

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660214

研究課題名(和文)着床過程におけるIhhの制御機構と機能の解明：子宮内膜スフェロイドを用いた解析

研究課題名(英文)Studies on the regulation and function of Ihh during implantation

研究代表者

山内 伸彦 (Yamauchi, Nobuhiko)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00363325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：着床・受胎率を改善し生殖効率を向上させるには、着床関連因子の人為的な操作が必須である。そのためには、着床期特異的な因子の制御機構とその機能を理解する必要がある。本申請研究では、着床関連因子の一つであるIhhに着目し、申請者が開発した生体外子宮内膜モデル(スフェロイド)を用いてIhhの制御機構と機能を明らかにする。これらの結果はIhhの人為的な制御法の確立に繋がり、着床・受胎率の向上へ繋がるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Hedgehog (Hh) proteins are involved in organogenesis and tumorigenesis by regulation of cell proliferation, differentiation and cell-cell interactions. In mammals, indian hedgehog (Ihh) is up-regulated by P4 and critically mediates uterine receptivity in the mouse. Additionally, expression of Ihh mRNA increased at the implantation period in rat uterus. These results indicate that Ihh expression is important in the uterus during pre-pregnancy. Recently, it was reported that the mouse conditional mutation of Ihh in the uterus during pregnancy has no competency of implantation and decidualization. The report suggested that the Ihh plays a critical role in the implantation through epithelial-stromal cross-talk. However, expression of Ihh in the endometrium of mammalian uterus has not been reported yet without rodents. In this study, we investigated the expression and regulation of Ihh in the bovine endometrium in vivo and in vitro.

研究分野：動物繁殖生理学

キーワード：Ihh 子宮内膜 ウシ スフェロイド P4

1. 研究開始当初の背景

受精から分娩までに至るまでの妊娠期間において、着床が成立した後分娩に至るまでの胚のロス率は通常5%以下とされる。このことは、着床過程が妊娠成立のための最も大きな律速段階であることを示している。したがって、胚と子宮内膜の着床を人為的に制御することが可能となれば、生殖効率を劇的に改善することが可能となる。着床過程には母体側と胎児側の両方の因子が複雑に作用し合う。しかしながら、着床期に機能的に働く因子を人為的に制御できる技術は現在まで開発されていない。この要因として、着床機構の解明が不十分であり、特に着床関連因子の制御機構に関する研究が少ないことが挙げられる。本研究では、着床に必須とされるインディアンヘッジホッグ (Ihh) に着目し、その制御機構と機能について子宮内膜スフェロイドを用いて解析する。

2. 研究の目的

着床・受胎率を改善し生殖効率を向上させるには、着床関連因子の人為的な操作が必須である。そのためには、着床期特異的な因子の制御機構とその機能を理解する必要がある。本申請研究では、着床関連因子の一つである Ihh に着目し、申請者が開発した生体外子宮内膜モデル (スフェロイド) を用いて Ihh の制御機構と機能を明らかにする。これらの結果は Ihh の人為的な制御法の確立に繋がり、着床・受胎率の向上へ繋がるものと期待される。

3. 研究の方法

1) ウシ子宮組織および培養細胞における Ihh の発現解析

a. ウシ子宮組織における Ihh の発現解析

前述のように、ウシを含む家畜の子宮における Ihh の発現は未だ報告がない。生体からの情報は本研究で欠かせないものであり、特に着床期 (ウシでは妊娠 18~20 日) 子宮における Ihh の発現解析が必要である。妊娠 18 日目のウシ子宮から伸張期胚と子宮組織のサンプリングを行い (5 頭分)、発情周期における発現と比較して解析を行った。

b. 培養細胞およびスフェロイドにおける Ihh の発現解析

培養系を用いて Ihh の制御機構を解析するには Ihh 発現細胞は必須のものであり、生体外での発現特性を明らかにしておく必要がある。マウスやラットの知見から、子宮内膜上皮細胞がそのターゲットとなることが予測される。単層上皮細胞とスフェロイド内の上皮細胞での相違、および妊娠に必要なステロイドホルモンである P4 の影響について解析を行った。

2) Ihh の発現制御におけるステロイドホルモンの役割

子宮における Ihh の発現はプロジェステロン (P4) に制御されることが想定されている。

しかしながら、その分子レベルでの作用機序や予想される仲介因子の存在に関しては未だ不明である。さらに、申請者らはラットの着床遅延モデルを使った実験において、着床に必須なエストラジオール (E2) が Ihh の発現を持続させるが、その下流因子である Gli1 を抑制することを明らかにした。これらの結果は、P4 と E2 が Ihh の発現制御の中心的な役割を果たしている可能性を示すものであり、その作用機序を中心とした解析を行い Ihh の発現制御機構を明らかにする。

