

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659767

研究課題名（和文） インプランテーションウインドウ制御因子の探索

研究課題名（英文） Study on the molecules responsible for implantation window

研究代表者

鈴木 宏志 (SUZUKI HIROSHI)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授

研究者番号：60333473

研究成果の概要（和文）：着床・妊娠にかかわる胚の認識機構を制御する分子の同定を試みるため、人為的に implantation window を早期に解放させ、継時的に採取した卵管および子宮組織における遺伝子発現をマイクロアレイを用いて網羅的に解析した結果、implantation window の開放時に発現が上昇した遺伝子 2 個、および発現が減少した遺伝子 1 個を得た。これらの遺伝子の発現をリアルタイム PCR でより詳細に検討した結果、交配後での子宮での発現上昇、その後の急速な抑制、および着床時における卵巣での発現上昇を認めた。今後、これらの遺伝子を implantation window の制御因子候補として、より詳細な検討を加える必要がある。

研究成果の概要（英文）：To develop a control method for embryonic implantation and subsequent differentiation and proliferation as well as recognition of embryonic attachment in uterus, expression pattern of genes responsible for initiation of implantation window in uterine tissues from an identical recipient which transferred fertilized oocytes at pronucleus stage and embryos at 8-cell stage into right and left side of the oviduct, respectively, was examined by using a DNA microarray. As a result, at the open of implantation window, one down-regulated and two up-regulated genes were identified. These presumably responsible genes for window of implantation were further analyzed the expression profile during the course of preimplantation development and implantation by a real time PCR method. Expression of Sprr2f was highest on 0.5 dpc and gradually decreased with preimplantation development and during implantation. However, Sprr2f strongly expressed in ovarian tissues on 3.5 dpc. Ass1 highly expressed in uterus on 4.5 dpc and in ovary on 3.5 dpc. Further analysis of these molecules as candidates of genes responsible for regulation of implantation window is required in uterine and ovarian tissues at peri-implantation period.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：着床、胚、遺伝子、妊娠、偽妊娠

## 1. 研究開始当初の背景

現在、我が国においては、毎年 60 人に 1 人が体外受精などの生殖補助技術の介在である。この事実は、少子高齢化に悩む我が国

において、生殖補助技術が不妊症治療に多大な貢献を果たしていることを示している。しかしながら、胚移植後の妊娠率は、生殖補助技術による不妊治療が始まった 30 年前と、

さほど変わることなく 20%前後にとどまっております。この妊娠率の向上が残された大きな課題となっている。その最大の要因は、着床の制御に関する理解に乏しいことである。

哺乳動物における胚の着床と妊娠は、胚と母体子宮環境との相互作用によって成立する。母体が胚を受容して着床が可能となる期間を、一般に、implantation window と呼んでいる。これまでの研究は、この window は非常に狭く、また、厳格な卵巣ホルモンの支配下にあることを示していた。しかし、研究代表者は、異なる発生段階の胚を同一の受容雌に移植した場合、移植時に、より発生の進んでいた胚が若い胚よりも先行して着床すること、すなわち、この実験的状況における implantation window は、受容雌の妊娠日齢に固有の window よりも早く開くことを発見した。そこで、本研究は、この胚移植実験系を用いて、着床・妊娠にかかわる胚の認識機構を制御する分子の同定を試み、母体の胚の認識機構の理解のみならず、着床や分化、増殖の制御法の開発によって、医学・薬学への貢献を図ろうとするものである。

## 2. 研究の目的

本研究は、胚移植実験系を駆使した「発見」を礎として、着床・妊娠にかかわる胚の認識機構を制御する分子の同定を試み、母体の胚の認識機構の理解のみならず、着床や分化、増殖の制御法の開発を図ろうとするものである。より具体的には、(1) implantation window 開放のトリガー候補分子の同定と解析、(2) トリガー候補分子の人為的発現制御による胚の着床に及ぼす効果の解析、(3) トリガー候補分子の発現制御遺伝子の探索・同定を成し遂げる基礎を構築する。

本研究の特色は、implantation window の制御に関わる分子の同定、制御機構の理解であり、これらの成果は胚発生機構の理解や母体の胚認識機構の解明に貢献する。また、implantation window の制御に関わる分子の同定によって、implantation window を支配する分子の発現の人為的制御が可能となり、これが胚の着床、妊娠の成立の機会を高めることに繋がることを期待できる独創性を有している。この成果は、不妊治療への貢献が期待できるばかりでなく、効果的な避妊法の開発にも寄与する可能性があるため、質の高い知的財産の形成が見込まれる。従来、哺乳動物の着床は、卵巣ホルモンの厳格な制御下にあり、非常に限局した期間にのみ成就すると考えられ、このことは、着床遅延現象の存在からも支持されていた。すなわち、仮に異なる発生段階の胚が、同一の生殖道に存在した場合には、受容雌の妊娠日齢に同調するように胚の発生は休止し、同時に着床するものと信じられていたのである。本研究は、過去

の常識を打破して、膣栓確認日の受容雌の妊娠日齢に同調している前核期受精卵と 8 細胞期胚の 2 種類の異なる発生段階の胚を同一の受容雌に移植した場合に、8 細胞期胚の方が 2 4 時間先行して着床することを観察したこと、すなわち、より発生の進んでいた胚が若い胚よりも先行して着床すること、この実験的状況における implantation window は受容雌の妊娠日齢に固有の window よりも早く開くことを発見したことに起因する。この発見は、少なくともマウスにおいては、固有の window である 2 4 時間に加え、人為的にさらに 2 4 時間 window を拡大させることの可能性が見出されたことを意味している。この発見を礎とした本研究の成果は、胚の着床、胚の認識機構の解明に大きな貢献を果たすことが考えられる。また、人為的に implantation window の開閉が制御可能となれば、胚の着床機会の延長、拡大が期待され、妊娠率の向上が見込めることとなり、ヒト不妊治療や家畜の生産に効果を発揮すると考えられる一方、新規避妊法の開発も視野に入るなど、質の高い応用が期待できる。

## 3. 研究の方法

前核期の受精卵および 8 細胞期胚を同一の受容雌の左右の卵管に移植して、実験的に implantation window を早期に開放させる。移植後 7 日目まで 2 4 時間間隔で前核期卵側および 8 細胞期胚側の子宮組織および卵管組織を採取する。これらの組織で DNA マイクロアレイによる種々の遺伝子の発現パターン解析を実施し、着床直前に発現が亢進・減少する分子を同定する。複数の異なるサンプル間で発現レベルの変化している遺伝子群を探索し、特徴ある遺伝子を解析するジーンハンティングを試みるとともに、上述の多種のサンプルについての並列解析を行ない、発現情報を網羅的に解析して行く。

また、過去の着床関連分子の解析研究のほとんどは、妊娠と非妊娠状態の比較においてなされていた。胚の存在あるいは胚からの何らかのシグナルが implantation window の開放に重要であるとの仮説を立てると、偽妊娠マウスを用いた検討を加えることが必要である。本実験においては、上述の実験で同定された遺伝子について、妊娠および偽妊娠マウスの 0.5dpc から 10.5dpc まで 24 時間間隔で採取した子宮および卵巣組織から RNA を抽出し、リアルタイム定量 PCR によって発現の推移を観察し、胚の存在の有無と着床前後の遺伝子発現の関係について明らかにする。

## 4. 研究成果

着床・妊娠にかかわる胚の認識機構を制御する分子の同定を試みるため、前核期の受精卵および 8 細胞期胚を同一受容雌の左右の

卵管に移植して人為的に implantation window を早期に解放させ、継時的に採取した卵管および子宮組織における遺伝子発現をマイクロアレイを用いて網羅的に解析した結果、28,815 アレイに対する発現が確認された。自然交配において発現量が5倍以上に変化していた遺伝子は208遺伝子であった。Implantation window が開き始めると考えられる3.5 dpcにおいて発現が亢進する遺伝子を同定するために2.5 dpcから3.5 dpcの間で発現が上昇し、3.5 dpcから4.5 dpcの間で発現が減少、そして4.5 dpcから5.5 dpcにかけて減少していた遺伝子を検索したところ、31遺伝子が検出された。また、3.5 dpcにおいて発現が減少する遺伝子を同定するため、2.5 dpcから3.5 dpcの間に発現が減少し3.5 dpcから4.5 dpc および4.5 dpcから5.5 dpcにかけて、それぞれ、発現が上昇していた遺伝子を検索したところ8遺伝子が検出された。同様に、前核期の受精卵を移植した3.5 dpcで自然交配の2.5 dpcと比較して上昇する遺伝子は13遺伝子で、減少は25遺伝子であった。また、8細胞期胚を移植した2.5 dpcで自然交配の2.5 dpcと比較して上昇したのは17遺伝子、減少したのは13遺伝子であった。これら検出された遺伝子で、実験区にかかわらず implantation window の開放時に発現が上昇した遺伝子は2遺伝子、および発現が減少した遺伝子は1遺伝子であった。これらの遺伝子、あるいはこれらの上流にある遺伝子は、implantation window のトリガーとなる可能性があると考えられる。

次に、これらマイクロアレイを用いた解析によって同定された遺伝子について、交配後、継時的(0.5 dpc から 4.5 dpc)にリアルタイムPCRによる発現解析を実施した。尚、ハウスキーピング遺伝子としては $\beta$ アクチン、GAPDH および PGK1 を用い、これらの発現をReFinderを用いて解析し、最も適切なハウスキーピング遺伝子を選択して比較検討した。Sprr2fの子宮での発現は、0.5 dpcで最も高く、以降、その発現は着床の前後を含めて有意に減少した。卵巣におけるこの遺伝子の発現は、着床時の3.5 dpcで最も上昇する成績であった。また、Ass1の子宮での発現は着床開始後の4.5 dpcで最も高く、卵巣においては3.5 dpcで最も高い成績であった。Sprr2fはエストロゲンで誘導されることが知られているが、交配後での子宮での発現上昇、その後の急速な抑制、および着床時における卵巣での発現上昇は、implantation window の制御因子候補のひとつとして検討に値するものと考えられた。また、炎症性のサイトカインが血管内皮細胞で、Ass1の遺伝子の発現を抑制することが知られているが、生殖器における発現変動に関する知見が得られたのは本研究が初めてである。Ass1の早期の発

現誘導によって implantation window の開放を早めることへの期待を抱かせる成績を得たと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

- (1) Oi, M., Yamada, K., Hayakawa, H., Suzuki, H. Sexing of dog sperm by fluorescence in situ hybridization. J. Reprod. Dev. 査読有, 59, 2013, 92-96.
- (2) Hayashi, S., Asano, T., Kakizaki, R., Suzuki, H. Beneficial effect of hyperbaric oxygen therapy on the follicular survival in the mouse ovary after transplantation. J. Reprod. Dev. 査読有, 58, 2012, 260-263.
- (3) Abdel-Ghani, M., Shimizu, T., Asano, T., Suzuki, H. In vitro maturation of canine oocytes co-cultured with bovine and canine granulosa cell monolayers. Theriogenology, 査読有, 77, 2012, 347-355.
- (4) Suzuki, H. Cryopreservation of canine embryos and resulting pregnancies. Reprod. Dom. Anim. 査読有, 47, 2012, 141-143.
- (5) Abdel-Ghani, M., Abe, Y., Asano, T., Hamano, S., Suzuki, H. Effect of bovine cumulus-oocyte complexes-conditioned medium on in vitro maturation of canine oocytes. Reprod. Med. Biol. 査読有, 10, 2011, 43-49.
- (6) Abe, Y., Suwa, Y., Asano, T., Ueta, Y. Y., Kobayashi, N., Ohshima, N., Shirasuna, S., Abdel-Ghani, M. A., Oi, M., Kobayashi, Y., Miyoshi, M., Miyahara, K., Suzuki, H. Cryopreservation of canine embryos. Biol. Reprod. 査読有, 84, 2011, 363-368.
- (7) Kawase, Y., Suzuki, H. A study on freeze-drying as a method of preserving mouse sperm. J. Reprod. Dev. 査読有, 57, 2011, 176-182.
- (8) Abdel-Ghani, M., Abe, Y., Asano, T., Suzuki, H. Effect of graft site and gonadotrophin treatment on follicular development of canine ovarian grafts transplanted to NOD-SCID mice. Reprod. Med. Biol. 査読有, 10, 2011, 259-266.
- (9) Hirayama, Y., Inoue, K., Suzuki, H. Effect of intraperitoneal administration of desialylated erythropoietin on the follicular survival in cryopreserved canine ovaries after xenotransplantation. J.

Mamm. Ova Res. 査読有, 28, 2011, 143-147.

[学会発表] (計 9 件)

- (1) Suzuki, H. Puppies from liquid nitrogen -Cryopreservation of canine embryos-. 7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. July 26-29. 2012, Whistler, British Columbia, Canada.
- (2) Suzuki, H. Effect of hyperbaric oxygen therapy on the follicular reserve on canine ovarian tissues after xenotransplantation. 17th International Congress on Animal Reproduction. July 29-August 2. 2012, Vancouver, British Columbia, Canada.
- (3) 新田あかね、白砂孔明、松本茜、鈴木宏志、マラリア原虫感染が妊娠時特異的に重篤化する免疫学的メカニズムの解明、第 105 回日本繁殖生物学会、2012 年 9 月 5-8 日、筑波大学会館、つくば市
- (4) Nitta, A., Shirasuna, K., Matsumoto, A., Suzuki, H. Analysis of the immunological mechanisms that malaria leads to a pregnancy-specific severity. 45th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. August 12-15. 2012, State College, Pennsylvania, USA.
- (5) Suzuki, H., Oi, M. Sperm Sexing in the dog by fluorescence in situ hybridization. 45th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. August 12-15. 2012, State College, Pennsylvania, USA.
- (6) Suzuki, H., Hayashi, H., Asano, T. Effect of hyperbaric oxygen therapy on the follicular loss of ovarian tissues after transplantation. 44th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. July 31-August 4. 2011, Portland, Oregon, USA.
- (7) Suzuki, H. Cryopreservation of canine embryos. The 12th International Congress on Reproductive Biomedicine. September 7-9. 2011, Royan Institute, Tehran, The Islamic Republic of Iran.
- (8) Suzuki, H. Follicular loss of cryopreserved canine ovary after xenotransplantation and its solution. The 12th International Congress on Reproductive Biomedicine. September 7-9. 2011, Royan Institute, Tehran, The Islamic Republic of Iran.
- (9) Suzuki, H. Puppies from frozen embryos. International Meeting for Evolution of

Reproductive Biology and Task of Frontiers: Trajectory and Prospective of IVF, Stem Cell and Epigenetic Study. September 13-17. 2011, AIINA Hall, Morioka, Iwate, Japan.

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 宏志 (SUZUKI HIROSHI)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授

研究者番号 : 60333473

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :