

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07767

研究課題名(和文) 子宮由来シグナル因子により誘導される胚盤胞活性化の機序に関する研究

研究課題名(英文) Study on mechanisms of blastocyst activation induced by uterine-derived factors

研究代表者

金野 俊洋 (KONNO, Toshihiro)

琉球大学・農学部・准教授

研究者番号：60568260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、子宮由来シグナル因子による胚盤胞活性化機序の解明を目的とした。着床の成立には胚盤胞活性化と子宮の胚受容能獲得が同時に進行する必要があるが、この胚・子宮間の同調に介在する機序は未だ明らかでない。マウスの着床期子宮はエストロゲンの一時的な血中濃度上昇により胚受容能を獲得する。そこで本研究では、エストロゲン依存的に子宮より分泌され、胚盤胞活性化を誘導する因子の同定を試み、オステオポンチンとフィブロネクチンを同定した。これら細胞外基質タンパク質は胚盤胞のインテグリンを受容体として着床期の胚発生に重要な役割を有していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the mechanism(s) of blastocyst activation for implantation. Precise coordination of blastocyst and uterine endometrial competencies is essential for successful implantation. Mechanisms coordinating the activation of blastocyst and uterine receptivity for embryo implantation are largely unknown. Receptive status of uterine endometrium is confined to a specific interval during gestation referred to as "window of embryo implantation receptivity". In mice, this receptive period is controlled by ovarian estrogen. In this study, we explored the uterine-derived factors responsible for blastocyst activation and osteopontin and fibronectin are identified as possible candidates of estrogen-dependent signals from uterus to induce blastocyst activation. Ligation of these extra-matrix proteins with integrins at the blastocyst surface may play an important role in embryonic development during implantation.

研究分野：生殖生理学

キーワード：着床 胚盤胞 子宮内膜 エストロゲン 胚受容能

1. 研究開始当初の背景

我が国では 10%のカップルが不妊症・不育症に悩み、少子化への拍車をかける要因のひとつともなっている。体外受精胚移植法の発展により男性因子および卵管因子を原因とする不妊症の妊娠率は飛躍的に向上したが、胚盤胞期以降の発生および着床の不全を原因とする不妊症症例に対する有効な治療戦略は未だに確立されていない。またひとたび妊娠が成立しても、胎盤の形成不全は妊娠高血圧症候群や子宮内胎児発育制限をもたらす、母体の生命を脅かすだけでなく児の生涯にわたる健康を障害することも知られる。産業動物においても不受胎による経済的損失は大きな問題である。我が国におけるウシの繁殖はほぼ 100%が人工授精によるものであるが、その受胎率は年々低下傾向にあり、人工授精によるウシの受精率は約 90%であるが分娩に至るのは約 55%、特に泌乳能力の高いホルスタインにおいては約 40%に過ぎない。

ヒトやマウスの胚は胚盤胞を形成したのち子宮に着床する。ウシやヒツジの胚は胚盤胞形成後に栄養外胚葉が著しく伸長するエロンゲーションを経て子宮壁に接着する。ミンクヤアザラシなど一部の動物種では、胚盤胞は子宮内で浮遊状態を保ち、母体の条件が整ったのちに子宮へ着床する着床遅延が見られる。マウスやラットでは卵巣除去とプロゲステロン投与により人為的に着床遅延を誘導する着床遅延モデルが確立している。近年、ヒツジの胚盤胞も、着床遅延マウスの子宮内では休止状態となることが報告され、胚盤胞休止は着床遅延動物のみに見られる形質ではなく、多くの動物種の胚で保存された形質であり、胚発生が胚盤胞期より先に進行するためには適切な子宮内環境、すなわち胚発生を促進する子宮由来因子が必要であることが示唆された。

着床期特異的に子宮より分泌され胚盤胞期以降の胚発生を促進、すなわち胚盤胞を活性化する因子は未だ不明であり、その同定と作用の解明はヒトの不妊症に対する治療戦略の確立や産業動物の効率的な生産への応用に有用な知見をもたらすことが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、マウスをモデルに用いて胚盤胞を活性化する子宮由来因子を同定することを目的とした。

ウシやヒツジの胚盤胞は透明帯から脱出後エロンゲーション胚となるが、胚盤胞の体外でエロンゲーションを誘導する培養法は現在まで未確立である。一方で、ヒトやマウスの胚盤胞は透明帯から脱出後速やかに子宮壁に接着・浸潤するため、胚盤胞期以降の胚発生を観察することは容易ではない。このため、活性化に伴い胚盤胞に起きる生理的現象は未だ不明である。胚盤胞が子宮に着床するためには栄養外胚葉細胞がその頂端面に接

着性を獲得する必要がある。我々はマウスにおいてエストロゲン依存的に着床期の子宮腺より分泌されるオステオポンチンが胚盤胞栄養外胚葉のインテグリンを活性化し、これにより胚盤胞が着床期特異的に接着性を獲得することを明らかにした。しかし、オステオポンチン欠損マウスは妊孕性を有しており、胚盤胞の着床に向けた活性化には着床期子宮よりエストロゲン依存的に分泌される複数の因子が冗長的に作用すると考えられる。

本研究では胚盤胞の接着性を胚盤胞活性化の指標として捉え、胚盤胞のインテグリン活性化に介在する細胞内シグナリングの同定と、そのリグナリングを活性化しうる子宮由来因子の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1)胚盤胞の接着性活性化に介在する細胞内シグナリングの同定: 妊娠 3.5 日齢の ICR マウス子宮より胚盤胞を回収し、オステオポンチン添加培養液中で培養後、リン酸化特異的抗体を用いた western blotting 法により FAK, AKT および MAPK のリン酸化状態を解析した。また、胚盤胞のオステオポンチン添加培養中に FAK, PI3K および MAPK に対する低分子阻害剤(それぞれ、PF-573228, LY-294002 および PD-98059)を添加し、western blotting により各シグナル伝達物質のリン酸化を評価、さらにローダミン・フィブロネクチン法により胚盤胞の接着性を評価することにより、胚盤胞の接着性活性化に介在する細胞内シグナリング経路を明らかにした。

(2)胚盤胞活性化を誘導する子宮由来因子の探索: マウスの妊娠子宮は卵巣由来ステロイドホルモンの制御を受けており、プロゲステロンによる感作を受けた子宮はエストロゲン血中濃度の一過性上昇により胚受容能を獲得する。この子宮内膜の胚受容能獲得にはエストロゲン依存的に発現する白血病阻止因子(leukemia inhibitory factor, LIF)とその下流シグナルである STAT3 が重要な役割を有している。そこで本研究では、妊娠 3.5 日齢における子宮内膜上皮細胞の遺伝子発現を STAT3 欠損マウスと野生種マウスとで比較したマイクロアレイデータ(NCBI ArrayExpress: E-GEOD-44087)を解析し、STAT3 依存的に着床期の子宮内膜上皮より発現され胚盤胞に作用するリガンドとなりうる分泌性タンパクの探索を行った。胚盤胞における受容体発現の参照データには、胚の遺伝子発現を解析したマイクロアレイデータ(NCBI ArrayExpress: E-GEOD-7309)を用いた。マイクロアレイデータの解析により得られた胚盤胞の活性化を誘導する子宮由来因子の候補について、その発現を妊娠 3.5 および 4.5 日齢のマウス子宮、およびエストロゲン受容体阻害剤(ICI 182,780)を投与した妊娠 4.5 日齢マウス子宮を用いて RT-PCR、

