

令和元年5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06640

研究課題名(和文) エピゲノムに着目した着床における胚と子宮の相互作用の解析

研究課題名(英文) Analysis of the interaction between embryo and uterus during the preimplantation period based on epigenome

研究代表者

原口 広史 (Haraguchi, Hirofumi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50804506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：着床直前の胚のDNAメチル化の変化は不明であるため、マウスの胚の活性化前後を解析したところ、発現変化した遺伝子の多くはメチル化に差があり、メチル化による発現変化が示唆された。マウスの子宮の解析では、胚接着部位は非接着部位に比べ10倍以上の発現変化した遺伝子数が3倍程度であったことから、胚接着が大きな遺伝子発現変化を誘導したことが示された。着床前に、不妊治療や避妊に用いられるプロゲステンを高容量投与したところ、着床障害が見られ、着床に必須であるLIFが低下し、LIFを投与で、着床障害率は改善した。このことから、プロゲステンが着床直前の子宮のLIFを低下させ着床を阻害する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

着床機構の解明は生命科学の研究対象として興味深いだけではなく、臨床生殖医学の見地からも重要である。今回の成果は、未だ詳細がわかっていない着床機構の解明につながる可能性がある。また、少子化が叫ばれている近年の社会情勢は不妊症治療が必要となっており、今回の成果が、不妊治療の更なる発展や、新規の避妊法の開発、生殖医療における卵巣ホルモンの適正使用の向上につながる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Since changes of DNA methylation in embryos just before implantation are unknown, we investigated DNA methylation of mouse embryos between before and after activation. Many of the genes whose expression has changed have differences in DNA methylation. This result was suggested that expression changes due to methylation during preimplantation period. In the analysis of mouse uterus, implantation site was about three times as many as the number of genes whose expression was changed compared to non-implantation site. It was shown that implantation induced large gene expression changes in uterus. Progesterin is used for infertility treatment and contraception. When we administered high doses of progesterin before implantation, implantation failure was observed, and LIF, which is essential for implantation, was reduced. Implantation failure of this model was improved by administration of LIF. These results indicate that excessive progesterin may reduce LIF in the uterus and inhibit implantation.

研究分野：生殖

キーワード：妊娠・着床 エピゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣から排卵した卵子は卵管内で精子と受精した後、卵割を行い、着床直前に子宮内に移入し、子宮による作用によって胚が活性化し着床能を獲得し、子宮への接着反応を開始し、着床によりトロフェクトダームおよび ICM の細胞分化が加速する。胚のエピゲノム変化として、着床を契機に胚の DNA メチル化がダイナミックに促進されることがヒト・マウスともわかっている (Smith ZD, Nature 2012; Guo H, Nature 2014)。着床直前という、初期胚発生の後半の過程において、子宮 胚間の協調的な作用が重要と考えられているが、その分子・細胞の作用メカニズムについての詳細は不明のままである。研究代表者は着床直前の子宮における microRNA による着床能の制御についての報告 (Haraguchi H, et al. Mol Endocrinol 2014) をしており、着床直前における胚と子宮のエピゲノム調節に着目した。着床までの過程における胚自身の研究は進んでいるものの、子宮と胚という相互作用の観点の研究はこれまで十分に行われてこなかった。

2. 研究の目的

齧歯類の研究から、初期胚の発生は子宮からの刺激がなければ胚盤胞の状態（休眠状態 (dormancy)）になって止まるが、エストロゲンの刺激を子宮が受けると、子宮内膜からの何らかの生理活性物質の分泌によって胚は活性化し、胚の接着反応が開始するという、胚盤胞活性化 (activation) の機構が存在すると考えられている。本研究では、「卵巣ホルモンによる子宮内膜の着床能の獲得 子宮内膜による胚盤胞活性化 子宮への胚の接着反応」の過程の分子メカニズムを、マウスを用いてエピゲノムの観点から検討し、子宮と胚のエピゲノム変化が機能的にどのように胚着床と関わっているかについて明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1)着床直前の胚と子宮内膜の RNA の発現と、DNA メチル化・ヒストン修飾を解析する。エピゲノム制御による子宮と胚の相互作用を解析する。
(2)卵巣ホルモンが子宮に与える影響を解析する。
(3)着床障害をもつ子宮特異的遺伝子欠損マウスで検討する。着床に重要な Lif、Stat3 のコンディショナルノックアウトマウスを用い、胚と子宮内膜の RNA の発現を解析する。

4. 研究成果

(1)上記にもあるが胚の活性化という概念があるが、その前後の胚および子宮におけるエピゲノム変化は明らかになっていない。そこで、胚の活性化前後の受精卵の DNA メチル化・ヒストン修飾を解析した。プロゲステロン、エストロゲンで着床をコントロールできる着床遅延モデル (図 1) を用い、胚の RNA-seq、MeDIP-seq、ChIP-seq (H3-K4、H3-K9、H3-K27) を行った。MeDIP-Seq により、活性化前後で DNA メチル化の全体の程度の差は見られなかったが、RNA-seq で発現が 2 倍以上変化した 4092 遺伝子のうち、メチル化に差があった遺伝子は 2843 遺伝子と 69% で DNA メチル化による発現の変化だったと考えられた。ChIP-seq (H3-K4、H3-K9、H3-K27) についてはデータ解析中である。子宮については、レーザーマイクロダイセクションを用い、子宮内膜症上皮を回収し、解析を行っている (参照 Haraguchi H, et al. Mol Endocrinol 2014)。サンプルとしては、胚の活性化の前の妊娠 4 日目の午前、胚の活性化の後である妊娠 4 日目の午後、そして着床後である妊娠 5 日目の胚接着部位と非接着部位を用い RNA-seq を行った。現在も解析中であるが、妊娠 4 日目の午後と比較して、妊娠 5 日目の胚接着部位と非接着部位において 10 倍以上の発現変化を示した遺伝子数は、各々 952 および 323 であったことから、胚接着が子宮内膜管腔上皮に大きな遺伝子発現変化を誘導していることが示された。今後母子宮のより詳細な解析を継続する予定である。胚の活性化に着目した胚と子宮のエピゲノム解析は未だなされておらず、今回の結果および今後の更なる解析は、未だ不明な点の多い着床機構の解明や、不妊治療の新規の治療ターゲットを発見できる可能性を秘めていると考えられる。

(2)卵巣ホルモンによる子宮の解析では、プロゲステロンは不妊治療で子宮の着床能を補助する目的で用いられる一方、避妊目的にも用いられるが、プロゲステロンが着床に与える影響については未だ不明であることに着目して、プロゲステロンが着床に与える影響を検討した。着床前に、マウスに高容量のプロゲステロンを投与したところ、着床障害が見られた。着床に必須因子である LIF 発現を着床直前の妊娠 4 日目の午後の子宮で調べたところ、プロゲステロン投与で LIF は有意に低下した。また、プロゲステロン投与による着床障害を救済するため、妊娠 4 日目に LIF 蛋白を投与したところ、着床障害率は改善した。このことから、プロゲステロンが着床直前の子宮の LIF 発現を低下させることで着床を阻害する可能性が示された。この結果は生殖医療にお

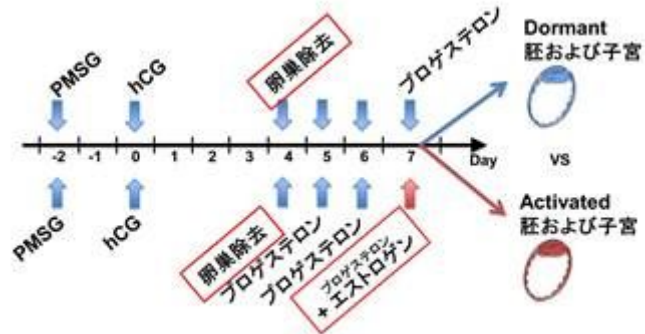


図1. 着床遅延モデル 上がDormancy、下がActivation

ける卵巣ホルモンの適正使用や避妊技術の向上につながる可能性があると考えられる。
(3)上記の実験内容を踏まえ、LIF が着床に重要であることから、LIF の子宮及び胚への影響を
着目し、子宮特異的 LIF 欠損マウスの着床前後の胚と子宮の RNA-seq を行っており解析中である。
また、LIF の下流である Stat3 のコンディショナルノックアウトマウスの解析を行った。
子宮の上皮特異的欠損マウスと間質特異的欠損マウスを作成し、解析したところ、どちらも不
妊であり、着床障害があった。しかし、上皮特異的欠損マウスと異なり、間質特異的欠損マウ
スでは、通常着床直前に見られる子宮の分化・増殖能の劇的な変化(参照 Haraguchi H, et al.
Mol Endocrinol 2014)に、異常をきたしていることが分かった。上皮特異的欠損マウスと間質
特異的欠損マウスは異なるメカニズムで着床障害が出ている可能性があり、現在解析中である。
今回の結果より、部位特異的に解析することが重要であることが示唆され、着床機構の解明の
一助となる可能性があると考えられる

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Haraguchi Hirofumi, Hirota Yasushi, et al. Mdm2-p53-SF1 pathway in ovarian granulosa cells directs ovulation and fertilization by conditioning oocyte quality. The FASEB Journal. 査読有、33,2019,2610-20.

DOI: 10.1096/fj.201801401R

Matsumoto Leona, Hirota Yasushi, Haraguchi Hirofumi, et al. HIF2 in the uterine stroma permits embryo invasion and luminal epithelium detachment. Journal of Clinical Investigation. 査読有、128,2018,3186-97.

DOI: 10.1172/JCI98931

Egashira Mahiro, Hirota Yasushi, Shimizu-Hirota Ryoko, Saito-Fujita Tomoko, Haraguchi Hirofumi, et al. F4/80+ Macrophages Contribute to Clearance of Senescent Cells in the Mouse Postpartum Uterus. Endocrinology. 査読有、158,2017,2344-53.

DOI: 10.1210/en.2016-1886

〔学会発表〕(計 7 件)

Hirofumi Haraguchi, et al. Ovarian Mdm2 deficiency compromises ovulation through upregulation of p53. American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) Annual Meeting. 2019.

原口広史、他。Mdm2-p53 axis is a key machinery of ovulation.第 70 回日本産科婦人科学会学術講演会.2018.

Mitsunori Matsuo, Yasushi Hirota, Tomoko Saito-Fujita, Hirofumi Haraguchi, et al. Levonorgestrel Inhibits Embryo Implantation by Downregulation of Uterine LIF Expression. Society for Reproductive Investigation, 65th Annual Scientific Meeting, Endometrium Satellite Meeting.2018.

原口広史、他。Tumor suppressor p53 impairs cumulus cell-oocyte complex expansion and ovulation.第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会.2017.

伊賀上翔太、廣田泰、藤田知子、原口広史、他。Global gene expression profile in the luminal epithelium of the mouse uterus during embryo attachment. 第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会.2017.

平塚大輝 廣田泰 原口広史、他。DNA methylation and its transcriptional regulation of pre-implantation mouse blastocyst in the process of blastocyst activation. 第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会.2017.

原口広史、他。卵巣の Mouse double minute 2 homolog (Mdm2) 欠損による過剰な p53 は steroidogenic factor 1 (SF1) を誘導し排卵障害を引き起こす。第 62 回日本生殖医学会学術講演会.2017.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。