

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11231

研究課題名(和文) ヒト胚着床に関わるversicanの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of versican involved in human embryo implantation

研究代表者

堀江 昭史 (HORIE, Akihito)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：30535836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：これまで行ってきた胚着床モデルはin vitroにおける検証であるため実際のin vivoで同様の機能を確認できるかが重要であると考え我々はマウスにおけるin vivo環境下での胚着床に関わる効果を検討した。versicanのcKOマウスを作成し胚着床、分娩胎仔数、胎仔重量などを確認した。その結果胚着床、分娩胎仔数には影響を認めないことがわかった。一方で出生仔重量については有意に小さい結果であった。これらの結果の理由としてヒトとマウスにおいて胚着床メカニズムおよび子宮におけるversicanの発現パターンが異なることがわかった。今後初期胎盤形成における機能解析を中心に検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Versicanは全身の臓器に存在し、細胞の接着や浸潤などに関わり細胞外マトリックスを構成する重要な分子であることがわかっているが、着床・妊娠に関する研究は殆どない。今回の結果からマウス胚着床において影響を認めないものの新生仔重量が有意に小さいことがわかり、妊娠高血圧などと同様の状態を形成している可能性が高い。今後研究を更にすすめるうえで、妊娠合併症の病態解明においても非常に意義がある結果であった。

研究成果の概要(英文)：Since the embryo implantation models that have been conducted so far were in vitro verification model, it is important to be able to confirm similar functions in vivo model, and we are involved in the effect of embryo implantation in mouse in vivo model. Versican cKO mice were manufactured and we examined the number of embryo implantation, the number of fetus, fetal weight, etc. As a result, it was found that there was no effect on embryo implantation and number of fetus. On the other hand, the weight of offspring was significantly smaller. The reason for these results was that the embryo implantation mechanism and the expression pattern of versican in the uterus differ between humans and mice. In the future, we plan to focus on functional analysis of early placenta formation.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：versican 胚着床 コンディショナルノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症の発症は、逆流月経血に含まれる子宮内膜細胞が腹膜や卵巣に接着することにより引き起こされるとする説が有力である。その発症あるいは増悪にかかわる因子についてのこれまでの研究のほとんどは、逆流する子宮内膜細胞に着目したものであった。一方、受け手側の腹膜に着目した研究はほとんどなく、研究代表者らは「子宮内膜症の発症要因は子宮内腔から逆流する子宮内膜細胞の側だけではなく、それを受けとる腹膜の側にもある」との仮説をたてて、検討を行ってきた。肉眼的に内膜症病変のない腹膜組織について内膜症女性群と非内膜症女性群においてマイクロアレイ解析を行ったところ、細胞接着に関与する因子の一つである versican が抽出された。実際に、ヒトの腹膜中皮細胞に versican を過剰発現すると、子宮内膜細胞の腹膜への接着・浸潤が促進されることが実証された (Tani H. J Clin Endocrinol Metab. 2016)。子宮内膜細胞の接着・浸潤に versican が関与していることが明らかとなり、次に、我々は胚が子宮内膜細胞に接着・浸潤する着床の過程においても versican が関与している可能性について検討することとした。

マウスにおいては、着床前の子宮内膜間質に versican が出現し、着床後に versican は発現し続けることが報告されており、versican がマウスの着床に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。しかしヒト子宮内膜組織における versican の発現およびその機能についてはほとんど解明されていない。研究代表者らはヒト子宮内膜組織における versican 発現を詳細に検討し、胚着床の時期である黄体期中期の子宮内膜上皮細胞および腺腔内にある分泌物に最も強く発現していることとを世界にさきがけて明らかにした [Reproduction2018]。さらに研究代表者らは、「versican は胚着床にも重要な役割を果たしている」との仮説を実証するために、本研究に着手した。

2. 研究の目的

まず、ヒト胚着床モデルを用いて胚接着における versican の関わりについて検討を行った。Ishikawa 細胞に versican 強制発現させた ISKW-V1、V3 細胞株を樹立し、それらと BeWo 細胞を用いた実験を行ったところ versican のコンドロイチン硫酸側鎖が着床に関与していることが示唆された [Reproduction. 2018]。

そこで、Versican が胚着床・妊娠経過に及ぼす促進効果を *in vivo* において実証することを目的とした。

3. 研究の方法

具体的には以下の3つを行う計画を立案した。

1) 着床障害女性における versican 発現の検討。

これまでの検討で、versican は胚接着に強く関わっていることが示唆されている。そこで着床障害女性の子宮内膜における versican の発現を検討するために、以下の実験を行う。

