

機能的食品による妊娠率の向上

研究年度 令和 5 年度
研究期間 5 年度～ 7 年度
研究代表者名 田中進
共同研究者名 岡田英孝・村田紘未

緒言

ヒトの子宮内膜は約 28 日の月経周期を持ち、月経、増殖期、ならびに分泌期を繰り返す¹⁾。月経後、卵巣では卵細胞を取り巻く卵胞からエストロゲンが血中に分泌され、このホルモンの影響を受けて子宮内膜に含まれる間質細胞 (Endometrial Stromal Cells, EnSC) が増殖し、子宮内膜は厚みを増す。これを増殖期と呼ぶ。その後、卵巣で排卵が起こると、卵胞は黄体化し、黄体からプロゲステロンが血中に分泌されるようになる。これに呼応して子宮内膜で粘膜腺上皮細胞の分泌が上昇するため、この時期の子宮内膜を分泌期と呼ぶ。このとき、腺上皮の変化のみならず、子宮内膜に最も多く含まれる EnSC が丸みを帯びて上皮様の細胞へと分化する¹⁾。この EnSC で起こる分化を「脱落膜化」と呼び、排卵後のプロゲステロンレベルの上昇が起因となる。子宮内膜でのプロゲステロン受容体欠損等によるプロゲステロンシグナルの減弱は下流の多数の遺伝子の調節不全を起こし²⁾、不妊症や不育症の原因ともなっている³⁾。

プロゲステロンシグナルの正常な伝達により EnSC は脱落膜化し、下垂体前葉ホルモンとして知られるプロラクチン (Prolactin, PRL)、インスリン様成長因子結合タンパク質 (Insulin-like growth factor binding protein 1, IGFBP1)、インターロイキン 15 (Interleukin-15, IL15) 等の合成・分泌を開始する。PRL は血管内皮細胞に働きかけることでラセン動脈の発達を促し、IGFBP1 は胚盤胞に由来する絨毛外栄養膜細胞に働きかけ胎盤形成を促す⁴⁾。IL15 は末梢に存在するナチュラルキラー細胞と比較して細胞毒性の低い子宮特異的ナチュラルキラー (Uterine natural killer, uNK) 細胞の増殖と分化を制御し、uNK 細胞は EnSC と協調しながらラセン動脈のリモデリングを促すことで、子宮内膜の脱落膜化をさらに促進させる。一方で uNK 細胞は胚受容における免疫寛容にも重要な働きを果たす³⁾。脱落膜化に異常が生じることで、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⁵⁾ため、EnSC の脱落膜化を理解することは非常に重要である。一方、ヒトでは着床に先立ち EnSC の脱落膜化が起こるのに対し、実験動物では胚着床後にのみ開始されるという大きな違いがあり、実験動物での結果との乖離がみられる。そこで、われわれは患者からの単離 EnSC ならびに樹立された EnSC 細胞株を用いてヒト子宮内膜の脱落膜化を研究してきた。

われわれの先行研究において、子宮内膜の脱落膜化を制御しうる新規因子を探索し、機能的食品エルゴチオネイン (ergothioneine, EGT) の特異的なトランスポーター carnitine organic cation transporter 1 (OCTN1) が脱落膜化 EnSC で有意に上昇していることを見出し、EGT の脱落膜化への関与を想起した。EGT は、Tanret によって麦角から発見された分子量 229.3 の親水性含硫アミノ酸であり⁶⁾、強い抗酸化作用を示す機能的食品であることが知られている⁷⁾。血中から細胞への取り込みに特異的トランスポーター OCTN1 が同定され⁸⁾、細胞内に取り込まれることで細胞内の酸化ストレスの恒常性に寄与する。EGT は生体内の防御システムとは独立しており、生体の既存の防御システムでは対応できないヒドロキシラジカルを素早く還元できるという特徴を持つ⁹⁾。その機能的により抗老化作用、抗炎症作用、ならびに抗神経変性作用があることが報告されている⁹⁾。一方、加齢に伴い血中 EGT 濃度は減少することが知られており¹⁰⁾、この減少が子宮内膜の抗酸化力を低下させ¹¹⁾、脱落膜化の障害とそれに続く癒着胎盤等の妊娠合併症の発症や妊娠率の低下に関与している可能性を考えた。

そこで本研究では、EGT が OCTN1 を介して EnSC の脱落膜化にどのような影響を及ぼすのかを目的として研究を行った。ヒト EnSC 株 KC02-44D を用い、*in vitro* で脱落膜化を誘導した後、定量 PCR 法にて EGT による影響を検討した。続いて、ウエスタ

ンブロッティング法により脱落膜化時のマーカータンパク量の変化を検討し、EnSCの脱落膜化におけるEGTの効果に迫った。

材料と方法

1. EnSC株(KC02-44D)の培養

ヒトEnSC細胞株KC02-44DをAmerican Type Culture Collection (Manassas, VA)から購入し、10% fetal bovine serum (FBS)、10mM HEPES (Life Technologies, NY, USA)、ならびに1% Antibiotics 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (4.5g/L D-Glucose、フェノールレッドならびにL-Glutamine 含有) (Life Technologies, NY, USA) の培地(DMEM・FBS)を用いて細胞培養を行った。10 cmシャーレにコンフルエントになった細胞(1.2×10^6 細胞数)を12 wellプレートへ継代した。

2. KC02-44D細胞への脱落膜化処理

12wellプレート(コーニング)に撒きなおしてコンフルエントになったことを確認し、①コントロール群と②脱落膜化処理群に分け(それぞれの群で $n=5$)、刺激を行った。Phenol redはエストロゲン作用物質として知られるため¹²⁻¹⁴)、コントロール群は10%のCharcoal Stripped (CS)-FBS(活性炭を用いることで血清中に含まれる他のホルモンを吸着し除去する)、10mMのHEPES、1%のAntibiotics、1%のGlutaMAXを含むDMEM(phenol red 不含)(DMEM・CS-FBS)にて3日おきに培地交換をしながら6日間培養した。脱落膜化処理群はエストロゲン(10^{-8} M)、プロゲステロンアナログ(medroxyprogesterone acetate, MPA) (10^{-6})、ならびに8-Bromo-cAMP (Sigma-Aldrich Co. LLC) (0.5mM)をDMEM・CS-FBSに加え、3日おきに培地交換をしながら6日間刺激した。

