

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07133

研究課題名(和文) 子宮上皮の再生システムを用いた着床過程の細胞動態の解析

研究課題名(英文) Cellular level analysis of an embryo implantation process by means of uterine epithelium replacement

研究代表者

平手 良和 (Hirate, Yoshikazu)

東京医科歯科大学・統合研究機構・講師

研究者番号：70342839

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)：哺乳類発生において着床は不可欠なイベントである。胚の着床は子宮が受容期のときにのみ起こるが、受容期への移行を制御している分子機構についてはまだ不明な点が多い。本研究課題では、着床機序の解析ツールとして子宮内膜上皮in vivo再生システムの確立を目指した。その結果、TRECK法による子宮内膜上皮の細胞死誘導と細胞移植の組み合わせにより、上皮の一部を置換再生するシステムを確立した。また、子宮内膜上皮へのin vivoエレクトロポレーションによる直接遺伝子導入に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果である子宮上皮再生システムとin vivoエレクトロポレーションを活用することで、これまで解析手段がなかったために機能解明が進んでいなかった遺伝子の解析を進めることができ、着床の分子基盤の包括的理解を大きく前進させることができる。不妊治療として実施される体外受精(IVF)において、着床の失敗は治療が不成功に終わる原因の3分の1を占めており、この原因としてIVF後の胚移植のタイミングと子宮の受容期に入るタイミングとのズレが考えられている。子宮の胚受容についての理解が進み、子宮の受け入れ態勢をコントロールできるようになれば、不妊治療の成績の向上につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Embryo implantation is an essential event in mammalian development. It occurs only when the uterus is in a receptive window. Molecular mechanisms that regulate the transition of the receptive window remains largely unknown. In this study, we aimed to develop new tools that facilitate analyses of implantation-related molecules. The first tool is a uterine epithelial (UE) cell replacement. The UE cells of a host mouse are eliminated by the toxin receptor-mediated conditional cell knockout system, and transplanted UE cells from a donor mouse with different genetic modification regenerate the UE, resulting in UE cell replacement with different genetic property from the host. The second tool is an in vivo gene delivery system by electroporation that allows for the UE cell specific genetic modifications. These newly developed tools are expected to facilitate study of implantation related genes and may improve the reliability of assisted reproductive technology.

研究分野：実験動物学

キーワード：マウス 子宮内膜 TRECK法 ジフテリア毒素 細胞移植 in vivo エレクトロポレーション 遺伝子導入 細胞置換

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の発生初期における胚盤胞の子宮への着床は正常な発生進行において不可欠なイベントであり、胚盤胞と子宮との間で織りなす複雑でダイナミックな相互作用のプロセスである。マウスにおいては、妊娠4日目に胚盤胞が子宮に到達するのと時を同じくして子宮側が胚を受入れることのできる状態(受容期)となる。4日目の夕刻には反子宮間膜側の管腔上皮と胚盤胞とが接するようになり(apposition)、妊娠5日目になるとクリプト(陰窩)構造が形成され、胚盤胞はその中に封じ込められて子宮管腔上皮と胚盤胞が密着するようになる(attachment)。その後、胚盤胞と接した管腔上皮はアポトーシスを起こし、生じた管腔上皮の隙間から栄養外胚葉細胞が管腔上皮を突き破って間質に入り込んでいく(invasion)。Attachmentに先がけて管腔上皮側は細胞極性を消失し、invasionに先がけて胚盤胞と密着した管腔上皮細胞はアポトーシスによる細胞死を起こす。このような細胞生物学的な管腔上皮の変化が胚盤胞の着床を可能にしているが、管腔上皮の着床における変化の細胞生物学的側面についてはまだ不明な点が多い。

研究代表者は、転写因子 Sox17 の着床における役割の解明に取り組んでおり、Sox17 が子宮内膜の管腔上皮で発現していること、そして Sox17 ヘテロ変異メスマウスは着床不全となることを明らかにしてきた(Hirate et al., 2016)。Sox17 は管腔上皮で発現しているため管腔上皮の着床における挙動について特に興味を持って解析を行っているが、研究を進めるうちに、管腔上皮を解析するための実験系が十分でなく、機能未知遺伝子の着床における役割を解析するための新しい実験系が必要であると感じた。研究代表者は胚盤胞の細胞分化が細胞極性と Hippo 経路によって制御されていることを明らかにしている。この経験で培ったマウス胚の発生工学技術と着床における細胞極性制御の知見を生かして、本研究では管腔上皮で発現する機能未知遺伝子の着床における機能評価系を構築し、着床制御の包括的理解を目指すための基盤技術を確立する。

