Y, Mizumoto Y, Nakamura M, Iwaware J, Obata T, Fujiwara H. FDG-PET-positive ovarian thecoma with GLUT5 expression: Five cases. *J Obstet Gynaecol Res*. 2017 Mar;43(3):599-603. 査読有

4. Suginami K, Sato Y, Horie A, Matsumoto H, Kyo S, Araki Y, Konishi I, Fujiwara H. Platelets are a possible regulator of human endometrial re-epithelialization during menstruation. *Am J Reprod Immunol*. 2017 Jan;77(1). 査読有
5. Iizuka T, Wakae K, Nakamura M, Kitamura K, Ono M, Fujiwara H, Muramatsu M. APOBEC3G is increasingly expressed on the human uterine cervical intraepithelial neoplasia along with disease progression. *Am J Reprod Immunol*. in press, 2017 査読有
6. Imakawa K, Bai R, Fujiwara H, Ideta A, Aoyagi Y, Kusama K. Continuous model of conceptus implantation to the maternal endometrium. *J Endocrinol*. 233:R53-R65, 2017 Review. 査読有
7. Matsumoto H, Sato Y, Horie A, Suginami K, Tani H, Hattori A, Araki Y, Kagami K, Konishi I, Fujiwara H. CD9 suppresses human extravillous trophoblast invasion. *Placenta*. 2016 Nov;47:105-112. doi: 10.1016/j.placenta.2016.09.014. 査読有
8. Obata T, Nakamura M, Mizumoto Y, Matsumoto T, Takakura M, Fujiwara H. Synchronous endometrioid adenocarcinomas in the uterine cervix and corpus. *J Obstet Gynaecol Res*. 2016 Oct;42(10):1390-1394. doi: 10.1111/jog.13049. 査読有
9. Yoshitake H, Oda R, Yanagida M, Kawasaki Y, Sakuraba M, Takamori K, Hasegawa A, Fujiwara H, Araki Y. Identification of an anti-sperm auto-monoclonal antibody (Ts4)-recognized molecule in the mouse sperm acrosomal region and its inhibitory effect on fertilization in vitro. *J Reprod Immunol*. 2016 Jun;115:6-13. doi: 10.1016/j.jri.2016.04.001. 査読有
10. Kagami K, Yamazaki R, Minami T, Okumura N, Morishita E, Fujiwara H. Familial discrepancy of clinical outcomes associated with fibrinogen Dofen: A case of huge genital hematoma after episiotomy. *J Obstet Gynaecol Res*. 2016 Jun;42(6):722-725. doi: 10.1111/jog.12972. 査読有
11. Ghosh H., Auguadri L., Battaglia S., Simone Thirouin Z., Zemoura K., Messner S., Acuña M. A., Wildner H., Yévenes G. E., Dieter A., Kawasaki H., Hottiger M. O., Zeilhofer H. U., Fritschy J.-M. and Tyagarajan S. K., Several posttranslational modifications act in concert to regulate gephyrin scaffolding and GABAergic transmission, *Nature Communications*, 7, 13365, 2016 査読有
12. Toda T., Shinmyo Y., Dinh D. T. A., Masuda K. and Kawasaki H., An essential role of SVZ progenitors in cortical folding in gyrencephalic mammals, *Scientific Reports*, 6, 29578, 2016 査読有
13. Hoshiya Y., Toda T., Ebisu H., Wakimoto M., Yanagi S. and Kawasaki H., Sox11 balances dendritic morphogenesis with neuronal migration in the developing cerebral cortex, *Journal of Neuroscience*, 36, 5775-5784, 2016 査読有
14. Endo S., Yoshitake H., Tsukamoto H., Matsuura H., Kato K., Sakuraba M., Takamori K., Fujiwara H., Takeda S., Araki Y. TEX101, a glycoprotein essential for sperm fertility, is required for stable expression of Ly6k on testicular germ cells. *Sci.Rep*. 6: 23616, 2016 査読有
15. Hamamura K., Nonaka D., Ishikawa H., Banzai M., Yoshitake H., Yanagida M., Nojima M., Yoshida K., Takamori K., Asada K., Lee L-J, Tanaka K., Takeda S., Araki Y. Simple quantitation for potential serum disease biomarker peptides, primarily identified by a peptidomics approach in the serum with hypertensive disorders of pregnancy. *Ann.Clin.Biochem*. 53: 85-96, 2016 査読有
16. Sumita K, Lo YH, Takeuchi K, Senda M, Kofuji S, Ikeda Y, Terakawa J, Sasaki M, Yoshino H, Majd N, Zheng Y, Kahoud ER, Yokota T, Emerling BM, Asara JM, Ishida T, Locasale JW, Daikoku T, Anastasiou D, Senda T, Sasaki AT. The lipid kinase PI5P4K8 is an intracellular GTP sensor for metabolism and tumorigenesis. *Mol Cell*. 61. 187-198, 2016 査読有
17. Fujiwara H, Araki Y, Imakawa K, Saito S, Daikoku T, Shigeta M, Kanzaki H, Mori T. Dual Positive Regulation of Embryo Implantation by Endocrine and Immune Systems - Step-by-Step Maternal