western blotting 法、および免疫蛍光法により検証した。

4. 研究成果

(1) 胚盤胞の接着性活性化に介在する細胞内シグナリングの同定: オステオポンチンはそのアミノ酸配列中に Arg-Gly-Asp(RGD)配列を有し、RGD 配列を認識するインテグリンヘテロダイマーと結合する。インテグリンとそのリガンドとの結合は、FAK を介して多様な生理作用を誘導することが知られる。オステオポンチン添加培養液中で胚盤胞を培養すると、FAK のリン酸化が増加することから、胚盤胞においてもオステオポンチンとインテグリンの結合は FAK を介して細胞内にシグナルを伝達することが示された。FAK の下流で活性化することが知られる AKT と MAPK も、胚盤胞をオステオポンチン処置することでリン酸化が増加した。FAK の低分子阻害剤である PF-573228 を添加するとオステオポンチンによる AKT と MAPK のリン酸化増加は阻害されることから、オステオポンチンは胚盤胞のインテグリンと結合し、FAK を介して PI3K/AKT シグナリングと MAPK シグナリングを活性化することが示された。また、PF-573228 と PI3K に対する低分子阻害剤である LY-294002 はそれぞれオステオポンチンによる胚盤胞の接着能活性化を阻害したが、MAPK に対する低分子阻害剤である PD-98059 は胚盤胞の接着能活性化に影響しなかったことから、オステオポンチンは FAK を活性化し、その下流の PI3K/AKT シグナリングを介して接着能を活性化することが確認された。MAPK は栄養膜幹細胞の自己増殖に重要な役割を有しており、PI3K/AKT は栄養膜細胞系列への分化、とくに浸潤性に関わる遺伝子の発現に関与することが知られる。このため、オステオポンチンとインテグリンの結合は MAPK シグナリングを介して栄養外胚葉細胞の増殖を、PI3K/AKT シグナリングを介して栄養膜細胞系列への分化を、それぞれ誘導している可能性が考えられる。そこで、胚盤胞をオステオポンチン添加培養液中で 60 分間および 90 分間培養し、栄養外胚葉の細胞増殖に及ぼす影響を EdU 取り込み法と Ki67 免疫蛍光法により検証したが、オステオポンチンによる栄養外胚葉の細胞増殖への影響は検出されなかった。また、細胞の浸潤性獲得の初期現象として知られる E-カドヘリンの現象や細胞極性の現象も確認されなかった。胚盤胞のインテグリン-リガンド結合による FAK を介した胚盤胞活性化の可能性については、さらなる実験条件の最適化とより詳細な検証が必要である。

(2) 胚盤胞活性化を誘導する子宮由来因子の探索: Stat3 欠損マウスの妊娠 3.5 日齢子宮内膜上皮細胞における遺伝子発現を解析したマイクロアレイデータを解析し、Stat3 欠損により発現量が 1/2 以下になる遺伝子を

1409 遺伝子、このうち翻訳産物の局在が細胞外である遺伝子を 80 遺伝子同定した。これらの遺伝子のうち、その転写産物がそれらの受容体を介して標的細胞の MAPK もしくは PI3K/AKT シグナリングを活性化しうるものを KEGG データベースで探索した結果、10 遺伝子が抽出された。KEGG データベースに記載がなかった 37 遺伝子については、文献情報を元に MAPK および PI3K/AKT シグナリングを活性化しうる遺伝子を探索し、17 遺伝子が抽出された。これら合計 27 遺伝子のうち、胚盤胞においてその転写産物に対する受容体が発現しているものは 13 遺伝子、また受容体が不明であるものは 7 遺伝子あり、これら合計 20 遺伝子を胚盤胞活性化の子宮由来因子候補とした。しかしながら、これら 20 遺伝子のうちその発現のエストロゲン依存性が RT-PCR により明確に確認できたのは Spp1(オステオポンチンをコードする遺伝子)のみであった。RT-PCR に用いた mRNA は子宮全体から抽出したものであり子宮内膜間質由来の mRNA も含む。そこで、発現量の多い 10 遺伝子についてはさらに免疫蛍光法による検証を行ったが、子宮内膜上皮でタンパク質発現が確認された遺伝子は Spp1, Fn1, Cxcl14 のみであった。Cxcl14 はそのタンパク質発現に個体差が大きく、まったく発現が確認されない個体も多く存在した。Spp1 については、我々がすでに報告したエストロゲン依存的な子宮腺からの分泌と一致する結果が得られた。Fn1 はフィブロネクチンをコードする遺伝子で、フィブロネクチンはオステオポンチンと同様にそのアミノ酸配列中に RGD 配列を含む細胞外気質タンパク質の一種であり、本研究ではその子宮内膜上皮におけるエストロゲン依存的な発現が免疫蛍光法に確認された。また、胚盤胞の体外培養へのフィブロネクチンの添加は、オステオポンチンと同様に FAK および PI3K/AKT シグナリングの活性化を介して胚盤胞の接着性を誘導した。子宮内膜上皮で産生されるフィブロネクチンが子宮管腔内に分泌されるか否かは、さらなる検証が必要である。マイクロアレイデータの解析による結果の多くは RT-PCR などによる再現性が確認されなかった。この原因にはマウス品種間差異やマイクロアレイサンプルへの間質細胞の混入などが考えられる。マイクロアレイデータにより抽出された遺伝子にはケモカインや炎症に関与するサイトカインが多く含まれていたが、Stat3 は IL-6 受容体ファミリーの下流で様々な遺伝子発現を制御することが知られている。マイクロアレイに用いた mRNA は子宮から単離した子宮内膜上皮細胞より抽出したものであり、この単離プロセスで誘導される炎症反応により生体の子宮とは異なる遺伝子発現が誘導されている可能性も考えられる。