2. 研究の目的

本研究では attachment に至るまでの子宮管腔上皮の細胞動態に関与する機能未知遺伝子の評価系の構築を目的とした。

1) TRECK システムと細胞移植による in vivo 上皮再生システムの確立。

TRECK システムとは、組織・細胞特異的にジフテリア毒素受容体を発現させ、ジフテリア毒素の投与により受容体を発現する細胞のみを細胞死へと誘導するシステムである(Saito et al., 2001)。ジフテリア毒素を投与すると同時に別のマウス個体(ドナー)あるいは管腔上皮由来の細胞株から調製した管腔上皮細胞を子宮内腔に移植することで管腔上皮をドナー由来の細胞に置換する実験系を確立する。

2) 脱細胞化組織を用いた in vitro 上皮再生システムの確立。

子宮から脱細胞化組織を作製し、in vitro で脱細胞化組織上に管腔上皮細胞を播種することで上皮を再生させた。子宮の脱細胞化は本学の生体材料研究所岸田研究室において作製法が確立されており、脱細胞化組織を上皮再生の足場として用いることで、より生体に近い環境で上皮を再構築できると考えている。この in vitro 系を確立することで、管腔上皮細胞の増殖や細胞極性の形成過程を in vivo よりも容易に解析できるようになることが期待される。

3) in vivo エレクトロポレーションによる子宮上皮への遺伝子導入。

脱細胞化組織を用いた in vitro 上皮再生システムが困難な場合の代替法として、in vivo エレクトロポレーションによる子宮上皮への遺伝子導入を確立する。

3. 研究の方法

マウス

子宮内膜上皮特異的に DTR を発現するマウス(Ltf-iCre; ROSA-iDTR)は、Ltf-iCre マウス(Daikoku et al., 2014)と Cre 依存的に毒素受容体である霊長類ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子(HB-EGF)を発現する ROSA-iDTR(Buch et al., 2005)マウスとの交配により作製した。このマウスを用いて、8週齢から18週齢で毒素の濃度検討、および投与回数(1回または2回)の検討を行った(Fig. 1A, B)。また、Ltf-iCre; ROSA-iDTR に ROSA-tdTomato を交配することで、毒素受容体が発現している部位が赤色蛍光により可視化されるマウス(Ltf-iCre; ROSA-iDTR; ROSA-tdTomato)を作製した。このマウスに毒素投与を行なった後、緑色蛍光を発する、CAG-EGFP マウスの子宮内膜上皮を移植し、子宮内膜上皮置換をおこなった(Fig. 1C)。

移植用子宮内膜上皮細胞の調製

午前8時から12時の間に子宮を摘出し、子宮を切り開いて内膜を露出し、ハンクス平衡塩溶液(HBSS)中でパンクレアチン(Sigma-Aldrich)及び、ディスパーゼ(Thermo Fisher)を用いて4℃で1時間、室温で1時間、37℃で15分間処理し、実体顕微鏡下でピンセットを用いて子宮内膜上皮を剥離した。剥離した上皮シートを23ゲージの注射針に10回ほど通し、HBSSで2回洗浄を行った。細胞生存率は、懸濁液の一部にトリパンプルを加え血球計算盤で生存細胞・死細胞数をカウントすることにより調べた。

TRECK 法と細胞移植による子宮内膜上皮置換

Ltf-iCre; ROSA-iDTR; ROSA-tdTomato のマウスに24時間の間隔を開け2回毒素投与を行

なった。48 時間で、子宮内膜上皮細胞懸濁液を 27 ゲージ針付きハミルトンシリンジで片側の子宮卵管接合部から 50 μ l 注入した (Fig. 1C)。

免疫染色

子宮を摘出し、4% パラホルムアルデヒド (PFA)/PBS を用いて 4°C で一晩固定後、パラフィンに包埋して 5 μ m 厚で切片を作製した。一次抗体には、Sox17 (R&D Systems, AF1924; 1:400), E-cadherin (Takara, M108; 1:250), FoxA2 (Abcam, EPR4466; 1:1000), Ki67 (Affimetrix eBioscience, 14-5698-82; 1:500), Sox7 (R&D Systems, AF2766; 1:200), Areg (R&D systems, AF989; 1:1000), HB-EGF (Bioss Inc, bs-3576R; 1:100) を使用した。

