

会長指定シンポジウム 2 子宮内膜機能の調節機構—着床機構の視点から—

子宮内膜間質細胞の cytokine 産生に関する研究

大分医科大学産科婦人科学教室

奈 須 家 栄

Th1/Th2 Cytokines Differentially Regulate the Production of gp130-related Cytokines and Chemokines by Endometrial Stromal Cells

Kaei NASU

Department of Obstetrics and Gynecology, Oita Medical University, Oita

Key words : Th1/Th2 cytokine · gp130-related cytokine · Chemokine · Endometrial stromal cell · Implantation

要旨 子宮内膜は種々の細胞により構成され、月経周期や妊娠に伴って形態的、機能的に変化するとともに、局所における複雑な cytokine network を形成している。このうち子宮内膜間質細胞は種々の cytokine, hormone, growth factor を産生することにより、着床、妊娠の維持に重要な役割を果たしている。

妊娠の維持には Th1/Th2 bias が重要であり、正常妊娠では Th2 優位となる。また、習慣性流産では脱落膜リンパ球の Th1/Th2 bias が異常となる。しかし、各々の Th1/Th2 cytokine の子宮内膜局所における働きはいまだ十分に解明されていない。我々は、局所における cytokine network の一部として働く gp130-related cytokine や chemokine の産生に対する Th1/Th2 cytokine の作用について、培養子宮内膜間質細胞を用いて検討した。

増殖期後期の正常子宮内膜より、子宮内膜間質細胞を分離、培養した。種々の濃度の Th1 cytokine (IL-2, IFN- γ , TNF- β), Th2 cytokine (IL-4, IL-13) を添加し、24 時間後に上清を回収した。ELISA 法を用いて上清中の gp130-related cytokine (IL-6, IL-11, LIF), CXC chemokine (IL-8, GRO α) および CC chemokine (MCP-1, RANTES, eotaxin) 濃度を測定した。その結果、IL-2 は検討したすべての cytokine の産生に影響しなかった。IFN- γ の添加により、子宮内膜間質細胞からの IL-6, MCP-1 および RANTES の産生は増加したが、IL-8 の産生は減少した。TNF- β の添加により、検討したすべての cytokine の産生が濃度依存性に増加した。また、IL-4 の添加により、子宮内膜間質細胞からの IL-6, IL-8 および MCP-1 の産生は濃度依存性に増加したが、RANTES の産生は減少した。IL-13 の添加により、IL-6, IL-8, MCP-1 および eotaxin の産生は濃度依存性に増加したが、IL-11 および LIF の産生は IL-13 の濃度依存性に減少した。

今回の検討結果より、各々の Th1/Th2 cytokine は子宮内膜間質細胞の cytokine 産生に対して固有の作用を有することが判明した。Th1/Th2 cytokine による子宮内膜の cytokine network の調節は非常に複雑であり、子宮内膜内の炎症性細胞の分布や機能を微妙なバランスをとりながら調整することにより、妊娠の成立、維持に必要な局所環境が形成され则认为される。感染や炎症をはじめとするさまざまな原因により、この mechanism に異常が生じた場合、Th1/Th2 cytokine による子宮内膜機能の調節機構のバランスが崩れ、結果として不妊や流産を引き起こすと推察される。Th1/Th2 cytokine をはじめとする子宮内膜機能の調節因子は、そのほとんどが脱落膜だけでなく絨毛からも産生されることから、胎児・母体間の接点において、双方からの調節を受け、着床、妊娠の維持に働くことが示唆される。局所における cytokine network の調節機構に関する詳細な検討により、ヒトの生殖 mechanism がさらに明らかになると考えられる。

緒 言

子宮内膜は子宮内膜間質細胞, 子宮内膜腺上皮細胞, 血管内皮細胞, 炎症性細胞などにより構成され, 月経周期や妊娠に伴って形態的, 機能的に変化するとともに, 局所における複雑な cytokine network を形成している¹⁾²⁾. このうち子宮内膜間質細胞は妊娠時には胎児との接点として, また感染が起こった場合には細菌やウイルスなどの侵入に対するバリアとして, 種々の cytokine, hormone, growth factor を産生することにより, 細菌感染, 月経, 着床, 妊娠の維持などの reproductive process に重要な役割を果たしている. 特に今回検討の対象としている gp130-related cytokine, chemokine については, interleukin (IL)-6³⁾⁴⁾, IL-11⁵⁾, leukemia inhibitory factor (LIF)⁶⁾, oncostatin M⁷⁾, IL-8³⁾⁴⁾, epithelial neutrophil activating peptide 78 (ENA-78)⁸⁾, growth-regulated oncogene (GRO) α ⁹⁾, GRO β ¹⁰⁾, granulocyte chemotactic protein-2¹¹⁾, interferon (IFN)- γ -inducible protein-10¹²⁾, macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1)³⁾⁴⁾, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α ¹³⁾, and MIP-3 α ¹⁴⁾, regulated upon activation, T cell expressed and secreted (RANTES)¹⁵⁾, eotaxin¹⁶⁾などが子宮内膜間質細胞から産生されることが報告されている.