(3) 胚盤胞接着性の部位特異性: オステオポンチンにより胚盤胞で活性化する細胞内シ

グナリングを同定する過程で我々は、胚盤胞の接着能活性化が常に壁側栄養外胚葉に限定的であること、すなわち極栄養外胚葉は接着性を示さないことを見出した。マウスにおいては、壁側栄養外胚葉の細胞は着床に伴い浸潤性を獲得し一次栄養膜巨細胞へと分化する。これにたいして極栄養外胚葉の細胞は増殖して外胎盤錘を形成し、後の胎盤形成に与る。外胎盤錘の形成には内部細胞塊に由来する FGF4 が重要な役割を有している。FGF4 はまた、栄養膜幹細胞の自己増殖に必須である。そこで我々は、内部細胞塊に由来する FGF4 が胚盤胞の部位特異的な接着性獲得に参与している可能性を検証し、オステオポンチンによる壁側栄養外胚葉の接着性獲得は FGF4 を添加することにより阻害されること、また、FGF4 はオステオポンチンとインテグリンの結合による AKT のリン酸化を阻害することを明らかにした。しかし、壁側栄養外胚葉において見られる FGF4 の接着性獲得阻害機序が極栄養外胚葉でも同様に作用しているかどうかは不明であり、また、FGF4 がインテグリンの活性化を阻害するのか、インテグリンの細胞内局在に影響するのかも不明であり、今後さらなる検証が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

建本秀樹・船曳美和・佐渡山祐希・上原みなみ・金野俊洋・山中賢一・沖繩在来ブタアグーの精液輸送時ならびに精子凍結時における トコフェロールと アスコルビン酸の同時処理による凍結融解精子性状の改善効果. 日本暖地畜産学会報. 査読有, 2017;60(2):111-120.

Tomoko Minakawa, Keiichi Ueda, Miyuu Tanaka, Natsuki Tanaka, Mitsuru Kuwamura, Takeshi Izawa, Toshihiro Konno, Jyoji Yamate, Eiko Nakagawa Itano, Ayako Sano, and Shinpei Wada. Detection of Multiple Budding Yeast Cells and a Partial Sequence of 43-kDa Glycoprotein Coding Gene of *Paracoccidioides brasiliensis* from a Case of Lacaziosis in a Female Pacific White-Sided Dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). *Mycopathologia*. 査読有, 2016;181(7-8):523-529.

[学会発表](計1件)

Ichiko Nishi, Fumie Kawase, Tomomi Kurane, Keiichiro Ohta, Hideki Tatemoto and Toshihiro Konno. Mural trophoctoderm specific activation of adhesion competence in

peri-implantation murine blastocyst., The 4th World Congress of Reproductive Biology, September 2017.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金野 俊洋 (KONNO, Toshihiro)

琉球大学・農学部・准教授

研究者番号: 60568260