

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380161

研究課題名(和文)

胚着床における母子境界組織の時間的・空間的調和～着床期流産の解決に向けて～

研究課題名(英文) Time and spatial regulation of the embryo implantation at fetomaternal interface; the resolution of habitual and spontaneous abortion.

研究代表者：

本道 栄一 (Eiichi Hondo)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：30271745

研究成果の概要(和文):本研究では、項目を3つにわけて胚着床の分子機構の解明を目指した。胚着床は、胚が子宮内膜に接着する前後で生物現象が大きく二つに分けられる。接着前で最も大切な現象は、胚の子宮内でのスペーシングであり、接着後は子宮内膜の炎症反応を伴う組織のリモデリングである。この二つの仕組みを検討すると同時に、発見された分子経路を抑制することによる着床阻害試験の確立を行った。スペーシングに関しては、胚が卵管に存在する時期にはすでに重力方向の胚着床予定部位は決定されていることを明らかにし、子宮内膜のリモデリングに関しては、LIFによるプロジェステロン経路の制御、神経筋接合部で必須の役割を担うAgrin-アセチルコリン受容体経路の重要性について明らかにした。また、抗体を用いて分子経路を特異的に阻害する非常に簡便な方法の開発を行った。これらにより、今後の胚着床の研究が迅速かつ大幅に発展することが期待される。

研究成果の概要(英文): This study aimed to clarify the mechanism of embryo implantation in mice. The process of embryo implantation is divided into 2 portions; spacing of the embryo before attachment of the embryo to the surface of the endometrium, and remodeling of the endometrium after attachment. In addition to these analysis of molecular networks regulating embryo implantation, development of the technique which disrupt the molecular network discovered, was performed. In the study of embryo spacing, the predicted regions where the embryo attaches, were already determined before the embryo descended from the oviduct to the uterine horn. Also, it was revealed about remodeling of the endometrium that LIF regulates the progesterone pathway, and Agrin-acetylcholine pathway, which is indispensable for the function at the neuro-muscular junction. Finally, very easy method to disrupt embryo implantation was invented in this study. This study must promote rapid and wide development of investigation in embryo implantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：発生生物学、形態学

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：LIF, 胚着床, 脱落膜化, スペーシング

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類において、妊娠の成否は、その95%

以上が胚着床の成否にかかっている。つまり、動物種を問わず、自発性・習慣性流産のほとんどが胚の着床期に起こるのである。着床期

流産が、産業動物の生産の大きな妨げとなり、ヒトおよび動物福祉の向上の妨げとなっていることは明らかである。一方で、着床期流産の抜本的な解決策は出されていない。今後、胚着床の制御機構が解明され、着床期流産が回避されれば、産業動物の生産性が大きく向上することは疑いなく、さらに絶滅危惧動物の確保や、ヒトの不妊治療に大きな進歩を見込むことができる。

正常の妊娠過程では、胚の子宮上皮への接着に続き、1. 胚と子宮の接着部位での子宮上皮細胞のアポトーシス 2. 子宮内膜における顕著な脱落膜化 3. 子宮管腔の閉鎖の3つが調和しながら連続して起こることが必要である(Hondo and Stewart, *Genome Biol*, 2004)。ところが、着床不全を起こしているマウスでは、胚が子宮へ接着するものの、上記1-3が全く起こらず、従って最終的に胚は流産する。着床不全マウスでは、胚-子宮上皮間 (A)、子宮上皮細胞-子宮上皮細胞間 (B)、子宮上皮-間質細胞 (脱落膜細胞へ分化) 間 (C) での分子応答が正常に機能しないために流産が起こるものと考えられるが、その詳細は不明である。胚着床に関しては、上記の他、胚が子宮へ接着する前に、子宮管腔の中で正常な位置取り (スペーシング) を完了する必要があるが(Hondo *et al*, *Anat Histol Embryol*, 2007)、その機能の詳細も不明である。LPA3 を欠損したマウスでは、正常なスペーシングが起こらず、隣の胚と胎盤を共有することで、胚の過密により妊娠中期に流産することが知られている (Ye *et al*, *Nature*, 2005)。このように、受精から胎盤形成に至るまで (着床期) には機能の異なる二つのイベント (子宮内膜の変化とスペーシング) を正確に完了する必要があるが、それを制御する分子ネットワークの詳細は不明のままであった。

## 2. 研究の目的

- 前項で述べた子宮内膜の変化1-3をコントロールする分子ネットワークを明らかにする。
- 胚のスペーシングを制御する分子ネットワークを明らかにする。
- 上のAおよびBで明らかになった分子ネットワークの情報を基に、*in vivo*での胚着床のコントロール試験を行う。

## 3. 研究の方法

- 本研究では、マウス胚着床に必須の因子である白血病阻止因子 (LIF) の下流の分子経路を明らかにすることを主として

行った。特に、Indian hedgehog (Ihh) 遺伝子との関連、神経筋接合部で必須の役割を担っている Agrin 関連分子との関連について検討を行った。哺乳類の妊娠現象の本質は、子宮内膜における正常な血管新生である。従って、LIF の持つ血管新生に対する役割について調査を行った。

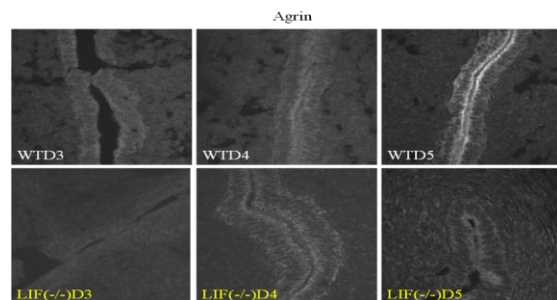
- 当初の予定では、既存のマイクロアレイデータから得られた分子ネットワークを基準とする予定であったが、タンパク質発現との相関性の問題から研究の抜本的な見直しを行った。まず、胚のスペーシングにおいて重力軸と並行した間膜-反間膜軸での位置取りを解析するモデルの作出を行った。
- 当初の予定では、着床遅延マウスおよび LIF 欠損マウスを用いて着床期流産の回復試験を行う予定であったが、当研究室で LIF 欠損マウスが絶えてしまったこと、着床遅延マウスにおいて子宮内への分子導入が効率よく行えなかったことから、着床阻害試験のみを行った。これに関してはレンチウイルスベクター法に代わって、単純な抗体投与法の開発を行った。

## 4. 研究成果

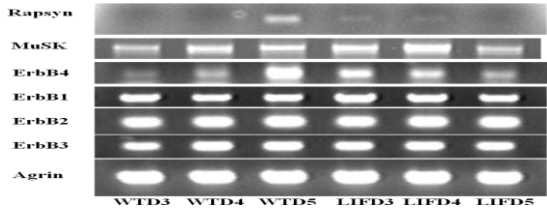
### A. Agrin 関連分子について

神経筋接合部において必須の役割を担う Agrin および関連分子と LIF の関連性について検討を行った。動物は LIF 欠損マウスおよび野生型マウスを用いた。まず、Agrin の着床期における発現パターンを解析するために、LIF 欠損マウスおよび野生型マウスの妊娠3日、4日、5日子宮での発現解析を行った (下図)。

(例 WTD3: 野生型マウス妊娠3日)



野生型マウスでの妊娠3日、4日およびすべての LIF 欠損マウスでの Agrin の発現およびその強度は類似していたが、妊娠5日目には子宮上皮細胞の頂面に強く発現しており、子宮管腔の閉塞に関与している可能性が示唆された。次に、Agrin 関連分子の子宮内膜における発現を確認した (下図)



結果、神経筋結合部において、Agrin からアセチルコリン受容体の凝集にいたる分子経路のすべてのメンバーが子宮上皮でも揃っていることが明らかとなった。従って、アセチルコリンエステラーゼを検出することにより間接的にアセチルコリン受容体の所在を検出した。結果、野生型マウスの妊娠4日、5日で子宮上皮頂面において強い反応が認められたが、LIF 欠損マウスではこのような反応が認められなかった。これにより、LIF の作用のひとつは、Agrin-アセチルコリン受容体経路を通して、子宮管腔の閉塞を制御することであると結論付けた。

#### LIF-Ihh 経路の解析

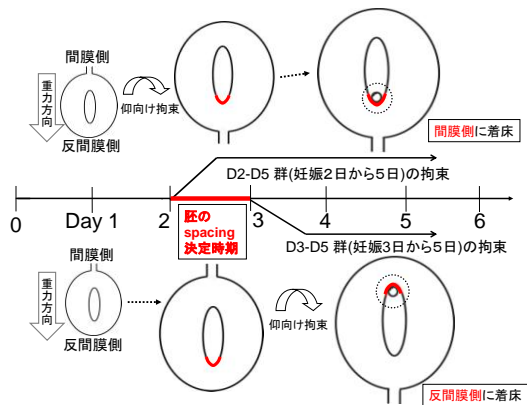
本研究でも同様に、LIF 欠損マウスおよび着床遅延マウスを用いて研究を行った。本経路の解析では、マイクロアレイの結果に基づき、プロゲステロン受容体 (Pgr) を加えた、LIF-Ihh-Pgr の三者の関連について研究を行った。野生型マウスで Ihh 遺伝子の発現は妊娠4日目にピークに達し、Pgr 遺伝子は妊娠5日目に減少を開始することが明らかとなった。一方、LIF 欠損マウスではこのような変化は認められなかった。着床遅延マウスに LIF を投与したところ、両遺伝子量ともに増加したが Pgr 遺伝子の発現は一過性で、Ihh の発現上昇に先立って起きた。さらに、LIF 欠損マウスにおいて着床遅延処置を施したものにエストロゲン (E2) を投与して Ihh および Pgr 遺伝子の発現を調査したところ、Ihh 遺伝子は E2 投与で上昇したが、Pgr 遺伝子の上昇は起こらなかった。これらの結果は、胚着床必須である LIF の効果のひとつは、プロゲステロン-Pgr 系を媒介する Pgr 遺伝子の発現、次いで起こる Ihh 遺伝子発現を変化させることであると結論した。

#### LIF の血管新生に及ぼす影響

胚着床に及ぼす LIF の作用を具体的に決定していくことを目的として、その血管新生に及ぼす影響を検討した。LIF 欠損マウス子宮の組織標本、着床遅延マウスに LIF を投与した子宮の組織標本および21種のレクチンを用いて研究を行った。結果、*Dolichos biflorus* 由来のひとつのレクチンにおいて、特に LIF 投与後6時間で、血管内皮細胞への結合反応が増加していた。同レクチンが血管新生のマーカーとして知られることから、LIF の胚着床における役割のひとつは、子宮内膜の血管新生を促すことであると結論した。

B. 本項目では、胚が子宮内膜に接触する以前に起こる子宮内での胚のスペーシングに関し、胚の着床部位の決定時期について特定を行い、胚のスペーシング機構を解析するためのモデルの作製を行った。マウス胚は、妊娠3日目に卵管から子宮角へ移行し、その着床部位が決定される。今回は、特に重力方向の胚の位置取りに関し、その決定時期を検討した。出来るだけマウスのストレスを排除する工夫をしながら、マウスの腹部が上を向くように拘束した。拘束は妊娠2日目～5日目、妊娠3日目～6日目、妊娠3日目～5日目の3群を作製し、さらに対照群として拘束ストレスの程度が同様になるよう、腹部が正常に下を向くように拘束する群を作製した。通常、マウスは子宮管腔内で重力方向に従うように、子宮管腔の下部に着床する。この現象に例外は報告されていない。ところが、妊娠2日目～5日目にかけて拘束した群でのみ、胚着床が子宮管腔内の上部に着床するものが確認された(下図)。同期間(妊娠3日目～6日目)、妊娠2日目から妊娠3日目を除いた時期(つまり、妊娠3日目～5日目の拘束)、さらに平伏位での胚着床(対照群)のすべてで胚の着床部位に攪乱が認められなかった(次ページ図)、妊娠2日目から3日目の時期が重力軸に沿った胚のスペーシングに決定的であり、こ



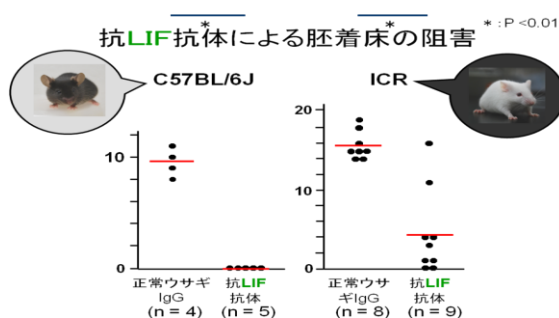


の決定には重力が少なからず関与していることが示唆された。従って、妊娠2日目～妊娠5日目の拘束は、重力方向の胚のスペーシングを研究する上で有効なモデルであることが示唆された。

C. 本項目では、AおよびBで明らかになった分子ネットワークの検証を行うための基礎技術の開発を行った。

ポリエチレングリコール化したマウスの変異 LIF が着床を阻害する報告があるが、本研究を他の分子に応用するのはかなり難しい。なぜなら、ある分子を阻害するためには、活性部位の同定がなされていることが必須であり、新規の分子に関しては同方法が適用できないからである。そこで、抗 LIF 抗体を連続的に腹腔内へ投与することによる着床阻害試験の確立を試みた。組み換え LIF タンパク質を作製し、作製した抗 LIF 抗体を三回連続投与（妊娠3日目～4日目に10時間および12時間間隔）し、B6 および ICR マウスを用いてその着床阻害効果について検討を行った。二つの系統のマウスを用いたのは、将来的に、着床不全の個体差を検討するためである。

結果、下図のように、着床阻害効果が認められた。



さらに、抗 LIF 抗体の子宮内での局在を検討したところ、子宮内のほぼすべての組織で陽性反応が認められた。このことは簡便な抗体投与試験により候補分子の機能抑制が胚着床においては可能であることを示している。そこで、その一例として Agrin の阻害試験を

行った。結果、胚着床は一部抑制され、そのすべてで子宮管腔の閉塞が阻害されていた。胚着床が完全には抑制されなかったのは、Agrin の生理活性部位を直接認識する抗体ではなかったことが考えられたが、一方で本研究の有効性、Aで示唆した一つの作用が検証できたことは非常に大きな結果である。

## 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)

[雑誌論文] (計 5 件)

1) Spacing of the embryo in the uterus is disrupted by the supine position of the body during the peri-implantation period in mice. Sugiyama M, Terakawa J, Khan H, Wakitani S, Choi EK, Kiso Y, Hondo E. J Reprod Dev. 2010 Apr;56(2):191-4. (査読有)

2) Reproductive performance in diabetes mice with a special reference to uterine natural killer cells and placental growth factor. Phichitrasilp T, Hondo E, Rerkamnuaychoke W, Wakitani S, Sugiyama M, Terakawa J, Kiso Y. J Vet Med Sci. 2009 Apr;71(4):519-23. (査読有)

3) Agrin pathway is controlled by leukemia inhibitory factor (LIF) in murine implantation. Terakawa J, Hondo E, Sugiyama M, Wakitani S, Stewart CL, Kiso Y. J Reprod Dev. 2009 Jun;55(3):293-8. (査読有)

4) Spontaneous endometrial hyperplasia in the uteri of IL-2 receptor beta-chain transgenic mice. Kusakabe K, Kiso Y, Hondo E, Takeshita A, Kato K, Okada T, Shibata MA, Otsuki Y. J Reprod Dev. 2009 Jun;55(3):273-7. (査読有)

5) Uterine natural killer cells in perforin and beta(2)-microglobulin deficient mice. Phichitrasilp T, Hondo E, Kusakabe K, Nakagawa Y, Ihara K, Wakitani S, Kiso Y. J Vet Med Sci. 2009 Feb;71(2):251-3. (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

Murine Implantation-Similarity and Differences Among Species. Eiichi Hondo. The Third Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. November 4-9, 2009. Chungbuk National University, Cheongju, Korea. (招待講演)

〔図書〕（計 0 件）  
〔その他〕  
ホームページ等

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本道栄一（Eiichi Hondo）  
名古屋大学・生命農学研究科・教授  
研究者番号：30271745

### (2) 研究分担者

木曾康郎（KISO Yasuo）  
山口大学・農学部・教授  
研究者番号：10142374

水上洋一（MIZUKAMI Yoichi）  
山口大学・総合科学実験センター・教授  
研究者番号：80274158

吉国通庸（YOSHIKUNI Michiyasu）  
九州大学・農学研究員・教授  
研究者番号：50210662

### (3) 連携研究者

該当なし