子宮内膜機能の調節因子としては, steroid hormone⁸⁾⁹⁾, prostaglandin や platelet activating factor などの eicosanoid¹³⁾, IL-1, tumor necrosis factor (TNF)- α などの proinflammatory cytokine³⁾をはじめとする多くの物質が報告されている. 子宮内膜は局所の cytokine network に作用するこれらの多くの因子による調節を受け, 月経周期や妊娠に伴って形態的, 機能的に変化し, 着床に対応し, 妊娠を維持する. この調節機構が何らかの原因により障害された場合, 不妊, 流産となると考えられている. 臨床的にも, 感染や炎症の存在が着床や妊娠の維持を障害することは広く知られている.

さらに近年, 主に T リンパ球から産生される IL-2, TNF- β , IFN- γ をはじめとする T helper (Th) 1 cytokine および IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 などの

表 1 着床期における cytokine の働き

- | |
|--------------------------------|
| 1. 炎症性細胞の浸潤, 活性化 |
| 2. T リンパ球の Th1/Th2 への分化誘導 |
| 3. 血管新生 |
| 4. 内膜間質細胞, 腺上皮細胞の分化, 増殖 (脱落膜化) |
| 5. 胚の着床 |
| 6. 絨毛の浸潤 |

Th2 cytokine が, 白血球の機能制御を介して免疫機能を調節することにより, 妊娠の成立, 維持に重要な役割を果たすことがわかってきた¹⁷⁾¹⁸⁾. これらの cytokine は子宮内膜, 脱落膜からだけでなく, 絨毛細胞からも産生されるといわれており, 胎児・母体間の接点における何らかの局所的働きがあると考えられている¹⁹⁾. 妊娠に伴う T リンパ球機能の変化について検討した免疫学的検討から, 妊娠に伴う全身的变化として, 妊娠の維持には Th1/Th2 bias が重要であり, 正常妊娠では Th2 優位となることが知られている²⁰⁾²¹⁾. また, 習慣性流産では脱落膜 T リンパ球の Th1/Th2 bias が異常となることが報告されている²²⁾. しかし, 諸家の報告から, 局所における Th1/Th2 cytokine の作用は複雑であり, 妊娠時の子宮内膜の免疫機能の変化は, 全身的な Th1/Th2 bias を当てはめたのみでは説明できない点も多いと考えられる^{23)~26)}. さらに, これらの Th1/Th2 cytokine の子宮内膜局所における働きはいまだ十分に解明されていない.

我々は, 局所における cytokine network の一部として白血球の機能制御に深く関与する gp130-related cytokine や CXC および CC chemokine の産生調節を介して, Th1/Th2 cytokine が子宮内膜の cytokine network に対して作用すると推測した. 今回のシンポジウムのテーマである, 着床機構の視点からみた子宮内膜機能の調節機構を cytokine の働きから考えると, 表 1 に示すように, 子宮内膜に発現する gp130-related cytokine や chemokine は, 炎症性細胞の浸潤, 活性化, T リンパ球の Th1/Th2 への分化誘導, 血管新生, 内膜間質細胞, 腺上皮細胞の脱落膜化に伴う分化, 増殖, 胚の着床, 絨毛の浸潤などの着床に伴うさまざま

なイベントに関与していることが報告されている。したがって、これらの cytokine の産生調節について検討することにより、着床のメカニズムが解明されと考えられる。

今回、Th1/Th2 cytokine による子宮内膜の cytokine network の制御について明らかにするため、正常月経周期および妊娠時に子宮内膜、脱落膜および絨毛で産生される Th1/Th2 cytokine として IL-2, IFN- γ , TNF- β , IL-4 および IL-13 に着目し、培養子宮内膜間質細胞における gp130-related cytokine (IL-6, IL-11, LIF), CXC chemokine (IL-8, GRO α) および CC chemokine (MCP-1, RANTES, eotaxin) 産生に対する作用について検討した。

方 法

子宮筋腫の手術時に、患者の同意を得て増殖期後期の正常子宮内膜を採取した。Collagenase 処理により子宮内膜間質細胞を分離し、RPMI 1640 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) + 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL) を用いて培養した³⁾。抗 Vimentin 抗体 (V9, Dako, Glostrup, Denmark), 抗 keratin 抗体 (Dako), 抗 factor VIII 抗体 (Dako) および抗 leukocyte common antigen 抗体 (2B11 + PD7/26, Dako) を用いた免疫染色および脱落膜化による prolactin 産生能の検討により、子宮内膜間質細胞であることを確認した。6-well plate (Corning, New York, NY, USA) で培養し、confluent となった子宮内膜間質細胞に IL-2 (0.1 ~ 100 ng/ml) (R&D systems, Minneapolis, MN, USA), IFN- γ (0.01 ~ 100 U/ml) (R&D systems), TNF- β (0.1 ~ 100 ng/ml) (R&D systems), IL-4 (0.1 ~ 100 ng/ml) (R&D systems) および IL-13 (0.1 ~ 100 ng/ml) (R&D systems) を添加 (1 ml/well) し、24 時間後に上清を回収した。RANTES 産生に対する IFN- γ および IL-4 の作用を検討する際には、TNF- α による刺激を同時に行った。ELISA 法 (R&D systems) を用いて上清中の IL-6, IL-11, LIF, IL-8, GRO α , MCP-1, RANTES および eotaxin 濃度を測定した。IL-11, LIF, GRO α , eotaxin に関しては、TNF- β と IL-13 についてのみ検討を行った。

それぞれの ELISA kit の sensitivity は、IL-6 : 0.70 pg/ml, IL-11 : 8.0 pg/ml, LIF : 8 pg/ml,

IL-8 : 4.4 pg/ml, GRO α : 5 pg/ml, MCP-1 : 5.0 pg/ml, RANTES : 8 pg/ml および eotaxin : 5 pg/ml であった。測定結果は mean $\pm$ SD で表し、Bonferroni/Dunn test を用いて統計学的解析を行った。p < 0.05 を統計学的有意とした。

結 果

使用した培養液中には、今回検討した 8 種類のいずれの cytokine も検出されなかった。無刺激の子宮内膜間質細胞の培養上清中には、少量の IL-6, IL-11, LIF, IL-8, GRO α , MCP-1, RANTES および eotaxin が認められた。Th1/Th2 cytokine の刺激による子宮内膜間質細胞からの gp130-related cytokine, CXC および CC chemokine の産生をそれぞれ順に示す。

gp130-related cytokine に対する作用

図 1 に示すように、Th1 cytokine である IFN- γ , TNF- β , Th2 cytokine である IL-4, IL-13 はいずれも、濃度依存性に IL-6 産生を増強した。一方、IL-2 は IL-6 産生に影響しなかった。IL-11 産生は TNF- β 刺激により増強し、IL-13 刺激により抑制された (図 2)。LIF 産生も TNF- β 刺激により増強し、IL-13 刺激により抑制された (図 3)。IL-6, IL-11 および LIF の検討結果から、同じ gp130-related cytokine に属する cytokine に対しても、Th1/Th2 cytokine の作用は、各々異なっていることが示唆された。

CXC chemokine に対する作用

図 4 に示すように、IFN- γ 刺激により IL-8 産生は抑制された。一方、TNF- β , IL-4 および IL-13 は濃度依存性に IL-8 の産生を増強した。また IL-2 は IL-8 産生に影響しなかった。

GRO α 産生は TNF- β 刺激により増強したが、IFN- γ および IL-13 刺激では変化しなかった (図 5)。IL-8 および GRO α の検討結果から、同じ CXC chemokine に属する cytokine に対しても、Th1/Th2 cytokine の作用は、一部異なっていることが示唆された。

CC chemokine に対する作用

図 6 に示すように、IFN- γ , TNF- β , IL-4, IL-13 は、いずれも MCP-1 産生を濃度依存性に促進 delete した。一方、IL-2 は MCP-1 産生に影響しな

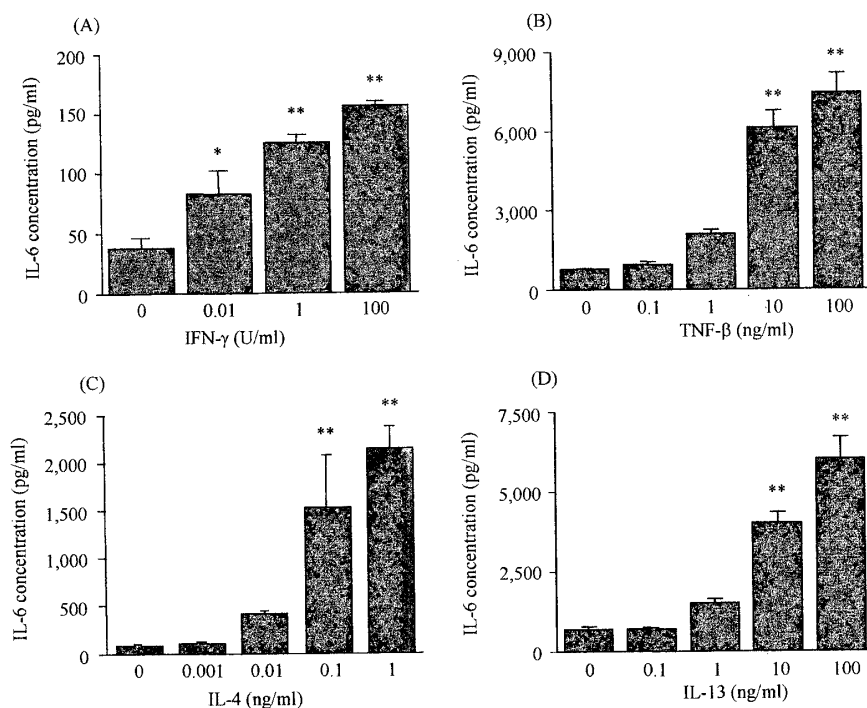


図1 IFN- γ , TNF- β , IL-4 および IL-13 刺激による IL-6 濃度の変化. * $p < 0.001$, ** $p < 0.0001$ vs. unstimulated control (Bonferroni/Dunn test).

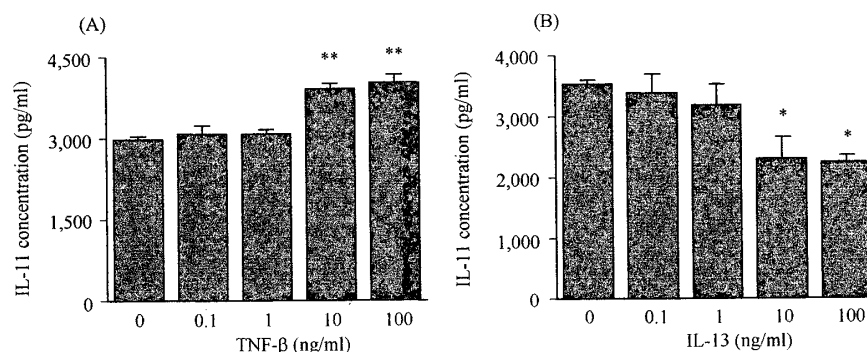


図2 TNF- β および IL-13 刺激による IL-11 濃度の変化. * $p < 0.0025$ and ** $p < 0.0001$ vs. control (Bonferroni/Dunn test).