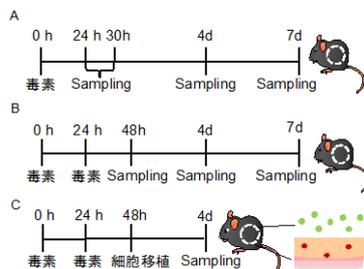


Fig. 1. 毒素投与実験スケジュール
(A) 毒素 1 回投与。(B) 毒素 2 回投与。(C) 細胞移植実験。

脱細胞化子宮組織の作製

培養基材となる脱細胞化子宮組織を作製した。C57BL/6J の野生型のメスマウス (8 週齢) を安楽死後、開腹により子宮を取り出した。取り出した子宮はハンクス液中で脂肪組織と血液を取り除いた。左右の子宮角を 4 等分し管腔を切り開いて子宮片を四角形のシート状にした。このとき、子宮片の開きをよくするために子宮間膜側を切った。そして SDS 処理もしくは高静水圧処理によって子宮片を脱細胞化した (Santoso et al, 2014)。SDS 処理では子宮片を 1% SDS 溶液に入れ室温で 2 時間振盪し、その後 DNase I 含有洗浄液で 1 週間洗浄した (洗浄①)。洗浄液は 2 日に 1 回交換し、遮光し 4°C で振盪した。高静水圧処理では子宮片を 1 万気圧で 40 分間処理したのち、DNase I 含有洗浄による 1 週間の洗浄を行った。さらに、ハンクス液を 3 日間毎日交換し 4°C で振盪した (洗浄②)。

脱細胞化子宮組織上での上皮細胞培養

培養中に脱細胞化組織が浮き上がることを抑えるために、融解した 0.8% 低融点アガロースゲルで脱細胞化子宮組織を培養ディッシュの底に貼り付けた。その際、脱細胞化子宮組織の管腔側が上になるようにした。培養ディッシュに 10% CS-FBS/DMEM-F12 を加え、子宮内膜上皮細胞懸濁液を脱細胞化子宮組織に滴下し、37°C、5% CO₂ で培養した。培養後、蛍光顕微鏡で観察し、PFA で固定したあとパラフィンブロックを作製しヘマトキシリン・エオシン染色を行った。上皮培養のコントロールとして、マトリゲルを用いた培養も行った。35 mm 培養ディッシュに 18 mm × 18 mm のカバーガラスを置き、その上に 450 μ L の希釈マトリゲル (マトリゲル: PBS=1:3) を加え、10% CS-FBS-DMEM/F12 を 1.8 mL、細胞懸濁液を 0.2 mL 加え、37°C、5% CO₂ のインキュベーターで培養し、蛍光顕微鏡で観察した。

in vivo エレクトロポレーションによる子宮内膜上皮への遺伝子導入

麻酔下で雌マウスの背側部を開き、子宮を体外に引き出した。管腔内に CAG-EGFP ベクター溶液 (0.5 μ g/ μ L) を注入後、エレクトロポレーター (ベックス社遺伝子導入装置 CUY21EDIT II、電極 LF646P10X2) で、50V decay × 3, 25V decay × 3 の条件でエレクトロポレーションを行った。

4. 研究成果

毒素投与による細胞死誘導の条件検討

本研究で毒素投与の際に用いた Ltf-iCre; ROSA-iDTR マウスは、子宮内膜上皮特異的に毒素受容体である霊長類 HB-EGF を発現しており、HB-EGF が過剰発現した個体であると考えられることができる。HB-EGF は胚盤胞が受容期子宮に付着する際に関与していると考えられており 4)、このマウスで着床や出産に何らかの影響があることが予想されたが、着床に異常はなく妊性を持つことを確認した (n = 3)。

Ltf-iCre; ROSA-iDTR マウスを使用し、細胞死を誘導可能な毒素濃度の検討、ならびに子宮内膜上皮の継時的変化を観察した。投与濃度の検討は、0-4 μ g/kg の範囲の 4 段階で行った。毒素 1 回投与 4 日において、0-0.4 μ g/kg では上皮に変化がみられないのに対し、4 μ g/kg では上皮構造の消失が確認できた。この結果から毒素の投与濃度を 4 μ g/kg に決定した。

