

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16824

研究課題名(和文)着床不全の病態解明と治療薬の開発：着床を誘起する胚由来サイトカインの同定と応用

研究課題名(英文)Embryonic beta-catenin is required for priming of the uterus to implantation

研究代表者

祝井 麻希(Iwai, Maki)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・リサーチアソシエイト

研究者番号：70645267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Beta-カテニン(CTNNB1)と胚発生に必須であるものの、マウスのCTNNB1欠損胚はE7.0の原腸陥入期に異常を示して胚性致死となる。CTNNB1の重要度から着床前には代償機構が存在する可能性がある。本研究では、(1)Ctnnb1欠損胚(欠損精子と欠損卵由来の胚)は、leukemia inhibitory factorの分泌によって開始される母体側の着床応答を誘起できない、(2)Ctnnb1欠損胚盤胞において、caudal-type homeobox 2遺伝子の栄養外胚葉細胞での発現が消失する、(3)野生型マウスの卵管内液の注入によって上記の異常は回復する、の3点を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで分子生物学的研究や細胞生物学的研究などの研究により、着床や妊娠維持を成功させるために子宮側が起こす反応については解明が進んできた。その一方、着床において胚がどのような役割を持っているのかは未だに不明な点が多い。本研究によってマウスにおける着床に必要な胚側因子を明らかにすることは、着床メカニズムを解明するための第一歩となる。更に、この研究を進展させることにより、不妊の大きな原因の一つである着床不全の解明と治療への助けとなる。

研究成果の概要(英文)：Repeated implantation failure is a major cause of infertility in otherwise healthy women. Uterine beta-catenin (CTNNB1) plays a critical role in the establishment of implantation. However, the role of embryonic CTNNB1 in implantation is unclear. We addressed this issue by analyzing mice carrying Ctnnb1-deficient embryos (Ctnnb1 / embryos). Ctnnb1 / embryos were produced by intercrossing mice bearing -catenin-deficient eggs and sperm. Ctnnb1 / blastocysts were formed, but embryos were resorbed and empty decidual capsules were formed. Moreover, leukemia inhibitory factor, a uterine factor essential for implantation, was undetectable, and CDX2, a transcription factor determining trophectoderm cell fate, could not be observed in Ctnnb1 / blastocysts. Intrauterine injection of uterine fluids from control mice recovered the uterine response to Ctnnb1 / blastocysts. These results indicate that uterine response to implantation is inducible by supplemental materials.

研究分野：産婦人科学

キーワード：着床 着床不全 -カテニン LIF CDX2 サイトカイン Wntシグナリング 不妊

1. 研究開始当初の背景

β -カテニンは armadillo ファミリーとして発見された 88 kDa のタンパク質で、他のタンパク質との結合に関わる繰り返し配列 (armadillo repeat domain) をもつ。 β -カテニンには 2 つの働きが知られている。第一に、細胞接着因子であるカドヘリンの細胞内ドメインに結合し、細胞骨格であるアクチン繊維との結合を促進することで、細胞接着部位を形成する働きである。第二に、Wnt シグナルを細胞核に伝達する因子として機能し、胚発生の多くの場面での Wnt シグナル応答遺伝子の発現を制御する働きである。

β -カテニンのホモ欠損胚はヘテロ欠損マウス同士の交配から報告されており、受精後 7 日目 (E7.0) に原腸陥入の異常を示し、胚性致死に至る。しかしながら、着床以前の発生ステージには全く異常が認められないことから、卵および精子形成、受精、着床以前の胚発生には必須ではないとされた。ただし、マウスは多産であり、子宮内に β -カテニン欠損胚、野生型胚、ヘテロ欠損胚が同時に存在する状況で得られた結果であることから、ヒトのように単胎、またはホモ欠損胚のみが存在する状況下とは異なることが推測される。

本研究では、Cre/LoxP システムを用いて β -カテニン欠損胚だけが子宮内に複数存在する母親マウスを作り出すことに成功した。受精から発生過程を詳細に観察してみると、従来、シングル欠損胚で発生異常が見られた E7.0 より前、着床直後の E4.5 には胚のスペーシング異常が生じ、さらには E6.5 までにほとんどの胚が消失することがわかった。このことから、着床には β -カテニン、あるいは β -カテニンの欠損によって発現が低下・消失した因子が正常な着床には必須であることが推測された。