Recognition of the Developing Embryo.
Am J Reprod Immunol. 75:281-9, 2016
査読有

18. Wakae K, Aoyama S, Wang Z, Kitamura K, Liu G, Monjurul AM, Koura M, Imayasu M, Sakamoto N, Nakamura M, Kyo S, Kondo S, Fujiwara H, Yoshizaki T, Kukimoto I, Yamaguchi K, Shigenobu S, Nishiyama T, Muramatsu M.
Detection of hypermutated human papillomavirus type 16 genome by next-generation sequencing.
Virology. 485:460-466, 2015. 査読有

19. Yoshitake H, Hashii N, Kawasaki N, Endo S, Takamori K, Hasegawa A, Fujiwara H, Araki Y.
Chemical characterization of N-linked oligosaccharide as the antigen epitope recognized by an anti-sperm auto-monoclonal antibody, Ts4.
PLoS One. 10: e0133784, 2015. 査読有

20. Ahasan MM, Wakae K, Wang Z, Kitamura K, Liu G, Koura M, Imayasu M, Sakamoto N, Hanaoka K, Nakamura M, Kyo S, Kondo S, Fujiwara H, Yoshizaki T, Mori S, Kukimoto I, Muramatsu M.
APOBEC3A and 3C decrease human papillomavirus 16 pseudovirion infectivity.
Biochem Biophys Res Commun. 457:295-299, 2015. 査読有

21. Bono Y, Kyo S, Kiyono T, Mizumoto Y, Nakamura M, Maida Y, Takakura M, Fujiwara H.
Concurrent estrogen action was essential for maximal progestin effect in oral contraceptives.
Fertil Steril. 101:1337-43, 2014. 査読有

22. Zhang X, Kyo S, Nakamura M, Mizumoto Y, Maida Y, Bono Y, Takakura M, Fujiwara H.
Imatinib sensitizes endometrial cancer cells to cisplatin by targeting CD117-positive growth-competent cells.
Cancer Lett. 345:106-14, 2014. 査読有

23. Bai R, Bai H, Kuse M, Ideta A, Aoyagi Y, Fujiwara H, Okuda K, Imakawa K, Sakurai T.
Involvement of VCAM1 in the bovine conceptus adhesion to the uterine endometrium.
Reproduction. 148:119-27, 2014. 査読有

24. Takahashi H, Takizawa T, Matsubara S, Ohkuchi A, Kuwata T, Usui R, Matsumoto

H, Sato Y, Fujiwara H, Okamoto A, Suzuki M, Takizawa T.

Extravillous trophoblast cell invasion is promoted by the CD44-hyaluronic acid interaction.
Placenta. 35:163-70, 2014. 査読有

25. Zhang X, Kyo S, Nakamura M, Mizumoto Y, Maida Y, Bono Y, Takakura M, Fujiwara H.
Imatinib sensitizes endometrial cancer cells to cisplatin by targeting CD117-positive growth-competent cells.
Cancer Lett. 345:106-14, 2014. 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 藤原 浩
平成 28 年度第 2 回滋賀県産科婦人科医学会学術講演会 2016.9.3 大津プリンスホテル (滋賀県大津市)
「後腹膜アプローチにおける腫瘍学と生殖医学の相違点 生殖機能の再建を目指して」(特別講演)

2. 藤原 浩
第 52 回中国四国生殖医学会学術講演会 2016.8.27 岡山国際交流センター(岡山県岡山市)
「胚着床機能を再考察する 新しい着床誘導エッセンスの提言」(特別講演)

3. 藤原 浩
第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会 2016.4.23 東京国際フォーラム(東京都千代田区)
「乳癌患者に対する治療による卵巣過剰刺激作用」(教育講演)

4. 藤原 浩
第 30 回日本生殖免疫学会総会・学術集会 2015.11.21 熊本県民交流館パレア(熊本県熊本市)
「母体による胚の認識機構 胚の着床(寄生)と感染症は表裏一体か」(オープニングレクチャー)

5. 藤原 浩
第 6 回金沢大学学際科学実験センターシンポジウム 女性生殖組織の機能と疾患 2015.11.13 金沢大学附属医学図書館十全記念スタジオ(石川県金沢市)
「末梢血循環細胞による胚着床誘導機構」

6. 藤原 浩
第 42 回日本産婦人科医学会学術集会新潟大会 2015.10.18 新潟県立ホテル(新潟県新潟市)
「生殖の場における免疫 内分泌の役割」

(教育講演)

7. Fujiwara H.
International Congress On “Embryo Implantation: Intricacies and Strategies for its Success”
organized by National Institute of Immunology, New Delhi, India, 9-11 March, 2015.
「Positive contribution of immune cells to endometrial receptivity and embryo implantation」
8. 藤原 浩
第 60 回日本生殖医学会学術講演会・IFFS / JSRM International Meeting 2015
Topics Session Implantation: Molecular Mechanism & Management
2015.4.26～29 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
「Possible involvement of eph-eprin system in the initial step of embryo implantation」
9. 藤原 浩
第 60 回日本生殖医学会学術講演会・IFFS / JSRM International Meeting 2015
60JSRM Symposium Recognition of pregnancy and implantation 妊娠認識と着床
2015.4.26～29 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
「Contribution of blood cells to embryo implantation」
10. 藤原 浩
第 217 回熊本産婦人科学術講演会
2014.10.19 熊本地域医療センター(熊本県熊本市)
「胚着床に対応する生殖臓器の機能を考慮した再建術を目指して」(特別講演)
11. 藤原 浩
第 22 回日本胎盤学会学術集会・第 32 回の本絨毛性疾患研究会 2014.10.4 芝蘭会館(京都府京都市)
「絨毛外胎膜剥離(EVT)の基礎と臨床」
12. 藤原 浩
第 127 回関東連合産科婦人科学会総会・学術集会 2014.6.22 都市センターホール(東京都千代田区)
「産婦人科医が認識すべき乳癌ホルモン治療の問題点」

(図書)(計 2 件)

1. Fujiwara H, Araki Y, Sato Y, Takakura M, Nakamura M, Mizumoto Y, Horie A, Kanzaki H, Mori T. Role of circulating blood cells in maternal tissue remodeling and embryo-maternal cross-talk. In Uterine Endometrial Function, ed. Hideharu Kanzaki, Springer, in press.
2. Fujiwara H, Araki Y, Saito S, Imakawa K, Kyo S, Shigeta M, Shiotani M, Horie A, Mori T. A novel concept of fundus-ovary-salpinx-para-aorta implantation promoting unit during human embryo implantation. In Embryology, ed. Bin Wu, InTech, ISBN 978-953-51-4214-0. Published: October 21, 2015.

(産業財産権)

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 浩(FUJIWARA, Hiroshi) 金沢大学医学系 教授
研究者番号: 30252456

(2) 研究分担者

高倉 正博(TAKAKURA, Masahiro) 金沢大学附属病院 准教授
研究者番号: 20313661

荒木 慶彦(ARAKI, Yoshihiko) 順天堂大学医学系研究科 准教授
研究者番号: 70250933

服部 明(HATTORI, Akira) 京都大学薬学研究科 准教授
研究者番号: 50300893

河崎 洋志(KAWASAKI, Hiroshi) 金沢大学脳・肝インターフェース研究センター 教授
研究者番号: 50303904

大黒多希子(DAIKOKU, Takiko) 金沢大学学際科学実験センター 教授
研究者番号: 30767249

京 哲(Kyo, Satoru) 島根大学医学部 教授
研究者番号: 50272969