かった。Eotaxin の産生は、TNF- β および IL-13 の刺激により濃度依存性に増加した(図 7)。TNF- α 刺激により誘導された RANTES の産生は、IFN- γ の添加によりさらに促進したが、IL-4 の添加により抑制された(図 8)。MCP-1, eotaxin および RANTES の検討結果から、同じ CC chemokine に属する cytokine に対しても、Th1/Th2 cytokine の作用は、各々異なっていることが示唆された。

結果のまとめ

Th1/Th2 cytokine 刺激の結果をまとめて表 2 に示す。すべての cytokine についての検討が終了したわけではないが、① IL-2 は検討した gp130-related cytokine, chemokine の産生にまったく影響しなかった。② IFN- γ の添加により、子宮内膜間質細胞からの IL-6, MCP-1 および RANTES の産生は濃度依存性に増加したが、IL-8 の産生は IFN- γ の濃度依存性に減少した。また、IFN- γ は子宮内膜間質細胞からの GRO α の産生に影響しなかつ

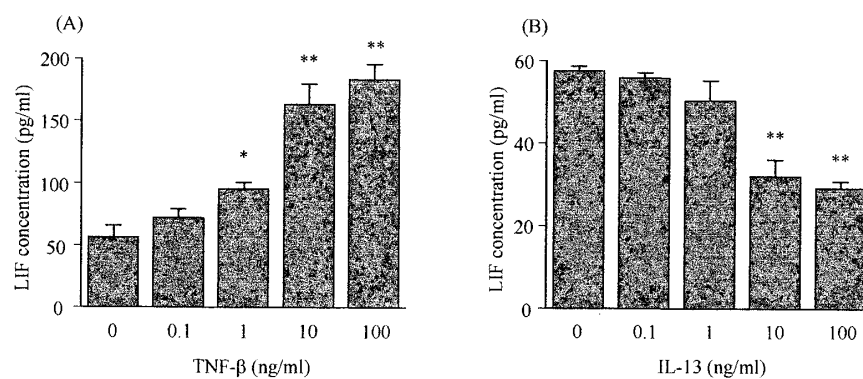


図3 TNF- β および IL-13 刺激による LIF 濃度の変化. * $p < 0.0025$ and ** $p < 0.0001$ vs. control (Bonferroni/Dunn test).

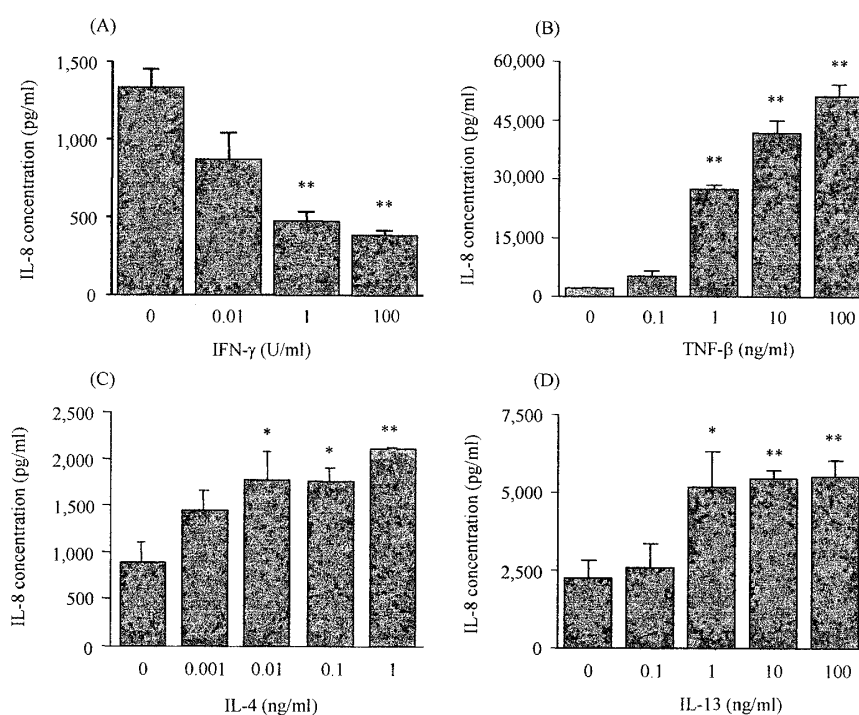


図4 IFN- γ , TNF- β , IL-4 および IL-13 刺激による IL-8 濃度の変化. * $p < 0.001$, ** $p < 0.0005$ vs. unstimulated control (Bonferroni/Dunn test).

