

# ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化ならびに 老化モデルの作製

田中進・麩谷健介・吉田南海香・澤近美彩

Decidualization of the human endometrial stromal cells and aging models

Susumu TANAKA, Kensuke FUTANI, Namika YOSHIDA and  
Misa SAWACHIKA

## 要 旨

ヒトにおいて胚が着床するためには、子宮内膜に含まれる間質細胞が着床に先んじて脱落膜化する必要がある。実験動物においては胚着床後のみ脱落膜化が開始されるため、ヒトの脱落膜化の研究を行う際に実験動物は適さない。そのため、脱落膜化の研究はヒト子宮内膜組織より単離された初代培養ヒト子宮内膜間質細胞を用いて研究が行われてきた。本研究ではヒト子宮内膜間質細胞株である KC02-44D 細胞に対して細胞膜透過性の 8-Bromo-cAMP を用いることで脱落膜化に要する時間を短縮したモデルを作製し、その後の脱分化も確認した。さらに酸化ストレスによる老化モデルを作製した。老化モデルでは脱落膜化マーカーの発現に変化は生じなかった。一方で、老化モデルは炎症性サイトカインを含む細胞老化関連分泌形質の産生・分泌が亢進しており、分泌された細胞老化関連分泌形質が周りの細胞の脱落膜化や胚着床に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

キーワード：子宮内膜、脱落膜化、cAMP、老化

---

所属：

長崎県立大学看護栄養学部栄養健康学科

Department of Nutrition Science, Faculty of Nursing and Nutrition, University of Nagasaki, Siebold

## I 背景と目的

ヒト子宮内膜は月経後の約2週間、排卵までの時期に、卵胞からのエストロゲン (E<sub>2</sub>) の影響を受け、機能層は厚くなる<sup>1)</sup>。排卵後、約2日で黄体が形成され、黄体からのプロゲステロン (P4) の分泌が開始される。その影響を受けて子宮内膜では子宮腺上皮が発達するとともに活発に分泌活動を行うようになる。この時、P4が子宮内膜の間質にも働きかけることで子宮内膜は胚受容のための「脱落膜化」という分化を起こす。この脱落膜化は主に子宮内膜に含まれる間質細胞 (Endometrial Stromal cells, EnSC) で起こり、核の拡大、核小体の増加、細胞質内での脂肪滴やグリコゲンの蓄積、膜境界に存在する分泌顆粒、ゴルジ体と肥大化した粗面小胞体、さらに線維芽細胞様から上皮細胞様への形態学的な変化が見られる<sup>2,3)</sup>。妊娠が成立しない場合は、分泌期が10~12日間続いた後、子宮内膜は月経を起こす。月経により、子宮内膜の機能層が剥がれ落ち基底層が残存する。この一連のサイクルを月経周期と呼び、通常約28日間である。

黄体からのP4分泌が開始された後、ヒト子宮内膜でのcAMPレベルの上昇が観察される。単離したヒトEnSCにおいてもP4に反応して細胞内のcAMPレベルが上昇することから、これは主にEnSCでのcAMPの上昇を見ているものと考えられる<sup>4)</sup>。P4反応後にEnSCの細胞内で上昇が観察されるcAMPはcAMP依存性プロテインキナーゼの活性化を介してcAMP応答配列結合タンパク質 (cAMP responsive element binding protein, CREB) をリン酸化させる<sup>5)</sup>。このリン酸化されたCREBがCREB結合タンパク質と結合することで脱落膜化のマスターレギュレーターであるforkhead box O1 (FOXO1) やheart and neural crest derivatives expressed 2 (HAND2) 等の転写制御因子群を活性化し<sup>6)</sup>、その結果として、Insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP1)、プロラクチン (PRL)、ならびにinterleukin 15 (IL15) の産生が起こる<sup>7,8)</sup>。

脱落膜化の結果、EnSCはIGFBP1によって胎盤形成を司る絨毛外栄養膜細胞 (Extravillous trophoblast, EVT) の遊走を制御し、PRLを分泌することで胎児や胎盤に酸素や栄養素を供給するらせん動脈のリモデリングを行う。さらに

はIL15分泌による子宮ナチュラルキラー細胞の量や分布の制御を行い、本来異物と認識される受精卵や生育した胚への攻撃を弱める免疫寛容を制御する。それらの結果として、EnSCは胚の着床、胎盤の成長、ならびに妊娠の維持を制御する。脱落膜化に異常が生じると着床障害や流産、妊娠高血圧腎症、胎児発育不全、癒着胎盤などが起こるため、胎児の正常な発育においてEnSCの脱落膜化は非常に重要である<sup>9)</sup>。

ヒトでは着床に先立ちEnSCの脱落膜化が起こる (すなわち脱落膜化に胚着床を必要としない) のに対し、実験動物 (ラット、マウス、その他の哺乳類) では胚着床後のみ脱落膜化が開始されるという大きな違いがあり、ヒトの脱落膜化の研究を行う際に実験動物は適さない<sup>10,11)</sup>。これらのことから、ヒト子宮内膜の脱落膜化の研究は、ヒト子宮内膜組織より単離された初代培養ヒトEnSCを用いて研究が行われてきた<sup>9)</sup>。しかしながら、初代培養ヒトEnSCを脱落膜化させるためには生体内同様、約2週間のP4による刺激が必要であり時間を要する<sup>12,13)</sup>。さらに、患者由来であるため、年齢、経験月経回数の違い、月経周期中での採取時期の違い等、その反応性に個人差があるといった問題点も含んでいる。

そこで本研究の第一目標として①脱落膜化に要する時間の短縮と②患者個人々のバックグラウンドの違いによる差の2点を克服するため、P4刺激後に上昇し脱落膜化を促進させる細胞内cAMPの上昇に着目し、さらに樹立されたヒトEnSC株KC02-44D<sup>14)</sup>を用いることで、問題点を克服した脱落膜化モデルの作製を試みた。

一方、元来、妊孕性低下のほとんどは受精卵が原因と考えられてきたが、体外受精時の着床前胚染色体異数性検査の導入によるデータの蓄積が大きな要因となり、現在では着床不全の約3分の1以上は母体子宮内膜の受容性 (すなわち適切な子宮内膜の脱落膜化) が不十分なことが原因であることが明らかとなっており<sup>15)</sup>、「子宮内膜由来の着床不全の解明」が、産科学・婦人科学領域における喫緊の問題となっている。近年、月経を重ねるごとに子宮内膜の基底層に老化EnSCが残存すること、ならびにそれらと脱落膜化の障害との関係が示されている。老化EnSCと子宮内膜可塑性の低下、流産等への関与<sup>16)</sup>、着床不全への先行<sup>17)</sup>、ならびに着床不全との関連も示唆された<sup>18)</sup>。ただし、老化EnSCの子宮内膜機能への