本研究では、卵管から子宮内に β -カテニンを欠損させた胚のみを存在させることによって見られる着床異常の病態を明らかにし、どのような分子によってその表現型が起こるのかを解明し、着床という生命誕生にとって必要不可欠なものはあるが、解明が進んでいない現象のメカニズムを解明することを目的にする (図 1)。本研究の成果は、不妊状の主要な原因となっている反復性着床不全の研究に寄与することができる。

2. 研究の目的

子宮側にはまったく異常は無く、胚のみで β -カテニンを欠損させた胚を、雌雄の生殖系列特異的な欠損マウスから作製することで、従来とは異なり、より早期での発生異常胚を作り出すことができた。そこで、我々が作製した β -カテニン欠損胚 (完全欠損胚) を解析することで、着床に必要な胚側因子の存在の有無、因子の特定をめざすことが本研究の目的である。子宮内の胚発生を継続的に見ることができないという点では従来法と変わらないものの、今まで見られなかった表現型が見られていることから、そのメカニズムと原因を解明することにより、子宮内で着床時に何が起きているのかを推測することができる。

3. 研究の方法

(1) β -カテニン欠損胚の作製

従来のコンベンショナルな遺伝子欠損マウスの作製技術では、 β -カテニン欠損胚を作製する際、子宮内には欠損胚のほかに野生型の胚とヘテロ欠損胚が同時に存在してしまう。何らかの液性因子が胚発生に関わると仮定すると、多胎であるマウスでは異常が隠されてしまうかもしれない。

そこで本研究では Cre/LoxP システムを用いて、母体内に β -カテニン欠損胚のみを存在させることに成功した。具体的には、 β -カテニン遺伝子の floxed (以下 f/f) マウスと卵特異的な Zp3 プロモーターで制御された Cre リコンビナーゼ遺伝子をもったマウスを掛け合わせて作製した Zp3-cre β -カテニン floxed/floxed (以下 Zp3-cre f/f) マウスと、精子特異的な Protamine プロモーターと Cre リコンビナーゼを持つマウスを掛け合わせて作製した Protamine-cre β -カテニン floxed/floxed (以下 Ptm-cre f/f) マウスを交配させることにより、 β -カテニン欠損胚のみが子宮に着床するマウスを作製した (図 2)。

【従来のモデル】

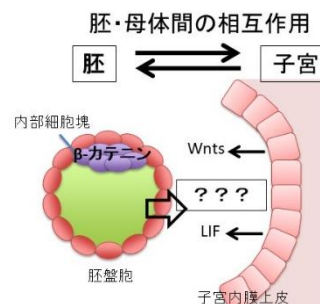


図1 着床に至る子宮と胚盤胞の相互作用

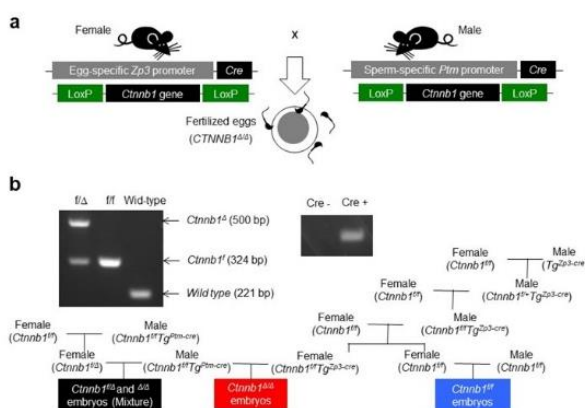


図2 β -カテニン完全欠損胚の作製

(2)β-カテニン欠損胚で生じる着床異常の解析

着床直後の E4.5 から E6.5 まで胚をもった母親マウスの卵巣と子宮を採取し、排卵数、着床した痕跡（着床痕数）、着床時の子宮や胚の状態を数値化し、β-カテニン欠損による異常を解析した。さらに、子宮の連続切片を作成し、HE 染色や免疫染色によって着床時の子宮と胚の状態を観察した。