京都大学医学部倫理委員会の承認および同意書による患者の了承のもとに、45歳以下の閉経していない女性で、婦人科良性疾患のために摘出された子宮から採取した子宮内膜、もしくは、着床障害女性から子宮内膜搔爬により採取した子宮内膜のうち、いずれも黄体期中期(着床期)由来のもののみを実験に供することとする。これらのサンプルを用いて、着床障害女性由来の着床期内膜と分娩歴のある女性由来の着床期内膜における versican の発現の差異について検討を行う。具体的には、子宮内膜組織における versican の発現を免疫組織学的染色、western blotting により検討する。さらに、内膜上皮細胞のみを分離し、各群における versican の発現の差異について患者背景も考慮のうえ、詳細に検討する。

2) マウス胚盤胞を用いた胚着床モデルにおける versican の機能解析。

3) versican ノックアウト・マウスにおける着床障害の評価。

子宮における versican 発現のみを欠如させたコンディショナル・ノックアウトマウス(cKO)を作成する。

Versican の cKO マウスを用いて、子宮内膜における versican 発現の有無が胚着床率、その後の妊娠経過、出生仔の数、出生体重に与える影響について *in vivo* で検討する。さらに、胚盤胞における trophoblast の母体組織への浸潤に与える影響についても検討する。

4. 研究成果

これまで行ってきた胚着床モデルは *in vitro* における検証であるため、実際の *in vivo* で同様の機能を確認できるかが重要であると考え、マウスにおける *in vivo* 環境下での胚着床に関わる効果を検討した。

まず、非妊娠時のヒトとマウスにおける versican の発現について確認したところ、ヒトと同

様にマウスにおいても性周期を通じて発現していることがわかった。またマウスにおける versican の発現も性ホルモンによりコントロールを受けていることがわかった。更に胚着床後の versican の発現変化としては、ヒトもマウスも胚周囲から発現が徐々に低下していくことがわかった。

まず、胚着床における versican の機能及び妊娠後の影響について検討する目的で、versican の子宮特異的 cKO マウスを作成した。

コントロールマウスと比較して cKO では妊娠率、流産率には差を認めなかった。この結果の理由としてはヒトとマウスの着床過程が異なることと、ヒトと違いマウスでは子宮内膜上皮に versican が発現していないことが影響していると考えられた。また、その後の妊娠経過を検討すると、妊娠数、流産率、胎盤重量には差を認めなかったものの新生仔体重において cKO では有意に体重減少を認めた。そこで、妊娠高血圧との関連性を調べるため、母獣の妊娠中の血圧、尿蛋白などを検討したところ、分娩時の血圧が cKO において有意に高かった。更に妊娠各時期における胎児の重量においてもやはり cKO にて有意に低かった。

これらの結果から、versican はマウスにおいて、胚着床には影響を認めないものの、妊娠中の高血圧、さらには仔の体重減少に関わりがあり、妊娠高血圧症候群を模倣していると考えられた。今後これらの結果を元に、さらに versican の血管リモデリングを含めた胎盤形成におけるメカニズムを検討し、論文発表する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyazaki Y, Horie A, Tani H, Ueda M, Okunomiya A, Suginami K, Kondoh E, Baba T, Konishi I, Shinomura T, Sato Y.	4. 巻 Oct 1.
2. 論文標題 ersican V1 in human endometrial epithelial cells promotes BeWo spheroid adhesion in vitro.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reproduction.	6. 最初と最後の頁 REP-18-0333.R1.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/REP-18-0333	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yusuke Sagae, Akihito Horie, Yoshimi Kitawaki, Asuka Okunomiya, Hirohiko Tani, Yukiyasu Sato, Masaki Mandai
2. 発表標題 Expression of versican and versikine in the mouse uterus during peri-implantation period.
3. 学会等名 第71回 日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寒河江 悠介、北脇 佳美、奥宮 明日香、谷 洋彦、堀江 昭史、万代 昌紀
2. 発表標題 着床期マウス子宮におけるversicanの発現についての検討
3. 学会等名 日本生殖医学会
4. 発表年 2019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
研究分担者	佐藤 幸保 (SATO Yukiyasu) (00508236)	京都大学・医学研究科・非常勤講師 (14301)	

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
研究分担者	大黒 多希子 (DAIKOKU Takiko) (30767249)	金沢大学・学際科学実験センター・教授 (13301)	
研究分担者	谷 洋彦 (TANI Hirohiko) (70615252)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	