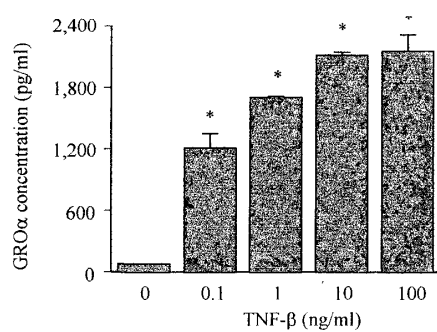


図5 TNF- β 刺激による GRO α 濃度の変化. * $p < 0.0001$ vs. control (Bonferroni/Dunn test).

た. ③TNF- β の添加により, 検討したすべての cytokine の産生が濃度依存性に増加した. ④ IL-4 の添加により, 子宮内膜間質細胞からの IL-6, IL-8 および MCP-1 の産生は濃度依存性に増加したが, RANTES の産生は IL-4 の濃度依存性に減少した. また, IL-4 は子宮内膜間質細胞からの GRO α 産生に影響しなかった. ⑤ IL-13 の添加により, 子宮内膜間質細胞からの IL-6, IL-8, MCP-1 および eotaxin の産生は濃度依存性に増加したが, IL-11

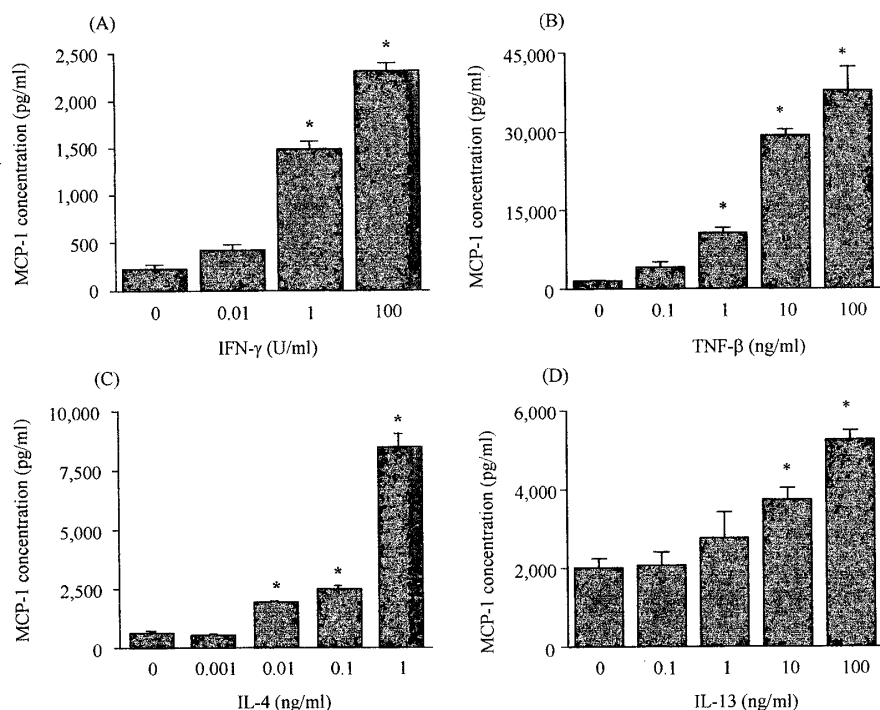


図6 IFN- γ , TNF- β , IL-4 および IL-13 刺激による MCP-1 濃度の変化. * $p < 0.0005$ vs. unstimulated control (Bonferroni/Dunn test).

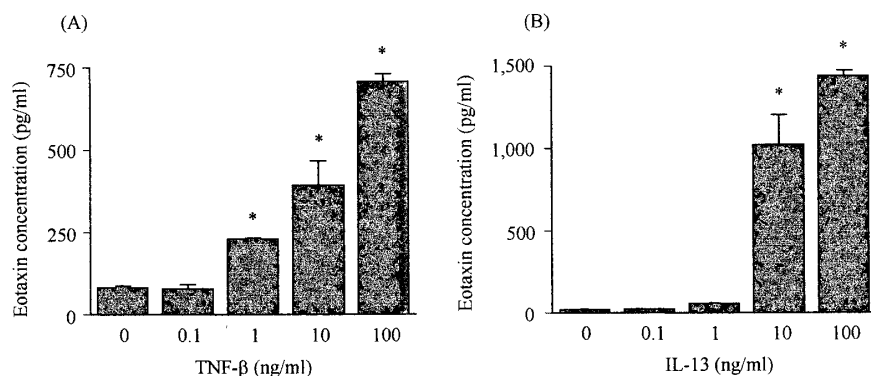


図7 TNF- β および IL-13 刺激による eotaxin 濃度の変化. * $p < 0.0001$ vs. control (Bonferroni/Dunn test).