3. EGTの脱落膜化への影響

先行研究¹⁵)を参考にしてKC02-44D細胞の脱落膜化処理時に加えるEGTの適正刺激濃度検定を行い、100 μ Mを適性濃度として決定した。ヒト血中でのEGT濃度は3.0~2.3mg/100ml (100.3~130.5 μ M)程度であることが報告されている¹⁶)。

4. 定量PCR

脱落膜化処理/未処理後のKC02-44D細胞(0.4×10^6 細胞数)からSepasol®-RNA I Super G(ナカライテスク, KYOTO, JAPAN)を用いてtotal RNAを抽出した。その後、250ngのtotal RNAとReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO)を用いて逆転写反応を行った。得られたcDNAでの脱落膜化の誘導や脱落膜化時のEGTの影響を見るため、定量PCRを行った。定量PCR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。測定した遺伝子名とPrimer配列は表1に示す。各遺伝子の相対変化はhypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)を内部標準としてddct法により算出した¹⁷)。

5. 細胞毒性アッセイ

KC02-44D細胞を500 cells/wellとなるよう96穴マイクロプレートの各ウェルに播種し、脱落膜化未処理群、脱落膜化処理群それぞれにEGTを5 μ M、10 μ M、50 μ M、または100 μ Mとなるよう添加し、3日おきに同様の培地に交換をしながらCO₂インキュベーター内(37°C、5%CO₂)で6日間培養した。その後、Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST(同仁化学, Kumamoto, Japan)にて細胞毒性を測定した。各ウェルの450nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(パーキンエルマー・ジャパン, YOKOHAMA, JAPAN)で測定し、未処理群の値を0%として、各条件での培地中に放出されるLDH(本来細胞内に存在する)量を算出した。

6. 細胞増殖アッセイ

KC02-44D細胞を500 cells/wellとなるよう96穴マイクロプレートの各ウェルに播種し、脱落膜化未処理群、脱落膜化処理群それぞれにEGTを5 μ M、10 μ M、50 μ M、または100 μ Mとなるよう添加し、3日おきに同様の培地に交換をしながらCO₂インキュベーター内(37°C、5%CO₂)で6日間培養した。その後、Cell Counting Kit-8(同仁化学)にて細胞生存率を測定した。脱落膜化未処理群と脱落膜化処理単独群で細胞生存率に有意差があるのか、あるいはEGTの濃度と細胞生存率に相関があるのかを検討した。

7. ウェスタンブロッティング法

ウェスタンブロッティング法にて EGT による forkhead Box O1 (FOXO1)タンパク量の変化を検討した。脱落膜化未処理群(対照群)、培地に 100 μ M の EGT を添加した群、脱落膜化処理時に 100 μ M の EGT を添加した群、脱落膜化処理単独群の 4 群を用意し、6 日間の培養を行った。6 日後、KC02-44D 細胞からプロテアーゼインヒビター(ナカライテスク)を加えた冷 RIPA 緩衝液(ナカライテスク)にて RIPA 可溶性画分を抽出し、濃度測定を BCA アッセイ(ナカライテスク)を用いて行った。次いで、10 μ g の RIPA 可溶性画分を SDS-PAGE (153mA, 35 分)にてタンパクを分離した後、トランスブロット SD セル(Bio-rad, CA, USA)を用いてタンパクを Clear Blot P+メンブレン(アトー, 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)を用いて 1 時間室温にてブロッキングした。ブロッキング後のメンブレンを、一次抗体反応液(1/1,000 FoxO1 (C29H4) Rabbit mAb #2880 (Cell Signaling Tech, MS, USA) in TBS-T with 5% Blocking One)中で 4 $^{\circ}$ C、一晚インキュベートした。次の日に TBS-T で 5 分 3 回洗浄後、二次抗体反応として、1/3,000 HRP Horse Anti Rabbit IgG Antibody (Peroxidase) (VECTOR PI-1000) in TBS-T with 5% Blocking One にて室温で 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 1 分間反応させたのち、LAS4000(GE ヘルスケアジャパン, TOKYO, JAPAN)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 を用いて行い FOXO1 のタンパク量は actin beta (ACTB)タンパク量にて補正した。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, Germany, Darmstadt)と 1/3,000Anti-IgG (H+L), Mouse, Horse-Poly, HRP (VECTOR PI-2000)を使用した。

8. 統計解析

得られたデータに対し、Shapiro-Wilk 正規性検定を行い各群の正規性を確認した後、両側で Welch の T 検定を行った。その後、Bonferroni 補正を行い、有意水準となる p 値を決定した。統計解析は IBM SPSS Statistics version 29.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) を用いて行った。

結果

1. ヒト EnSC 株での OCTN1 発現の検討

KC02-44D 細胞において脱落膜化処理によって OCTN1 の発現上昇が確認された ($p<0.05$ 、各群 $n=15$ 、図 1)。

2. 脱落膜化マーカーへの濃度別 EGT の影響

EGT の効果を見るために KC02-44D 細胞を用いて EGT の濃度の違いによる脱落膜化マーカーの発現変化を検討した。脱落膜化処理に各種濃度の EGT を加えた結果、PRL は未処理群に対して脱落膜化処理単独群で上昇したが ($p<0.05$)、脱落膜化処理単独群と EGT 追加処理群との間に有意な差は生じなかった(図 2)。IGFBP1 に関しては未処理群に対して脱落膜化処理単独群で発現が上昇し、50 μ M と 100 μ M の EGT を加えると IGFBP1 の有意な減少が観察された ($p<0.05$ 、図 2)。IL15 は未処理群に対して脱落膜化処理単独群で有意に上昇し ($p<0.05$)、100 μ M の EGT 添加により有意に減少した(図 2)。100 μ M EGT における反応性が最も高かったため、今後の検討では 100 μ M EGT を使用し、KC02-44D 細胞自体ならびに脱落膜化への影響を検討した。

3. 脱落膜化への EGT の影響

KC02-44D 細胞を用いて脱落膜化マーカー(PRL、IGFBP1、IL15、ならびに HAND2)への 100 μ M EGT の影響を検討した。PRL 発現は未処理群に対して脱落膜化処理単独群で有意に上昇した ($p<0.05$)。また、未処理群および脱落膜化処理単独群に EGT を加えても、有意な変化はなかった(図 3)。IGFBP1 発現は未処理群に対して脱落膜化処理単独群で有意に上昇した ($p<0.05$)。未処理群に対して EGT を加えても有意な変化はなかったが、脱落膜化処理時に EGT を加えた時の有意な発現減少が再確認された ($p<0.05$ 、図 3)。IL15 に関しては未処理群に対して脱落膜化処理単独群で発現が有意に上昇した ($p<0.05$)。一方、EGT の濃度検定実験とは違い、未処理群および脱落膜化処理単独群に EGT を加えても、有意な減少は見られなかった(図 3)。今後試行回数を増加させ再現性を確認する必要がある。HAND2 に関しては未処理群に対して脱落膜化処理単独群で有意に上昇した ($p<0.05$)。また、未処理群および脱落膜化処理単独群に EGT を加えても、有意な変化はなかった(図 3)。

4. 細胞機能への影響の確認

脱落膜化時に EGT を加えた時の IGFBP1 の発現低下が、細胞死による細胞数の減少もしくは細胞活性の低下が関与している可能性を考え、EGT による細胞毒性を見たところ、脱落膜化処理群ならびに脱落膜化未処理群どちらにおいても死細胞数(または細胞膜に障害を受けた細胞数)に EGT 濃度依存的な変化はなかった(図 4)。続いて、EGT による細胞生存率の変化を見たところ、脱落膜化処理群で有意に細胞生存率が下がることを確認した($p < 0.05$ 、図 4)。ただし、脱落膜化により細胞が大きくなるため、限られたスペースによる細胞数の減少を見ているだけの可能性もある。一方で、脱落膜化処理時に濃度を変化させて EGT を加えても生存率に有意な差が見られなかったことから、EGT 自体は KC02-44D 細胞の生存率にも影響を与えないことがわかった。

5. 脱落膜化における FOXO1 の制御

プロゲステロンは EnSC 細胞質内の PGR へと結合、核内に移行した後、PRL と IGFBP1 の転写を直接制御すると共に転写因子 HAND2 と FOXO1 の転写を誘導する。誘導された HAND2 は PRL と IL15 の転写を制御し、FOXO1 は IGFBP1 の転写制御に加わる。そのため、EGT による IGFBP1 の発現変化に FOXO1 の関与を想起した。

そこで、ウェスタンブロット法にて EGT による FOXO1 タンパク量の変化を検討した。脱落膜化処理によって FOXO1 タンパクの発現が上昇した。脱落膜化処理時に 100 μ M EGT を添加したところ、FOXO1 タンパクの減少が確認された(図 5A)。この EGT による減少が、転写の減少、翻訳の阻害、またはタンパク分解の亢進によるのかを検討するため、qPCR によって FOXO1 の発現変化を検討した。脱落膜化処理単独群に比して EGT 追加処理群において FOXO1 の発現が有意に減少したため、EGT による FOXO1 転写自体の減少がタンパク量の減少につながっていると考えられた($p < 0.05$ 、図 5B)。

考察

EGT は細胞内に取り込まれることで細胞内の活性酸素種を除去し、細胞内の酸化ストレスを一定に保つ働きがある¹⁸⁾。別の細胞内での抗酸化作用を誘導するタンパクとして核因子赤血球関連因子 2(NF-E2 related factor 2, NRF2)が知られる¹⁹⁾。非酸化ストレス下では、NRF2 は kelch like ECH

associated protein1 (KEAP1)により細胞質に留められ、ユビキチン化されることで常時プロテアソーム依存的なタンパク質分解を受ける^{19,20)}。一方、細胞が酸化ストレスに暴露されると、KEAP1 による NRF2 抑制機構は解除され、NRF2 は核に移行し、抗酸化応答配列(antioxidant response element, ARE)を介して抗酸化作用を持つタンパクをコードする遺伝子の発現を誘導する²¹⁾。FOXO1 は IGFBP1 の転写制御以外にも抗酸化作用をもつグルタチオンの代謝酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼおよびグルタチオンレダクターゼの転写制御を行っており²²⁾、酸化ストレスに対する生体防御機構の一つとして働く²³⁾。さらに、FOXO1 転写制御領域には ARE が存在し、酸化ストレスによる NRF2 の核移行によって FOXO1 の発現が促進される²⁴⁾。KC02-44D 細胞において EGT の添加は脱落膜化時に生じる何らかの酸化ストレスを緩和し、本来であれば誘導されるはずの NRF2 の核移行を、KEAP1 による分解を再開させることで阻害し、結果、FOXO1 とそれに続く IGFBP1 の発現上昇を抑制したと考えられた。

本研究において EGT による脱落膜化時の IGFBP1 の発現上昇の抑制が見られた。IGFBP1 には細胞遊走を刺激し、絨毛外栄養膜細胞の浸潤を促す働きがある^{25,26)}。脱落膜化 EnSC からの IGFBP1 は局所で絨毛外栄養膜細胞の持つインテグリン $\alpha 5$ と $\beta 1$ サブユニットを介して絨毛外栄養膜細胞の遊走を制御する²⁵⁾。そのため、厳密に規定された量の IGFBP1 は正常な胎盤の形成に必須であり、胎児の正常な発育を手助けすることになる。一方で、過剰な IGFBP1 発現は絨毛外栄養膜細胞の胎盤への浸潤を乱し、筋層にまでその浸潤が達することで、癒着胎盤の原因となり母子の生命を脅かす²⁷⁾。さらに EnSC 自体がインテグリン $\alpha 5/\beta 1$ を発現するため、IGFBP1 は自己分泌によるネガティブフィードバック機構を介して EnSC の脱落膜化にも関与し²⁸⁾、脱落膜の薄層化にもつながる可能性がある。そこで EGT は EnSC の IGFBP1 発現を規定することで、絨毛外栄養膜細胞の遊走制御と脱落膜の薄層化を防ぎ、癒着胎盤の予防に一役買っているのではないかと考えられた。

