

引チューブを挿入し、子宮腔内を生理食塩水 5ml で洗浄(flushing)後、吸引して回収する。回収液は、1500rpm、10 分間の遠心により細胞を沈降させた後、上清を-80°Cで保存した。

子宮内腔洗浄液の分析としては、最初にMMPについて zymography による半定量を行った (Inagaki N et al, Hum Reprod 2003;18(3):608-615)。ポジティブ・コントロール (pro-MMP2, active-MMP2, pro-MMP9, active-MMP9, 2 量体 MMP9)と比較することにより、各検体の MMP それぞれの濃度を、Inagaki らの方法により半定量(スコアリング)した。陽性例には抗生物質とプレドニゾロン 10mgを10日間投与した。

移植胚数については、平成 18 年より原則として単一胚盤胞移植を目指した。しかし、胚の状態によっては 2 個移植を行うこともあった。また、採卵数の少ない場合は採卵後培養3日目に移植を行った。胚移植 10 日後に血中 hCG を測定して妊娠の有無を判定した。統計処理には、 χ^2 乗検定を用いた。

(2) CD9

(i) マウス子宮内膜における CD9 の発現を免疫染色で検討した。また、子宮腔内洗浄液をウェスタンブロットに供し、子宮腔内への CD9 分泌量を検討した。

(ii) 性交 120 分後に CD9 ノックアウトマウスにおける受精状況を観察し、正常マウスの場合と比較した。

(3) HMGPI

一方、胚の質的診断に有用なバイオマーカーを探索することを目的に、マウス着床前期胚の遺伝子発現プロファイリング・データの *in silico* 解析を行った。その結果、着床前期胚に特異的に発現する新規遺伝子 *Hmgpi* が発見されたので、詳細な発現解析と機能解析を行った。

(i) 定量的リアルタイム逆転写 PCR、ウェスタンブ

ロット、免疫染色

(ii) 受精卵への siRNA 注入による *Hmgpi* 発現抑制が着床前期および着床周辺期の胚発生に与える影響を検討した。

C. 研究結果

(1) MMP 陰性例は 496 例 [90.3%] (I 群)、陽性例は 53 例 [9.7%] であった。陽性例のうち、内服治療後の再検で陰性となった例が 50 例 [94.3%] (II 群)、治療後も陽性であった例は 3 例 [5.7%] (III 群)。

平均年齢は、I 群で 36.71±4.11、II 群で 36.34±4.12、III 群で 38.33±0.57 と有意な差は認められなかった。

検査後に妊娠した例は、I 群で 223 例 [45.0%]、II 群で 27 例 [54.0%]、III 群で 1 例 [33.3%]であったが、

妊娠までの移植回数および平均移植胚数に差は認められなかった。しかし、流産率は、I 群で 123 例 [55.2%]、II 群で 7 例 [25.9%]、III 群で 0 例であった。すなわち、MMP 陰性例よりも、MMP 陽性で治療後に陰性化した例の方が流産率は低かった。

(2) CD9

(i) マウス子宮内膜腺上皮で CD9 の強発現が認められ(図1)、さらに子宮内腔への CD9 の分泌も認められた(図 2)。

(ii) CD9 ノックアウトマウスでは、子宮を遡上して卵管に到達する精子数が減少していた(図3)。子宮内の CD9 が精子の誘導に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(3) マウス着床前期胚特異的遺伝子 *Hmgpi* の発現・機能解析

(i) *Hmgpi* は high mobility group box ドメインを 2 個持つ転写因子をコードすることが推定され、その mRNA は 2 細胞期～胚盤胞、また胚性幹細胞で、タンパク質レベルでは 4 細胞期～胚盤胞、胚性幹細胞で発現が認められたが、胎生 7 日齢～成獣ではいかなる臓器においても発現は認められなかった。4 細胞期～桑実胚では細胞質のみに発現し、培養液中への分泌も示唆された。一方、胚盤胞および胚性幹細胞では核内にも局在を認めた。

(ii) 受精卵への siRNA 注入により、*Hmgpi* は着床周辺期に至るまで発現が抑制された。その結果、着床前期胚発生が抑制される胚を認め(桑実胚で発生停止)、胚盤胞に至った胚でも、その後の着床および out growth が阻害された。

D. 考察

Inagaki らは、16 例の反復着床不全例に対し、子宮内腔洗浄液中の MMPs 活性が高いことを報告している(Inagaki N et al, Hum Reprod 2003;18(3):608-615)。今回我々は、子宮内腔洗浄液中の MMP 活性が高い症例に対して、抗生剤とプレドニゾロンの内服治療が MMP 活性の正常化に著効を示し(94.3%で陰性化)、妊娠率の改善にも有用である可能性を示した(妊娠率:I 群, 45.0%; II 群, 54.0%; III 群, 33.3%)。興味深いことに、妊娠率あるいは流産率のいずれについても、I 群で II 群よりも良好な結果が得られている(流産率:I 群, 55.2%; II 群, 25.9%)。このことから、I 群では MMP 以外に反復着床不全の原因が存在すると考えられるものの、II 群では、MMP 活性の上昇が反復着床不全に寄与していたが、MMP の正常化により反復着床不全が一部あるいは完全に解消できたことを示していると考えられる。

今後は、子宮内腔における CD9 の液性因子としての役割についてマウスを用いた基礎的検討をさらに進めるとともに、今後はヒト子宮内腔洗浄液中の

CD9 濃度と妊娠率との相関を検討する。

一方、着床前期胚特異的遺伝子 *Hmgpi* は正常な初期胚発生に必須であり、その HMGPI タンパクの培養液中への分泌を観察することが胚の質的診断に有用である可能性が示唆された。

E. 結論

子宮内腔洗浄液中の液性因子と妊娠予後の相関を検討することにより、着床における新たな臨床的指標を発見できると考えられた。

胚からのパラクライン因子 HMGPI が胚の質的診断に有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

論文発表

Toyoda M, Hamatani T, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. Chip to analyze cell identity in Reproductive and Regenerative Medicine. Current Medicinal Chemistry 2010, in press.

Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein *Hmgpi* in early embryonic development. Human Molecular Genetics 2010; 19(3): 480-493

学会発表

持丸佳之, 久慈直昭, 高野光子, 浜谷敏生, 浅田弘法, 青木大輔, 吉村泰典 交流磁場発生装置を

用いたブタ卵巣の超低温保存 第 61 回日本産科
婦人科学会総会・学術講演会 2009 年 4 月 4 日
京都

山田満稔, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 持丸佳之, 高
野光子, 浅田弘法, 久慈直昭, 青木大輔, 梅澤明
弘, 吉村泰典 着床前期胚に特異的に発現する新
規遺伝子 Hmgp の発現および機能解析 第 50 回
日本哺乳動物卵子学会 2009 年 5 月 8 日 東京

持丸佳之, 久慈直昭, 山田満稔, 高野光子, 浜谷
敏生, 阿久津英憲, 浅田弘法, 末岡浩, 青木大輔,

吉村泰典 単一卵子の DNA マイクロアレイによる
遺伝子発現解析とその応用 第 27 回日本受精着
床学会 2009 年 8 月 6 日 京都

山田満稔, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 持丸佳之, 高
野光子, 浅田弘法, 久慈直昭, 吉村泰典 着床前
期特異的新規遺伝子 Hmgp による着床周辺期発
生の制御機構 第 54 回日本生殖医学会・学術講
演会 2009 年 11 月 23 日 金沢

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

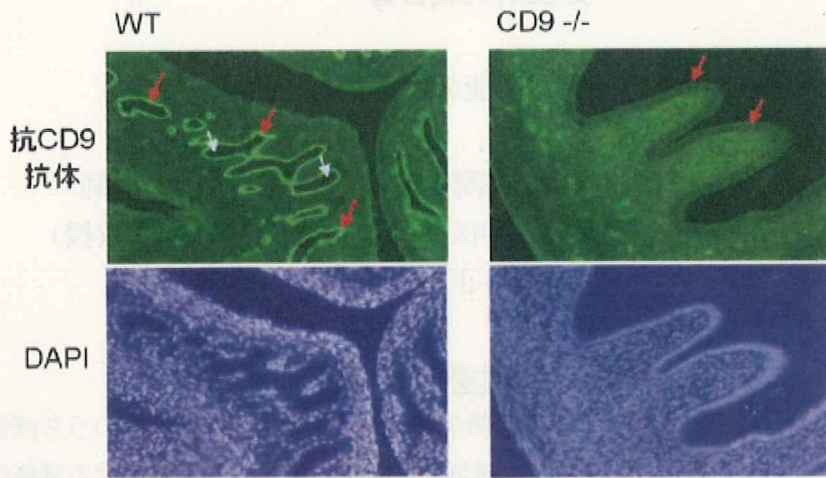


図-1 抗 CD9 抗体、DAPI で染色した子宮断面の蛍光像

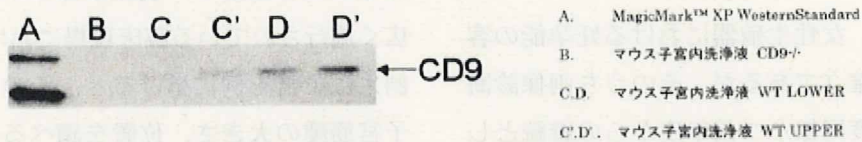


図 2 遠心分離した子宮内洗浄液のウェスタンブロット結果

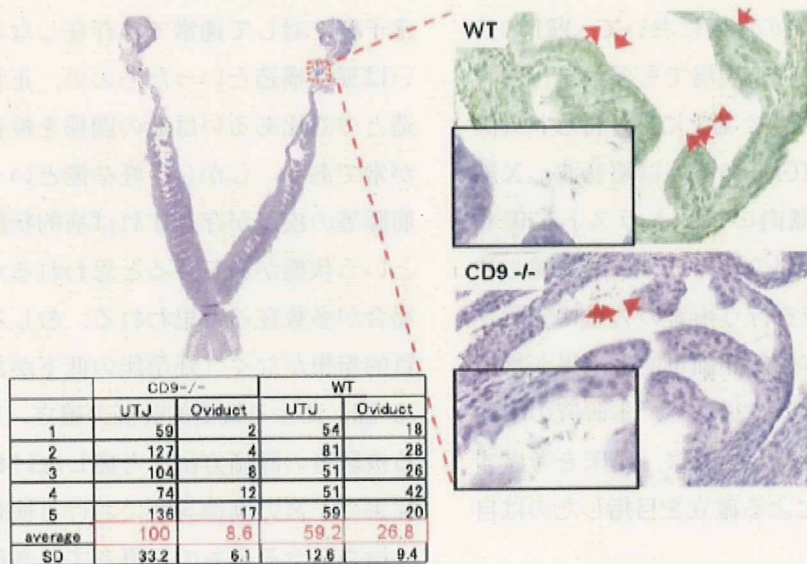


図 3 HE により染色した、交配後 120 分後の子宮・卵管断面図

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業） 分担研究報告書

女性生殖器における妊孕能の客観的な評価法の確立

研究分担者 山梨大学医学部附属病院放射線科学内講師
(現 順天堂大学医学部放射線医学教室准教授)
堀 正明

研究要旨

本研究の目的は、女性生殖器における妊孕能の客観的な評価法の確立であるが、そのうち画像診断に関して、前年度同様かつ前年度からの継続として、特に磁気共鳴画像（以下、MRI）における評価法の確立を主たる目的とした。不妊症症例を対象に Cine MRI や T2 値などの検討を行った。

A. 研究目的

本研究の目的は、女性生殖器における妊孕能の客観的な評価法の確立であるが、そのうち画像診断に関して、前年度同様かつ前年度からの継続として、特に磁気共鳴画像（以下、MRI）における評価法の確立を主たる目的とした。

画像診断の側からみれば、骨盤部女性生殖器（子宮、卵巣等）はその疾患の評価において、MRI の良い適応となり、実際臨床の現場でも多数施行されている。その理由としては、MRI により得られる画像が、他の画像検査（CT、あるいは超音波、X線写真等）に比し、組織内のコントラストに優れ（例：子宮の内膜と筋層の境界）、遊離 X 線の被曝は皆無であり、検査を行う術者の力量に影響されることが少ない、客観的評価可能な結果が得られるということが大きい。従って、本研究の主題に沿った評価方法の確立としては、臨床を考慮すると MRI による手法による確立を目指したのは自然といえる。

したがって妊孕能の客観的な評価法に MRI を用いることに対しては何ら問題ないと思われるが、では実際の遂行において具体的にどのような方法で撮像を行うかという点では、現在定まったもの

はないといえよう。現在本邦のみならず世界的に広く施行されている臨床現場における MRI 検査は、例えば子宮を例に挙げると、その目的としては、子宮筋腫の大きさ、位置を調べる、子宮筋腫と腺筋症の鑑別診断を行う、腫瘍があった場合にその伸展範囲や浸潤の程度を確認するといったものであり、まず器質的病的背景ありきであり、いわば正常子宮に対して通常では存在しない異常信号あるいは異常構造といったものの、正常と思われる構造との対比あるいはその関係を検査するというのが常である。しかし、妊孕能というものは、子宮筋腫等の疾患が存在すれば病的状態としての低下という状態がありうると思われるが、そうでない場合が多数在ると思われる。むしろ、いわゆる器質的疾患がなく、妊孕能の低下がある場合における MRI による機能的評価の確立、いわば正常である被験者の評価方法を考慮しなければならない。

従来の子宮の画像診断における検査手法と、大きく検査概念そのものを再考すべき部分が多い。

近年 MRI を用いた疾患の評価方法として、視覚的評価ではなく、画像統計解析や、PC 上における自動処理、あるいは定量的評価といった手法が用いられている。順に例示していくと、まず画像統

計解析に関しては、いわゆる標準といわれる状態から、信号強度あるいは形態的变化が統計学的にどの程度の偏位があるのかを評価する手法である。具体的には、脳神経の分野で特に顕著な発展を認め、アルツハイマー病における早期発見、あるいは高リスク群における統合失調症の発症前評価が可能であるとされている。これら疾患の脳の形態的变化はごく軽微なもので人間の目による視覚的評価では、仮に経時的データが存在しても認識しえない程度のものである。また、PC 上における自動処理としては、特に周期的な運動を行う器官において、視覚的評価以上の情報を同一データより取得することができる。この分野では、特に心拍動時における心筋の奇異運動がそれに相当する。最後に定量的評価としては、従来から MR spectroscopy による成分分析や T2 値の測定といった手法がある。過去では、これら撮像方法は施行に要する時間がかかり長く、研究レベルならともかく日常臨床においてはあまり現実的な検査手法ではなかったが、近年の MRI の進歩により、かなり短時間で施行可能となっている。例えば T2 値の測定は関節（膝関節等）において、早期より軟骨の変性を指摘可能であるといった有用性の報告がある。

したがって本分担研究の目的は、上記のような従来とは異なる撮像手法を用いつつ、MRI を使用して女性生殖器官における妊孕能の客観的な評価法の確立を目指すことである。

B. 研究方法

目的の項で示したとおり、本研究では骨盤部撮像の MRI として、臨床で多く用いられている骨盤部撮像法とは異なる撮像を試み、解析を行う

1 対象

不妊症を有する女性被験者であれば、特に撮像における制限はない。

ただし、一般的な MRI 撮像の禁忌がないこと（閉

所恐怖症、体内金属等）は事前に確認する必要がある。

2 撮像方法

まず、通常の臨床で多く用いられている骨盤部のルーチン撮像、具体的には骨盤部の T2 強調像矢状断、横断像、T1 強調像の横断像にてそれぞれ数イメージ撮像を行い、MRI で指摘可能な器質的疾患の除外を行う。（ただし、子宮筋腫は不妊症と大きく関係しているため、筋腫があっても対象群からは除外しない）

その後研究の撮像手法として

- ① 子宮全体の三次元ボリューム撮像
- ② 子宮の連続的時間差撮像、いわゆるシネ MRI 撮像
- ③ 子宮内膜の T2 値測定

を昨年継続して行った。それぞれの撮像手法に関しては、実際の撮像開始前に撮像パラメーターの至適化を行う

3 データ解析

上記により得られた画像について、可能であれば画像統計解析を行うが、そもそもその解析手法そのものが確立されたものはなく、そこから検討を行う必要がある。

また、シネ MRI に関しても、子宮にての定量的解析手法は現時点ではなく、その検討も必要であり。T2 値測定も正常子宮内膜の正常値というものは存在せず、撮像手法の妥当性（正しく T2 値が測定されているか、被験者周囲に生理食塩水等の対照物を置く）のみが確認可能であり、その結果の解釈は他の要素との比較検討を行う

(倫理面への配慮)

被験者より得られたデータは全て匿名化し、いわゆるインターネットと接続のない専用の PC 内に保存してあり、解析を行っている。すなわち、将来的には、本研究の結果は個々の事例において益すべき必要性があるが、現時点、すなわち検査方法の確立段階においては、個々の差異よりは共通すべき点を抽出し、かつ統計学的な普遍的なベースラインとしての性格をより有していると思われる、それ以上の意味を持たないため匿名化されたデータで研究遂行上、実際的な支障は来さないものと確信できる。

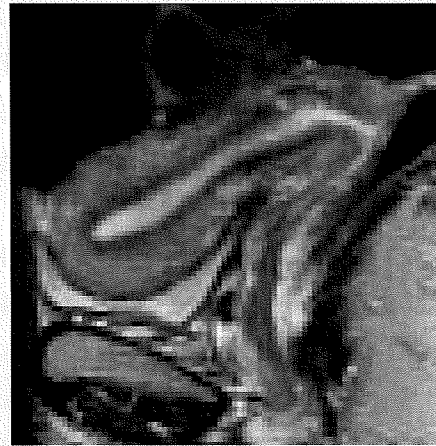
C. 研究結果

1 撮像を考慮された対象群は95名であったが、実際に器質的疾患がなく、研究対象の検討可能な被験者は、昨年度分とあわせ51人であった。子宮の蠕動運動とその後の妊孕能に関して現在、解析中である。

2 研究的撮像手法の各々について

① 子宮全体の三次元ボリューム撮像

子宮内膜、筋層、筋腫（もしあれば）が比較的明瞭に区別できる三次元 T2 強調像の撮像が可能であった。ただし個人差は大きく、このデータから各部分を抽出し、その容積を統計学的に処理するような手法の開発までには至らなかった。



約 1.3×1.3×1.3mm のボクセルサイズで撮像した三次元ボリューム撮像の 1 断面例

② 子宮の連続的時間差撮像、いわゆるシネ MRI 撮像

子宮の矢状断面像のシネ MRI の撮像は可能であり、データの収集は行うことができた。しかしながら、現段階では解析手法の確立にはいたらず、データの評価としては、子宮の蠕動運動を視覚的に評価するのみである。

③ 子宮内膜の T2 値測定

非検者から得られた値に関しては偏差が大きく、本研究の目的に合致するような傾向、意義は現時点では見出せなかった。ある程度の傾向は指摘可能であるかもしれないが、その有用性の議論までは不可能である。

D. 考察

本年度は昨年度に比し、解析対象となりうる症例およびデータの収集がある程度は可能であった。しかしながら、研究遂行の上での施設間の諸事情（例：統一されていない撮像方法等）によるデータの不均一さは第一の反省点であると考えられる。