および LIF の産生は IL-13 の濃度依存性に減少した。また、IL-13 は子宮内膜間質細胞からの GRO α および RANTES の産生に影響しなかった。

IL-6 や MCP-1 のように、IFN- γ と TNF- β , IL-4 と IL-13 が同様の作用を示すものもあったが、IL-8 のように異なった作用を示すものも認められた。さらに同じ gp130-related cytokine, CXC chemokine, CC chemokine の group 内でも、一定の傾向

があるとはいえず、それぞれの Th1/Th2 cytokine に対する反応は異なっていた。

考 察

今回の検討より、Th1 cytokine である IFN- γ と TNF- β , および Th2 cytokine である IL-4 と IL-13 は、子宮内膜間質細胞の gp130-related cytokine や chemokine 産生を調節することにより、子宮内膜における cytokine network の一部として機能

していると考えられる⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾。この点に関しては、IFN- γ 、TNF- β 、IL-4、IL-13がいずれも子宮内に発現していることから¹⁹⁾、推測された通りの結果である。特にIFN- γ に関しては、文献的にIFN- γ の刺激によりIL-8産生が亢進する細胞群と、抑制される細胞群があり⁴⁾、今回の内膜間質細胞の実験結果は非常に興味深い。また、正常子宮内膜には好中球が浸潤する機会が少ないが、IFN- γ によるIL-8の産生抑制が関与している可能性が示唆される⁴⁾。さらに、着床期の子宮内膜ではIFN- γ が一過性に発現するなど、Th1/Th2 cytokineの発現に時間的、量的な変化が起こることから²⁷⁾、Th1/Th2 cytokineによる着床期の子宮内膜間質細胞のcytokine産生の調節は非常に複雑であると推測される。

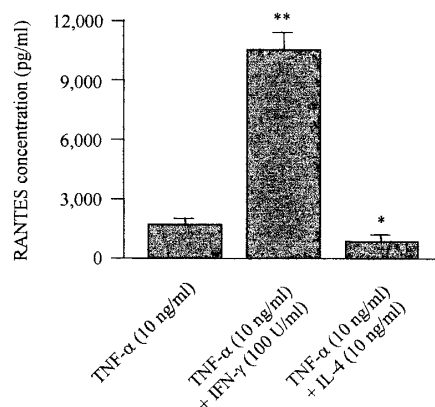


図8 IFN- γ およびIL-4とTNF- α の同時刺激によるRANTES濃度の変化。* $p < 0.025$, ** $p < 0.0001$ vs. TNF- α -stimulated control (Bonferroni/Dunn test)。

Th1/Th2 biasがTh2優位となることが、妊娠の維持に重要であるといわれている¹⁷⁾。IL-2、IFN- γ およびTNF- β は同じTh1 cytokineに属することから、同様の作用を有するのではないかと考えられたが、今回の検討結果より、子宮内膜間質細胞のcytokine産生に関しては多くの点で異なる作用を有していることが判明した。また、同じTh2 cytokineに属するIL-4とIL-13に関しても同様の結果が得られた。IFN- γ 、TNF- β 、IL-4、IL-13をはじめとするTh1/Th2 cytokineは子宮内膜間質細胞のcytokine産生を調節することにより、脱落膜内の炎症細胞の機能や分布をコントロールし、着床機能・妊娠維持に重要な役割を果たすと考えられるが、本研究の結果から、同じgroup内のTh1/Th2 cytokineでも子宮内膜間質細胞に対する働きの一部は異なっており、子宮内膜におけるTh1/Th2 cytokineの局所作用はこれまで考えられてい

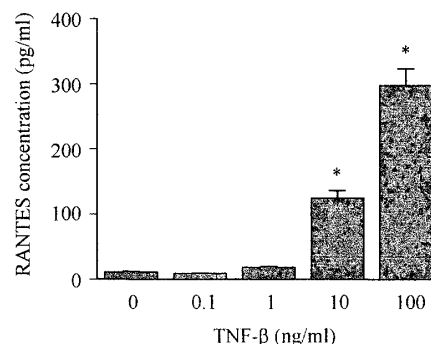


図9 TNF- β 刺激によるRANTES濃度の変化。* $p < 0.0001$ vs. control (Bonferroni/Dunn test)。

表2 結果のまとめ

	Th1 cytokine			Th2 cytokine	
	IL-2	IFN- γ	TNF- β	IL-4	IL-13
IL-6	→	↑	↑	↑	↑
IL-11	NE	NE	↑	NE	↓
LIF	NE	NE	↑	NE	↓
IL-8	→	↓	↑	↑	↑
GRO α	→	→	↑	NE	→
MCP-1	→	↑	↑	↑	↑
RANTES	NE	↑	↑	↓	→
Eotaxin	NE	NE	↑	NE	↑

NE : not examined

た以上に複雑であり、全身の見地から考えられた Th1/Th2 bias の仮説のみでは説明できない点も多いと考えられる。子宮内膜の cytokine network の全容の解明には子宮内膜内の間質細胞以外の細胞に対する働きを含め、さらに詳細な検討が必要である。

子宮内膜に対して作用する Th1/Th2 cytokine はそれぞれ固有の作用を示すことにより、子宮内膜内の gp130-related cytokine や chemokine 産生を微妙なバランスをとりながら調整していると思われる。例えば、gp130-related cytokine に関しては、IL-6, IL-11, LIF はいずれも脱落膜化、着床の過程で重要な働きを有すると考えられているが、それぞれの作用がわずかに異なるため、特異的な調節が必要だと推測される。さらに、炎症性 mediator, steroid hormone などのさまざまな因子による修飾を受けて子宮内膜間質細胞から産生された gp130-related cytokine や chemokine は、炎症性細胞の機能や分布を調節するとともに、内膜間質細胞自身や子宮内膜腺上皮細胞、血管内皮細胞などのその他の細胞に対しても、細胞機能の調節因子として paracrine/autocrine 的に作用し、正常月経周期における子宮内膜の形態的、機能的変化を制御し、着床および妊娠の維持に必要な局所環境が成立していると考えられる。