EGT による糖尿病ラットの妊娠率の改善が報告されているが、子宮内膜脱落膜への影響は検討されていない^{29,30)}。欧州食品安全機関は、EGT が 800 mg/kg/day でも無毒性であることを発表し、妊娠中および授乳中の女性、子供、ならびに乳児へ

の EGT のサプリメント使用を承認している³¹⁾。OCTN1 は胎盤を形成する胚盤胞由来の絨毛外栄養膜細胞にも存在する³²⁾。胎盤形成異常を基盤とする多因子性妊娠高血圧症候群である子癩前症モデルラットに EGT を投与すると、子癩前症のマーカーである血中 sFlt-1 の減少、胎盤におけるミトコンドリア関連酵素の発現上昇、ミトコンドリアに由来する活性酸素種の減少、ならびに胎児の体重増加、が観察されるため、絨毛外栄養膜細胞における OCTN1 発現の重要性が示唆されている³³⁾。しかしここでも子宮内膜脱落膜での OCTN1 発現ならびに EGT の影響は調べられていない。我々は EGT の特異的なトランスポーター OCTN1 の EnSC での発現、脱落膜化での発現上昇、ならびに IGFBP1 への効果を見出すことで EGT という隠れた着床ならびに妊娠維持のための重要なファクターを世界に先駆けて見出した。繰り返しになるが、EGT が子宮脱落膜での IGFBP1 の発現を制御することで胎盤形成に制限をかけ、胎盤形成異常を基盤とする妊娠高血圧腎症や胎盤の過形成である癒着胎盤等を防いでいるのではないかと考えている。

血中 EGT には食事に由来するものだけでなく、真菌類や腸内細菌が合成したものも含まれることが報告されている^{34,35)}。一方、胃に含まれる *H. pylori* や腸内細菌は食餌性 EGT の多くを代謝し、疾患関連代謝産物であるおりメチルアミン N-オキシドの生成に寄与し、ヒトの健康に影響を与える可能性があることも示唆されており³⁶⁾、腸内細菌の産生する EGT の役割が大きな意味を持つと考えられる。精神的ストレスを受けたラットにおいて、腸内細菌の一つである *L. reuteri* が増加し、*L. reuteri* により合成された EGT の急激な増加が知られている³⁷⁾。このラットへの EGT の経口投与はストレス軽減作用が示されており、妊娠中という様々な要因(特に自律神経の乱れ)でストレスを感じやすくなる状態において、腸内細菌に由来する EGT がストレス軽減のみならず流産の予防にも重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

まとめ

本研究において EGT の特異的なトランスポーターである OCTN1 が脱落膜化 EnSC で発現上昇することを見出した。EGT は OCTN1 を介し、胎盤形成を促す IGFBP1 の発現を抑制することから、癒着胎盤などを防いでいると考えられた。

参考文献

- 1) Murata H, Tanaka S, Tsuzuki-Nakao T, Kido T, Kakita-Kobayashi M, Kida N, Hisamatsu Y, Tsubokura H, Hashimoto Y, Kitada M, 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.
- 2) Papakonstantinou PE, Georgiadou V, Doumanis G, Bistola V, Papaparaskevas J, Filippatos G, Xydonas S (2023). Implantable Cardiac Defibrillator-Related Culture-Negative Infection: A Case of *Coxiella burnetii* Infection. *J Clin Med*, 12(8),
- 3) Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H (2004). Molecular cues to implantation. *Endocr Rev*, 25(3), 341-373.
- 4) Okada H, Tsuzuki T, Murata H (2018). Decidualization of the human endometrium. *Reproductive medicine and biology*, 17(3), 220-227.
- 5) Cha J, Sun X, Dey SK (2012). Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nature medicine*, 18(12), 1754-1767.
- 6) Tanret C (1909). Sur une base nouvelle retiree du seigle ergote, l'ergothioneine. *Rend. Acad. Sci.*, 149, 222-224.
- 7) Franzoni F, Colognato R, Galetta F, Laurenza I, Barsotti M, Di Stefano R, Bocchetti R, Regoli F, Carpi A, Balbarini A, et al. (2006). An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox. *Biomed Pharmacother*, 60(8), 453-457.
- 8) Kato Y, Kubo Y, Iwata D, Kato S, Sudo T, Sugiura T, Kagaya T, Wakayama T, Hirayama A, Sugimoto M, et al. (2010). Gene knockout and metabolome analysis of carnitine/organic cation transporter OCTN1. *Pharm Res*, 27(5), 832-840.
- 9) Apparoo Y, Phan CW, Kuppasamy UR, Sabaratnam V (2022). Ergothioneine and its prospects as an anti-ageing compound. *Exp*

Gerontol, 170, 111982.

10) Sotgia S, Zinellu A, Mangoni AA, Pintus G, Attia J, Carru C, McEvoy M (2014). Clinical and biochemical correlates of serum L-ergothioneine concentrations in community-dwelling middle-aged and older adults. *PLoS One*, 9(1), e84918.

11) Chaleckis R, Murakami I, Takada J, Kondoh H, Yanagida M (2016). Individual variability in human blood metabolites identifies age-related differences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(16), 4252-4259.

12) Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS (1986). Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(8), 2496-2500.

13) Welshons WV, Wolf MF, Murphy CS, Jordan VC (1988). Estrogenic activity of phenol red. *Mol Cell Endocrinol*, 57(3), 169-178.

14) Rajendran KG, Lopez T, Parikh I (1987). Estrogenic effect of phenol red in MCF-7 cells is achieved through activation of estrogen receptor by interacting with a site distinct from the steroid binding site. *Biochem Biophys Res Commun*, 142(3), 724-731.

15) Grundemann D, Hartmann L, Flogel S (2022). The ergothioneine transporter (ETT): substrates and locations, an inventory. *FEBS Lett*, 596(10), 1252-1269.

16) Kumosani TA (2001). L-ergothioneine level in red blood cells of healthy human males in the Western province of Saudi Arabia. *Exp Mol Med*, 33(1), 20-22.

17) Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*, 3(3), 71-85.