次に、上述で決定した 4 μ g/kg の濃度で毒素投与した子宮内膜上皮の継時変化を観察した。HE 染色にて、毒素 1 回投与 24 時間では上皮細胞塊が管腔へと脱落する様子が観察でき、毒素 1 回投与 30 時間で管腔上皮、子宮腺上皮共に消失が観察された (Fig. 2A)。また、毒素 2 回投与 48 時間においても管腔上皮、子宮腺上皮の消失が観察された (Fig. 2C)。上皮の消失

について、上皮マーカーである E-cadherin の免疫染色より詳細に観察すると、毒素 1 回投与 24 時間、30 時間とその発現は減少し、管腔上皮、子宮腺上皮ともに上皮細胞の接着が消失していく様子が確認された (Fig. 2B)。

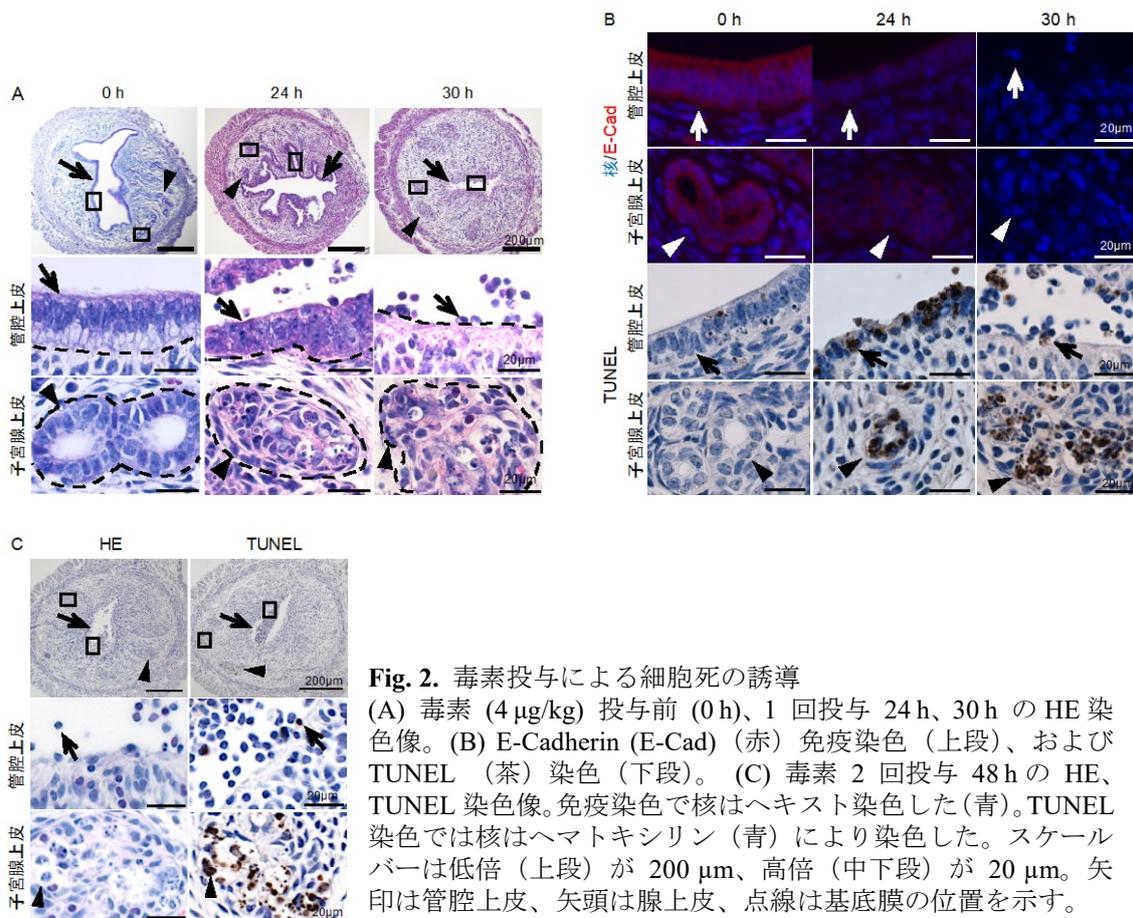


Fig. 2. 毒素投与による細胞死の誘導

(A) 毒素 (4 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 投与前 (0h)、1 回投与 24h、30h の HE 染色像。(B) E-Cadherin (E-Cad) (赤) 免疫染色 (上段)、および TUNEL (茶) 染色 (下段)。(C) 毒素 2 回投与 48h の HE、TUNEL 染色像。免疫染色で核はヘキスト染色した(青)。TUNEL 染色では核はヘマトキシリン (青) により染色した。スケールバーは低倍 (上段) が 200 μm 、高倍 (中下段) が 20 μm 。矢印は管腔上皮、矢頭は腺上皮、点線は基底膜の位置を示す。

