

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659788

研究課題名(和文) 不妊病態に関わるCD9およびエキソソームの卵管/子宮内における働き

研究課題名(英文) The physiological role of CD9 and exosomes in oviducts and uteri

研究代表者

宮戸 健二 (MIYADO, KENJI)

独立行政法人国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部・室長

研究者番号：60324844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、精子と卵の細胞融合を促進する卵側因子としてCD9が必須であり(Miyado et al. Science, 2000)、更に、CD9を主な構成成分とする膜構造体(exosome, エキソソーム)が存在することを明らかにしてきた(Miyado et al., PNAS, 2008)。本研究では、卵管から子宮内に存在するCD9を含むエキソソームの生理機能、特に、子宮内膜上皮の再生における役割について研究を行った。その結果、CD9を介した子宮内膜上皮細胞からの血管新生因子VEGF-Aの子宮内腔への分泌が、子宮内膜上皮の再生、特に出産後の子宮内膜上皮の修復に関わっていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In mammals, the female reproductive tract is remodeled cyclically throughout adult life. Despite the expression of CD9 in the epithelium of the uterus, its role is unclear. Here, we addressed this issue by examining fertilization-competent Cd9^{-/-} mice expressing CD9-GFP in their eggs (Cd9^{-/-}-TG). Immunobiochemical analysis demonstrated that CD9 was present in the uterine secretions. Electron microscopic analysis revealed the extracellular matrix-like feature of CD9-containing structures. We also found that the litter size of Cd9^{-/-}-TG female mice was significantly reduced after their first birth. Histologic analysis revealed severely delayed re-epithelialization of the endometrium both in vitro and in vivo in mice. The quantity of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) was remarkably reduced in Cd9^{-/-}-TG female mice. These results provide the first evidence that CD9-mediated VEGF secretion plays a role in re-epithelialization of the uterus.

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：不妊 出産 子宮内膜上皮 再生 CD9 VEGF-A エキソソーム

1. 研究開始当初の背景

晩婚化によって生じる晩産の傾向は、我が国の出生率を低下させ、超少子化状態を引き起こしている。その結果として、急激に人口が減少することが予測され、近い将来、現在の経済規模を維持することが難しくなる恐れがある。単に出生児を増やすような政策は女性軽視との誤解を招く恐れがあるが、緊急に児童福祉と医療が一体となった対策をとることが必要である。

出生率が低下する一因として、加齢によって引き起こされる生殖器官、生殖細胞の機能低下、および生殖器官に関連した疾患の増加が予想されている。ただ、生殖能力の低下が年々早まっていることが危惧されており、加齢だけでは説明できない事態が生じている可能性もある。

妊孕性が低下する原因として、様々な問題が想定されるため、病態を解明した上で治療法を確立するには、様々な方面から研究に取り組むことが必要である。一見、無策にも捉えられるが、不妊は難治性疾患としては認知されておらず、病気としても捉えられていない摩訶不思議な現象である。そのため、医療だけ考えても、生殖医療、精神面のケアといった様々な方面からの対策が必要である。また、今後の更なるライフスタイルの変化に対応して、既存の不妊治療および生殖補助医療の安全性と効率をより一層向上させることも必要である。

2. 研究の目的

加齢にともなう妊孕性低下のメカニズムの解明と、安全で適切な治療システムを構築するためには、分子レベルで病態、病因を解明した上で、エビデンスに基づいた的確な治療システムを築くことが重要である。女性の卵巣は、配偶子を作り出す重要な器官であるが、一方、子宮は外界と接し、感染症などの脅威に曝されつつも、胎児が成長するためには必要不可欠な生殖器官である。そのため、子宮の機能障害は単なる細胞の機能不全を超えて、生物種の存続にかかわる問題になってしまう。そこで、胎児発育における子宮の機能を解明することは、生殖研究において中心的な課題である。しかしながら、生殖の基礎研究には長い歴史があるにもかかわらず、いまだに子宮機能の全容解明には至っていない(図1)。申請者は、精子と卵の細胞融合を促進する卵側因子として膜4回貫通型蛋白質ファミリー(テトラスパニン)に属するCD9が必須であり(Miyado et al. *Science*, 2000)、更に、CD9を主な構成成分とする膜構造体(exosome, エキソソーム)が存在することを明らかにしてきた(Miyado et al. *PNAS*, 2008)。本研究では、卵管から子宮内に存在するCD9を含むエキソソームの生理機能、特に、子宮内膜上皮の再生における役割について研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 卵特異的にCD9-GFPを発現するCD9欠損雌マウスにおける出産回数による産仔数の比較

CD9欠損マウスは雌の不妊でその原因は精子との受精異常だけであると考えられてきた。また、CD9欠損雌マウスの卵子にCD9-GFPを発現させたマウス(CD9^{-/-}-TG)では、産仔数が回復することから、子宮でのCD9の機能については解析されていなかった。しかし、出産回数による産仔数の変化を調べたところ、2回目から産仔数が激減することがわかり、CD9は子宮でも何らかの役割を担っている可能性が出てきた。そこで、出産回数による産仔数の変化について調べた。雌にはCD9^{-/-}-TG、雄には8~12週齢のCD9^{-/-}マウスを用いた。

(2) 卵管から子宮内および子宮上皮でのCD9タンパク質の定量

卵管から子宮にかけての管腔内にエキソソームが存在することはウエスタンブロット解析により確認した。マウスの4日(発情前期 発情期 発情後期 休止期)の性周期で子宮内の状態が変わる。そこで、それぞれのステージに対応する子宮内液を、スミアテストによって判別したマウスより回収して用いた。

(3) 子宮内膜上皮の細胞培養による検討

免疫染色によってCD9は子宮内膜上皮に特的に発現していることが明らかになった。そこで、マウスの子宮内膜細胞を培養し、細胞の運動性についての評価を行った。マウスにはCD9^{-/-}-TGと野生型マウスを用い、コラゲナーゼ処理によって子宮内膜細胞を回収し、一定期間培養を行った後、プラスチックチップにより直線的に細胞を剥離させ、隙間が細胞で埋まるまでの日数を測定した。

(4) 子宮内液に含まれるサイトカインの定量

発情期の野生型マウスとCD9^{-/-}-TGマウスの子宮内液を回収し、血管新生因子(VEGF-A)を含めたサイトカインのマルチプレックスサスペンションアレイを用いての測定を行った。

(5) 子宮内腔へのVEGF-Aの注入による子宮内膜再生に対する効果の検討

出産1週間以内のCD9^{-/-}-TGマウスの子宮内腔にVEGF-Aによる子宮内膜再生に対する効果を検討した。VEGF-Aを単に注入しただけでは、効果が持続しないと考え、ブルーセファロースビーズに吸着させたVEGF-Aを注入することで、効果を持続させた。1週間経過後、子宮を取り出し、組織学的に検討を行い、ビーズ周辺での子宮内膜上皮の厚さを、未処理群と比較した。

(6) 子宮内膜上皮の組織学的検討

野生型およびCD9^{-/-}-TGマウスの発情期の子宮内膜上皮における接着関連因子(E-カドヘリン、インテグリン $\alpha\beta$ 1、CD98)の局在を免疫組織化学によって解析した。更に、透

過型電子顕微鏡により、子宮内膜上皮における細胞の特徴を観察した。

(7) 生化学的解析

CD9 の発現は、ラット抗マウス CD9 抗体 (KMC8, BD Bioscience) を用い、2 次抗体にはヤギ抗ラット IgG 抗体-HRP (シグマアルドリッチ) を用いて、検出には ECL Plus を用いた。VEGF-A の検出には、ラット抗 VEGF 抗体 (ab51653, abcam) を用いた。

(8) 実験動物を用いることに対する倫理的配慮

実験動物を用いる研究については、動物実験指針に準拠して研究を実施した (承認番号 2003-002, 2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめた。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮を行った。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。

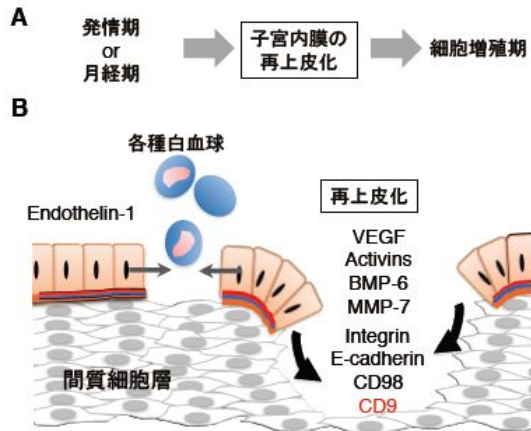


図1. 子宮内膜上皮の再生に関わる因子群

4. 研究成果

(1) 子宮内液での CD9 の検出とエキソソームの形態学的解析

CD9 は膜タンパク質であるため細胞膜に存在するのが一般的であるが、エキソソームと呼ばれる膜構造体の成分として、体液中に存在することが知られている。形態は異なるものの、卵でも CD9 を含む構造体が同定されており、エキソソームの仲間であると考えられている (図 2)。子宮上皮細胞では免疫染色によって CD9 が発現していることが示されたが、シエキソソームの存在の有無については子宮内液については検討されていない。そ