Cytokine network の視点から考えると、感染や炎症をはじめとするさまざまな原因により、この mechanism に何らかの異常が生じた場合、Th1/Th2 cytokine による子宮内膜機能の調節機構のバランスが崩れ、結果として月経異常や不妊、流産などの病態を引き起こすと推察される。Th1/Th2 cytokine をはじめとする子宮内膜機能の調節因子は、そのほとんどが脱落膜だけでなく絨毛からも産生されることから、胎児・母体間の接点において、双方からの調節を受け、着床、妊娠の維持に働くことが示唆される。今回は各々の gp130-related cytokine, chemokine の子宮内膜に対する作用については検討を行っていないが、Th1/Th2 cytokine を含め、局所における cytokine network の調節機構に関する詳細な検討により、着床の mechanism がさらに明らかになると考えられる。

結 語

着床のための子宮内膜機能の調節機構の一つとして、子宮内膜の cytokine network の調節が重要であると考えられる。今後の研究の発展により、着床機構の詳細が明らかになることを期待する。

謝 辞

第 55 回日本産科婦人科学会学術講演会 会長指定シンポジウム 2 「子宮内膜機能の調節機構—着床機構の視点から—」において講演の機会を与えていただきました会長の中野仁雄教授ならびに関係の諸先生方、座長の労をお取りいただきました武谷雄二教授、玉舎輝彦教授に深謝いたします。

また、研究、発表にあたり多大な御指導、御協力を頂きました宮川勇生教授、共同研究者の方々に謹んで感謝いたします。

共同研究者(敬称略)

宮川勇生、植原久司、吉松 淳、河野康志、藤澤佳代、菅野輝勝、有馬和代、嶺真一郎、福田淳一郎、孫 兵、上田多美、江藤雅子、西田正和

文 献

1. Chard T. Cytokines in implantation. Hum Reprod Update 1995; 1: 385—396
2. Garcia-Velasco JA, Arici A. Chemokines and human reproduction. Fertil Steril 1999; 71: 983—993
3. Nasu K, Matsui N, Narahara H, Tanaka Y, Takai N, Miyakawa I, Higuchi Y. MaMi, a human endometrial stromal sarcoma cell line that constitutively produces interleukin (IL)-6, IL-8, and monocyte chemoattractant protein-1. Arch Pathol Lab Med 1998; 122: 836—841
4. Nasu K, Matsui N, Narahara H, Tanaka Y, Miyakawa I. Effects of interferon- γ on cytokine production by endometrial stromal cells. Hum Reprod 1998; 13: 2598—2601
5. Cork BA, Li TC, Warren MA, Laird SM. Interleukin-11 (IL-11) in human endometrium: expression throughout the menstrual cycle and the effects of cytokines on endometrial IL-11 production in vitro. J Reprod Immunol 2001; 50: 3—17
6. Arici A, Engin O, Attar E, Olive DL. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80: 1908—1915
7. Ohata Y, Harada T, Fujii A, Yoshida S, Iwabe T, Terakawa N. Menstrual cycle-specific inhibition

- of endometrial stromal cell proliferation by oncostatin M. *Mol Hum Reprod* 2001 ; 7 : 665—670
8. *Nasu K, Arima K, Kai K, Fujisawa K, Nishida M, Miyakawa I.* Expression of epithelial neutrophil-activating peptide 78 in cultured endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2001 ; 7 : 453—458
 9. *Nasu K, Fujisawa K, Arima K, Kai K, Sugano T, Miyakawa I.* Expression of growth-regulated oncogene α in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2001 ; 7 : 741—746
 10. *Fukuda J, Nasu K, Sun B, Mine S, Kawano Y, Miyakawa I.* Expression of growth-regulated oncogene β in an endometrial epithelial cell line, HHUA, and cultured human endometrial stromal cells. *J Reprod Immunol* (in press)
 11. *Mine S, Nasu K, Fukuda J, Bing S, Miyakawa I.* Secretion of granulocyte chemotactic protein-2 by cultured human endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2003 ; 79 : 146—150
 12. *Kai K, Nasu K, Nakamura S, Fukuda J, Nishida M, Miyakawa I.* Expression of interferon- γ -inducible protein-10 in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2002 ; 8 : 176—180
 13. *Nasu K, Narahara H, Matsui N, Kawano Y, Tanaka Y, Miyakawa I.* Platelet-activating factor stimulates cytokine production by endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 1999 ; 5 : 548—553
 14. *Sun B, Nasu K, Fukuda J, Mine S, Nishida M, Miyakawa I.* Expression of macrophage inflammatory protein-3 α in an endometrial epithelial cell line, HHUA, and cultured human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2002 ; 8 : 930—933
 15. *Arima K, Nasu K, Narahara H, Fujisawa K, Matsui N, Miyakawa I.* Effects of lipopolysaccharide and cytokines on the production of RANTES by cultured human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2000 ; 6 : 246—251
 16. *Hornung D, Dohrn K, Sotlar K, Greb RR, Wallwiener D, Kiesel L, Taylor RN.* Localization in tissues and secretion of eotaxin by cells from normal endometrium and endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 ; 85 : 2604—2608
 17. *Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR.* Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship : Is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993 ; 14 : 353—356
 18. *Raghupathy R.* Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 1997 ; 18 : 478—482
 19. *Haynes MK, Jackson LG, Tuan RS, Shepley KJ, Smith JB.* Cytokine production in first trimester chorionic villi : detection of mRNAs and protein products in situ. *Cell Immunol* 1993 ; 151 : 300—308
 20. *Marzi M, Vigano A, Trabatttoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, Clerici M.* Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1996 ; 106 : 127—133
 21. *Matthiesen L, Ekerfelt C, Berg G, Ernerudh J.* Increased numbers of circulating interferon- γ and interleukin-4-secreting cells during normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1998 ; 39 : 362—367
 22. *Piccinni M-P, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Ronagnani S.* Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nature Med* 1998 ; 4 : 1020—1024
 23. *Dudley DJ.* Recurrent pregnancy loss and cytokines. Not as simple as it seems. *J Am Med Assoc* 1995 ; 273 : 1958—1959
 24. *Vives A, Balasch J, Yagüe J, Quintó L, Ordi J, Vanrell JA.* Type-1 and type-2 cytokines in human decidual tissue and trophoblasts from normal and abnormal pregnancies detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Am J Reprod Immunol* 1999 ; 42 : 361—368
 25. *Nasu K, Sugano T, Fujisawa K, Arima K, Narahara H, Miyakawa I.* Effects of interleukin-4 on the in vitro production of cytokine by human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2001 ; 7 : 265—270
 26. *Nasu K, Fukuda J, Sun B, Nishida M, Miyakawa I.* Interleukin-13 and tumor necrosis factor- β differentially regulate the production of cytokines by cultured human endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2003 ; 79(S1) : 821—827
 27. *Kayisli UA, Mahutte NG, Arici A.* Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology. *Am J Reprod Immunol* 2002 ; 47 : 213—221