さて、個々の撮像方法について 限られたデータのみであるが考察する。まず子宮全体の三次元ボリューム撮像であるが、約 1.3×1.3×1.3mm のボクセルサイズで撮像可能であり、画質も良好であったが、臨床用の MRI 装置を使用している都合上、

すべての施設で撮像が可能であるという訳ではない。現在、画像統計解析を目的とした脳の volumetric scan が約 $1 \times 1 \times 1 \text{mm}$ の T1 強調像で撮像されていることを考えると今回の撮像で得られたものも十分高空間分解能といえるが、本年度は、以前にも指摘した正常像の確立の問題の解説に至らず、よってこのデータから何らかの結果を得ることは不可能であった。今後の方針としては、同一被験者を複数回撮像し、その差分上の変化を解析する、あるいは筋腫がある場合に筋腫の子宮全体に対する容積等による検討であれば十分可能であるし、そこから何らかの定量的評価可能な基準が見出しうると確信している。

また、いわゆるシネ MRI 撮像に関しては、既報がいくつか存在しうが単発的であり、今回のわれわれの検討でも蠕動運動の頻度あるいは異常運動（全体的、部分的）なものが妊孕能に関連しているのという結論が限られたデータの範囲でも示されたことは、エビデンスを基とする医療につながる上で本領域における大きな進歩であり今後は解析手法の確立をさらに迅速に行うのを目標とすべきである。

子宮内膜の T2 値測定に関しては、その値そのものでは解釈も解析も困難であり、撮像時の他の条件、すなわち女性ホルモン値等の相関が問題となると思われる、今後は相当数のデータが収集できれば、妊孕能との相関も見出しうると思われるが、上記三次元ボリューム撮像データ同様、“何をもって正常とする” のかが研究遂行の上での焦点となる。

総括として、MRI の新たな撮像手法とその画像の

妥当性に関しては、現時点で問題ないものと考えて、データの収集方法や他の要素との相関に関して、昨年度よりある程度の傾向が描出されてきたとは言え、代表研究者や他の分担研究者とのさらぬる検討が必要である。

E. 結論

本年度においては、データ収集方法としての MRI の撮像方法に確立はほぼなしえたと考える。今後は、統計処理に必要な数の被験者のデータ収集、および得られた画像からの解析手法の確立の研究を推進すべきである。

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

本年度においては、ある程度の症例を収集するに至るも、統計学的に有意であるとは言い難い結果しか得られなかった。次年度以降の研究に関して、正常値あるいは正常像の確立を含めた検討が必要である。

また、negative data の発表に関しては、今後類似の研究を発案あるいは遂行しようとする計画あるいは研究者の阻害になりうるものであると危惧、その影響を考慮し研究発表は遂行されなかった。

課題番号: H20-子ども-若手-011

課題名: 子ども家庭総合研究事業「女性生殖器官における妊孕能の客観的な評価法の確立」

主任研究者: 吉野 修 (東京大学 産婦人科)

分担課題: 子宮内膜評価(腹腔内癒着に関する解析)

分担研究者: 浅田 弘法 (慶應義塾大学医学部産婦人科 専任講師)

(要約) 骨盤内の癒着特に、卵巣と子宮の癒着評価は子宮卵管造影では極めて困難である。卵巣と周辺臓器の癒着を検出するために、cine MRI を用いた骨盤内癒着評価方法の開発を行った。

A. 研究目的

女性の晩婚化と妊娠年齢の上昇により、不妊を主訴とした患者が増加している。不妊の原因は卵巣機能の低下、卵子の質の低下、子宮内膜における着床機能の低下、精子受精能の低下など多岐にわたっている。一方、卵巣周囲や卵管周囲の癒着といった、物理的な障害も不妊症の原因の一部を占めている。これらの物理的な障害因子は、内視鏡などの外科的治療によって改善の見込みもあるため、より精度の高い診断が求められている。また、卵管造影検査は従来より卵管性不妊の検査項目として行われてきたが、油性造影剤の使用により、腹腔内の癒着もある程度診断可能であった。しかし、卵巣・卵管周囲癒着の診断には診断が困難なことが多く、卵管造影以外の非侵襲的癒着検査が求められてきた。

本研究では、cine MRI を用いた卵巣周囲癒着評価を行い、その診断精度について検討することを目的とした。

B. 研究方法

同意を得られた子宮内膜症、子宮筋腫、卵巣嚢腫、卵管留水症などの良性婦人科疾患の患者に対して、通常の MRI 検査に追加して、FIESTA 法による cineMRI を撮影した。撮影画面を 1 人の放射線診断医が読影し、左右卵巣癒着を 5 段階で評価した。読影結果と腹腔鏡下手術時の腹腔内所見を比較検討し、cine MRI の癒着評価の感度、特異度に関して検討を行った。

1. 撮像方法

通常の骨盤 MRI ルーチン画像 (T2 axial, sagittal, T1 axial) に加えて、FIESTA 法にて sagittal, coronal の撮像を行った。1 秒に 1 枚の間隔で経時的撮像を行い、cine 像を作成した。一つの断面に対して、深吸気—呼気—深吸気—呼気で息をとめることを繰り返し、それぞれ 3 枚ずつ、計 12 枚の撮像を行った。この方法で、卵巣、子宮領域を撮像した。

2. 評価方法

撮像画像を 1 名の放射線診断医が読影し、左右卵巣周囲の癒着を 5 段階に評価した (表 1)。その評価の後に、手術時の腹腔内所見と照合し、卵巣周囲癒着診断の感度、特異度を検討した。癒着の強度は MRI による読影結果と rASRM 分類の卵巣周囲癒着のスコアを子宮内膜症以外の患者にも適用することで、両者の関連性を評価した。

C. 研究結果

卵巣周囲癒着の cine MRI による診断は、感度 78%、特異度 80% で検出が可能であった。癒着の重症度に関しても評価を行った。cineMRI にて癒着なしと判断された症例で卵巣周囲癒着は検出されなかった。また、MRI における癒着スコアが高いものほど、rASRM の付属器周囲癒着スコアが高くなる傾向が認められた (図 1)。ことに、MRI

読影により癒着の程度が 4 および 5 と評価された症例には、付属器周囲癒着が強度であり、癒着スコアが 15~20 という症例が含まれていた。

D. 考察

腹腔鏡による腹腔内の診断と cineMRI における腹腔内癒着診断に対して比較検討を行ったが、cine MRI によって、卵巣周囲の癒着の評価が可能であることが示唆された。

腹腔鏡下手術は外科的侵襲であり、合併症の頻度が少なくなってきたとはいえ、一部の症例には発症することがある。その合併症には腹腔内の癒着が起因する臓器損傷(主として消化管損傷、血管損傷など)が多い。今まで腹壁周囲の癒着診断は超音波検査にてもある程度可能であったが、骨盤腔内の術前癒着診断は比較的困難であった。今回施行した方法を定型化し応用することにより、腹腔鏡などの外科的侵襲の施行前に、リスク評価をすることができる可能性がある。

また、不妊症症例に対して腹腔鏡検査を行うかどうか議論があるところであるが、今後の症例検討により、腹腔内癒着評価が非侵襲的に施行可能であれば、cine MRI により、不妊症患者に対する腹腔鏡下手術の適応が判断できる可能性があると考えられた。

E. 結論

cine MRI による卵巣周囲癒着評価方法を確立した。本方法により、腹腔鏡下手術が適応となる不妊症患者を事前に診断できる可能性が示された。

F. 健康危険情報 なし

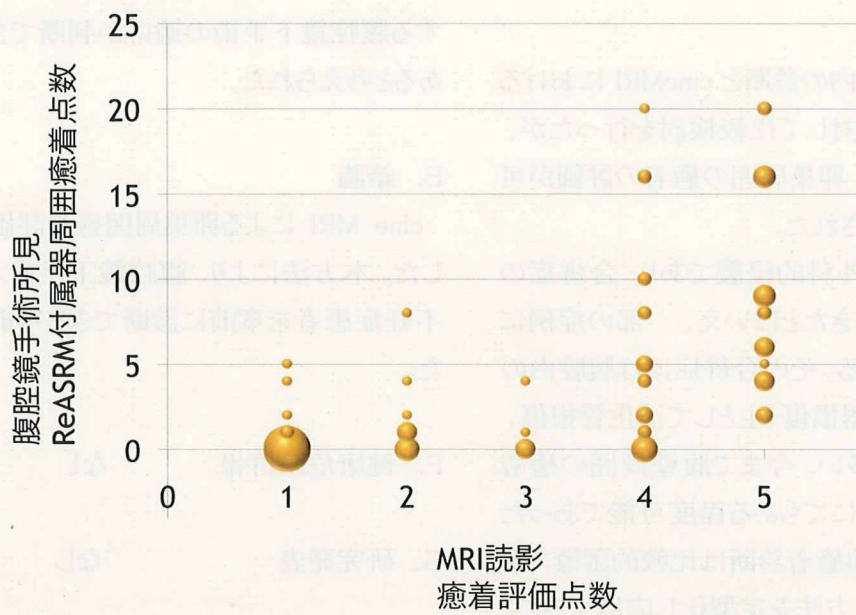
G. 研究発表 なし

知的財産権の出願・登録状況 なし

表 1. 癒着評価スコア

スコア	癒着程度
1	癒着なし
2	癒着の可能性が低い
3	不明
4	癒着の可能性が高い
5	癒着あり

図1. rASRM 付属器癒着スコアと cine MRI 癒着評価



課題番号: H20-子ども-若手-011

課題名: 子ども家庭総合研究事業「女性生殖器における妊孕能の客観的な評価法の確立」

主任研究者: 吉野 修 (東京大学 産婦人科)

分担課題: 子宮内膜

分担研究者: 大須賀 穰 (東京大学産科婦人科教室 講師)

(要約) 子宮内膜は排卵後の分泌期には脱落膜化を起こす

BMP (bone morphogenetic protein) サイトカインに着目し、その発現および卵胞発育における作用についての検討を行った。

A. 研究目的

子宮内膜は胚の着床および胎盤の形成にむけて、排卵後の分泌期には脱落膜化変化を起こすことが知られており、同変化は所謂、子宮内膜の分化と考えられている。一方、胚の着床後、子宮内膜は胎児の発育するためのスペースを確保するために、その体積を増加させるべく増殖しなくてはならない。すなわち、子宮内膜は胚の着床および妊娠の維持のために、分化と増殖を同時に行わなくてはならない。一般的に2つの事象は相反するものと考えられていることから、子宮内膜は特殊な組織と考えられる。子宮内膜の妊娠にむけての上記変化にはエストロゲン、プロゲステロンだけではなく局所因子が関係していることが考えられているが、まだ詳細は分かっていない。我々は細胞の分化および着床に重要な因子であるサイトカイン BMP-7 (bone morphogenetic protein-7)に着目し、子宮内膜での発現およびその機能に関して検討を行った。

B. 研究方法

患者の同意のもと、検体を採取し以下の実験を行った。

実験1) BMP-7のヒト子宮内膜における発現の変化 (in vivo)

子宮筋腫や子宮外妊娠手術時に得られたヒト子宮内膜(N=26)および脱落膜(N=5)を用い、BMP-7

mRNA の各月経周期および妊娠時の発現を real time PCR を用いて検討した。

実験2) ヒト子宮内膜間質細胞 (normal endometrial stromal cell: NES) における BMP-7 mRNA 発現変化

NES 培養系にエストロゲン (10 ng/ml) もしくはプロゲステロン (100 ng/ml) を添加し、BMP-7 mRNA の発現を検討した。

実験3) BMP-7の分化に関する作用

長期間のエストロゲンおよびプロゲステロにより NES は脱落膜化することが知られている。同培養系にリコンビナント BMP-7 (R&D 社製 10-100 ng/ml)を添加し、NES の分化マーカーである培養上清中 IGFBP-1 濃度を ELISA にて測定した。

実験4) BMP-7の細胞増殖に関する作用-

NES 培養系に BMP-7(10-100 ng/ml)を添加し、細胞増殖にあたる影響につき BrdU 法を用いて検討した。

C. 結果

実験1) BMP-7のヒト子宮内膜における発現の変化 (in vivo)

図1にヒトの各月経周期、脱落膜における BMP-7 発現の変化を示す。BMP-7 の発現量は増殖期で多く、分泌期および脱落膜では有意に減少した。

実験2) ヒト子宮内膜間質細胞 (normal

endometrial stromal cell: NES) における BMP-7 mRNA 発現変化

ヒト子宮内膜間質細胞ではプロゲステロンにより添加6時間後からBMP 7が減少した。24時間後には約45%まで減少する。エストロゲン添加による減少は認めなかった。(図2)

実験3) BMP-7の分化に関する作用

NESにエストロゲン、プロゲステロンを添加することで、子宮内膜の脱落膜化マーカーであるIGFBP-1が培養6日以降では誘導される。同実験系にBMP-7を添加したところ、BMP-7の濃度依存性にIGFBP-1の産生が抑制された(図3)。

実験4) BMP-7の細胞増殖に関する作用

NES培養系にBMP-7(10-100 ng/ml)を添加し、細胞増殖にあたる影響につきBrdU法を用いて検討したところ、BMP-7 10 ng/ml添加にて80%に、100 ng/ml添加にて70%に抑制された

H. 考察

子宮内膜は胚の着床および妊娠の維持のために、分化と増殖を同時に行わなくてはならない。一般的に2つの事象は相反するものと考えられていることから、子宮内膜は特殊な組織と考えられる。我々はBMP-7 (bone morphogenetic protein-7)に着目し、子宮内膜での発現およびその機能に関して検討を行った。In vitroの実験系においてBMP-7は子宮内膜細胞の増殖抑制および分化の抑制作用を有することを見出した(実験3、4)。In vivoの検討において、分泌期および脱落膜ではBMP-7の子宮内膜での発現が減少を認めた。すなわち、子宮内膜は胚の受け入れおよび妊娠の維持のために、子宮内膜の増殖および分化の抑制因子であるBMP-7を減少させることで、相対的に子宮内膜の増殖および分化を誘導していることが想定された。また、BMP-7の

減少は排卵後より卵巣から分泌されるプロゲステロンにより制御を受けていることが分かった。子宮内膜は妊娠にむけて、卵巣より分泌されるエストロゲン、プロゲステロンにより制御を受けていることが知られているが、今回の検討において、より下流の制御機構について明らかにすることができた。

E. 結論

子宮内膜の分化および増殖の制御機構にBMPサイトカインファミリーが関与していることを見出した。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

<論文発表>

- 1: Kodama A, Yoshino O, Osuga Y, Harada M, Hasegawa A, Hamasaki K, Takamura M, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Takemura Y, Yano T, Taketani Y. Progesterone decreases bone morphogenetic protein (BMP) 7 expression and BMP7 inhibits decidualization and proliferation in endometrial stromal cells. Hum Reprod. 2010 Mar;25(3):751-6.
- 2: Wada-Hiraike O, Yamamoto N, Osuga Y, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. Aberrant implantation and growth of uterine leiomyoma in the abdominal wall after laparoscopically assisted myomectomy. Fertil Steril. 2009 Nov;92(5):1747.e13-5.

3: Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yano T, Nishii O, Taketani Y.

Bone morphogenetic protein-6 stimulates gene expression of follicle-stimulating hormone receptor, inhibin/activin beta subunits, and anti-Müllerian hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril.* 2009 Nov;92(5):1794-8.

4: Koga K, Hiroi H, Osuga Y, Nagai M, Yano T, Taketani Y. Autoamputated adnexa presents as a peritoneal loose body. *Fertil Steril.* 2010 Feb;93(3):967-8.

5: Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Nishii O, Yano T, Taketani Y. Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) increases the expression of follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in human granulosa cells.

Fertil Steril. 2010 Mar 1;93(4):1273-9.

6: Koizumi M, Momoeda M, Hiroi H, Hosokawa Y, Tsutsumi R, Osuga Y, Yano T, Taketani Y. Expression and regulation of cholesterol sulfotransferase (SULT2B1b) in human endometrium.

Fertil Steril. 2010 Mar 15;93(5):1538-44.

7: Hasegawa A, Yoshino O, Osuga Y, Kodama A, Takamura M, Nishii O, Taketani Y. Hyaluronic acid reagent suppressed endometriotic lesion formation in a mouse model. *Fertil Steril.* 2010 Mar 30.

I. 知的財産権の出願・登録状況 なし

図1 各月経周期 (E:前期 M:中期 L:後期 P:増殖期 S:分泌期) および decidua (脱落膜) におけるヒト子宮内膜 BMP-7m RNA の発現

BMP-7 mRNA の子宮内膜における発現は、MS: 中期分泌期、LS: 後期分泌期、および decidua: 脱落膜で減少していた。

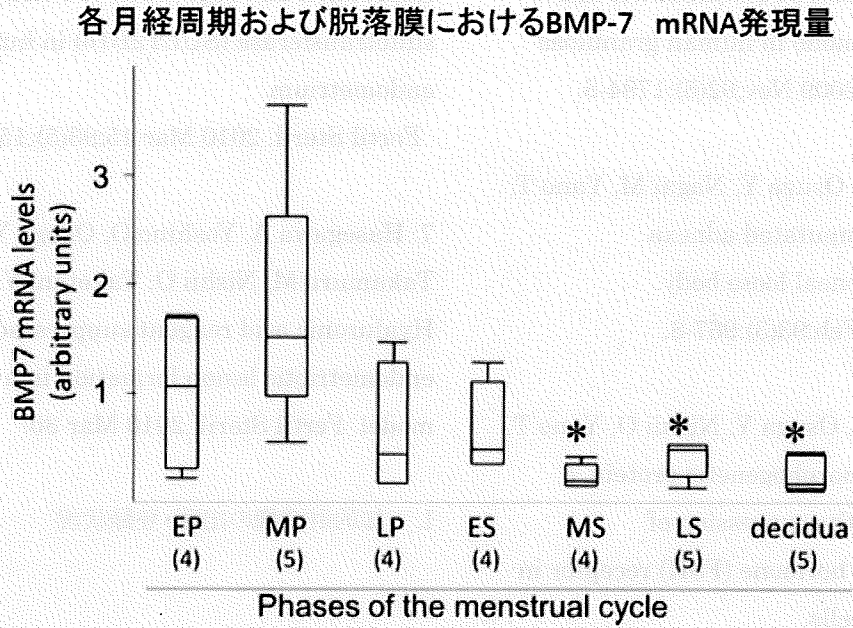


図2 子宮内膜間質細胞(NES)に estradiol もしくは progesterone を添加し、BMP-7 mRNA 発現を検討した。

Progesterone 添加により BMP-7 の発現は減少したが、estradiol 刺激では変化が見られなかった。

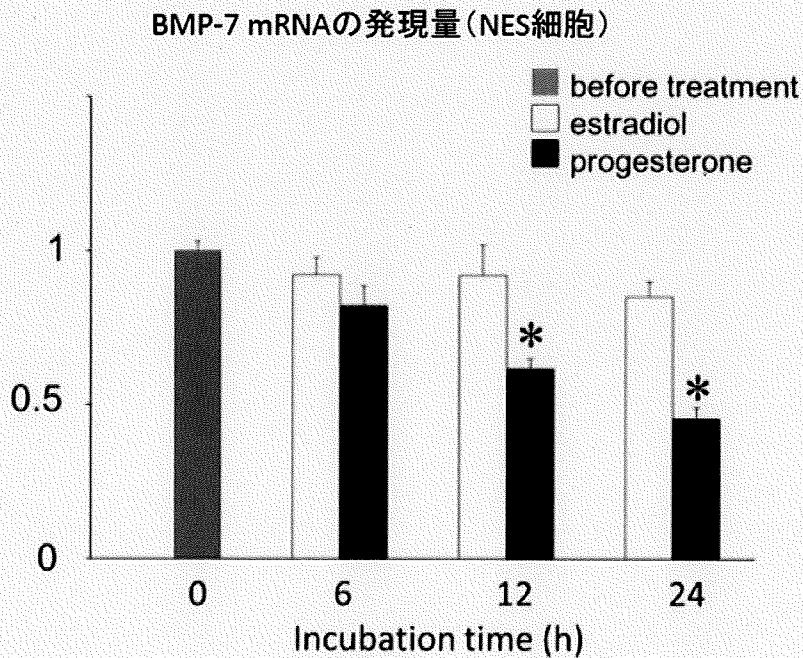
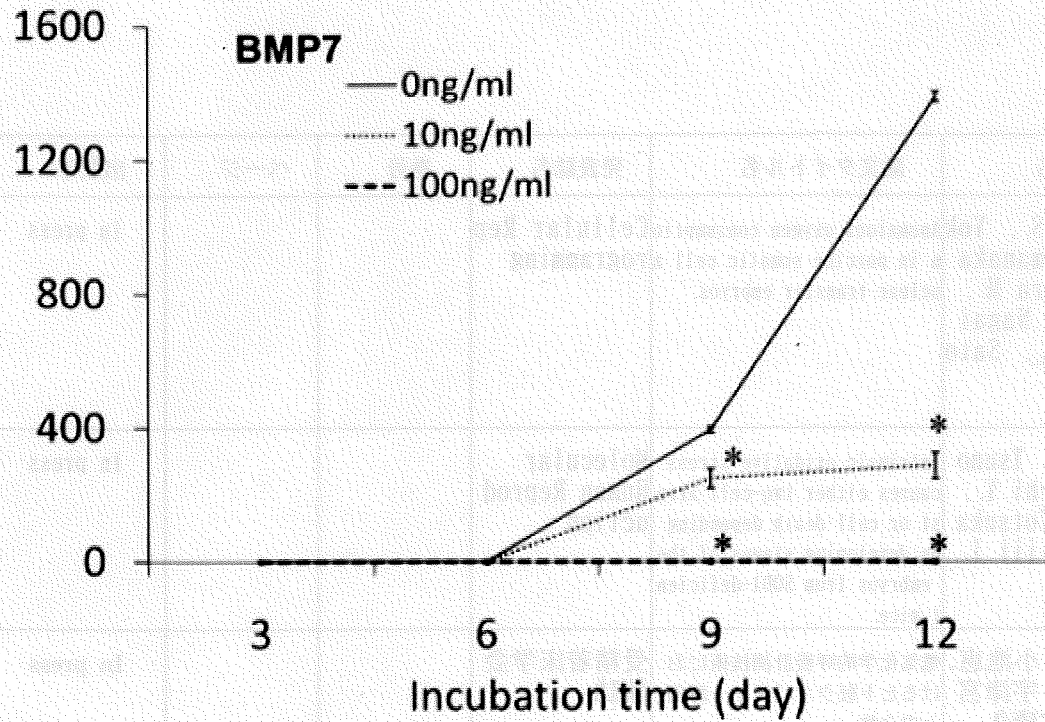


図3 子宮内膜間質細胞をエストロゲンおよびプロゲステロン存在下で培養すると脱落膜化が誘導され、IGFBP-1濃度が上昇する（実線）。そこに BMP-7 を添加すると濃度依存性に IGFBP-1 濃度が減少した。

脱落膜化マーカーIGFBP-1の培養上清中濃度



III. 主な研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
阿部宏之	胚の機能検定法	鈴木秋悦	カラーアトラス 不妊治療のための卵子学	医歯薬出版		2010	127-131

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sugimura S., Yokoo M., Yamanaka K., Kawahara M., Wakai T., Nagai T., <u>Abe H.</u> , Sato E.	Anomalous oxygen consumption in porcine somatic cell nuclear transfer embryos.	Cellular Reprogramming			In press
Kimura N., Tsunoda T., Iuchi Y., <u>Abe H.</u> , Totsukawa K., Fujiii J.	Intrinsic oxidative stress causes either two-cell arrest or cell death depending on developing stages of the embryos from SOD1-deficient mice.	Molecular Human Reproduction			In press
後藤香里、小池恵、熊迫陽子、宇津宮隆史、荒木康久、 <u>阿部宏之</u>	電気化学的呼吸計測技術におけるヒト胚クオリティー評価と安全性	受精着床学会雑誌			In press
Sakagami N., Yamamoto T., Akiyama K., Nakazawa Y., Kojima N., Nishida K., Yokomizo S., Takagi Y., <u>Abe H.</u> , Suzuki C., Yoshioka K.	Viability of porcine embryos after vitrification using water-soluble pullulan films.	J. Reprod. Dev.			In press
Yamashiro H., Toyomizu M., Kikusato M., Toyama N., Sugimura S., Hoshino Y., <u>Abe H.</u> , Moisyadi S., Sato E.	Lactate and adenosine triphosphate in extender enhance the cryosurvival of rat epididymal sperm.	J. Am. Assoc. C. Lab. Anim. Sci.	49	160-166	2010
Kyono K., Nakajima Y., Nishinaka C., Hattori H., Kyoya T., Ishikawa T., <u>Abe H.</u> , Araki Y.	A birth from the transfer of a single vitrified-warmed blastocyst using ICSI with calcium ionophore oocyte activation in a globozoospermic patient.	Fertil. Steril.	91	e7-e11	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shiku H., Yamakawa T., Nashimoto Y., Takahashi Y., Torisawa Y., Yasukawa T., Ito-Sasaki T., Yokoo M., <u>Abe H.</u> , Kambara H., Matsue T.	A microfluidic dual capillary probe to collect messenger RNA from adherent cells and spheroids.	Anal. Biochem	385	138-142	2009
Murakawa H., Aono N., Tanaka T., Kikuchi H., Yoshida H., Yoshida H., Yokoo M., <u>Abe H.</u>	Morphological evaluation and measurement of the respiration activity of cumulus-oocyte complexes to assess oocyte quality.	J. Mamm. Ova Res.	26	32-41	2009
Hasegawa A, Yoshino O, Osuga Y, Kodama A, Takamura M, Nishii O, Taketani Y.	Hyaluronic acid reagent suppressed endometriotic lesion formation in a mouse model.	Fertil Steril.			In press
Kodama A, Yoshino O, Osuga Y et al.	Progesterone decreases bone morphogenetic protein (BMP) 7 expression and BMP7 inhibits decidualization and proliferation in endometrial stromal cells.	Hum Reprod	25	751-6	2010
Takamura M, Koga K, Osuga Y, Takamura Y, Hamasaki K, Hirota Y, Yoshino O, Taketani Y.	Post-operative oral contraceptive use reduces the risk of ovarian endometrioma recurrence after laparoscopic excision.	Hum Reprod	24	3042-8	2009
Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yano T, Nishii O, Taketani Y.	Bone morphogenetic protein-6 stimulates gene expression of follicle-stimulating hormone receptor, inhibin/activin beta subunits, and anti-Müllerian hormone in human granulosa cells.	Fertil Steril.	92	1794-8	2009
Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Nishii O, Yano T, Taketani Y.	Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) increases the expression of follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in human granulosa cells.	Fertil Steril.	93	1273-9	2010
Orisaka M, Jiang JY, Orisaka S, <u>Kotsuji F.</u> , Tsang BK.	Growth differentiation factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis.	Endocrinology.	150	2740-8	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F.	Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development.	J Ovarian Re	2	9-	2009
Fukuda S, Orisaka M, Tajima K, Hattori K, Kotsuji F.	Luteinizing hormone-induced Akt phosphorylation and androgen production are modulated by MAP Kinase in bovine theca cells.	J Ovarian Re	2	17-	2009
Kobayashi N, Orisaka M, Cao M, Kotsuji F. , Leader A, Sakuragi N, Tsang BK.	Growth differentiation factor-9 mediates follicle-stimulating hormone-thyroid hormone interaction in the regulation of rat preantral follicular development model.	Endocrinology.	150	5566-74	2009
Toyoda M, Hamatani T, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A.	Chip to analyze cell identity in Reproductive and Regenerative Medicine.	Current Medicinal Chemistry			In press
Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kueji N, Yoshimura Y, Umezawa A.	Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development.	Human Molecular Genetics	19	480-493	2010
Wada-Hiraike O, Yamamoto N, Osuga Y, Yano T, Kozuma S, Taketani Y.	Aberrant implantation and growth of uterine leiomyoma in the abdominal wall after laparoscopically assisted myomectomy.	Fertil Steril.	92	1747 e 13-5	2009
Koga K, Hiroi H, Osuga Y, Nagai M, Yano T, Taketani Y.	Autoamputated adnexa presents as a peritoneal loose body.	Fertil Steril.	93	967-8	2010
Koizumi M, Momoeda M, Hiroi H, Hosokawa Y, Tsutsumi R, Osuga Y, Yano T, Taketani Y.	Expression and regulation of cholesterol sulfotransferase (SULT2B1b) in human endometrium.	Fertil Steril.	93	1538-44	2010

Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein *Hmgpi* in early embryonic development

Mitsutoshi Yamada^{1,2}, Toshio Hamatani^{1,*}, Hidenori Akutsu², Nana Chikazawa^{1,2}, Naoaki Kuji¹, Yasunori Yoshimura¹ and Akihiro Umezawa²

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi Shinjyuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan and ²Department of Reproductive Biology, National Research Institute for Child Health and Development, 2-10-1 Ohkura Setagaya-ku, Tokyo 157-8535, Japan

Received August 24, 2009; Revised October 22, 2009; Accepted November 11, 2009

Mining gene-expression-profiling data identified a novel gene that is specifically expressed in preimplantation embryos. *Hmgpi*, a putative chromosomal protein with two high-mobility-group boxes, is zygotically transcribed during zygotic genome activation, but is not transcribed postimplantation. The *Hmgpi*-encoded protein (HMGPI), first detected at the 4-cell stage, remains highly expressed in pre-implantation embryos. Interestingly, HMGPI is expressed in both the inner cell mass (ICM) and the trophectoderm, and translocated from cytoplasm to nuclei at the blastocyst stage, indicating differential spatial requirements before and after the blastocyst stage. siRNA (siHmgpi)-induced reduction of *Hmgpi* transcript levels caused developmental loss of preimplantation embryos and implantation failures. Furthermore, reduction of *Hmgpi* prevented blastocyst outgrowth leading to generation of embryonic stem cells. The siHmgpi-injected embryos also lost ICM and trophectoderm integrity, demarcated by reduced expressions of Oct4, Nanog and Cdx2. The findings implicated an important role for *Hmgpi* at the earliest stages of mammalian embryonic development.

INTRODUCTION

Preimplantation development encompasses the period from fertilization to implantation. Oocytes cease developing at metaphase of the second meiotic division, when transcription stops and translation is reduced. After fertilization, sperm chromatin is reprogrammed into a functional pronucleus and zygotic genome activation (ZGA) begins, whereby the maternal genetic program governed by maternally stored RNAs and proteins must be switched to the embryonic genetic program governed by *de novo* transcription (1,2). Our previous gene expression profiling during preimplantation development revealed distinctive patterns of maternal RNA degradation and embryonic gene activation, including two major transient 'waves of *de novo* transcription' (3). The first wave during the 1- to 2-cell stage corresponds to ZGA. The second wave during the 4- to 8-cell stage, known as

mid-preimplantation gene activation (MGA), induces dramatic morphological changes to the zygote including compaction and blastocoele formation, particularly given that few genes show large expression changes after the 8-cell stage. ZGA and MGA together generate a novel gene expression profile that delineates the totipotent state of each blastomere at the cleavage stage of embryogenesis, and these steps are prerequisite for future cell lineage commitments and differentiation. The first such differentiation gives rise to the inner cell mass (ICM), from which embryonic stem (ES) cells are derived, as well as the trophectoderm at the blastocyst stage. However, the molecular regulatory mechanisms underlying this preimplantation development and ES-cell generation from the ICM remain unclear.

Induced pluripotent stem (iPS) cells are ES cell-like pluripotent cells, generated by the forced expression of defined factors in somatic cells, including Pou5f1/Oct4, Sox2, Klf4

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +81 353633819; Fax: +81 332261667; Email: t-hama@sc.itc.keio.ac.jp