(3)着床に必須なサイトカインの絞り込み

β-カテニン導入細胞と癌細胞で共通して発現の上昇しているサイトカインが存在し、その特定をマイクロアレイによって行っているため（The EMBO Journal 24:73–84, 2005）、液性因子はそれらのサイトカインと同じ、あるいはファミリー遺伝子であることが推測された。そこで、E3.5 雌から子宮内灌流によって採取した胚から RNA を抽出し、マイクロアレイによって発現が有意に減少したサイトカイン遺伝子を抽出した。

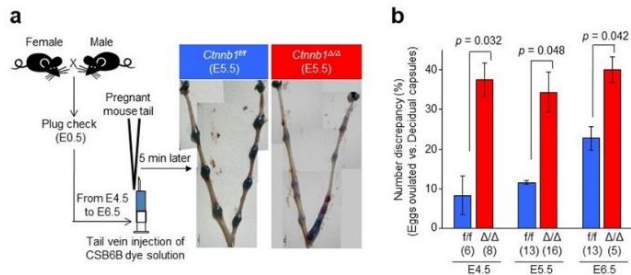


図3 β-カテニン完全欠損胚の着床異常

(4)子宮内洗浄液の投与によるレスキュー試験

着床を調節する胚由来サイトカインを含む可能性が高いと考えられるコントロール胚（E3.5）が存在する子宮を PBS で洗浄し、その洗浄液を β-カテニン欠損胚が存在する母親マウスの子宮内に投与することにより、着床異常のレスキューを試みた。

(5)胚消失の原因説明

初期胚が消失するという表現型の原因とサイトカインの機能を推測するため、胚と子宮の切片を作製した。胚消失の原因はアポトーシスと免疫反応のどちらか（または両方）によるものと予測しており、アポトーシスの定量化と、各種免疫細胞系のマーカーについての免疫染色を行った。

(6)特定したサイトカインが着床に必須であることの証明

特定したサイトカインを子宮内に投与することにより、β-カテニン欠損胚をレスキューし、着床以降まで発生させた。レスキュー度は子宮における着床痕の数、連続切片の HE 染色、免疫染色によって判定し、コントロール胚あるいはシンプル欠損胚と比較した。

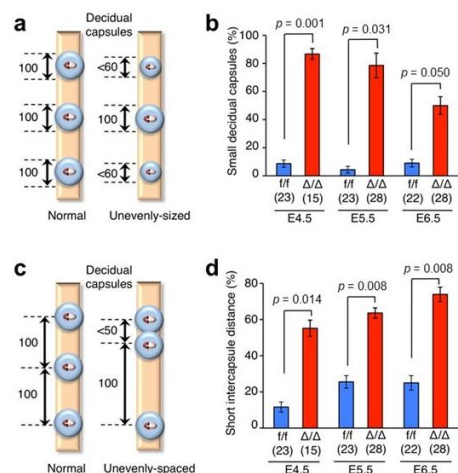


図4 β-カテニン完全欠損胚の着床異常（胚のサイズ、胚間のスペース）

4. 研究成果

(1)β-カテニン欠損胚の着床異常(着床痕数の増加)

β-カテニン欠損胚は胚盤胞まで正常に発生したものの、着床異常を示した。第一の特徴として、着床痕と、卵巣内を实体顕微鏡で観察した際に計測できる排卵数を比較したところ、着床痕数が排卵数に比べて、明らかに多くなった。この結果は、β-カテニン欠損胚は子宮への着床を試みるものの、何回か失敗し、その痕跡が子宮に複数個の着床痕として残った可能性が考えられた（図3）。

(2)β-カテニン欠損胚の着床異常(胚の大きさ、胚間のスペースの異常)

β-カテニン欠損胚による着床異常の第二の特徴として、胎仔を含んだ脱落膜カプセルの大きさが不均一であった（図4 a, b）。通常は同時に着床して胚が発生することを考えると、β-カテニン欠損胚は、着床するタイミングが不均一であることが考えられた。第三の特徴として、通常のマウスでは、着床して発生する胚の間隔が等間隔である一方、β-カテニン欠損胚では、胚間のスペースが不均一であり、着床する場所がコントロールされていないことが考えられた（図4 c, d）。以上のことから、β-カテニン欠損胚は着床に至る過程に問題が生じていることが明らかになった。

(3)β-カテニン欠損胚の着床異常(子宮側の着床シグナルの誘起)

β-カテニン欠損胚による着床異常をより明確に明らかにするために、脱落膜カプセルの内部を形態学的に調べた。その結果、胚を含まずに空洞化したカプセルの割合が、β-カテニン欠損胚では、着床後の

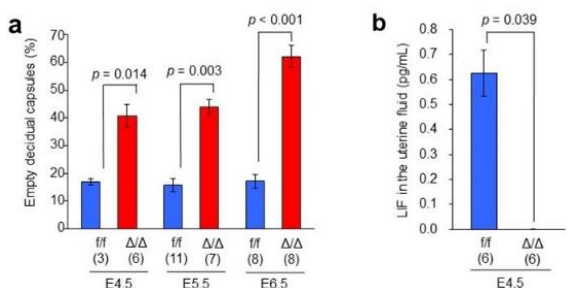


図5 β-カテニン完全欠損胚の着床異常（子宮内でのLIFの分泌量の低下）

ステージ (E4.5、E5.5、E6.5) で非常に多くなることがわかった (図 5 a)。

さらに通常では、胚盤胞がハッチングした後に着床が成立すると、leukemia inhibitory factor (LIF) が子宮側の組織から分泌される。ところが、着床が成立した直後 (E4.5) の子宮内液中の LIF を含めたサイトカインの量を、マルチプレックス法によって定量したところ、 β -カテニン欠損胚に対して、子宮からの LIF が分泌されないことが明らかになった (図 5 b)。以上のことから、 β -カテニン欠損胚を子宮が胚として認識していないことが推測された。

(4) β -カテニン欠損胚の着床異常のレスキュー実験

着床を調節する胚由来サイトカインを含む可能性が高いと考えられるコントロール胚 (E3.5)

が存在する子宮を PBS で洗浄し、その洗浄液を β -カテニン欠損胚が存在する母親マウスの子宮内に投与することにより、着床異常のレスキューを試みた。結果として着床異常が回復した (図 6 a, b, c, d, e, f)。次に、 β -catenin 欠損胚とコントロール胚盤胞を比較したマイクロアレイ解析を行ったところ、 β -catenin 欠損胚で顕著に発現が低下する 4 つのサイトカインを同定した。そこで、これらのサイトカインのどれか (または、すべて) によって子宮 (上皮細胞または間葉系細胞) から LIF が分泌されることを試みた。マウス子宮腔内にサイトカイン 4 因子を注入した後、子宮内腔液を回収し、ウェスタンブロット解析により LIF の分泌の有無を検出した。また、マウス子宮内膜細胞の初代培養系に加えて、ヒト子宮内膜上皮細胞の初代培養系に上述のサイトカインを添加することによって、LIF の分泌の有無を検討した。本研究の成果として論文投稿中である。

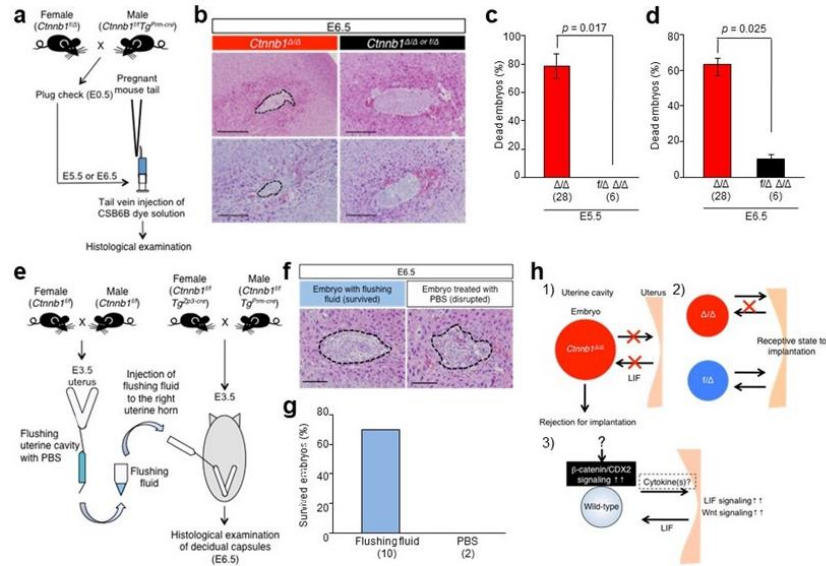


図6 着床異常のレスキュー(野生型マウスの卵管内液)

マウス子宮腔内にサイトカイン 4 因子を注入した後、子宮内腔液を回収し、ウェスタンブロット解析により LIF の分泌の有無を検出した。また、マウス子宮内膜細胞の初代培養系に加えて、ヒト子宮内膜上皮細胞の初代培養系に上述のサイトカインを添加することによって、LIF の分泌の有無を検討した。本研究の成果として論文投稿中である。

(5) 本研究の特色

これまで分子生物学的研究や細胞生物学的研究などの研究により、着床や妊娠維持を成功させるために子宮側が起こす反応については解明が進んできた。その一方で、着床において胚がどのような役割を持っているのかは未だに不明な点が数多くある。本研究は、 β -カテニンを欠損した胚は着床異常を起こすことを証明し、その表現型と胚を解析することにより、着床に必要なサイトカインを特定するものである。この表現型は今までの研究では報告が無かったものであり、これにより、着床のメカニズムの一部を解明することができる点で独創的な研究になると思っている (図 7)。

(6) 本研究の意義

着床の際、胚側から何かシグナルが出ているののではないか、そのシグナルによって子宮側が何らかの反応を起こし、着床を成功させるのではないかとすることは既に論文で指摘されてきた。しかしながら、そのシグナルが何であるか、どのような働きをするのか、あるいはそのシグナルがないとどうなるのかなどは研究が進んでおらず、論文は出ていない。本研究は着床に必要な胚性因子を特定するための初めての研究であるため、着床研究を更なるステップに進めるための足がかりになるであろう。

(7) 将来の見通し

本研究によってマウスにおける着床に必要な胚側因子を明らかにすることは、ヒトをはじめとする胎生動物の着床メカニズムを解明するための第一歩となることができる。さらに、この研究を発展させることにより、不妊の大きな原因の一つである着床不全の解明と治療への助けとなることが期待できる。

【新しいモデル】

胚・母体間の相互作用

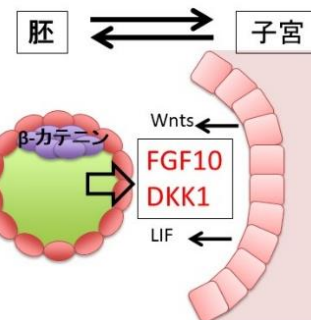


図7 着床に至る子宮と胚盤胞の相互作用

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sasaki Hiroyuki, Hamatani Toshio, Kamijo Shintaro, Iwai Maki, Kobanawa Masato, Ogawa Seiji, Miyado Kenji, Tanaka Mamoru	4. 巻 10
2. 論文標題 Impact of Oxidative Stress on Age-Associated Decline in Oocyte Developmental Competence	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 811
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2019.00811	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 -

1. 著者名 Iwai M, Harada Y, Miyabayashi R, Kang W, Nakamura A, Kawano N, Miyamoto Y, Yamada M, Hamatani T, Miyado M, Yoshida K, Saito H, Tanaka M, Umezawa A, Miyado K.	4. 巻 4
2. 論文標題 Chemotactic behavior of egg mitochondria in response to sperm fusion in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e00944
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2018.e00944	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 -

1. 著者名 Iwai M, Hamatani T, Nakamura A, Kawano N, Kanai S, Kang W, Yoshii N, Odawara Y, Yamada M, Miyamoto Y, Saito T, Saito H, Miyado M, Umezawa A, Miyado K, Tanaka M.	4. 巻 99
2. 論文標題 Membrane protein CD9 is repositioned and released to enhance uterine function.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 200-209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-018-0145-1	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 祝井麻希
2. 発表標題 子宮内膜上皮の膜タンパク質CD9は細胞内局在・細胞外分泌によって子宮機能を制御する
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 祝井麻希
2. 発表標題 不妊治療が就労女性のワークライフバランスに与える影響
3. 学会等名 第153回関東生殖医学会
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------