4. 研究成果

1) ウシ子宮内膜における Ihh の発現

抗 Ihh 抗体を用いてウシ子宮内膜組織における Ihh タンパク質の発現を解析した。免疫組織化学的検索の結果、ウシ子宮内膜における Ihh の発現は、腔上皮および腺上皮に局在していた。間質ではほとんど発現は見られなかった (図 1 A, B)。ウエスタンブロッティングの結果、分子量 34kDa 付近に一本のバンドが検出された (図 1 C)。

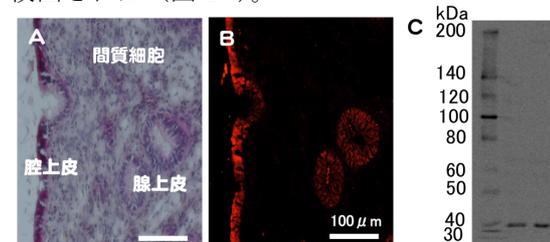


図1. ウシ子宮内膜におけるIhhタンパク質の発現解析。組織切片の免疫組織化学的検索 (A: HE染色像、B: 抗Ihh抗体による免疫染色)。C: 子宮内膜組織のウエスタンブロッティング。

2) 卵胞期、黄体期および着床期における Ihh の発現動態

RT-PCR の結果、卵胞期、黄体期および着床期のウシ子宮内膜において Ihh mRNA のバンドが検出された。real-time qPCR によって遺伝子の発現量を解析した結果、卵胞期と比較して、黄体期および着床期において有意に高い値を示した ($P < 0.05$) (図 2 A, C)。ウエスタンブロッティングによって得られたバンドを数値化し、タンパク質の発現量を比較した結果、遺伝子と同様に卵胞期と比較して黄体期および着床期において有意に高い値を示した ($P < 0.05$) (図 2 B, D)。これらの結果から、ウシ子宮内膜における Ihh の発現は P4 によって促進されている可能性が示唆された。

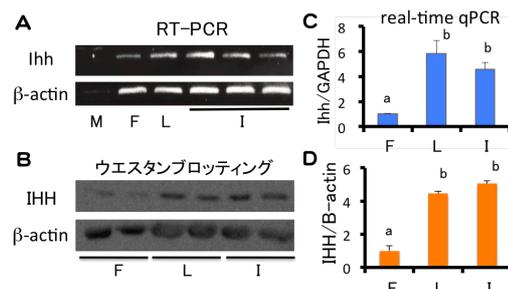


図2. 卵胞期 (F)、黄体期 (L) および着床期 (I) のウシ子宮内膜におけるIhhの発現。遺伝子発現 (A: RT-PCR、C: real-time qPCR)。タンパク質発現 (B: ウエスタンブロッティング、D: 得られたバンドの数値化。a vs. b; $P < 0.05$ 。

3) ウシ子宮内膜間質細胞 (BES) および上皮細胞 (BEE) における Ihh の発現

ウシ子宮内膜より組織片を採集し、エクスパラント法によって細胞を採取・分離した。単層培養 BES と BEE の Ihh 遺伝子発現を real-time qPCR によって解析した結果、上皮細胞で有意に高い値を示した ($P < 0.05$) (図 3A)。この結果は子宮内膜組織における Ihh の局在と一致するものであった。一方で、培地への P4 添加の影響は認められず、P4 が子宮内膜上皮細胞の Ihh 発現を直接的に誘導しているのではない可能性が示された。ウエスタンブロッティングによるタンパク質発現解析の結果は、遺伝子発現とほぼ同様であり、上皮細胞で高い発現が認められ、P4 の直接的な発現誘導作用は認められなかった (図 3B)。

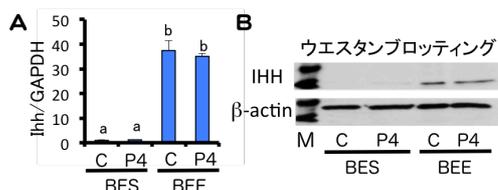


図3. ウシ子宮内膜間質細胞(BES)および上皮細胞(BEE)におけるIhhの発現解析. A: real-time qPCR. B: ウエスタンブロッティング. C: 対照区、P4: プロジェステロン添加区. a vs. b: $P < 0.05$.