18) Fu TT, Shen L (2022). Ergothioneine as a Natural Antioxidant Against Oxidative Stress-Related Diseases. *Front Pharmacol*, 13,

850813.

19) Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA (2018). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal*, 29(17), 1727-1745.

20) Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R (2018). Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1865(5), 721-733.

21) Motohashi H, Yamamoto M (2004). Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*, 10(11), 549-557.

22) Jin S, Wang TT, Huang JC, Wang YS, Guo B, Yue ZP (2023). Melatonin modulates endometrial decidualization via NOTCH1-NRF2-FOXO1-GSH pathway. *Biol Reprod*, 109(3), 299-308.

23) Klotz LO, Sanchez-Ramos C, Prieto-Arroyo I, Urbanek P, Steinbrenner H, Monsalve M (2015). Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol*, 6, 51-72.

24) Yu HF, Zheng LW, Yang ZQ, Wang YS, Wang TT, Yue ZP, Guo B (2021). TAZ as a novel regulator of oxidative damage in decidualization via Nrf2/ARE/Foxo1 pathway. *Exp Mol Med*, 53(9), 1307-1318.

25) Irving JA, Lala PK (1995). Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1. *Experimental cell research*, 217(2), 419-427.

26) Hamilton GS, Lysiak JJ, Han VK, Lala PK (1998). Autocrine-paracrine regulation of human trophoblast invasiveness by insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein (IGFBP)-1. *Experimental cell research*, 244(1), 147-156.

27) Crossey PA, Pillai CC, Miell JP (2002). Altered placental development and intrauterine growth restriction in IGF binding protein-1 transgenic mice. *J Clin Invest*, 110(3), 411-418.

28) Matsumoto H, Sakai K, Iwashita M (2008). Insulin-like growth factor binding protein-1 induces decidualization of human endometrial stromal cells

via $\alpha 5\beta 1$ integrin. *Molecular human reproduction*, 14(8), 485-489.

29) Dybing E, Doe J, Groten J, Kleiner J, O'Brien J, Renwick AG, Schlatter J, Steinberg P, Tritscher A, Walker R, et al. (2002). Hazard characterisation of chemicals in food and diet. dose response, mechanisms and extrapolation issues. *Food Chem Toxicol*, 40(2-3), 237-282.

30) Acosta JC, O'Loghlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, Fumagalli M, Da Costa M, Brown C, Popov N, et al. (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, 133(6), 1006-1018.

31) Efsa Panel on Dietetic Products N, Allergies, Turck D, Bresson JL, Burlingame B, Dean T, Fairweather-Tait S, Heinonen M, Hirsch-Ernst KI, Mangelsdorf I, et al. (2017). Scientific and technical guidance for the preparation and presentation of a health claim application (Revision 2). *EFSA J*, 15(1), e04680.

32) Wu X, George RL, Huang W, Wang H, Conway SJ, Leibach FH, Ganapathy V (2000). Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta. *Biochim Biophys Acta*, 1466(1-2), 315-327.

33) Unger T, Borghi C, Charchar F, Khan NA, Poulter NR, Prabhakaran D, Ramirez A, Schlaich M, Stergiou GS, Tomaszewski M, et al. (2020). 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. *Hypertension*, 75(6), 1334-1357.

34) Paul BD, Snyder SH (2010). The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant. *Cell Death Differ*, 17(7), 1134-1140.

35) Fujitani Y, Alamgir KM, Tani A (2018). Ergothioneine production using *Methylobacterium* species, yeast, and fungi. *J Biosci Bioeng*, 126(6), 715-722.

36) Dumitrescu DG, Gordon EM, Kovalyova Y, Seminara AB, Duncan-Lowey B, Forster ER, Zhou

W, Booth CJ, Shen A, Kranzusch PJ, et al. (2022). A microbial transporter of the dietary antioxidant ergothioneine. *Cell*, 185(24), 4526-4540 e4518.

37) Matsuda Y, Ozawa N, Shinozaki T, Wakabayashi KI, Suzuki K, Kawano Y, Ohtsu I, Tatebayashi Y (2020). Ergothioneine, a metabolite of the gut bacterium *Lactobacillus reuteri*, protects against stress-induced sleep disturbances. *Transl Psychiatry*, 10(1), 170.

表1 Primer list

Gene Name	Gene Symbol	Primer Name	Sequence
Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1	HPRT1	895F	5'-CTAGTTCTGTGGCCATCTGCTTAG-3'
		1034R	5'-GGGAACTGATAGTCTATAGGCTCATAGTG-3'
Prolactin	PRL	374F	5'-ATTCGATAAACGGTATACCCATGGC-3'
		623R	5'-TTGCTCCTCAATCTCTACAGCTTTG-3'
Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1	IGFBP1	636F	5'-CTATGATGGCTCGAAGGCTC-3'
		791R	5'-TTCTTGTTGCAGTTTGGCAG-3'
Interleulin15	IL15	165F	5'-GTTCACCCCAGTTGCAAAGT-3'
		351R	5'-CCTCCAGTTCCTCACATTC-3'
Heart and Neural Crest Derivatives expressed 2	HAND2	1479F	5'-AGAGGAAGAAGGAGCTGAACGA-3'
		1552R	5'-CGTCCGGCCTTTGGTTTT-3'
Organic Cation/Ergothioneine Transporter	OCTN1	836F	5'-ATGGGCCAGATCTCCAACATATG-3'
		975R	5'-TAAGCAAACAGTGGCAGCAG-3'
forkhead box protein O1	FOXO1	2336F	5'-ATGTGTTGCCCAACCAAAGC-3'
		2475R	5'-TTGGACTGCTTCTCTCAGTTCC-3'