Abstract

Human endometrial stromal cells (ESC) produce and secrete a variety of gp130-related cytokines and chemokines, including interleukin (IL)-6, IL-11, leukemia inhibitory factor (LIF), oncostatin M, IL-8, epithelial neutrophil activating peptide 78, growth-regulated oncogene (GRO) α , GRO β , interferon (IFN) γ -inducible protein-10, macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-3 α , regulated upon activation, T cell expressed and secreted (RANTES), and eotaxin. The expression of these cytokines is regulated by immune modulators such as IL-1, tumor necrosis factor (TNF)- α , platelet-activating factor, and prostaglandins, as well as ovarian steroid hormones. It is thought to be important during the menstrual cycle, at implantation, and in the maintenance of early pregnancy.

The response of T-helper (Th) cells upon activation is characterized functionally according to the cytokines they produce, which are roughly divided into two subsets: type 1 cells (Th1) and type 2 cells (Th2). A T-helper (Th) 1/Th2 model has been applied to as a system regulating the cytokine network in human reproductive processes. Normal pregnancy has been suggested to involve a Th2-dominant situation, which is characterized by a lack of strong maternal cell-mediated anti-fetal immunity with the humoral immune response being dominant. Decrease of Th2 lymphocytes in the decidua has been demonstrated in women with unexplained recurrent spontaneous abortions in comparison with that of women with normal gestation. However, it is suggested that the Th1/Th2 concept is probably too simplistic to explain some of the clinical and local processes.

To evaluate the effects of Th1 cytokines and Th2 cytokines on the production of gp130-related cytokines CXC chemokines and CC chemokines by ESC, we used the primary culture of ESC in vitro. Normal specimens of endometrium in the late proliferative phase were obtained, with informed consent, from premenopausal Japanese women who had undergone hysterectomy for intramural leiomyoma. Normal ESC were separated and cultured on 6-well culture plates until fully confluent. The concentrations of IL-6, IL-11, LIF, IL-8, GRO α , MCP-1, RANTES, and eotaxin in the culture media of ESC were measured using enzyme-linked immunosorbent assays following the addition of recombinant human IL-2, IFN- γ , TNF- β , IL-4, and IL-13, which have been demonstrated in the endometrium.

Small amounts of IL-6, IL-11, LIF, IL-8, GRO α , MCP-1, RANTES and eotaxin were detected in the culture medium of non-stimulated ESC incubated for 24 h. IL-2 did not affect the concentration of IL-6, IL-8, or MCP-1. IFN- γ stimulated the production of IL-6, MCP-1, and RANTES by ESC. Whereas, IL-8 production by these cells was suppressed by the addition of IFN- γ . TNF- β increased the concentration of all eight cytokines. IL-4 stimulated the production of IL-6, IL-8, and MCP-1. In contrast, TNF- α -induced production of RANTES was suppressed by IL-4. The levels of IL-6, IL-8, MCP-1, and eotaxin increased with the addition of IL-13. Whereas, the levels of IL-11 and LIF decreased with the addition of IL-13.

These results suggest that Th1/Th2 cytokines secreted in the cyclic endometrial tissue and in the decidua may differentially regulate the production of gp130-related cytokines and chemokines by ESC. The controlled expression of these cytokines in the local environment may contribute to the modulation of the immune reaction during the menstrual cycles, implantation, and in early pregnancy by the regulation of leukocyte trafficking and functions. These findings may provide insights into the mechanism involved in the recruitment of inflammatory cells into the endometrium during normal and pathological human reproductive processes of implantation period.