

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

令和 3年 4月 12日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 医学研究科・器官外科学講座

職 名 講師

氏 名 堀江 昭史

助 成 の 種 類	令和 2 年 度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	ヒト胚着床における末梢血単核球の促進的作用メカニズムの解明			
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容	なし			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名) 京都大学産婦人科・病院特定助教・奥宮明日香、大学院生・北脇 佳美			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) 現時点で発表した学会はないが、メカニズムを解明するためのマウスにおけるin vivoのモデルが出来上がりつつあり、それを用いて促進作用機序を解明する予定である			
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000	円	
	使用した助成金額	1,000,000	円	
	返納すべき助成金額		円	
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		研究試薬・抗体	95,282円	
		実験用器具、消耗品	57,778円	
マウス		253,590円		
動物飼育管理負担金	593,350円			
当財団の助成に つ い て	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 今回、我々としては資金繰りに非常に難渋していたときにいただけたこと、心より感謝しております。京大には多方面に渡り、様々な新しい研究事業があるため、このような形で助成をしていただけることは、我々研究者にとって非常に勇気を与えられ、活力となることは間違いありません。今後とも助成金制度拡充含めて、ご検討いただければ幸いです。			

成果の概要／堀江昭史

【研究内容】

不妊治療において、形態良好胚を3回以上移植しても妊娠に至らない難治性着床不全(RIF)という病態が存在する。近年、PGT-A等の着床前診断により胚側の要因は解決されつつあるが、原因不明の着床不全に対しては有効な治療法が確立されておらず、これまでの手法とは異なったアプローチでの治療の開発やその作用メカニズムの解明が重要である。

研究申請者らは、自己末梢血リンパ球(PBMC)療法をRIF患者に対して臨床研究として行ってきており、その成績としてPBMC療法は約37%の妊娠率を示しており、海外でもPBMC療法に関する同様の治療効果が数多く報告されている。PBMC療法は、着床不全患者より採取したPBMCをhCGを添加して培養し胚移植の3日前に子宮内投与を行う治療である。PBMC療法は、胚の着床率を向上させる画期的な治療法ではあるが、hCGにより刺激を受けたPBMCのどの細胞分画が着床に関わっているのか、また、どのような因子がその着床機序に寄与しているのか、その機序はどういったものかという学術的な問いが残ったままである。そこで本研究では、PBMCが分泌する液性因子を解析し、さらにその責任細胞を解明する。最終的にはPBMCの胚着床におけるメカニズムを明らかにすることを目的とする。

【研究成果】

① PBMC (末梢血単核球) 培養上清の解析

まずはじめに質量分析法による培養上清中の因子の解析を計画した。培養液由来のアルブミン等の血清タンパクによる検出力の低下の問題があり、培養上清中のPBMC由来分泌タンパクのみの精製を試みたものの想定する培養条件下では検出は困難であった。

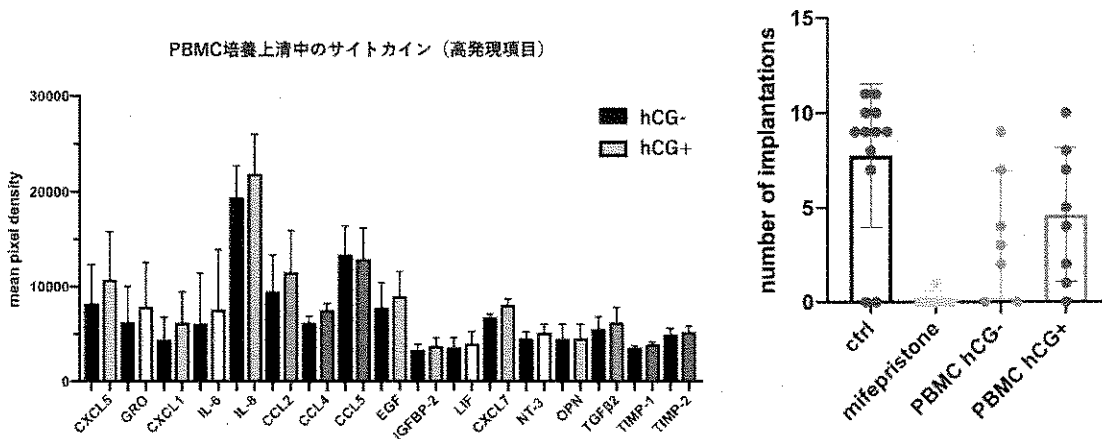
次に、サイトカインアレイによる解析を行うこととした。

PBMCが産生する液性因子のスクリーニングを行うため、臨床でのPBMC治療に準じて、黄体期女性から回収したPBMCにhCG添加の上48時間培養を行い、コントロール群としてhCG添加なしで培養するhCG非添加群を同様に培養し、それぞれの培養上清を回収した。各群4サンプルに対してサイトカインアレイでの解析を行った。結果として、PBMC培養上清中のサイトカインとしては過去の研究で着目していたIL-8を始めとして、RANTES、EGF、その他複数のケモカインが高値であり、脱落膜化後の内膜間質細胞からの産生されるケモカインが数多く含まれていた。着床に強く関与するサイトカインであるLIFや接着関連分子であるSPP1も少量検出された。アレイで高発現であった項目について培養時のhCG添加有無で比較すると、CXCL5、CXCL1、IL-8、CCL2、CCL4、EGF、TGF β 2がhCG添加群で増加傾向であった。PBMC治療に関する他科の報告で効果責任因子の候補としてあげられるIL-1 β 、GM-CSFは培養上清中には殆ど検出されなかった。(図1)

上記結果より、投与後PBMCが子宮内膜間質に移行し、着床不全患者で不足する脱落膜化細胞由来のサイトカインを代償し、胚の浸潤や着床に必要な免疫細胞の遊走を促進している可能性が示唆された。

② マウスモデルを用いた *vivo* での着床促進作用の検討

過去の基礎研究において hCG 添加 PBMC が絨毛癌細胞株やマウス胚の浸潤を促進することが示されている。一方、着床に必要な内膜側の変化としての子宮内膜間質の脱落膜化やより着床早期の内膜上皮細胞と胚の接着に関する PBMC 療法の効果は不明である。これらを評価する *in vitro* の系としてヒト内膜や細胞株を用いた接着実験や脱落膜化誘導実験を行ったが、PBMC 共培養や PBMC 培養上清による効果は確認できていない。また、臨床研究での PBMC 投与症例の内膜サンプル回収は困難であり、免疫系等の詳細な反応を介した作用は未だ評価できていない。そこで、マウス *in vivo* モデルを用いて PBMC 療法後の着床に及ぼす変化を解析することとした。ホルモン応答遺伝子の発現異常による着床不全モデルとしてプロゲステロン受容体・グルココルチコイド受容体阻害剤である RU486(mifepristone) 投与モデル、着床開始後早期の免疫寛容不全による初期流産モデルとして CBA/J 雌×DBA/2J 雄の交配モデルを用いて検討を行った。前者においては、陰栓形成後 1.5 日目に同系統マウス由来の培養後 PBMC を子宮内に投与することにより、妊娠率・胚着床数ともに有意に改善することを確認した。また、hCG 添加 PBMC の投与ではより着床数が増える傾向があることを確認した。(図 2) 後者のモデルについても PBMC 投与を開始し、胚吸収率の増減を評価予定としている。



【今後の見通し】

RU486 投与マウスモデルにおいての PBMC 療法の効果が確認されたため、今後は、PBMC 投与有無や、投与 PBMC の hCG 添加有無によるマウス子宮内膜の遺伝子発現変化およびホルモン受容体発現変化を解析し、サイトカインアレイの結果とも合わせ PBMC 療法により胚着床率が改善する機序や、PBMC によりレスキューされうる内膜側の異常について検討を行う予定である。初期流産マウスモデルについても効果が確認できるようであれば、子宮内膜内の補体系や免疫細胞の解析を行い、PBMC 療法が生体内で着床期の免疫環境に及ぼす影響を検討したいと考えている。

これらから得られる知見を元に、将来的には臨床の PBMC 療法においての適応症例の選択などに活かすことにつなげて行きたいと考えている。