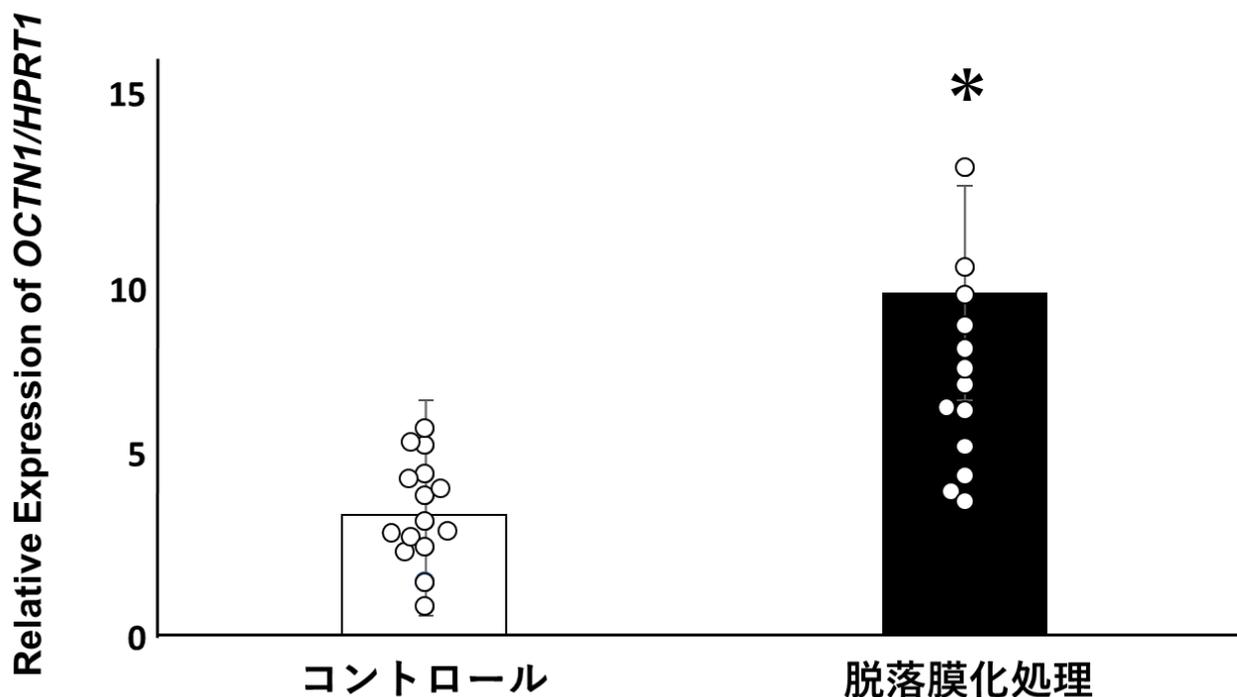


図 1. 脱落膜化ヒト子宮内膜間質細胞株 KC02-44D での OCTN1 発現

KC02-44D 細胞株に対して 6 日間の脱落膜化处理を行い、OCTN1 mRNA 発現量の変化を qPCR にて検討した。各バーは平均値、エラーバーは標準偏差を示す。各ドットは独立した実験を示す (n=15)。OCTN1: carnitine/organic cation transporter 1, HPRT1: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1. *: p<0.05 by using Welch's T-test against control.

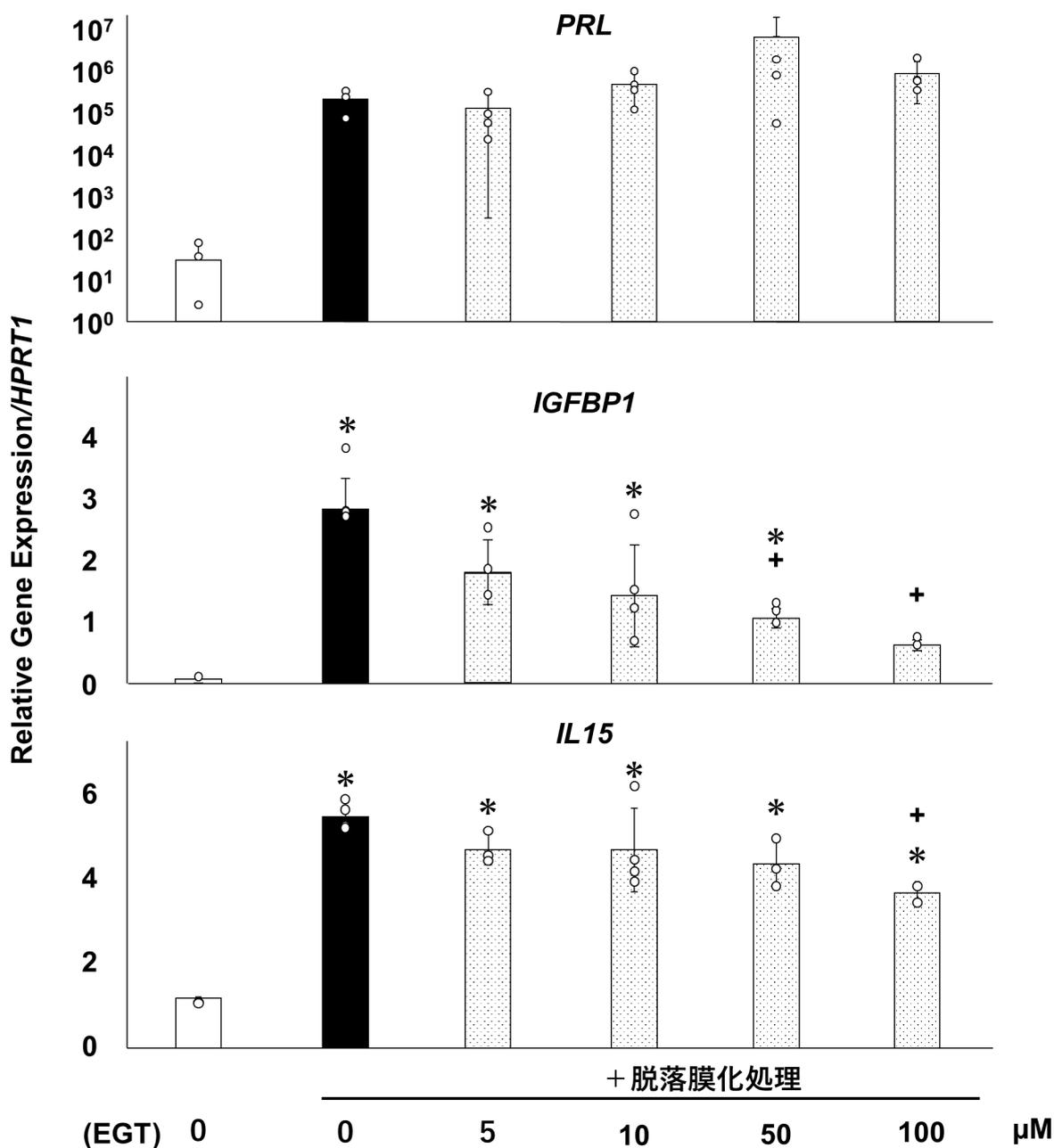


図 2. KC02-44D 細胞におけるエルゴチオネインの濃度検定

KC02-44D 細胞に対して脱落膜化处理および EGT の濃度を変えて qPCR で予備検討を行った。EGT の濃度は 0, 5, 10, 50, 100μM にて検討した。各バーは平均値、エラーバーは標準偏差を示す。各ドットは独立した実験を示す (n=4)。EGT: Ergothioneine, HPRT1: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1. *: 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 E2+MPA+cAMP. EGT: Ergothioneine, HPRT1: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1, E2: estrogen.

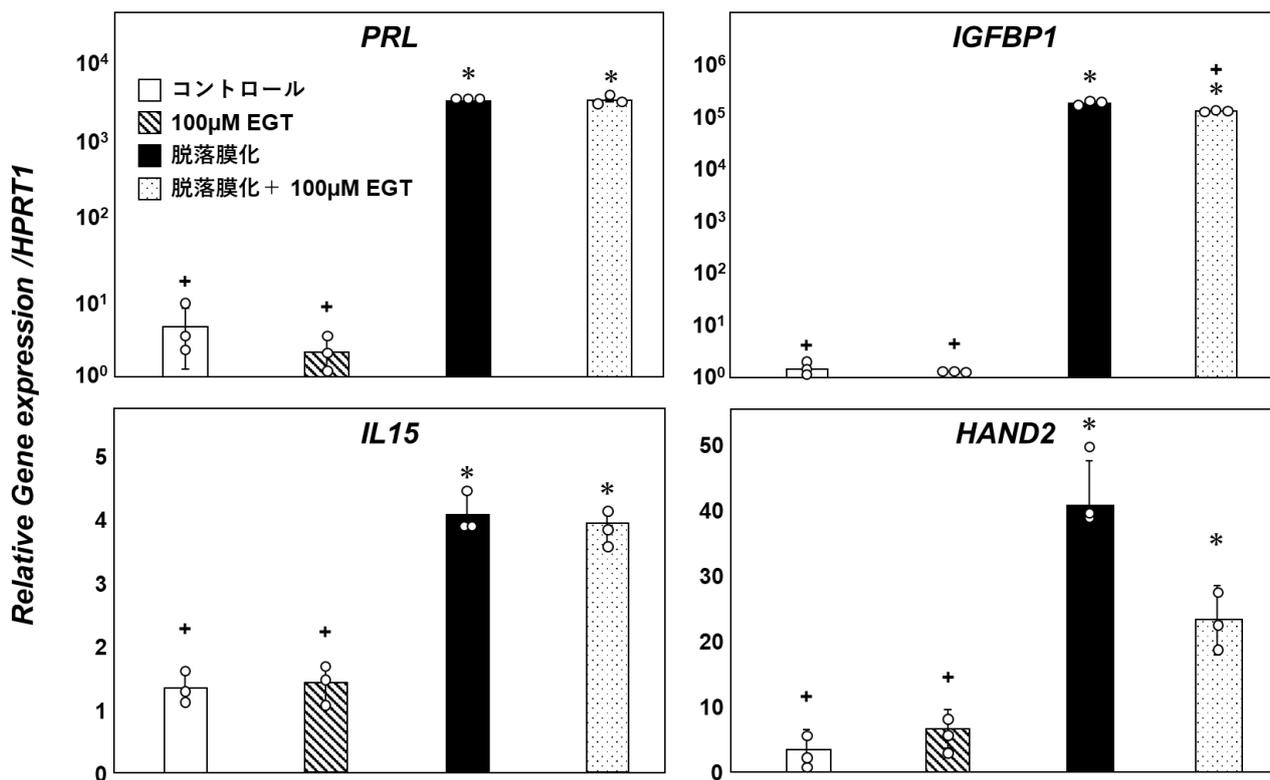


図3. 脱落膜化へのEGTの効果

KC02-44D 細胞に対して6日間の脱落膜化(decidualization treatment)/EGT処理を行い、脱落膜化マーカー遺伝子の発現量の変化をqPCRにて検討した。各ドットは独立した実験を示す(n=3)。EGT: ergothioneine, PRL: Prolactin, IGFBP1: Insulin-like growth factor binding protein, IL15: Interleukin-15, HAND2: Heart and neural crest derivatives expressed 2, HPRT1: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1. *: 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 decidualization treatment.