4) ヘテロスフェロイドにおける Ihh 発現

血中 P4 濃度が高い黄体期および着床期において子宮内膜における Ihh の発現が促進されていたにも関わらず、BES と BEE と単層培養細胞では P4 の直接的な促進効果は認められなかった。そこで本研究では、P4 が間質細胞を介して間接的に上皮細胞の Ihh 発現を制御している可能性を想定し、ヘテロスフェロイドを用いた解析を行った。BES と BEE から構成されるヘテロスフェロイドは、最外層が BES で被われ、内部に BES と ECM を含む構造の三次元多細胞塊である。単層培養細胞と比較して、スフェロイドの組織構造および生理学的反応が生体組織と近いため、細胞機能の解析に用いられている。real-time qPCR の結果、培地への P4 添加によってヘテロスフェロイドの Ihh 遺伝子発現が有意に増加した ($P < 0.05$) (図 4A)。Ihh タンパク質の発現も同様の結果を示した (図 4B, C)。単層培養細胞での解析結果を考慮すると、P4 によって間質細胞で何らかの因子が産生され、その因子によって上皮細胞の Ihh 発現が制御されている可能性が示唆された。このことは、間質細胞を介した P4 による上皮細胞の制御機構の存在を示唆するものである。

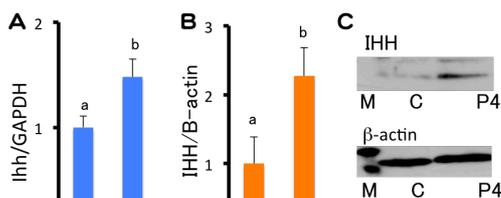


図4. ウシ子宮内膜ヘテロスフェロイドにおけるIhh発現に対するP4の影響. A: real-time qPCR. B: タンパク質の定量比較. C: ウエスタンブロッティング. C: 対照区、P4: プロジェステロン添加区、M: マーカー. a vs. b: $P < 0.05$.

5) 間質細胞ホモスフェロイド培養上清の影響

子宮内膜スフェロイドを用いた解析結果から、間質細胞で生産される因子が Ihh の発現を制御している可能性が示唆された。そこで、様々な条件で間質細胞ホモスフェロイドを処理し、その培養上清を回収してウシ子宮内膜スフェロイドの培養培地に添加した。real-time qPCR で Ihh の遺伝子発現を解析した結果、P4 によって処理した間質細胞ホモスフェロイドの培養上清添加によって、Ihh の遺伝子発現が有意に増加した ($P < 0.05$)。P4 と同時にそのアンタゴニストである RU486 を同時に加えて P4 の作用を阻害すると発現促進作用が消失した。一方で、培養上清回収処理時に添加した P4 が、子宮内膜ヘテロスフェロイドの遺伝子発現を促進する可能性が示唆されたため、P4 処理培養上清を子宮内膜ヘテロスフェロイドに添加する時に RU486 を同時に添加する区を設けた結果、Ihh の遺伝子発現は有意に増加した ($P < 0.05$)。これらの結果から、P4 によって間質細胞で産生が誘導された何らかの因子によって Ihh 遺伝子の発現が誘導されると結論付けられた。

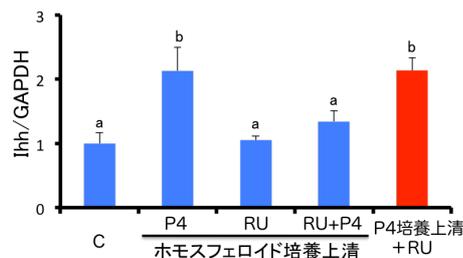


図5. ウシ子宮内膜ヘテロスフェロイドのIhh発現に対するホモスフェロイド培養上清の影響. C: 対照区、P4: プロジェステロン添加区、RU: P4阻害剤 (RU486). a vs. b: $P < 0.05$.

6) 間質細胞産生因子の影響

肝細胞増殖因子 (HGF) は子宮内膜間質細胞で産生されていることが報告されており、子宮機能に何らかの役割を持つ事が示唆されている。本研究ではウシ子宮内膜スフェロイドの Ihh 遺伝子発現に対する HGF の効果を解析した。その結果、HGF による Ihh 遺伝子発現促進効果は認められなかった。本研究では、P4 によって間質細胞で産生が誘導された何らかの因子によって Ihh 遺伝子の発現が制御されていることを明らかにした。今後はその網羅的な解析によって制御因子を明らかにする必要が有る。

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 7 件)

1. Islam MR, Yamagami K, Yoshii Y, Yamauchi N. Growth factor induced proliferation, migration, and lumen formation of rat endometrial epithelial cells in vitro. *J Reprod Dev* 2016 Mar 4.
2. Egashira A, Yamauchi N, Islam MR,