影響は、依然として包括的な理解がなされていない。そこで第二目標として、作製した脱落膜化モデル細胞を用いて、産婦人科領域の喫緊の問題である EnSC の老化モデルの作製を試みた。

## II 材料と方法

### 細胞培養

ヒト EnSC 細胞株 KC02-44D<sup>14)</sup> を ATCC (Manassas, VA) から購入した。DMEM (4.5 g/L D-Glucose, L-Glutamine, phenol red 含有) (Life Technologies, NY, USA) に 10% fetal bovine serum (FBS)、ならびに 10 mM HEPES (Life Technologies) を加えた培地 (DMEM-FBS) にて、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C、5% CO<sub>2</sub>) 内で 100 mm dish に コンフルエント (8.8 × 10<sup>6</sup> cells) になるまで 3 日おきに培地を交換しながら培養した。コンフルエントになった細胞は実験に応じて 12 well プレートへ 1 well あたり 0.1 × 10<sup>6</sup> cells を継代した。

### 8-Bromo-cAMP による脱落膜化誘導

播種後の KC02-44D 細胞がコンフルエントになった後、培地を DMEM (4.5 g/L D-Glucose 含有, phenol red 不含: phenol red に E<sub>2</sub> 様作用が知られるため) に 10% Charcoal stripped (CS)-FBS (活性炭を用いることで血清中に含まれるホルモンを吸着・除去する)、10 mM HEPES (Life Technologies) ならびに 1% GlutaMAX を加えた培地 (DMEM/CS-FBS) に変更した。そこに E<sub>2</sub> (10<sup>-8</sup> M)、P4 アナログである酢酸メドロキシプロゲステロン (MPA) (10<sup>-6</sup> M)、ならびに細胞内の cAMP を人為的に上昇させるための膜透過性のある cAMP アナログ (8-Bromo-cAMP)<sup>19)</sup> を添加した。培地交換は 3 日おきに行った。6 日間の E<sub>2</sub> と MPA 刺激の際に 0、150、500 μM の 8-Bromo-cAMP を加えることで脱落膜化が起こるかを検討した。脱落膜化への cAMP の適性濃度 (500 μM) を得たのち、条件群として以下の 6 群を用意した; グループ 1: 6 日間の DMEM/CS-FBS 培地での培養群、グループ 2: 6 日間の E<sub>2</sub> と MPA のみでの刺激群、グループ 3: 6 日間の E<sub>2</sub>、MPA、ならびに 500 μM 8-Bromo-cAMP 刺激群、グループ 4: 12 日間の DMEM/CS-FBS 培地での培養群、グループ 5: 12 日間の E<sub>2</sub> と MPA のみでの刺激群、グ

ループ 6: 12 日間の E<sub>2</sub>、MPA、ならびに 500 μM 8-Bromo-cAMP 刺激群。グループ 3 の処理にて脱落膜化マーカーの有意な上昇が確認できたことから、これから後はグループ 3 の処理を脱落膜化処理と呼ぶ。

### 細胞の DAPI 染色と画像処理方法

6 well プレートに滅菌したカバーガラスを敷き、そこに細胞を播種した。細胞は 6 日間の未処理コントロール群と脱落膜化処理群とした。6 日後、培養した細胞を PBS で洗浄した後、ホルムアルデヒド溶液で室温 10 分固定し、メタノール 4°C で 5 分間細胞膜の透水処理を行った。その後、DAPI-Fluoromount-G で封入を行い、核を DAPI で染色した。染色像は LSM700 共焦点レーザー顕微鏡 (カール・ツァイス社, Baden-Württemberg, Germany) で取り込み、未処理群 198 cells、脱落膜化処理群 44 cells の細胞の核の大きさを計測した。画像処理・計測は ImageJ を用いて行った。

### ウェスタンブロッティング法

コントロールならびに脱落膜化処理後の KC02-44D 細胞 (各 8.8 × 10<sup>6</sup> cells) を処置し、10 μg の RIPA 可溶性画分を SDS-PAGE した後、Clear Blot P+ メンブレン (ATTO, Tokyo, Japan) に転写した。転写後のメンブレンを 0.1% Tween-20 を含む TBS (TBS-T) で軽く洗浄した後、Blocking One (ナカライテスク) で 1 時間室温ブロッキングした。ブロッキング後、一次抗体反応液 (1/1,000 FoxO1 (C29H4) Rabbit mAb #2880 (CST, MS, USA) in TBS-T with 5% Blocking One) 中にて 4°C で一晩インキュベートした。次の日に TBS-T で 5 分 3 回洗浄後、二次抗体反応には、1/3,000 HRP Horse Anti-Rabbit IgG Antibody (VECTOR, PI-1000) in TBS-T with 5% Blocking One にて室温 1 時間反応させた。TBS-T で 5 分 3 回洗浄後、Chemi-Lumi One L (ナカライテスク) を加えて LAS4000 を用いてタンパクバンドを可視化した。バンドの定量は ImageJ を用い、FOXO1 のタンパク量は ACTB タンパク量を内部標準として補正した。ACTB の検出には 1/10,000 モノクロナール抗 β-アクチン マウス宿主抗体 (MERCK, A2228) と 1/3,000 Anti-IgG (H + L)、Mouse、Horse-Poly、HRP (VECTOR, PI-2000) を使用した。

### 残存 EnSC モデル作製

月経後も実際の子宮内膜に残存した EnSC は、血中 P4 の消失後に脱落膜化が解かれ PRL や IGFBP1 の発現が低下しその後再び次のサイクルで脱落膜化するのか、それとも一旦脱落膜化した EnSC は戻ることはなく脱落膜化し続けることで周りに影響を及ぼしてしまうのか、を今回作製したモデルで検討した。12 日間の未処理群、12 日

間の脱落膜化処理群、ならびに 6 日間の脱落膜化処理後に 6 日間の未処理群を用意した。

### Total RNA の抽出 - 逆転写反応 - 定量 PCR

各処理が終わった細胞 ( $0.4 \times 10^6$  KC02-44D cells/well in 12 well plate) から Sepasol®-RNA I Super G (ナカライテスク) を用いて total RNA を抽出した。得られた RNA サンプル

表 1. 使用した Primer 一覧

Gene	Primer		
Symbol	Definition	Name	Sequence (5' - 3')
HPRT1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1	895F	CTAGTTCTGTGGCCATCTGCTTAG
		1034R	GGGAACTGATAGTCTATAGGCTCATAGTG
IGFBP1	Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1	636F	CTATGATGGCTCGAAGGCTC
		791R	TTCTTGTTGCAGTTTGGCAG
PRL	Prolactin	374F	ATTCGATAAACGGTATAACCCATGGC
		623R	TTGCTCCTCAATCTCTACAGCTTTG
HAND2	Heart and Neural Crest Derivatives expressed 2	1479F	AGAGGAAGAAGGAGCTGAACGA
		1552R	CGTCCGGCCTTTGGTTTT
IL15	Interleukin 15	165F	GTTACCCCCAGTTGCAAAGT
		351R	CCTCCAGTTCCTCACATTC
B2M	Beta 2 Microglobulin	226F	GAAGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAG
		321R	GTAGTACAAGAGATAGAAAGACCACTCC
EF1A	Elongation Factor 1 alpha	643F	TCTGGTTGGAATGGTGACAACATGC
		971R	AGAGCTTCACTCAAAGCTTCATGG
BCL2L1	BCL 2 Like protein 1	665F	ACGAGTTTGAAGTCCGGTAC
		793R	CTGCTGCATTGTTCCCATAGAG
NQO1	NADPH dehydrogenase quinone 1	545F	AAGGCAGTGCTTCCATCAC
		669R	TGGAAGCCACAGAAATGCAG
HMOX	Heme Oxygenase	1373F	TGTTGGAGCCACTCTGTTCC
		1472R	ACGCATGGCTCAAAAACCAC
SOD1	Superoxide Dismutase 1	322F	TTGGAGACTTGGCAATGTG
		467R	ACCTTTGCCCAAGTCATCTG
NRF2	Nuclear factor erythroid 2 Related Factor 2	1228F	CAGGACATTGAGCAAGTTTGGG
		1342R	GTTTGGCTTCTGGACTTGAAC
KEAP1	Kelch like ECH Associated Protein 1	745F	ACATGCATTTTGGGGAGGTG
		885R	ACTTGACCCAGTTGATGCAG
GSR	Glutathione Reductase	1169F	AATAGCTGCTGGCCGAAAAC
		1305R	TGGCTTCATCTCCGTGAGTC
IL1B	Interleukin 1 beta	162F	AGCTGATGGCCCTAAACAGATG
		305R	TTGTCCATGGCCACAACAAC
SERPINE1	Serpine family E member 1	577F	GCAAGTGGACTTTTCAGAGGTG
		676R	TCCTTTCCCAAGCAAGTTGC
SCARA5	Scavenger Receptor class A member 5	629F	ACCTGCTGGTCTCCTGATTC
		738R	ATTCAGCCGGTTCACATTGC
CLU	Clusterin	264F	AAACGAAGAGCGCAAGACAC
		397R	CCATCATGGTCTCATTGCACAC

を cDNA とするため、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡, OSAKA, JAPAN) を用いて逆転写反応を行った。作製した cDNA サンプルを用いて、脱落膜化マーカー等の発現変化を見るため定量 PCR を行った。Thunderbird SYBR qPCR mix (東洋紡) に 5pmol の Forward Primer、5pmol の Reverse Primer (表 1)、cDNA サンプル、ならびに純水を加え、LightCycler96 (Roche Diagnostics KK, Tokyo, Japan) を用いて定量 PCR を行った。PCR 条件は preincubation (95°C, 30 秒) 後、2 step Amplification (95°C, 5 秒 → 60°C, 30 秒) を 45 サイクル繰り返し、さらに primer の特異性の確認として melting 反応 (95°C, 10 秒 → 65°C, 60 秒 → 97°C, 1 秒) を行った。各サンプルから得られた各遺伝子の相対値を ddct 法にて求めた。その際、hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) を内部標準として使用した。

#### 酸化ストレスによる老化促進

<条件 1>既報<sup>20)</sup>に従い、コンフルエントとなった KC02-44D 細胞 ( $4 \times 10^4$  KC02-44D cells/well in 96 well plate) に対して、DMEM に 200  $\mu$ M 過酸化水素  $H_2O_2$  を加え 37°C、5%  $CO_2$  で 2 時間インキュベートした後、PBS で洗浄した。その後、コントロールは DMEM・CS-FBS で、脱落膜化処理群は DMEM/CS-FBS に  $10^8$  M  $E_2$ 、 $10^6$  M MPA ならびに 500  $\mu$ M cAMP を加えて培養を継続した。その後、3 日おきと同じ培地に交換しながら 6 日間培養した。6 日後、Cellular Senescence Plate Assay Kit - SPiDER-  $\beta$  Gal (同仁化学, Kumamoto, Japan) を用いて老化度を測定した。測定には 2030 Multilabel Reader ARVO X4 (PerkinElmer inc., US-MA, 励起波長 535 nm, 発光波長 580 nm) を使用し  $\beta$ -galactosidase 活性を測定した。

<条件 2>細胞死が起こらず老化へ進行する条件を検討するため、条件 1 同様に PBS で洗浄後、0、50、100、ならびに 200  $\mu$ M  $H_2O_2$  をそれぞれ培地に加え 37°C、5%  $CO_2$  で 24 時間インキュベートした。その後、コントロールは DMEM/CS-FBS で、脱落膜化処理群は DMEM/CS-FBS に  $10^8$  M  $E_2$ 、 $10^6$  M MPA ならびに 500  $\mu$ M cAMP を加えて 3 日おきと同じ培地に交換しながら 6 日間培養を継続した。処置の終わった

細胞から total RNA 抽出、逆転写を行い、定量 PCR に供した。

#### 統計解析

統計解析は IBM SPSS Statistics ver. 29.0 (IBM Corp., NY, USA) を用いて行った。Shapiro-Wilk の検定を用いて正規性を見た。各実験のコントロール群と処理群間の比較を Welch の t 検定を用いて行った。すべての値は両側で、統計的有意性は p 値 < 0.05 とし、必要に応じて Bonferroni 法で p 値を補正した。

### III 結果

#### KC02-44D 細胞における cAMP 濃度の違いによる脱落膜化マーカーへの影響

KC02-44D 細胞に対して 6 日間の未処理 (control) 群、 $10^8$  M  $E_2$ 、 $10^6$  M MPA、ならびに 8-Bromo-cAMP を 0、150、ならびに 500  $\mu$ M 加えて刺激した (それぞれ 0  $\mu$ M cAMP、150  $\mu$ M cAMP、500  $\mu$ M cAMP) 群を用意し、cAMP の濃度による脱落膜化の指標として知られる IGFBP1、PRL、HAND2、ならびに IL15 の発現量の変化を検討した。さらに内部標準として HPRT1 とは別に B2M ならびに EF1A の発現量を確認した。初代培養 EnSC の脱落膜化の条件である  $10^8$  M  $E_2$  ならびに  $10^6$  M MPA 刺激群 (0  $\mu$ M cAMP 群) に対して、150  $\mu$ M cAMP 群と 500  $\mu$ M cAMP 群で IGFBP1、PRL、ならびに HAND2 の有意な発現上昇がみられた (p<0.05, 図 1)。それに対して IL15 では 500  $\mu$ M cAMP 群のみ有意な上昇が観察された (p<0.05, 図 1)。これらのことから 500  $\mu$ M cAMP を加えることで 6 日間の刺激でも十分な脱落膜化が誘導されると考えられた。B2M と EF1A では群間での有意な差は認めなかった (Data not shown)。

#### 脱落膜化処理による核の増大と転写因子 FOXO1 の発現

脱落膜化の形態学的な指標である核の増大を検討するため、KC02-44D 細胞に対して 6 日間脱落膜化処理 ( $E_2$ +MPA+500  $\mu$ M cAMP) を行った後、細胞を DAPI で染色し、核の面積を比較した。その結果、コントロール群に対して脱落膜化処理群で有意に核の大きさが増大した

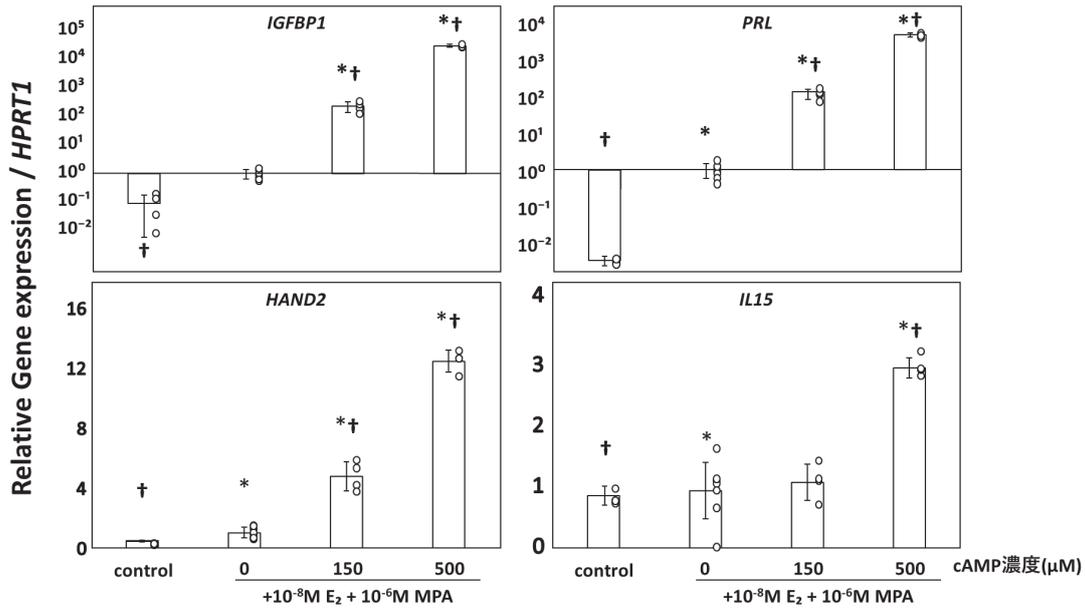


図 1. cAMP 濃度の違いによる脱落膜化マーカーの発現変化.

KC02-44D 細胞に対して 6 日間の  $10^{-8}$  M  $E_2$  と  $10^{-6}$  M MPA 刺激に加えて cAMP の濃度を変えたものに加え、脱落膜化マーカーの発現量の変化を qPCR にて検討した. \*:  $p < 0.05$  by using Welch' s T-test with Bonferroni correction against control. †:  $p < 0.05$  by using Welch' s T-test with Bonferroni correction against  $E_2$ +MPA without cAMP. IGFBP1: Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1, PRL: prolactin, HAND2: Heart And Neural crest Derivatives expressed 2, IL15: Interleukin 15, HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1,  $E_2$ : estrogen, MPA: medroxyprogesterone acetate.

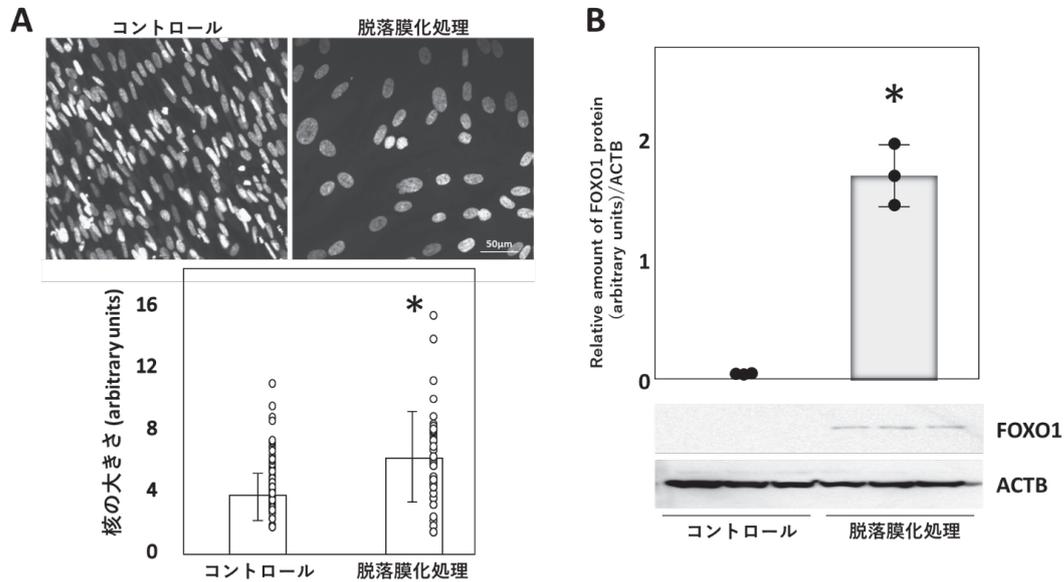


図 2. 脱落膜化による核の増大 (DAPI 染色) と転写因子 FOXO1 の増大

- A) KC02-44D 細胞に対して 6 日間脱落膜化処理を行い、固定後 DAPI にて核染色を行った。染色像は LSM700 共焦点レーザー顕微鏡で取り込み、ImageJ にて染色された核の面積を計測した。コントロール群で 198 細胞数、脱落膜化処理群で 44 細胞数を計測した。\*:  $p < 0.05$  vs control by using Welch' s T-test.
- B) KC02-44D 細胞を 6 日間の脱落膜化処理し、RIPA 可溶性分画を調製、SDS-PAGE により分離した。メンブレンに転写後、ブロッッキング、FOXO1 抗体反応、HRP 標識 2 次抗体反応を行い、最後にケミルミにて FOXO1 のバンドを検出した。得られたシグナルは Image J にて解析し、ACTB バンド強度で補正した。\*:  $p < 0.05$  vs control by using Welch' s T-test.

( $p < 0.05$ , 図 2A)。また脱落膜化によってタンパク量が増大する FOXO1 に関しても、ウェスタンブロッティング法にてコントロール群に対して脱落膜化処理群で有意なタンパク量の増大が認められた ( $p < 0.05$ , 図 2B)。

### KC02-44D 細胞における cAMP の有無と脱落膜化処理日数の違いによる発現量の変化

未処理 (control) 群、 $E_2$  と MPA で刺激した ( $E_2$ +MPA) 群、ならびに脱落膜化処理 ( $E_2$ +MPA+cAMP) 群をそれぞれ 6、12 日間培養することで、cAMP を加えた場合の脱落膜化モデル作製期間の比較を行った。脱落膜化の指標として IGFBP1、PRL、HAND2、ならびに IL15 の発現量を確認した。IGFBP1 では 6 日間 control 群と 6 日間  $E_2$ +MPA 群に対して 6 日間  $E_2$ +MPA+cAMP 群で有意な上昇が再確認されたが ( $p < 0.05$ )、12 日間まで刺激を延長してもそこからの有意な変化は無かった (図 3)。PRL では 6 日間 control 群に対して、6 日間  $E_2$ +MPA

群と 6 日間  $E_2$ +MPA+cAMP 群で有意な上昇が再確認されたが ( $p < 0.05$ )、12 日間まで刺激を延長しても同様に 6 日目からの有意な変化は無かった (図 3)。HAND2 では 6 日間 control 群に対して 6 日間  $E_2$ +MPA+cAMP 群で有意な上昇が再確認され ( $p < 0.05$ )、12 日間の刺激で有意ではないものの 6 日目に比べて逆に低下が認められた (図 3)。生体内ならびに初代培養 EnSC においても HAND2 は P4 刺激直後に高発現し、その後緩やかに減少することが知られるため<sup>20)</sup>、同様のことが起こったものと考えられる。IL15 では 6 日間 control 群と 6 日間  $E_2$ +MPA 群に対して 6 日間  $E_2$ +MPA+cAMP 群で有意な上昇が再確認されたが ( $p < 0.05$ )、12 日間まで刺激を延長しても 6 日目に比して有意な変化は無かった (図 3)。これらのことから KC02-44D 細胞株において 500  $\mu$ M cAMP を加えることで 12 日間おかずとも、6 日間の刺激で十分な脱落膜化が誘導されることが確認できた。

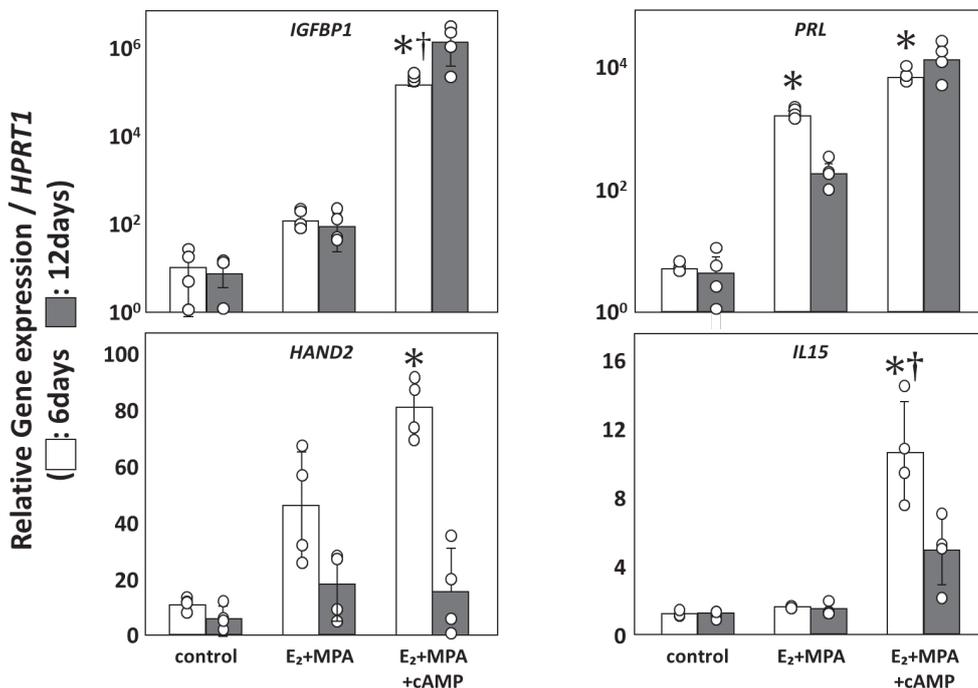


図 3 処理日数の違いによる脱落膜化マーカーの発現変化

KC02-44D 細胞に対し、未刺激群を control 群、 $E_2$  と MPA 刺激群を  $E_2$ +MPA 群、そこに cAMP を加えたものを  $E_2$ +MPA+cAMP 群とし、それぞれ 6、12 日間培養した後、脱落膜化マーカーの発現量の変化を検討した。バーは HPRT1 で補正した各群の平均値で、エラーバーは各群の標準偏差値である。

\* :  $p < 0.05$  by using Welch's T-test with Bonferroni correction against 6days control.  
 † :  $p < 0.05$  by using Welch's T-test with Bonferroni correction against 6days  $E_2$ +MPA without cAMP. IGFBP1: Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1, PRL: prolactin, HAND2: Heart And Neural crest Derivatives expressed 2, IL15: Interleukin 15, HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1,  $E_2$ : estrogen, MPA: medroxyprogesterone acetate.

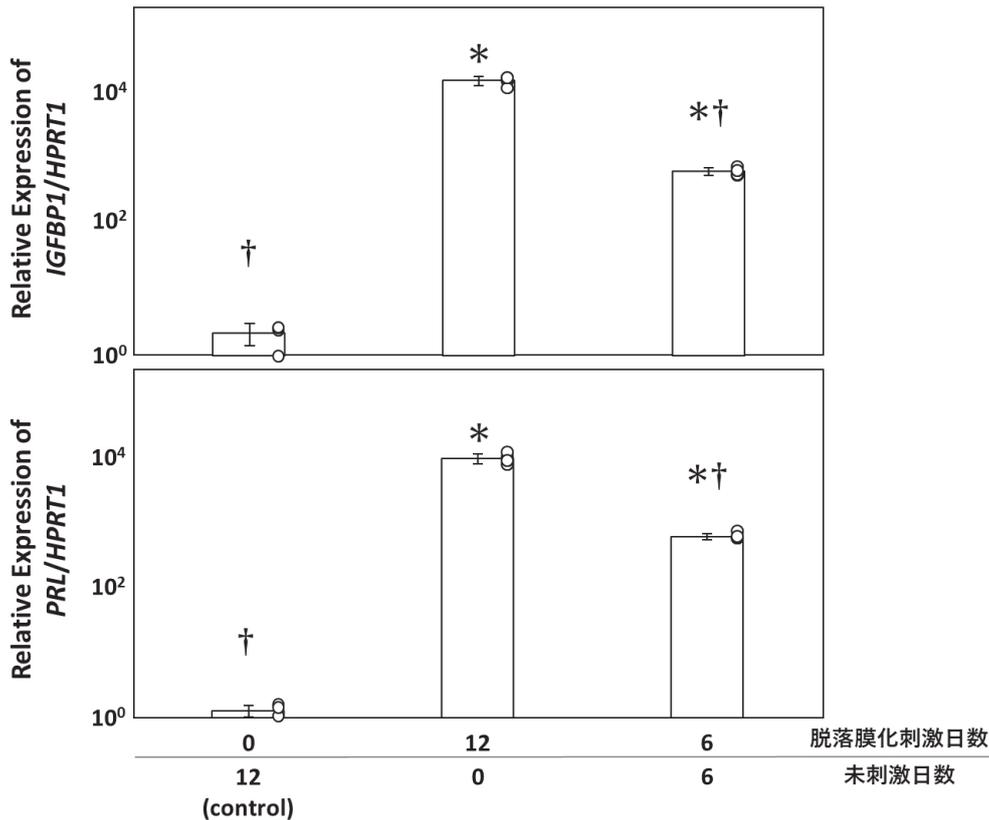


図4 残存モデル作製

KC02-44D 細胞に対し、12 日間の未刺激 (control) 群、12 日間連続で E<sub>2</sub>+MPA+cAMP 刺激群、ならびに 6 日間脱落膜化刺激後 6 日間未刺激だった群をそれぞれ培養し、IGFBP1、PRL の発現量の変化を検討した。バーは HPRT1 で補正した各群の平均値 (n=4) で、エラーバーは各群の標準偏差値である。\* : p < 0.05 by using Welch's T-test with Bonferroni correction against control. † : p < 0.05 by using Welch's T-test with Bonferroni correction against 12days decidualization. IGFBP1: Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1, PRL: prolactin, HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1, E<sub>2</sub>: estrogen, MPA: medroxyprogesterone acetate.

### KC02-44D 細胞における P4 消失による脱落膜化細胞の変化<残存モデル作製>

月経後も子宮内膜に残存する EnSC は P4 の刺激が無くなることで再び線維芽細胞様に脱分化する (すなわち上皮間葉転換が起こる<sup>21)</sup>) と考えられるため、今回我々が KC02-44D 細胞にて作製した脱落膜化モデルにおいて同様に脱分化が起こるかを検討した。12 日間未処理 (control) 群、12 日間脱落膜化処理群、ならびに 6 日間脱落膜化処理後 6 日間未処理群をそれぞれ培養することで、脱落膜化の脱分化を検討した。脱落膜化の指標として IGFBP1 ならびに PRL の発現量を確認した。IGFBP1 ならびに PRL では control 群に対して 12 日間脱落膜化処理群で有意な上昇が認められた (p<0.05, 図 4)。さらに 12 日間脱落膜化処理群に対して 6 日間脱落膜化

処理後 6 日間未処理群で有意な減少が認められた (p<0.05, 図 4)。これらのことから MPA 刺激を解くことで我々の KC02-44D 細胞の脱落膜化モデルでも脱分化が誘導できると考えられた。

### KC02-44D 細胞における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理による老化への影響

先行研究に倣い 1 時間 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理後に脱落膜化処理を行い、老化マーカーである SA-β-gal 量の変化を比較した。未処理群に対して、脱落膜化処理単独群と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理後脱落膜化処理群で有意な上昇が認められたが (p<0.05, data not shown)、脱落膜化処理単独群と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理後脱落膜化処理群との間に差がなかったことから、KC02-44D 細胞に対する 1 時間の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理では十分な老化誘導ができていないことが考えられた。

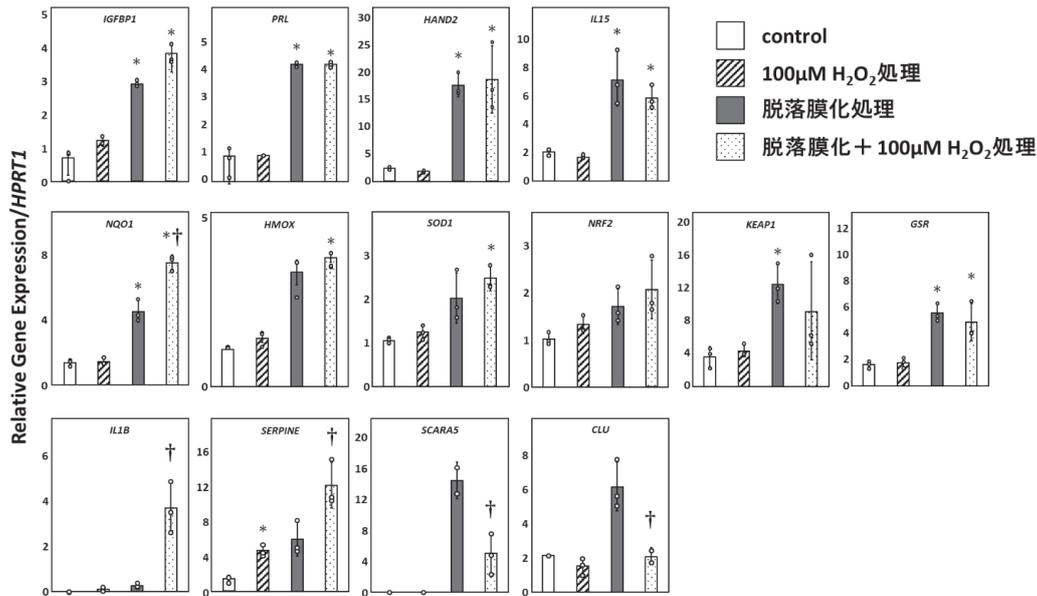


図5 酸化ストレス暴露による発現変化

KC02-44D 細胞に対し、24 時間 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の濃度を変えたものを加えた後、6 日間 E<sub>2</sub>, MPA, ならびに cAMP 刺激(脱落膜化刺激)を加えてそれぞれ培養し、発現量の変化を qPCR にて検討した。バーは HPRT1 で補正した各群の平均値で、エラーバーは各群の標準偏差値である。\* : p < 0.05 by using Welch' s T-test with Bonferroni correction against non-stimulated 6days control. † : p < 0.05, 6days decidualization with/without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by using Welch' s T-test with Bonferroni correction.

IGFBP1: Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1, PRL: prolactin, HAND2: Heart And Neural crest Derivatives expressed 2, IL15: Interleukin 15, NQO1: NADPH dehydrogenase quinone 1, HMOX: heme oxygenase, SOD1: superoxide dismutase 1, NRF2: NF-E2-related factor 2, KEAP1: kelch like ECH associated protein 1, GSR: glutathione reductase, IL1B: Interleukin 1 beta, SERPINE: serpin family E member, SCARA5: scavenger receptor class A member 5, CLU: Clusterin, HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1, E<sub>2</sub>: estrogen, MPA: medroxyprogesterone acetate.

そこで 24 時間 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理での変化を検討した。未処理群に対して 50 ならびに 100 µM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理では有意な変化なかったが、200 µM において激減が観察され (data not shown)、細胞の状態が悪化していることが示唆された。細胞死の指標である bcl-2-like protein 1 (BCL2L1) はやはり 200 µM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理にて増加していたが、100 µM での変化はなかった (data not shown)。そのため、100 µM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理により脱落膜化と老化への影響を検討した。脱落膜化処理により脱落膜化指標の IGFBP1、PRL、HAND2、ならびに IL15 の増加が観察されたが、脱落膜化 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理群との差は観察されなかった (図 5)。

それに対して細胞内の抗酸化酵素である NADPH dehydrogenase quinone 1 は脱落膜化処理群に比べて脱落膜化 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理群において有意な増加が観察された (p < 0.05, 図 5)。また他の抗酸化酵素である heme oxygenase ならび

に superoxide dismutase 1 は control 群と比較して脱落膜化 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理群において有意な増加が観察された (p < 0.05, 図 5)。Nuclear factor erythroid 2-related factor 2、kelch like ECH associated protein 1、ならびに glutathione reductase に脱落膜化処理群と脱落膜化 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理群との間に有意な差は認められなかった (図 5)。またすべてにおける脱落膜化処理群において control 群と比較して増加がみられた (図 5)。さらに細胞老化関連分泌形質 (Senescence-Associated Secretory Phenotype, SASP) である Interleukin 1 beta、serpin family E member 1、scavenger receptor class A member 5、clusterin は、脱落膜化処理群に比べて脱落膜化 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理群において有意な変化が観察された (p < 0.05, 図 5)。の発現量を確認した。

## IV 考察

本研究では KC02-44D 細胞株に対して  $10^8$  M の  $E_2$ 、 $10^6$  M の MPA、ならびに 500  $\mu$ M の 8-Bromo-cAMP を用いることで、胚着床に必須の分化である脱落膜化を 6 日間と早期に誘発することができた。8-Bromo-cAMP の添加は脱落膜化マーカー IGFBP1、PRL、HAND2、ならびに IL15 の有意な上昇を可能とし、本研究の目的の一つである脱落膜化に要する時間の短縮を達成することができた。しかしながら、8-Bromo-cAMP の添加による変化は限られた数の遺伝子発現の観点からしか検討できておらず、網羅的遺伝子発現解析等で見えていく必要があるだろう。一方、細胞内の cAMP を人為的に上昇させる薬剤として他にも dibutyryl-cAMP<sup>22)</sup> やフォルスコリン<sup>23)</sup> も知られており、今後これらを用いた脱落膜化への影響も検討していきたい。

これまでの研究から、初代 EnSC に対して  $E_2$  と MPA で 12 日間処理を行うことで形態学的変化や IGFBP1 や PRL などの脱落膜化マーカーの発現量増加が報告されている<sup>12, 13)</sup>。本研究においても KC02-44D 細胞に対する  $E_2$ +MPA 処理により脱落膜化マーカーの発現量増加が見られた。一方で、6 日間の  $E_2$ +MPA 処理で脱落膜化マーカーの発現量増加はプラトーに達し、それ以上の上昇は観察されなかった。P4 により誘導される脱落膜化は通常 2~3 日ほどで細胞内 cAMP レベルを上昇させ、PRL の産生・分泌を誘導する<sup>24)</sup>。そういった意味でも今回使用した 8-Bromo-cAMP の添加では、人為的な細胞内の cAMP 経路の活性化は過剰な反応を見ている可能性がある。KC02-44D 細胞に対して  $E_2$ +MPA+cAMP 処理を 12 日間まで延長したところ、6 日間の処理と比較して HAND2 と IL15 の減少が見られた。これらの結果は HAND2 が分泌期初期に P4 に反応してターゲットとなる遺伝子の発現を制御したのち一旦収まるためであり<sup>20, 25)</sup>、また、IL15 は HAND2 によって遺伝子発現が直接制御されることに起因すると考えられる。一方、本研究において HAND2 の発現低下による FOXO1、IGFBP1、ならびに PRL 遺伝子発現の変化は観察されておらず、別の制御が働いているものと考えられる。例えば、P4/progesterone receptor により誘導される homeobox A10 (HOXA10) は HAND2 とは独

立し、FOXO1 と協調しながら IGFBP1 ならびに PRL の転写制御領域に結合することでそれらの転写を制御しており<sup>26, 27)</sup>、今後 HOXA10 の関与も見ていく必要があるだろう。

MPA 刺激の消失によって IGFBP1 と PRL で有意な減少を認めた。これらのことから子宮内膜残存 EnSC と同様に脱落膜化 KC02-44D 細胞における脱分化が可能であると考えられる。

次いで、今回使用した KC02-44D 細胞に対して H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いた老化誘発の有無を検討した。先行研究をもとに 1 時間 200  $\mu$ M の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理を行ったが、未処理群と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理群で有意な老化進行の差が認められなかった。このことは、KC02-44D 細胞（もしかすると EnSC 自体も？）が酸化ストレスに対する強い耐性を持ち、その結果、老化しにくい可能性がある。実際、子宮内膜は 28 日ごとの崩壊や EVT の浸潤による炎症<sup>28)</sup> にさらされる等、ストレスフルな環境に置かれており、他の粘膜組織と比べても先に挙げた低酸素耐性等、ストレス耐性が高いことが考えられる。一方で、未処理群に比較して脱落膜化処理群で有意な老化進行が認められた。この結果は、EnSC の脱落膜化によって FOXO1 や IL8 の発現量が増加し、SA- $\beta$ -gal 量が上昇するためであると考えられる<sup>29)</sup>。EnSC は脱落膜化によって急性老化を起こすが、これは老化細胞の除去や着床時のリモデリングするために必要な炎症反応であり<sup>29)</sup>、子宮内膜の脱落（月経）には必要な変化と考えられている。

先行研究の老化誘導条件（1 時間の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理）では不十分であったため、本研究では 24 時間の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理を行った。200  $\mu$ M の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> では HPRT1 が減少し、細胞死の指標である BCL2L1 も上昇したため、細胞のアポトーシスが起っており、200  $\mu$ M は検討には不相当と考えられた。一方で、100  $\mu$ M の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理で KC02-44D 細胞の老化誘導が可能であると考えた。さらに 100  $\mu$ M の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理で SASP の動きも観察されたが、結果の信頼性の意味でも試行回数を増やし再現性を得ることが求められる。

本研究において老化による脱落膜化マーカーに発現変化は生じなかった。そのため、老化を起こした細胞自体は脱落膜化が阻害されていないことが考えられた。一方で、本研究の結果から老化した EnSC は炎症性サイトカインを含む SASP<sup>30)</sup> の産生・分泌が亢進している可能性が高

く、分泌された SASP が周りの細胞の脱落膜化や胚着床に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

本論文に関して、開示すべき利益相反関連事項はない。

## 参考文献

- 1) Maslar IA, Riddick DH (1979) . Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol*, 135 (6) , 751-754.
- 2) Gellersen B, Brosens JJ (2014) . Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocrine reviews*, 35 (6) , 851-905.
- 3) Kajihara T, Tanaka K, Oguro T, et al. (2014) . Androgens modulate the morphological characteristics of human endometrial stromal cells decidualized in vitro. *Reprod Sci*, 21 (3) , 372-380.
- 4) Gellersen B, Brosens J (2003) . Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol*, 178 (3) , 357-372.
- 5) Zhang H, Kong Q, Wang J, et al. (2020) . Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer. *Exp Hematol Oncol*, 9 (1) , 32.
- 6) Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, et al. (2004) . Silent information regulator 2 potentiates Foxo-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (27) , 10042-10047.
- 7) Aoki S, Kiuchi Y, Tokumo K, et al. (2020) . Association between optic nerve head morphology in open-angle glaucoma and corneal biomechanical parameters measured with Corvis ST. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 258 (3) , 629-637.
- 8) Murata H, Tanaka S, Tsuzuki-Nakao T, et al. (2020) . The transcription factor HAND2 up-regulates transcription of the IL15 gene in human endometrial stromal cells. *The Journal of biological chemistry*, 295 (28) , 9596-9605.
- 9) Murata H, Tanaka S, Okada H (2022) . The Regulators of Human Endometrial Stromal Cell Decidualization. *Biomolecules*, 12 (9) ,
- 10) Emera D, Romero R, Wagner G (2012) . The evolution of menstruation: a new model for genetic assimilation: explaining molecular origins of maternal responses to fetal invasiveness. *Bioessays*, 34 (1) , 26-35.
- 11) Ramsey EM, Houston ML, Harris JW (1976) . Interactions of the trophoblast and maternal tissues in three closely related primate species. *Am J Obstet Gynecol*, 124 (6) , 647-652.
- 12) Okada H, Nakajima T, Yoshimura T, et al. (2001) . The inhibitory effect of dienogest, a synthetic steroid, on the growth of human endometrial stromal cells in vitro. *Mol Hum Repro*, 7 (4) , 341-347.
- 13) Okada H, Nie G, Salamonsen LA (2005) . Requirement for proprotein convertase 5/6 during decidualization of human endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 90 (2) , 1028-1034.
- 14) Yuhki M, Kajitani T, Mizuno T, et al. (2011) . Establishment of an immortalized human endometrial stromal cell line with functional responses to ovarian stimuli. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 9, 104.
- 15) Altmae S, Koel M, Vosa U, et al. (2017) . Meta-signature of human endometrial receptivity: a meta-analysis and validation study of transcriptomic biomarkers. *Sci Rep*, 7 (1) , 10077.
- 16) Lucas ES, Dyer NP, Murakami K, et al. (2016) . Loss of Endometrial Plasticity in Recurrent Pregnancy Loss. *Stem Cells*, 34 (2) , 346-356.
- 17) Peter Durairaj RR, Aberkane A, Polanski L, et al. (2017) . Deregulation of the endometrial stromal cell secretome precedes embryo implantation failure. *Mol Hum Reprod*, 23 (7) , 478-487.
- 18) Tomari H, Kawamura T, Asanoma K, et al. (2020) . Contribution of senescence in human endometrial stromal cells during proliferative

- phase to embryo receptivity dagger. *Biology of reproduction*, 103 (1) , 104-113.
- 19) Hwang JH, Park MI, Hwang YY, et al. (2002) . The characteristics of integrins expression in decidualized human endometrial stromal cell induced by 8-Br-cAMP in in vitro. *Exp Mol Med*, 34 (3) , 194-200.
- 20) Murata H, Tanaka S, Hisamatsu Y, et al. (2021) . Transcriptional regulation of LGALS9 by HAND2 and FOXO1 in human endometrial stromal cells in women with regular cycles. *Mol Hum Repro*, 27 (11) , gaab063.
- 21) Kalluri R, Weinberg RA (2009) . The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119 (6) , 1420-1428.
- 22) Logan PC, Ponnampalam AP, Steiner M, et al. (2013) . Effect of cyclic AMP and estrogen/progesterone on the transcription of DNA methyltransferases during the decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod*, 19 (5) , 302-312.
- 23) Platt F, Moyer J, Singer BB, et al. (2023) . Forskolin versus cAMP-Induced Decidualization and Survival of Endometrial Stromal Cells of Endometriosis Patients. *Reprod Sci*, 30 (9) , 2680-2691.
- 24) Brar AK, Frank GR, Kessler CA, et al. (1997) . Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. *Endocrine*, 6 (3) , 301-307.
- 25) Shindoh H, Okada H, Tsuzuki T, et al. (2014) . Requirement of heart and neural crest derivatives-expressed transcript 2 during decidualization of human endometrial stromal cells in vitro. *Fertility and sterility*, 101 (6) , 1781-1790.e1-5.
- 26) Christian M, Zhang X, Schneider-Merck T, et al. (2002) . Cyclic AMP-induced forkhead transcription factor, FKHR, cooperates with CCAAT/enhancer-binding protein beta in differentiating human endometrial stromal cells. *The Journal of biological chemistry*, 277 (23) , 20825-20832.
- 27) Kim JJ, Buzzio OL, Li S, et al. (2005) . Role of FOXO1A in the regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 in human endometrial cells: interaction with progesterone receptor. *Biol Reprod*, 73 (4) , 833-839.
- 28) Sharma S, Godbole G, Modi D (2016) . Decidual Control of Trophoblast Invasion. *Am J Reprod Immunol*, 75 (3) , 341-350.
- 29) Brighton PJ, Maruyama Y, Fishwick K, et al. (2017) . Clearance of senescent decidual cells by uterine natural killer cells in cycling human endometrium. *eLife*, 6, e31274.
- 30) Borodkina AV, Deryabin PI, Giukova AA, et al. (2018) . "Social Life" of Senescent Cells: What Is SASP and Why Study It? *Acta Naturae*, 10(1), 4-14.