また、毒素投与による細胞死を TUNEL 染色によって観察したところ、毒素 1 回投与 24 時間において管腔上皮、子宮腺上皮ともに TUNEL 陽性細胞が増加していた (Fig. 2B)。また、毒素 2 回投与 48 時間では、子宮腺上皮で TUNEL 陽性細胞が増加していることが確認できた (Fig. 2C)。以上の結果から、毒素投与後上皮間の接着が消失、上皮細胞は球形となり腔内へと脱落し、上皮が崩壊していることが示唆された。

毒素投与後の細胞移植による細胞置換

次に細胞を除去したマウスに細胞を移植し、生着させる実験を行なった。ホスト側マウスとして毒素受容体を発現する細胞が赤色蛍光で可視化される Ltf-iCre; ROSA-iDTR; ROSA-tdTomato マウスを使用し、移植細胞として細胞が緑色蛍光で可視化される CAG-EGFP マウスの子宮上皮細胞を用いた。毒素 2 回投与 48 時間で子宮上皮細胞を子宮卵管接合部から移植し、その 48 時間後に子宮を摘出した (Fig. 1C)。摘出後、子宮を PFA 固定し、凍結切片を作成した。一部ではあるが、ホスト由来の赤い細胞の中に、ドナー由来の緑色蛍光細胞が生着している像が確認できた (Fig. 3)。

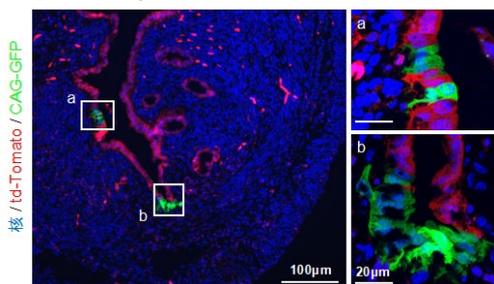


Fig. 3. 移植された子宮上皮細胞の生着

細胞移植後 48 時間におけるホストマウスの子宮上皮細胞 (tdTomato, 赤) と移植した子宮上皮細胞 (GFP, 緑) の凍結切片像。右図は a, b の拡大図。核はヘキスト (青) で染色した。スケールバーは左図が 100 μm 、右図が 20 μm 。

脱細胞化子宮組織の作製

脱細胞化処理を行っていない子宮組織切片をヘマトキシリン・エオシン染色したところ、核がヘマトキシリンによって青く染まるが (Fig. 4a)、SDS 処理もしくは高静水圧処理した脱細胞化子宮組織ではエオシンによる染色のみが見られ、完全に脱細胞化されていることが示された

(Fig. 4b, c)。

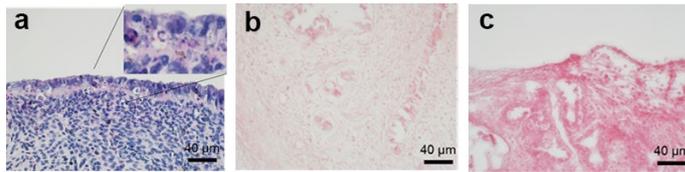


Fig. 4. 脱細胞化組織の作製
各子宮組織をヘマトキシリン・エオシン染色した。青色は核を、マゼンタは細胞質を示す。(a) 脱細胞化処理を行っていない子宮内膜組織。(b) SDS 処理による脱細胞化子宮組織。(c) 高静水圧処理による脱細胞化子宮組織。

脱細胞化子宮組織を基材とした子宮内膜上皮細胞の培養

播種用上皮細胞の調製における細胞生存率と細胞数は、26.88%、 6.14×10^5 cells/mL だった (n=5)。そのうち2回はマウスの性周期が発情後期であり、その時の細胞生存率は著しく低く、どちらもほぼ0%だった。マトリゲルを用いた培養では子宮内膜上皮細胞は生着・増殖した (Fig. 5a)。SDS 処理脱細胞化子宮組織では生き残った細胞は数個見られたが、細胞は増殖しなかった (Fig. 5b)。高静水圧処理後洗浄①まで行った脱細胞化子宮組織でも生き残った細胞は数個見られたが、細胞は増殖しなかった (Fig. 5c)。高静水圧処理後洗浄②まで行った脱細胞化子宮組織では細胞は生着・増殖した (Fig. 5d)。