- Yamagami K, Tanaka A, Suyama H, El-Sayed EM, Tabata S, Kuramoto T. Kid depletion in mouse oocytes associated with multinucleated blastomere formation and inferior embryo development. *Anim Sci J* 2016 Feb 18.
3. Yamagami K, Islam MR, Yoshii Y, Mori K, Tashiro K, **Yamauchi N**. Preimplantation embryo-secreted factors modulate maternal gene expression in rat uterus. *Cell Tissue Res* 2016; 364: 453-63.
 4. Egashira A, **Yamauchi N**, Tanaka K, Mine C, Otsubo H, Murakami M, Islam MR, Ohtsuka M, Yoshioka N, Kuramoto T. Developmental capacity and implantation potential of the embryos with multinucleated blastomeres. *J Reprod Dev* 2015; 61: 595-600.
 5. Yamauchi K, **Yamauchi N**, Yamagami K, Nakamura N, Yamashita S, Islam MR, Tabata S, Yahiro K, Tamura T, Hashizume K, Hattori MA. Development of an in vitro model for the analysis of bovine endometrium using simple techniques. *Anim Sci J* 2015; 86: 523-31.
 6. Yamagami K, **Yamauchi N**, Kubota K, Nishimura S, Chowdhury VS, Yamanaka K, Takahashi M, Tabata S, Hattori MA. Expression and regulation of Foxa2 in the rat uterus during early pregnancy. *J Reprod Dev* 2014; 60: 468-475.
 7. Isayama K, Chen H, **Yamauchi N**, Hattori MA. REV-ERBa inhibits the PTGS2 expression in bovine uterus endometrium stromal and epithelial cells exposed to ovarian steroids. *J Reprod Dev* 2014; 60: 362-370.
4. Yamagami K, Md. Rashedul Islam, Yoshii Y, Yamauchi N. Preimplantation embryo-secreted factors modulate maternal gene expression in rat uterus. Society for the Study of Reproduction, 48th Annual Meeting, 2015年6月.
 5. Yamashita S, Fujihara T, Tanaka R, Md. Rashedul Islam, Yamauchi N. Type I interferon regulates Matrix Metalloproteinases (MMPs) expression of the bovine endometrial cells in vitro. Society for the Study of Reproduction, 48th Annual Meeting, 2015年6月.
 6. 田中愛咲実, 山上一樹, 江頭昭義, 蔵本武志, 山内伸彦, 服部眞彰. マウス胎仔線維芽細胞における染色体分配制御因子 Kid および Cdc42 の発現と機能解析. 第 107 回日本繁殖生物学会、2014年8月.
 7. 藤江周一朗, 山下聖世, 中村暢寿, 山内伸彦, 服部眞彰. ウシ子宮内膜における Indian Hedgehog の発現とその制御. 第 107 回日本繁殖生物学会、2014年8月.
 8. Md. Rashedul Islam, Yamagami K, Yoshii Y, Yamauchi N, Hattori MA. Effects of Epidermal Growth Factor and Hepatocyte Growth Factor on Rat Endometrial Epithelial Cells Proliferation, Migration and Lumen Formation In Vitro. The 16th AAAP Animal Science Congress, 2014年11月.
 9. Yamauchi K, Yamauchi N, Yamagami K, Yamashita S, Md. Rashedul Islam, Tabata S, Yahiro K, Tamura T, Hattori MA. Development of an in vitro model for the analysis of bovine endometrium using Micro Sphere Array. The 16th AAAP Animal Science Congress, 2014年11月.
 10. 諫山慧士朗, 陳華濤, 山内伸彦, 服部眞彰. ウシ子宮内膜間質細胞および上皮細胞では Ptgs2 (Cox2) 発現は時計遺伝子 Rev-erba によって抑制的に制御されている. 第 106 回日本繁殖生物学会、2013年9月.

[学会発表] (計 10 件)

1. Md. Rashedul Islam, 山上一樹, 吉井裕香, 山内伸彦. In Vitro Culture of Rat Uterine Explants: Characterization, Hormonal Regulation and In Vitro Decidualization. 第 108 回日本繁殖生物学会、2015年9月.
2. 陶山晃, 田中愛咲実, 山上一樹, 江頭昭善, 蔵本武志, 山内伸彦. 染色体制御因子 Kid および Cdc42 抑制による多核化とアポトーシス誘導の関係. 第 108 回日本繁殖生物学会、2015年9月.
3. 吉井裕香, 山上一樹, Md. Rashedul Islam, 山内伸彦. ラット子宮における Sulf1 の発現および局在の解析染色体制御因子 Kid および Cdc42 抑制による多核化とアポトーシス誘導の関係. 第 108 回日本繁殖生物学会、2015年9月.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/chiku1/lrp-top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 伸彦 (YAMAUCHI, Nobuhiko)

九州大学大学院農学研究院・准教授

研究者番号：00363325