

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16763

研究課題名（和文）Lif及び下流シグナルによる胚活性化・着床機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of Lif-induced blastocyst activation and implantation

研究代表者

藍川 志津（Aikawa, Shizu）

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：80884577

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：Lifはヒト・マウスの着床期子宮上皮で高発現する。本研究では子宮上皮特異的にLifを欠損(Lif eKO)し、子宮におけるLifの分子機構を解析した。その結果、Lif eKOは重篤な不妊となることが明らかとなった。胚着床異常の原因を探るためRNA-seq解析を行ったところ、Lif eKO上皮ではStat3関連遺伝子及び胚着床関連遺伝子の発現が異常となっていた。更に着床期子宮内膜の3D免疫染色を行ったところ、Lif eKO、Stat3 eKOでは上皮の構造変化が全く起きていないことを見出した。以上から、Lifは上皮層に作用し、Stat3を介して胚着床と上皮形態変化を誘導していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不妊は生殖可能年齢のカップルの約15%が経験する社会的な問題である。現在までに体外受精や良好胚の選別法などが大きく発展してきている一方で、生殖補助医療による妊娠成功率は約30%で頭打ちとなっている。その要因として胚を子宮内に移植した際に子宮内膜との相互作用がうまくいかない着床異常が挙げられるが、倫理的観点からヒトにおける着床研究はほぼ不可能であり、その詳細なメカニズムはブラックボックスのままである。本研究はヒト・マウスで共通して子宮内膜での発現が見られるLifに着目し、その詳細な作用機序を明らかにしたものであり、今後着床診断や治療法確立に役立つと期待される。

研究成果の概要（英文）：Lif is highly expressed in the human and mouse uterus during implantation. In the present study, I analyzed the molecular mechanism of Lif in the uterus by specifically deleting Lif in the uterine epithelium (Lif eKO), and found that Lif eKO results in severe infertility. RNA-seq analysis revealed that the expression of Stat3-related genes and a series of genes involved in the transition from the receptive to the embryo-attachment phase was compromised in the Lif eKO epithelium. I also performed 3D immunostaining of the uterine epithelia and found that no structural changes of the epithelium occurred in Lif eKO and Stat3 eKO. These results suggest that Lif secreted from the endometrial epithelium acts on the epithelial layer and induces embryonic adhesion and epithelial morphological changes via Stat3 activation to ensure successful pregnancy.

研究分野：産婦人科学

キーワード：胚着床 妊娠 Lif

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

不妊は生殖可能年齢のカップルの約15%が経験し、殊に先進国においては高齢出産の増加に伴い社会的な問題となっている。現在までに体外受精や良好受精卵(胚)の選別法などが大きく発展してきている一方で、生殖補助医療による妊娠成功率は約30%で頭打ちとなっている。その要因として胚を子宮内に移植した際に子宮内膜との相互作用がうまくいかない着床異常が挙げられるが、倫理的観点からヒトにおける着床研究はほぼ不可能であり、その詳細なメカニズムはブラックボックスのままである。

着床は、①胚受容能を獲得した子宮内膜上皮への胚の対位(胚対位)、②着床能を得た(活性化した)胚の子宮内膜管腔上皮への接着(胚接着)、③胚の子宮内膜間質への浸潤(胚浸潤)という3つの一連の過程で定義される(図1)。胚が子宮内に到達してから着床が完了するまではわずかに数日間と極めて短時間であるが、この過程において胚または子宮内膜において何らかの異常が生じた場合、着床不全、胎児発育不良あるいは流産に至る。よって、着床期の胚と子宮内膜間における相互作用は厳密に制御されている必要がある。

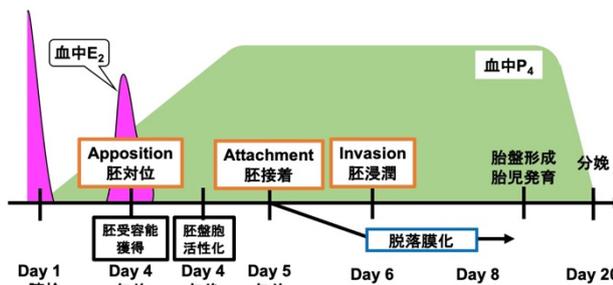


図1. 着床のマウスモデル

女性ホルモン P_4 及び E_2 は、哺乳動物において普遍的に着床に必須であることが明確に示されている分子である。交配後卵巣で黄体形成が生じると、着床期に向けて血中 P_4 濃度は上昇し、その後分娩に至るまで高いレベルで維持される。加えて、胚着床期には E_2 の一過的な分泌が生じる。マウスにおいて、交配確認後に卵巣を切除しても、 P_4 を投与することで、胚及び子宮内膜を着床期と同様の状態にすることができる(Paria et al, PNAS 1993; Ma et al, PNAS 2003)。一方、 P_4 を投与するだけでは胚盤胞の活性化は生じず、同時に E_2 を単回投与することで胚は着床することができる。この E_2 による着床誘導作用は P_4 非存在下では全く観察されないことから、両ホルモンが厳密なバランスで作用することが重要である(図1)。このように女性ホルモンの着床への寄与が示されてきた一方で、詳細な分子機構はほとんど明らかとなっていない。特に、初期胚自身は女性ホルモン受容体を発現していないことから(Gorski et al, Environ Health Perspect. 1995)、女性ホルモン刺激を受けた子宮が胚受容能を獲得するとともに何らかの分子を分泌し、胚及び子宮内膜自身に作用することで着床が開始されると本研究者は仮説を立てた。

2. 研究の目的

これまで臨床において着床改善の目的で、ホルモン投与療法、子宮内膜搔爬術による内膜肥厚化が試みられている(Almog et al, Fertil Steril. 2010)。しかしながらこれら治療法の効果は限定的であり、抜本的な解決には繋がっていない。また、治療法確立のためには着床異常をもたらす分子機構を明らかにすることが必須であるが、ヒトにおいては倫理的な制限が壁となり、マウス等の何らかの動物モデルが求められる。

女性ホルモンはヒトを含めた全ての哺乳動物において妊娠に必須であることが明確に示されている。血中 P_4 が高濃度に保たれた状態で一過的に E_2 レベルの上昇が生じると、子宮内膜は胚受容能を獲得するとともに胚の活性化が生じ、着床が生じる。本研究では、女性ホルモン依存的に子宮内膜発現上昇し、且つ分泌型因子である分子として、Leukemia inhibitory factor(Lif)に着目した。Lifの全身性KOは完全な不妊であり、その他の様々な着床不全マウスモデルでもLifの発現低下が報告されている(Stewart et al, Nature 1992; Cha et al, Nat Med. 2012)。よって、Lifは胚活性化・着床誘導に必須な分子であると強く示唆される。一方で、複雑なステップからなる胚着床過程においてLif及びその下流分子がどのように機能しているのか、その分子メカニズムはほとんど明らかとなっていない。そこで本研究では子宮上皮特異的なLif欠損マウスを用いることで、Lifによる胚活性化及び着床制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

Lifは子宮だけでなく、胚を含めた他の細胞・組織においても発現するため、Lif全身欠損マウスにおける解析では子宮に限局した評価が困難である。そこで本研究では、子宮内膜上皮特異的Cre・Ltf-Creを用いることにより、Lifを子宮内膜上皮特異的に欠損し、妊娠能及び着床期における表現型を解析した。また、Lifの下流で発現変動する遺伝子群を探索するため、着床期子宮より胚・上皮を回収し、RNA-seq解析を行った。また、近年の研究から、着床期子宮では胚を取り巻く上皮層の組織構造が大きく変化し、これが着床とその後の妊娠を担保することが明らかになってきている(Yuan et al, Nat Commun. 2017)。この検証のため、着床期子宮についてE-Cadherinに対する3D免疫染色を行い、組織透過処理の後、共焦点顕微鏡を用いて子宮内膜上皮の3D像取得を行った。

4. 研究成果

Ltf-Cre を用い Lif の子宮内膜上皮特異的な欠損 (Lif^{eKO}) マウスを作成したところ、Lif^{eKO} は野生型の 1 割程度まで妊孕能が低下していることがわかった。通常、妊娠 5 日目の朝には胚が子宮内膜に接着するが、Lif^{eKO} では接着が全く生じなかった。Lif 欠損時における胚接着異常の原因を探るため、Lif^{eKO} 由来の子宮内膜上皮及び胚について RNA-seq 解析を行ったところ、胚には遺伝子発現異常を認めなかった。一方、Lif^{eKO} 上皮では Stat3 関連遺伝子の発現が低下しているとともに、胚受容期から接着後への転換に関与する一連の遺伝子群の発現が異常となっていた。興味深いことに、これらの Lif^{eKO} における遺伝子発現異常、更に胚接着はリコンビナント Lif (rLif) の投与により回復した。胚接着期の子宮では上皮層が胚を包み込むよう劇的な形態変化が生じることが近年明らかとなってきた。そこで着床期子宮内膜の 3D 免疫染色を行い、上皮の形態を観察したところ、Lif^{eKO}、Stat3^{eKO} では上皮の構造変化が全く起きていないことを見出した。rLif 投与により Lif^{eKO} では上皮形態がレスキューされた一方、Stat3^{eKO} では全く改善がなかったことから、子宮内膜上皮から分泌される Lif は上皮層に作用し、Stat3 活性化を介して胚接着と上皮形態変化を誘導していることが示された。