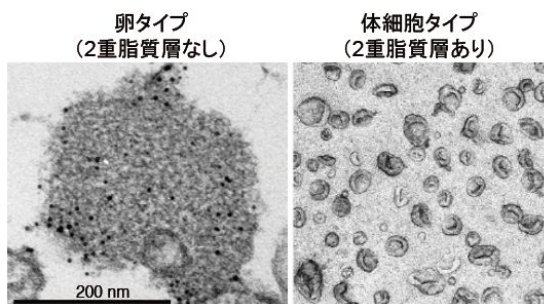


図2. 2種類のエキソソームの電子顕微鏡像

こで、それぞれの性周期のマウスをスミアテ

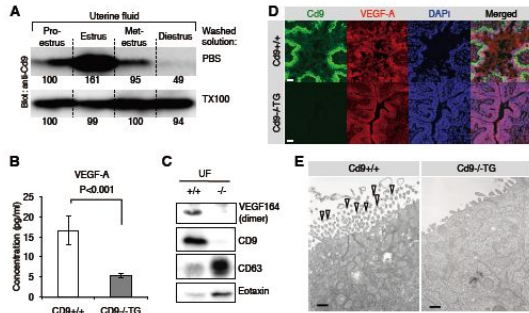


図3. 子宮内膜上皮でのCD9欠損によるVEGF-Aの子宮内腔への分泌異常

- A. CD9は発情期のマウスの子宮内腔で発現量が高くなる
- B. VEGF-AはCD9の発現と同調して、子宮内腔に分泌される(マルチプレックス法)
- C. 子宮内腔でのCD9の発現解析(ウエスタンブロット解析)
- D. 子宮内腔でのCD9とVEGFの発現(免疫染色)
- E. 子宮内腔でのCD9の発現と同調した上皮細胞での微絨毛形成

ストによって決定し、それぞれのマウスから子宮内液を回収し、ウエスタンブロット解析を行った。その結果、発情期の子宮内液中に CD9 が多量に存在することがわかった。そこで、発情期の子宮内液について免疫電子顕微鏡像を取得したところ、抗 CD9 抗体と結合した金コロイドが結合した卵子由来のエキソソームに類似した構造体が観察された。このことから、CD9 を含むエキソソームが子宮の機能に何らかの役割を担っている可能性が考えられた (図 3)。

(2) CD9 欠損によって生じる雄性不妊

CD9 の欠損によって卵の精子との融合異常が起こることは今までの研究から明らかになっている。一方、卵以外でも卵管上皮や子宮内膜上皮細胞に特異的な発現を示すことが知られているが、それらの上皮細胞での CD9 の役割は不明である。そこで、CD9 欠損マウスの受精異常を卵特異的に CD9-GFP 融合タンパク質を発現させた CD9 欠損マウス (CD9^{-/-}TG) を用いて産仔数を調べた。その結果、CD9-GFP の発現により初産で生まれてくる仔の匹数は、野生型マウスと同等であったものの、2 回目の出産以降から産仔数の有為な低下が認められたことから、受精以降の雌の生殖系においても CD9 は機能していることが推測された (図 4)。

(3) CD9^{-/-}TG マウスにおける出産後の子宮内膜上皮の再生過程の解析

子宮内膜上皮の再生過程における CD9 の役割を検討するため、出産後の雌マウスの子宮を時間経過に従って採取し、組織学的に検討した。その結果、出産後の CD9^{-/-}TG マウスの子宮内膜では、野生型マウスに比べて、上皮の再生が遅延しており、合わせて間質の肥厚も遅延していた。通常性の周期では再生異常は認められないものの、出産といった大規模な組織の再構成では異常が認められることが明らかになった。

CD9 の発現が上皮細胞層に局限することから、子宮上皮細胞の異常が子宮内膜の再生異常を引き起こしていることが推測された。そこで、CD9^{-/-}TG マウスの子宮内膜上皮細胞を単離し、培養系を用いて再生能力について

検討を行った。その結果、チップによって削られた細胞の再生が、野生型に比べて明らかに遅延することから、上皮細胞に異常を示すことがわかった。

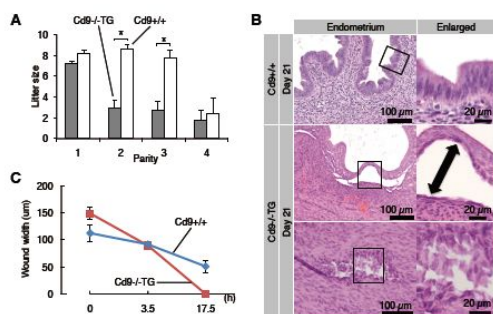


図4. 卵特異的CD9の発現によって受精異常が回復したCD9欠損マウス (CD9^{-/-}TG)

- A. 受精異常は回復したものの、産仔数は雌の出産回数に依存して低下
 B. 子宮内膜上皮の再生が遅延
 C. 培養系でも子宮内膜上皮の再生は遅延

(4) 子宮上皮再生メカニズムに関する検討 子宮内膜上皮細胞

CD9の欠損によってどのような分子機構に異常が生じているのかを明らかにするため、発情期のCD9^{-/-}TGと野生型マウスの子宮内液を回収し、定量を行った。その結果、免疫系に関わるサイトカインには増減が認められたが、全体としては免疫系のシステムは機能が維持されると考えられた。一方、血管新生因子であるVEGF-Aの発現がCD9^{-/-}TGマウスではほぼ消失していた。従来の考えでは、子宮内膜再生においてVEGF-Aは間質における血管新生に関わり、上皮細胞の再生には直接関与していないと考えられている。そこで、電子顕微鏡によって子宮内膜上皮細胞を観察したところ、発情期の野生型マウスでは、分泌細胞様の多数の微絨毛が内腔側に観察されたが、一方、CD9^{-/-}TGマウスではほとんど観察されなかった。続いて、CD9とVEGF-Aの関連を生化学的に免疫沈降法によって解析したところ、VEGF-AとCD9が複合体を作っていることが明らかになった。

(5) VEGF-A投与による子宮内膜上皮の再生

子宮内膜上皮の再生におけるVEGF-Aの直接的な関与を検討するため、子宮内腔へのVEGF-Aの投与を行った。その結果、VEGF-Aを含んだセファロースビーズを投与したCD9^{-/-}TGマウスの子宮では、子宮内膜上皮細胞の再生が認められた。

(6) 考察

子宮内膜再生は、胚の適切な着床およびその後の胎児の発育に重要な子宮内環境を提供する上で必要不可欠である。通常の性周期でも子宮内上皮の再生は繰り返されているが、本研究の成果として、出産後の子宮内膜再生といった大規模な子宮組織の再生には、CD9を介したVEGF-Aの産生による子宮内膜上皮の再生が必要であることが初めて示すことができた。CD9を介したVEGF-Aの放出の分子メカニズムには不明な点が多いが、少なくともVEGF-Aの子宮内腔への投与

によって子宮内膜上皮の再生が促進されることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15件)

Kawano N, Miyado K, Yoshii N, Kanai S, Saito H, Miyado M, Inagaki N, Odawara Y, Hamatani T, Umezawa A. Absence of CD9 reduces endometrial VEGF secretion and impairs uterine repair after parturition. *Sci Rep.* 2014 Apr 16;4:4701. doi: 10.1038/srep04701.

Sugawara K, Hamatani T, Yamada M, Ogawa S, Kamijo S, Kuji N, Akutsu H, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A. Derivation of human decidua-like cells from amnion and menstrual blood. *Sci Rep.* 2014 Apr 8;4:4599. doi: 10.1038/srep04599.

Kawano N, Araki N, Yoshida K, Hibino T, Ohnami N, Makino M, Kanai S, Hasuwa H, Yoshida M, Miyado K, Umezawa A. Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Mar 18;111(11):4145-50. doi: 10.1073/pnas.1320715111.

Yamada-Fukunaga T, Yamada M, Hamatani T, Chikazawa N, Ogawa S, Akutsu H, Miura T, Miyado K, Tarín JJ, Kuji N, Umezawa A, Yoshimura Y. Age-associated telomere shortening in mouse oocytes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013 Nov 21;11:108. doi: 10.1186/1477-7827-11-108.