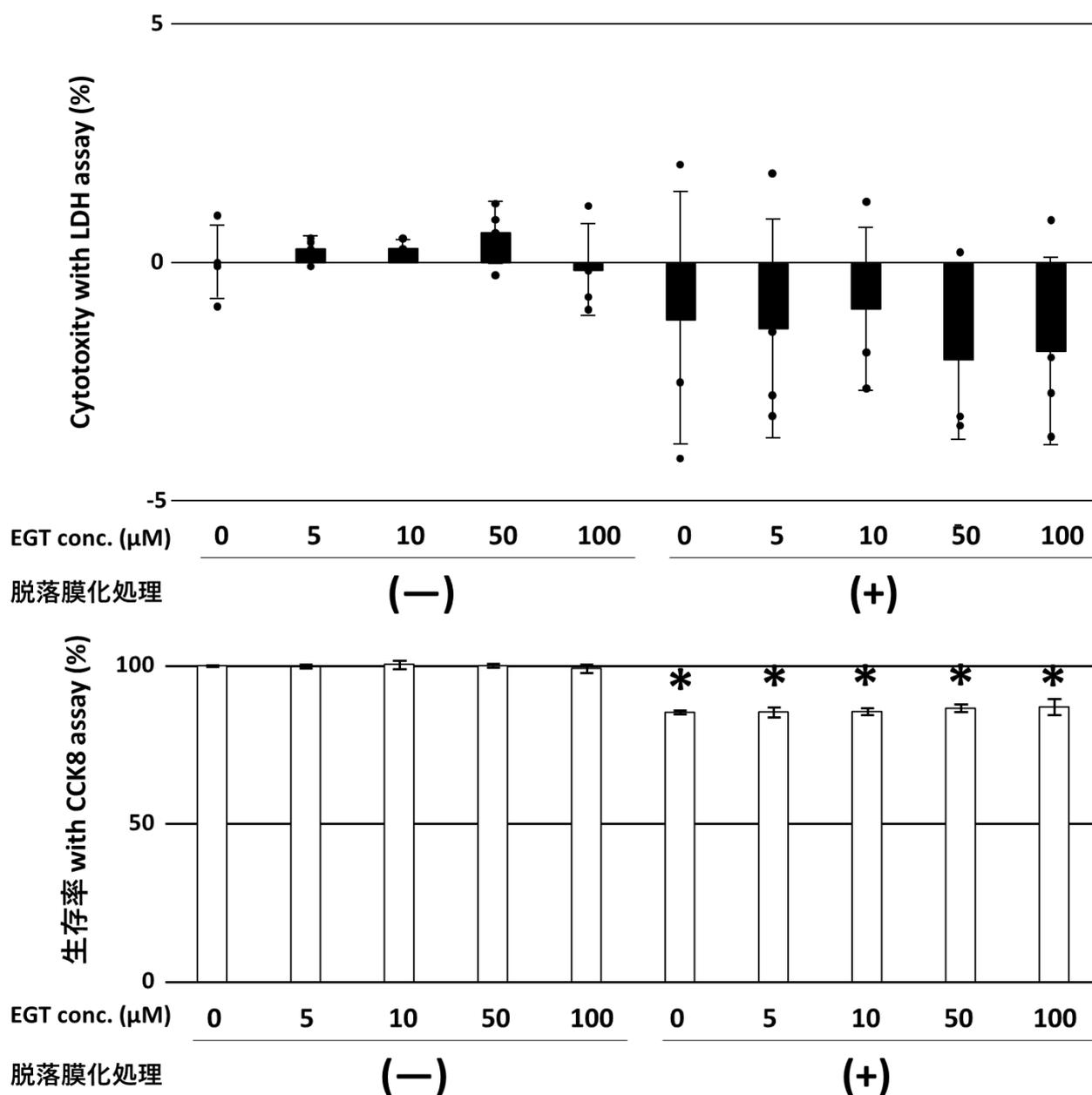


図 4. KC02-44D 細胞機能への EGT の影響

KC02-44D 細胞に対して 6 日間の脱落膜化/EGT 処理を行い、LDH アッセイにて細胞毒性を測定した。EGT の濃度を変化させても培地中に放出される LDH (本来細胞内に存在する) 量は未処理細胞と比べても変化が無いいため、EGT によって死細胞または細胞膜に傷害を受けた細胞数に変化はないと考えられる。EGT: Ergothioneine, LDH: L-lactate dehydrogenase.

KC02-44D 細胞に対して 6 日間の脱落膜化/EGT 処理を行い、CCK8 アッセイにて細胞生存率を測定した。脱落膜化処理自体は細胞生存率を低下させたが、そこから EGT の濃度を変化させても細胞生存率に変化はなかった。EGT: Ergothioneine, CCK8: Cell Counting Kit-8. *: $p < 0.05$ vs 脱落膜化処理(-) without EGT by Welch's Test with Bonferroni correction.

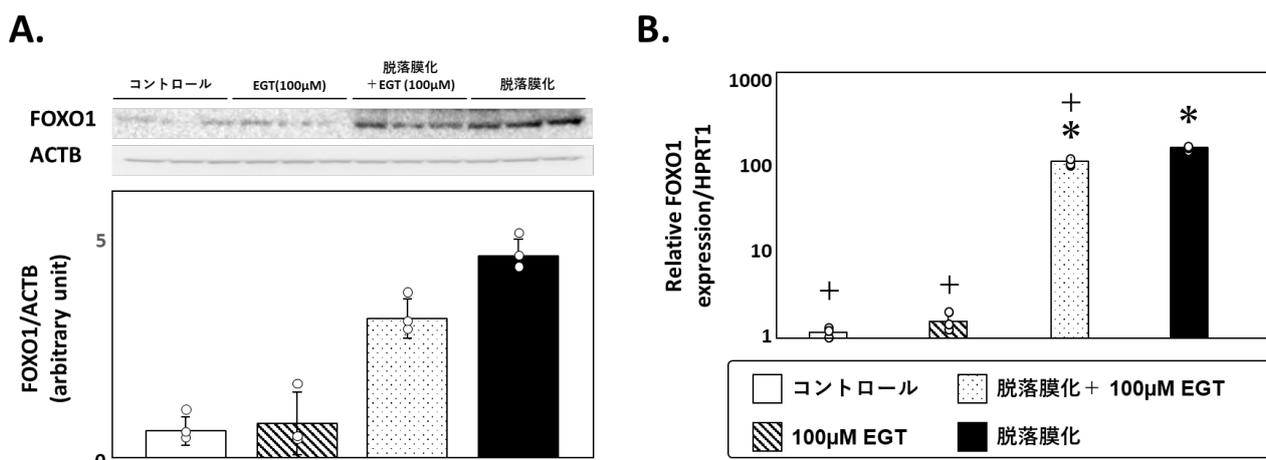


図 5. EGT による脱落膜化時の FOXO1 上昇の抑制

A. KC02-44D 細胞を 6 日間の脱落膜化/EGT 処理した後、RIPA 可溶性分画を調整し、SDS-PAGE により分離した。メンブレンに転写後、ブロッキング、FOXO1 抗体反応、HRP 標識 2 次抗体反応を行い、最後に化学発光にて 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。

B. KC02-44D 細胞に対して 6 日間の脱落膜化/EGT 処理を行い、FOXO1 発現量の変化を qPCR にて検討した。各ドットは独立した実験を示す (n=3)。

FOXO1: Forkhead box protein O1, EGT: Ergothioneine, HPRT1: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1, ACTB: actin-beta. *: 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 脱落膜化処理.