不妊は生殖可能年齢のカップルの約 15% が経験する社会的な問題である。現在までに体外受精や良好胚の選別法などが大きく発展してきている一方で、生殖補助医療による妊娠成功率は約 30% で頭打ちとなっている。その要因として胚を子宮内に移植した際に子宮内膜との相互作用がうまくいかない着床異常が挙げられるが、倫理的観点からヒトにおける着床研究はほぼ不可能であり、その詳細なメカニズムはブラックボックスのままである。本研究はヒト・マウスで共通して子宮内膜での発現が見られる Lif に着目し、その詳細な作用機序を明らかにしたものである。本研究者らのグループにおいても、ヒト着床期子宮内膜の特に腺上皮において Lif が高発現していることを報告している (Fukui et al. *Repro Sci.* 2021)。本研究の成果は、今後着床診断や治療法確立に役立つと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Fukui Yamato, Hirota Yasushi, Saito-Fujita Tomoko, Aikawa Shizu, Hiraoka Takehiro, Kaku Tetsuaki, Hirata Tomoyuki, Akaeda Shun, Matsuo Mitsunori, Shimizu-Hirota Ryoko, Takeda Norihiko, Ikawa Masahito, Osuga Yutaka | 4. 巻 162 |
| 2. 論文標題 Uterine Epithelial LIF Receptors Contribute to Implantation Chamber Formation in Blastocyst Attachment | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Endocrinology | 6. 最初と最後の頁 bqab169 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endoqr/bqab169 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Fukui Yamato, Hirota Yasushi, Aikawa Shizu, Ishizawa Chihiro, Iida Rei, Kaku Tetsuaki, Hirata Tomoyuki, Akaeda Shun, Hiraoka Takehiro, Matsuo Mitsunori, Osuga Yutaka | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 Uterine Receptivity is Reflected by LIF Expression in the Cervix | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Reproductive Sciences | 6. 最初と最後の頁 1457 ~ 1462 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s43032-021-00816-8 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Aikawa Shizu, Hirota Yasushi, Fukui Yamato, Ishizawa Chihiro, Iida Rei, Kaku Tetsuaki, Hirata Tomoyuki, Akaeda Shun, Hiraoka Takehiro, Matsuo Mitsunori, Osuga Yutaka | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 A gene network of uterine luminal epithelium organizes mouse blastocyst implantation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology | 6. 最初と最後の頁 e12435 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12435 | 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 Hiraoka Takehiro, Hirota Yasushi, Aikawa Shizu, Iida Rei, Ishizawa Chihiro, Kaku Tetsuaki, Hirata Tomoyuki, Fukui Yamato, Akaeda Shun, Matsuo Mitsunori, Shimizu-Hirota Ryoko, Takeda Norihiko, Osuga Yutaka | 4. 巻 163 |
| 2. 論文標題 Constant Activation of STAT3 Contributes to the Development of Adenomyosis in Females | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Endocrinology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endoqr/bqac044 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Hiratsuka Daiki, Aikawa Shizu, Hirota Yasushi, Fukui Yamato, Akaeda Shun, Hiraoka Takehiro, Matsuo Mitsunori, Osuga Yutaka | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 DNA Methylation and Histone Modification Are the Possible Regulators of Preimplantation Blastocyst Activation in Mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Reproductive Sciences | 6. 最初と最後の頁 494 ~ 525 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s43032-022-00988-x | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 藍川志津, 廣田泰, 赤枝俊, 松尾光徳, 賀来哲明, 福井大和, 大須賀穰 |
| 2. 発表標題 Cox-1・Cox-2による胚着床機構の解明 |
| 3. 学会等名 日本生化学会大会(Web) 94th 2021年 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 藍川志津, 廣田泰, 平岡毅大, 大須賀穰 |
| 2. 発表標題 子宮内膜上皮特異的Lifによる着床制御機構の解明 |
| 3. 学会等名 日本繁殖生物学会 第115回大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 藍川志津, 廣田泰, 有田誠, 磯部洋輔, 杉浦悠毅, 赤枝俊, 松尾光徳, 大須賀穰 |
| 2. 発表標題 着床期子宮におけるプロスタグランジンシグナルを介した胚生育巣形成機構 |
| 3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計2件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 藍川志津, 廣田泰 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 中外医学社 | 5. 総ページ数 478 |
| 3. 書名 スキルアップ ARTラボ 生殖補助医療の必須知識とテクニック :1-3-16 着床のメカニズム | |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 藍川志津, 廣田泰 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 メディカルレビュー社 | 5. 総ページ数 82 |
| 3. 書名 HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY Vol.29 No.3 特集：子宮内膜機能の基礎と臨床 | |

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|