Okumura N, Akutsu H, Sugawara T, Miura T, Takezawa Y, Hosoda A, Yoshida K, Ichida JK, Yamada M, Hamatani T, Kuji N, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A. β -catenin functions pleiotropically in differentiation and tumorigenesis in mouse embryo-derived stem cells. *PLoS One.* 2013 May 14;8(5):e63265. doi: 10.1371/journal.pone.0063265.

Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Fujimura L, Hatano M, Miyado K, Toshimori K. Integration of the mouse sperm fertilization-related protein equatorin into the acrosome during spermatogenesis as revealed by super-resolution and immunoelectron microscopy. *Cell Tissue Res.* 2013 Jun;352(3):739-50. doi: 10.1007/s00441-013-1605-y.

宮戸健二 テトラスパニンによる受精の膜融合制御 医学のあゆみ Vol.244, No.2, 181, 2013.

Ohnami N, Nakamura A, Miyado M, Sato M, Kawano N, Yoshida K, Harada Y, Takezawa Y, Kanai S, Ono C, Takahashi Y, Kimura K, Shida T, Miyado K, Umezawa A. CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. *Biol Open.* 2012 Jul 15;1(7):640-7. doi: 10.1242/bio.2012.1420.

Miyado M, Nakamura M, Miyado K, Morohashi K, Sano S, Nagata E, Fukami M, Ogata T. Maml1 deficiency significantly reduces mRNA expression levels of multiple

genes expressed in mouse fetal Leydig cells but permits normal genital and reproductive development. *Endocrinology*. 2012 Dec; 153(12):6033-40. doi: 10.1210/en.2012-1324.

Tsunoda S, Kawano N, Miyado K, Kimura N, Fujii J. Impaired fertilizing ability of superoxide dismutase 1-deficient mouse sperm during in vitro fertilization. *Biol Reprod*. 2012 Nov 29;87(5):121. doi: 10.1095/biolreprod.112.102129.

宮戸健二 卵由来エキソソームによる細胞融合の促進機構 医学のあゆみ Vol.241, No.11, 861-862, 2012.

Takezawa Y, Yoshida K, Miyado K, Sato M, Nakamura A, Kawano N, Sakakibara K, Kondo T, Harada Y, Ohnami N, Kanai S, Miyado M, Saito H, Takahashi Y, Akutsu H, Umezawa A. β -catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion. *Sci Rep*. 2011;1:68. doi: 10.1038/srep00068.

Ito M, Imai M, Muraki M, Miyado K, Qin J, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Hosoi Y, Saito H, Takahashi Y. GSTT1 is upregulated by oxidative stress through p38-MK2 signaling pathway in human granulosa cells: possible association with mitochondrial activity. *Aging* (Albany NY). 2011 Dec;3(12):1213-23.

Kawano N, Yoshida K, Miyado K, Yoshida M. Lipid rafts: keys to sperm maturation, fertilization, and early embryogenesis. *J Lipids*. 2011;2011:264706. doi: 10.1155/2011/264706.

Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Okino N, Ito M, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage. *BMC Dev Biol*. 2011 Apr 14;11:22. doi: 10.1186/1471-213X-11-22.

〔学会発表〕(計 2件)

宮戸健二 テトラスパニンを介した細胞融合の分子メカニズム、ワークショップ「4回膜貫通蛋白質の構造と機能解析の進展」、第36回日本分子生物学会年会、2013.

宮戸健二 受精の膜融合におけるCD9およびエキソソームの役割、シンポジウム「バイオイメージングにより明らかにされた動・植物の有性生殖メカニズム」、日本顕微鏡学会第68回学術講演会、2012

〔図書〕(計 3件)

Yoshida K, Kawano N, Harada Y, Miyado K. Role of CD9 in sperm-egg fusion and virus-induced cell fusion in mammals. *Sexual Reproduction in Animals and Plants*, edited by Sawada H, Inoue N, Iwano M, Springer, 2014.

動植物の受精学 - 共通性と多様性 - 澤田均 編, 化学同人, 2014年

Kawano N, Harada Y, Yoshida K, Miyado K. Role of CD9 in sperm-egg fusion and its general role in fusion phenomena. *Cell Fusions*, edited by Lars-Inge Larsson, Springer, 2011.

〔産業財産権〕
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
http://www.ncchd.go.jp/research/nch/reproduction/staff_miyado.html

6. 研究組織
(1)研究代表者
宮戸 健二 (Miyado, Kenji)
国立成育医療研究センター・再生医療センター・生殖・細胞医療研究部・室長
研究者番号: 60324844

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし