

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380172

研究課題名(和文) 胚着床を支える子宮内膜のリモデリング

研究課題名(英文) The remodeling of the endometrium, which supports embryo implantation

研究代表者

本道 栄一 (Hondo, Eiichi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：30271745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウスの子宮内膜間質細胞の分化、脱分化の機構を解析した。マウスの生殖周期中にはエストロゲン(E2)とプロジェステロン(P4)が複雑にからみあって間質細胞の分化制御を行っているが、特にE2がこの制御に強く関わっていることが明らかになった。不完全生殖周期中ではLIF、Oct3/4およびNanogタンパク質が発情後期から前期にかけて発現する一方で、E2は単独で、Oct3/4を制御するKlf4 mRNAの発現誘導を起こすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of differentiation and dedifferentiation of the uterine stromal cells was investigated. In the murine reproductive cycle, estrogen and progesterone regulates them in the complicated manner. This study clarified that especially estrogen are strongly involved in this mechanism. LIF, Oct3/4, and Nanog proteins were up-regulated from postestrus to proestrus, on the other hand, estrogen solely increase the expression Klf4 mRNA, which regulates Oct3/4 directly.

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：子宮内膜間質細胞 エストロゲン 分化・脱分化

## 1. 研究開始当初の背景

### **動物の生産性の向上に向けて**

農学にとって、動物食資源の確保は大きな使命であり、古くから動物の育種選抜による品種改良が行われてきた。品種改良の難しさは、動物の有用性を高めると同時に、近交度の上昇による個体の弱体化、繁殖障害を避けなければならないことにある。近交度の高さによる繁殖障害は、多くの場合、自然流産を引き起こすが（胚は子宮内に存在するが、子宮内膜の細胞が、周囲からの刺激に対して無応答）これを回避することは、動物の生産

## 1. 研究開始当初の背景

### **動物の生産性の向上に向けて**

農学にとって、動物食資源の確保は大きな使命であり、古くから動物の育種選抜による品種改良が行われてきた。品種改良の難しさは、動物の有用性を高めると同時に、近交度の上昇による個体の弱体化、繁殖障害を避けなければならないことにある。近交度の高さによる繁殖障害は、多くの場合、自然流産を引き起こすが（胚は子宮内に存在するが、子宮内膜の細胞が、周囲からの刺激に対して無応答）これを回避することは、動物の生産性を維持するためにとっても大切なことである。この自然流産のほとんどすべては、胚が子宮内膜に接着する時期、つまり胚の着床期に起こることが知られており、着床期の抜本的な解決が動物の生産性の向上につながるのである。

### **研究の背景（胚着床の研究の現状と今後）**

現時点でも、着床期流産を完全に解決できるだけの知見がなく、投薬等による経験的な対策を施すに留まる。申請者も含めて多くの研究者が、胚着床の分子基盤を確立しようとしてきた（Hondo and Stewart, *Genom Biol*, 2004）。次世代シーケンサーの普及により、トランスクリプトーム解析も急速に進んでいる。プロテオームの完成には、まだ少し時間がかかるものの着実に進展している。一方、胚着床の研究で一つの厳しい問題は、トランスクリプトームとプロテオームの相関性が乏しいことである。つまり mRNA とタンパク質の発現量の推移に相関性が乏しいのである。これを解決するには、今後 miRNA の標的を明らかにすることや、エピジェネティクスの研究を進展させる必要がある。一方で、最も大きな問題は、細胞学レベルのところ潜在している。つまり、子宮内膜を構成する各々の組織で（子宮管腔上皮、子宮腺上皮、粘膜固有層）幹細胞が明確に同定されておらず、組織を構成する細胞群の生殖周期に伴う動態がよくわかっていないのである。我々の研究によると、子宮管腔上皮細胞には機能の異なる複数の細胞種が存在する（Sugiyama and Hondo *et al*, *J Reprod Dev*, 2009）。しかも、この機能の異なる細胞群は、電子顕微鏡でも明確に区別出来ない（T細胞とB細胞が形態学的に区別できないと同様）。これまでに、子宮内膜の細胞種の違いを記載した報告は

なく、従って子宮内膜を構成する細胞の分化・脱分化を研究した報告もない。おそらく、この分化・脱分化は、胚着床の制御と同様、エストロゲンとプロゲステロンによって調節されているに違いない。これらの点が明らかにならないと、どのように胚を正確な位置に誘導し、胎盤形成へと向かわせるのか、また子宮内膜癌発生の機構も根本的には明らかにならないものと思われる。

## 2. 研究の目的

以上のような背景から、本研究では胚着床の根幹をなし、子宮内膜間質細胞の分化・脱分化の機構解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

子宮内膜間質細胞の分化・脱分化の機構解明には、エストロゲンとプロゲステロンが鍵となるが、両ステロイドホルモンは生殖腺に対し協調した複雑な生物活性を持っているため、初年度には、マウスの完全生殖周期中がエストロゲンとプロゲステロンにどの程度依存しているのか、つまり、これら二つのステロイドによって卵巣を除去したマウスの完全生殖周期は制御しうるかについて検討した。もしこれが可能であれば、生殖周期の維持に卵巣は必要なく、従って、エストロゲンとプロゲステロンの二つによって、子宮内膜間質細胞の分化も脱分化も制御されていることになる。

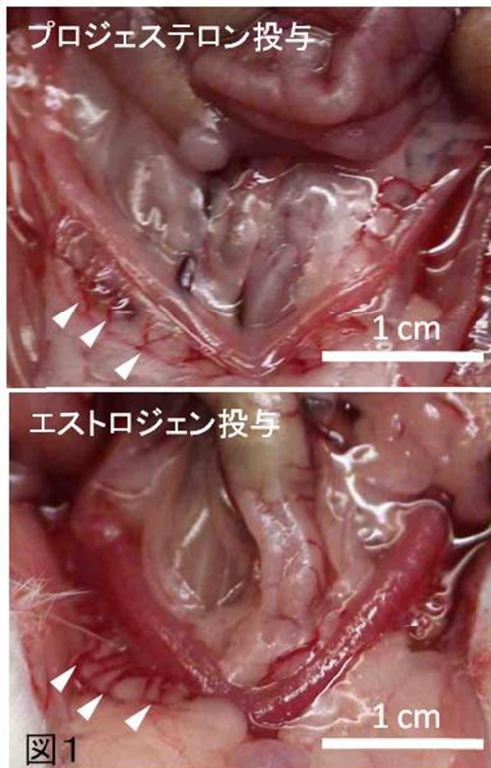
次に、エストロゲンとプロゲステロンの子宮内膜間質細胞への単独作用について、卵巣を除去して両ステロイドを枯渇させたマウスにそれぞれを投与することにより、子宮内膜間質細胞の詳細な形態学的観察を行うとともに、両ステロイドによって発現が誘導される因子についてトランスクリプトーム解析を行った。

## 4. 研究成果

情報に従って、雌雄を交配後、妊娠3日目に卵巣を除去し、プロゲステロンの持続投与、妊娠4日目のエストロゲンの刺激、および胎盤形成期へのエストロゲンの持続投与、さらに分娩期におけるプロゲステロン除去により、卵巣が存在しないまま、プロゲステロンとエストロゲンのみの作用で妊娠が成立し、分娩まで至ることが明らかとなった。つまり、プロゲステロンとエストロゲンを適切な時期に投与することで、マウスの完全生殖周期は維持され、内分泌機関としての卵巣は必要がないことが明らかとなった（雑誌論文 Terakawa *et al*）。

そこで、非妊娠マウスを用いてプロゲステロンとエストロゲンの子宮内膜間質細胞への単独作用を明らかにすることを試みた。性成熟に達した非妊娠マウスより卵巣を除去し、子宮内膜間質細胞の経時変化を電子顕微鏡にて観察した。子宮内膜間質細胞は3週間までは退行性変化を示すが、それ以降8

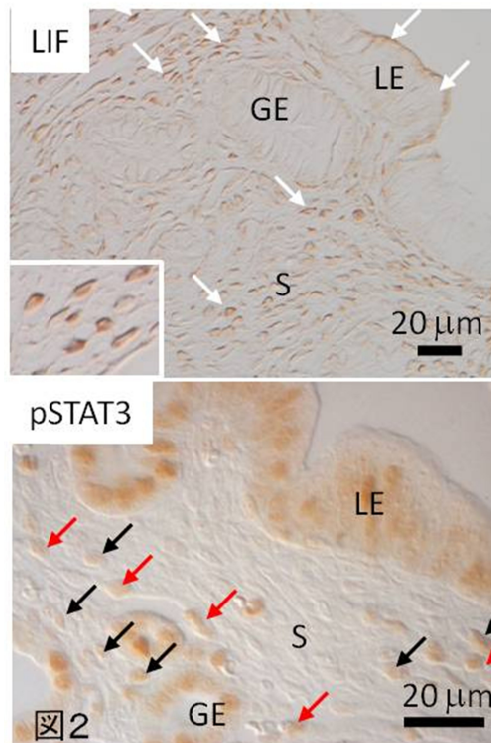
週齢までは全く変化しなかった。従って、卵巣除去後3週間の子宮内膜間質細胞の退行性変化を詳細に調べると、卵巣除去前の間質細胞数も卵巣除去後3週間の間質細胞数も変化しなかった。子宮の肉眼的な大きさは大きく変化するため、細胞の微細構造を調べると、細胞質の体積が著しく減少し、核には異染色質が増え、間質細胞の活性が著しく落ちていることが明らかとなった。そこへ、プロジェステロンとエストロジェンを別々に投与した。すると、エストロジェン投与24時間においてプロジェステロン投与群とは異なる劇的な変化が現れた(図1)。



そこで、この時期の子宮において、細胞のリプログラミングに関与する LIF と STAT3 のリン酸化について調べた。すると、エストロジェン投与群にのみ、LIF の発現と STAT3 のリン酸化が確認された(図2)。

さらに、エストロジェン投与群での Nanog および Oct3/4 の局在を調べたところ、リン酸化 STAT3 の陽性細胞とこれら二つの発現細胞は、多くの場合一致しなかった。このことは、子宮内膜間質細胞の多くは Jak/STAT3 経路とは別の経路で起こる可能性が示唆された。

次に、子宮内膜間質細胞の幹細胞についてを見出すことを目的に、発情周期中の LIF, Nanog, Oct4 の発現を調査した。これら3因子の発現は発情期の子宮内膜にはほとんど見られず、発情後期から発情前期にかけて発現がみられるという共通のパターンをみつけた。このことから、発情周期中に E2 レベルに応じて間質細胞の分化レベルが変動していると考えた。細胞のリプログラミングを行う細胞は予想以上に多く、このことが子宮



内膜は生殖周期中に非常に激しい細胞増殖を行うにもかかわらず癌化が起りにくい原因ではないかと推測した。一方、発情期にもわずかに Nanog, Oct3/4 を発現する細胞が認められたことは、発情周期の影響を受けない細胞すなわち最も未分化な細胞群が、発情期に検出された可能性がある。

そこで、ICR マウスに卵巣除去を施し、8週間後、エストロジェン投与群とプロジェステロン投与群との間で Affymetrix 社の MouseGene2.0 ST アレイを用いてトランスクリプトーム解析を行った。特にエストロジェンは強い生物作用を持っているので、通常は急速に発現が上昇する遺伝子が増加するためトランスクリプトーム解析が困難だが、今回は卵巣除去後8週間を経過させたので、エストロジェンに対する分子応答が緩徐であり(エストロジェンの白血病阻止因子に対する発現応答を指標)マウスの初期発生を制御する様々な遺伝子の発現変動を検出することが出来た。今回特筆すべきは、Klf4 遺伝子の発現がエストロジェン投与後6時間で認められたこと、マイクロアレイで変動が確認される程多量の発現が認められたことである。Klf4 は Oct3/4 に直接作用して脱分化を誘導する作用が報告されていること、Oct3/4 はその発現量が1.5倍程度の変動でも細胞のリプログラミングを誘導することから、マイクロアレイの結果でも、生殖周期中に現れた子宮内膜間質細胞の大規模なリプログラミングが起きていることが推測された。

最後に、これらの変化について系統差が存在するかどうか、その可能性を探った。指標として胚着床に必要な白血病阻止因子 LIF を着床期に阻害し、胚着床の誘導作用を見ることが、これら分子群の系統差を推測しようと

した。抗LIF抗体により、完全に胚着床が阻害された系統はC57/BL6およびMF1系統であり、他の3系統では一部の胚着床が阻害されるかもしくは全く阻害されなかった(雑誌論文 Kobayashi *et al* (in press))。胚着床におけるこの系統差は、すなわち子宮内膜間質細胞の生殖周期中のリプログラミングの分子機構にも系統差がある可能性を示している。

#### 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4件)

The contribution of leukemia inhibitory factor (LIF) for embryo implantation differs among strains of mice. Kobayashi R, Terakawa J, Kato Y, Azimi S, Inoue N, Ohmori Y, Hondo E. Immunobiology 2014(in press) 査読あり

The complete control of murine pregnancy from embryo implantation to parturition. Terakawa J, Watanabe T, Obara R, Sugiyama M, Inoue N, Ohmori Y, Hosaka YZ, Hondo E. Reproduction. 2012 Mar;143(3):411-5. 査読あり

Kisspeptin neurons mediate reflex ovulation in the musk shrew (*Suncus murinus*). Inoue N, Sasagawa K, Ikai K, Sasaki Y, Tomikawa J, Oishi S, Fujii N, Uenoyama Y, Ohmori Y, Yamamoto N, Hondo E, Maeda K, Tsukamura H. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Oct 18;108(42):17527-32. 査読あり

Embryo implantation is blocked by intraperitoneal injection with anti-LIF antibody in mice. Terakawa J, Wakitani S, Sugiyama M, Inoue N, Ohmori Y, Kiso Y, Hosaka YZ, Hondo E. J Reprod Dev. 2011 Dec;57(6):700-7. 査読あり

〔学会発表〕(計8件)

*In vivo* エレクトロポレーション法を用いたマウス子宮内膜への遺伝子導入、小林・早川・井上・大森・本道、日本畜産学会、2013年9月9日、新潟大学

インターロイキン6(IL-6)ファミリーの相互補完によるマウス胚着床の制御、小林・大森・井上・寺川・本道、日本獣医学会学術集会、2013年3月29日、東京大学

Role of LIF/STAT3 signaling pathway for

maintenance of the endometrium in non-pregnant mice. Suga/Terakawa/Sugiyama/Ohmori/Inoue/Hondo, The 4<sup>th</sup> Congress of Asian Association of Veterinary Anatomist, 25 October 2012, Phuket, Thailand.

The regulation of embryo spacing by Ihh, BMPs and Wnts in murine uterus.

Kobayashi/Terakawa/Ohmori/Inoue/Hondo, The 4<sup>th</sup> Congress of Asian Association of Veterinary Anatomist, 25 October 2012, Phuket, Thailand.

Involvement of Cxcl1 and Olfm1 in murine embryo implantation.

Nii/Terakawa/Ohmori/Inoue/Hondo, The 4<sup>th</sup> Congress of Asian Association of Veterinary Anatomist, 25 October 2012, Phuket, Thailand.

The effect of IL-11 and CNTF on embryo implantation.

Tajima/Terakawa/Ohmori/Inoue/Hondo, The 4<sup>th</sup> Congress of Asian Association of Veterinary Anatomist, 25 October 2012, Phuket, Thailand.

非妊娠マウスにおける子宮内膜の形態変化への白血病阻止因子の関与、菅・寺川・杉山・大森・井上・本道、日本畜産学会学術集会、2012年3月29日、名古屋大学

マウス子宮上皮細胞の増殖に対する白血病阻止因子の作用、寺川・杉山・大森・井上・本道、日本獣医学会学術集会、2011年9月9日、大阪府立大学

以上、発表者は名前の前に。

〔図書〕(計1件)

本道 栄一(山本雅子、谷口和美監訳) 緑書房、2014、504(309-342)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(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・大学院生命農学研究科  
教授

研究者番号：30271745

(2)研究分担者

井上 直子 (NAOKO INOUE)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科  
助教

研究者番号：90377789

(3)連携研究者

該当なし