

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19780215

研究課題名（和文）食虫目スunksにおける妊娠維持機構の解析と着床因子の探索

研究課題名（英文）The study of pregnancy and implantation factors in the musk shrew (*Suncus murinus*).

研究代表者

井上 直子 (INOUE NAOKO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号：90377789

研究成果の概要：

食虫目スunksでは妊娠初期の子宮におけるステロイドホルモン制御機構が不明であったが、本研究により卵巣だけでなく子宮において局所的に産生されるプロゲステロンならびにエストロゲンの相互作用により妊娠を維持している可能性が考えられた。また哺乳類において重要な着床因子の1つである白血病阻止因子 (LIF) がスunksの着床に関与していることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	330,000	3,730,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：スunks、妊娠、着床、ステロイドホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

有胎盤哺乳類の胚着床、妊娠において性ステロイドホルモンは子宮内膜の増殖分化を促し、様々なサイトカインを誘起することにより妊娠維持における主要な役割を果たしている。プロゲステロンは卵巣の黄体、および胎盤で主に合成され全妊娠期間を通じて必須のステロイドである。しかしなが

ら食虫目トガリネズミ科に属する実験動物であるスunks (*Suncus murinus*：交尾排卵動物、妊娠期間約 30 日) は、妊娠中期になるまでプロゲステロンは非妊娠状態と同等の低レベルを保ち、着床前の妊娠 5 日に卵巣除去を行っても、その後の全妊娠期間においていかなるステロイドを投与することなく妊娠が継続され、産仔が得られる唯

一の哺乳類であると報告されている (Hasler and Nalbandov, 1978)。卵巣、胎盤以外のプロゲステロン産生母地としては副腎が考えられるが、我々のこれまでの研究では、正常個体と卵巣除去個体の妊娠期の副腎におけるプロゲステロン産生に有意な差はみられなかった (第 98、99 回日本繁殖生物学会、第 106 回日本畜産学会)。また胎盤未形成時に副腎と卵巣の両方を除去しても妊娠が継続した (Furumura et al., 1985) という報告や、正常個体と卵巣除去個体の妊娠期におけるプロゲステロン濃度の推移には変化がみられないとの報告もあり、シンクスの妊娠初期におけるプロゲステロンの役割は未だ不明である。またエストロゲンは多くの哺乳類で胚の着床に必要とされるステロイドホルモンであるが、シンクス子宮ではエストロゲンに対する反応性が欠如しているとの報告がある。さらに着床に関する因子なども明らかにされておらず、妊娠維持機構に関して不明な点が数多く存在している。

## 2. 研究の目的

本研究では、シンクスの妊娠初期におけるプロゲステロンとエストロゲンの産生動態を解析することにより、着床期前後におけるステロイドホルモン制御機構を明らかにすること。ならびに着床に関与する因子の発現を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 子宮におけるステロイドホルモン応答

卵巣除去または卵巣+副腎除去を施した KAT 系統雌シンクスにプロゲステロン (2mg/0.1ml/個体) またはエストラジオール (0.5  $\mu$ g/0.1ml/個体) を単独または混合皮下投与し、投与24時間後の子宮湿重量の変化を調べた。コントロールにはセサミオイルを投与した。子宮における細胞増殖を

検討するために、組織採取の2時間前にブロモデオキシウリジン (BrdU) を投与し、ホルモン投与24時間後に子宮を採取、4%PFA固定後、常法に従いパラフィン切片を作製し、BrdU、プロゲステロン受容体 (PR) ならびにエストロゲン受容体 (ER  $\alpha$ ) の発現を免疫組織化学により解析した。

### 2) ステロイドホルモン産生ならびに受容体発現の解析

非妊娠ならびに妊娠1-10日の KAT 系統シンクス (妊娠は雌雄を2時間同居させ、雌の膣垢における精子の有無により確認) の子宮を採取し、免疫組織化学的手法によりステロイド合成酵素である P450<sub>scc</sub>、3  $\beta$  HSD、P450<sub>arom</sub> ならびにステロイドホルモン受容体の PR、ER  $\alpha$  の発現を解析した。またラジオイムノアッセイ (RIA) を用いて交尾前の非妊娠時から分娩後までの血漿中プロゲステロン濃度を測定した。

### 3) 着床期のステロイドホルモンの役割

妊娠5-7日にプロゲステロン拮抗剤 (RU486 : 13mg/kg b. w.) を皮下投与し、妊娠における影響を検討した。また妊娠3-5日に卵巣を除去し、妊娠維持を検討するとともに、一部にはエストラジオール (0.5  $\mu$ g/0.1ml/個体) を卵巣除去日から妊娠7日まで皮下投与した。

### 4) 着床因子・白血球阻止因子 (LIF) 発現の解析

非妊娠ならびに妊娠1-8日の子宮を採取し、Western blotにより LIF 発現を検討した。

## 4. 研究成果

### 1) 子宮におけるステロイドホルモン応答

これまでシンクス子宮ではエストロゲンに対する反応性が欠如していると報告されてきたが、エストロゲン単独投与によりコントロールに対し、子宮湿重量の有意な増加がみられ、子宮上皮ならびに間質におい

てBrdU陽性細胞が確認できた。プロゲステロンの単独投与では子宮湿重量における変化はみられなかったが、BrdU陽性細胞が子宮上皮ならびに間質においてみられた。またプロゲステロンとエストロゲンの混合投与では子宮湿重量が増加し、子宮上皮におけるBrdU陽性細胞数がそれぞれの単独投与より増加した。PR発現はコントロールと比較して、プロゲステロン投与により子宮上皮、子宮腺、筋層で減少し、エストロゲン投与により間質で上昇した。混合投与では子宮上皮、子宮腺で減少したが、間質では上昇した。ER $\alpha$ 発現はプロゲステロンならびに混合投与により、子宮上皮、子宮腺、筋層において減少した。エストロゲン投与では、コントロールと比較して変化は見られなかった。いずれも卵巣除去、卵巣+副腎除去間における差は見られなかった。これらのことより、スunks子宮はプロゲステロンならびにエストロゲンの相互作用によって、子宮上皮や間質における細胞増殖を促し、ステロイドホルモン受容体の発現を調節していることが明らかとなった。

## 2) ステロイドホルモン産生ならびに受容体発現の解析

卵巣、副腎以外のステロイドホルモン産生母地として、子宮におけるステロイドホルモン産生能を検討したところ、P450sccは非妊娠時より、3 $\beta$ HSD、P450aromはいずれも妊娠3日より子宮上皮、子宮腺において発現がみられた。卵巣と比較すると発現は弱く、また詳細なプロゲステロン、エストロゲン産生量を求めるには別の手法を用いた解析が必要であるが、子宮において局所的にステロイドホルモンが産生され、妊娠維持に関与している可能性が示唆された。また子宮におけるPR、ER $\alpha$ の局在を免疫組織化学的に解析したところ、PRは子宮上皮に

おいて非妊娠時から妊娠3日まで、間質、子宮腺において非妊娠時から胎盤が完全に形成されるまで、筋層においては胎盤形成後まで常に発現がみられた。しかしながら胎盤においてはPR発現がみられなかった。ER $\alpha$ は非妊娠時から妊娠6日まで子宮上皮、間質、子宮腺、筋層で強い発現がみられたが、胚の着床が生じると子宮上皮、間質における発現が消失した。非妊娠時から分娩後までの血漿プロゲステロン濃度は、妊娠15日目まで交尾前と同等の低濃度のプロゲステロン値を示し、妊娠中期の15日以降になりプロゲステロン値が急速に上昇した。これらのことより、スunksでは他のほ乳類と同様にプロゲステロンとエストロゲンの作用によって着床ならびに初期の妊娠が維持されることが考えられた。着床前に卵巣除去を施しても妊娠が継続したというこれまでの報告は、スunksは妊娠初期にプロゲステロンを多量に必要としないため、卵巣を除去しても子宮で産生される少量のプロゲステロンやエストロゲンの効果により妊娠が継続した可能性が考えられた。着床直後にER $\alpha$ 発現が急激に変化したことや胎盤におけるPR発現がみられなかったことより、胎盤形成過程におけるエストロゲンやプロゲステロンの役割は他の一般的な哺乳類と異なることが考えられた。

## 3) 着床期のステロイドホルモンの役割

プロゲステロン拮抗剤 (RU486) を妊娠5-7日に投与すると、妊娠が維持できず産仔は得られなかった。このことより、スunksの妊娠 (着床) において、少量であってもプロゲステロンは必須であることが明らかとなった。また着床日前 (3-5日) に卵巣除去を施し、妊娠を継続させた個体ではいずれも産仔を得ることはできなかったが、妊娠3日に卵巣除去し、7日までエストロゲン

を投与した個体で産仔を得られたものがあった。しかしながら5個体中1個体が成功したのみで、着床期におけるエストロゲンの役割とあわせて、さらなる検討が必要である。

#### 4) 着床因子・LIF発現の解析

スunks子宮における着床因子の発現を調べたところ、哺乳類の着床因子の1つとして明らかにされているLIFがスunks子宮においても着床日（妊娠7日目）の前日の妊娠6日で発現し、スunksの着床にもLIFが関与していることが考えられた。免疫組織化学によるスunks子宮におけるLIFの発現ならびにreal-time PCRによるLIF遺伝子の発現変動は現在検討中である。マウスやラットにおいてはLIFがエストロゲンの一過性上昇によって誘導されることがわかっているが、スunksの妊娠期間におけるエストロゲン濃度の推移は今のところ不明であり、現在スunksにおけるエストロゲンのアッセイ系を確立中である。

#### 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）

〔学会発表〕（計3件）

（1）NAOKO INOUE、Changes in localization of steroidogenic enzymes and steroid hormone receptors in the musk shrew (*Suncus murinus*). 米国繁殖学会、2008年5月29日、米国

（2）井上直子、スunks子宮におけるステロイドホルモン感受性、日本繁殖生物学会、2007年10月20日、東京大学

（3）溝呂木敏弘、スunks子宮におけるステロイド感受性、東海実験動物研究会、2007年7月7日、名古屋

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 直子 (INOUE NAOKO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号：90377789