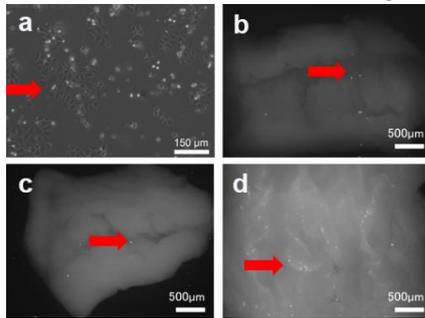


Fig. 5. 脱細胞化子宮組織を基材として用いた子宮上皮細胞の培養

(a) マトリゲルを基材として用いた培養。(b) SDS 処理により作製した脱細胞化子宮組織での培養。(c) 高静水圧処理後洗浄①まで行った脱細胞化子宮組織での培養。(d) 高静水圧処理後洗浄②まで行った脱細胞化子宮組織での培養。

in vivo エレクトロポレーションによる子宮内膜上皮への遺伝子導入

当初予定では上皮を *in vitro* 培養して遺伝子導入を行い子宮内に移植する予定だったが、前述の通り細胞置換効率が良くなかったため、子宮内膜上皮での *in vivo* エレクトロポレーションによる直接遺伝子導入を行うことに方針転換した。子宮管腔に CAG-EGFP ベクター溶液を注入し、50V decay×3, 25V decay×3 の条件でエレクトロポレーションを行ったところ、子宮管腔上皮の一部において EGFP の発現を確認することができた (Fig. 6)。

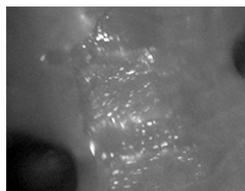


Fig. 6. *in vivo* エレクトロポレーションによる子宮内膜上皮への遺伝子導入
摘出した子宮の管腔面を露出し、蛍光顕微鏡で EGFP の発する蛍光を撮影した。

参考文献

- Buch T, Heppner FL, Tertilt C, et al. Nat Methods. 2005;2(6):419 - 426.
Daikoku T, Ogawa Y, Terakawa J, Ogawa A, DeFalco T, Dey SK. 2014;155(7):2718 - 2724.
Hirate Y, Suzuki H, Kawasumi M, et al. Sci Rep. 2016;6:24171.
Saito M, Iwawaki T, Taya C, et al. Nat Biotechnol. 2001;19(8):746 - 750.
Santoso EG, Yoshida K, Hirota Y, et al. PLoS One. 2014;9(7):e103201.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平手良和, 早川佳那, 中野有紀, 上村麻実, 三浦健人, 金井克晃, 金井正美
2. 発表標題 子宮SOX17の着床受容期における下流候補遺伝子の探索
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野有紀, 平手良和, 上村麻実, 金井克晃, 金井正美
2. 発表標題 TREC法を用いた子宮内膜上皮置換法の確立
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平手良和, 早川佳那, 中野有紀, 上村麻実, 三浦健人, 金井克晃, 金井正美
2. 発表標題 子宮内膜上皮SOX17の胚盤胞接着および脱落膜形成への関与
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平手 良和, 早川 佳那, 豊村 友賀, 五十嵐 瞳, 三浦 健人, 金井 克晃, 金井 正美
2. 発表標題 Sox17ヘテロ変異着床不全マウスにおける子宮上皮遺伝子の発現変化
3. 学会等名 第64回 日本実験動物学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 早川 佳那, 平手 良和, 上村 麻実, 三浦 健人, 金井 克晃, 金井 正美
2. 発表標題 Sox17ヘテロ変異雌マウスの子宮における着床不全のメカニズム解析
3. 学会等名 第160回 日本獣医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshikazu Hirate, Kana Hayakawa, Yuga Toyomura, Hitomi Igarashi, Kento Miura, Yoshiakira Kanai, and Masami Kanai-Azuma
2. 発表標題 Sox17 heterozygous mutant females are defective in implantation
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists cosponsored by APDBN (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平手 良和, 早川 佳那, 中野 有紀, 上村 麻実, 三浦 健人, 金井 克晃, 金井 正美
2. 発表標題 マウス子宮上皮における転写因子Sox17の発現は着床の成立に必須である
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中野 有紀 (Nakano Yuki)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中野 李佐 (Nakano Risa)		
研究協力者	根元 亮 (Nemoto Ryo)		