

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10660

研究課題名(和文)着床期の子宮内膜変化と胚受容能獲得のメカニズム

研究課題名(英文)The mechanism of change for endometrium at implantation stage

研究代表者

藤田 知子 (SAITO-FUJITA, Tomoko)

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：60375441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：受精卵が子宮内膜に着床する直前に、子宮内膜上皮の増殖抑制、子宮内膜間質の増殖亢進の変化並びに、内膜管腔の鋸歯状からスリット状へと構造変化というダイナミックな変化が生じる。この変化には、プロゲステロンシグナルが関与していることが明らかにはなっているものの、胚受容能との詳細なメカニズムは不明である。そこで、野生型と着床不全モデルマウスの着床前後の各子宮内膜上皮および、子宮頸部上皮を回収し、RNA-seq解析を行い比較した。これによって、着床不全によって、連動するいくつかの遺伝子をとらえることができ、またLifが子宮内膜より採取しやすい頸部上皮細胞における、着床不全マーカーであると同定した。

研究成果の概要(英文)：Before the embryo implants into the endometrium, the dynamic changes are occurred in the uterus, which is the proliferation-differentiation switching in the luminal epithelium and stromal cells, and is that the serrated structure of uterine lumen becomes to the slit shape. These changes may be associated with Progesterone signaling, but it is undetermined the detail. Thus, we try to analyse the RNA-seq using the luminal and cervix epithelium from the pre-implantation stage between WT and implantation failure model mice for understanding of the mechanism of receptivity association with these dynamic uterus changes at the point of progesterone signaling.

In the results, the expression of 300 genes changed between control and implantation failure mice, and the expression of LIF gene may be as the receptive marker in the cervix epithelium, which are easy to collect than endometrium.

研究分野：生殖生理学

キーワード：子宮内膜 着床 胚受容能 プロゲステロンシグナル 子宮頸部 マーカー 遺伝子発現プロファイル

1. 研究開始当初の背景

受精卵の着床前診断や、体外受精が不妊治療の一環として進められており、技術的な進歩もめまぐるしいものの、着床障害の治療はこれまで革新的な診断・治療法が全く提案されておらず、子宮内は未だブラックボックスといえる。着床障害は良好胚を胚移植しても妊娠しないことで定義されるが、着床障害の新規診断・治療法の確立が不妊治療の残された最後の大きな課題となっている。

ヒトもマウスも卵子は卵管内で精子と受精し、着床前期胚として卵管内で発育し、着床直前に胚盤胞となり子宮内に移入する。マウス子宮内膜に関しては、排卵直後にはエストロゲン (17 β -estradiol; E2) の作用によって子宮内膜管腔は鋸歯状となるが、その後の卵巣黄体化に伴いプロゲステロン (P4) に暴露されることで、子宮内膜は適切な細胞増殖・分化の状態を獲得し、管腔はスリット状になる。その後 P4 に加えて再度 E2 が卵巣から分泌され、その作用を受けた子宮内膜上皮は、何らかの生理活性物質を放出し、その作用により胚が活性化され、子宮への接着反応、すなわち着床が開始する。着床により胚および子宮内膜の細胞分化が加速する。着床においては、子宮内膜と胚という2つの要素において、着床を可能にする能力がタイミングよく獲得されることが必須である。このうち子宮内膜側の能力を「子宮内膜の胚受容能」と呼ぶ。マウスおよびヒトの子宮内膜の胚受容能の獲得に際して、子宮内膜の増殖能のダイナミックな変化 (子宮内膜上皮増殖抑制・間質増殖亢進) と、子宮内膜上皮の細胞極性の減弱が認められ、これらは子宮内膜の胚受容能獲得の必要条件と考えられている。P4 の影響下に、これらの変化が起こることがその後の着床の成立には必須であり、この機構が障害されると着床しない。

2. 研究の目的

着床直前の子宮内膜管腔は鋸歯状からスリット状へと構造変化し、上皮の細胞増殖抑制・間質増殖促進というダイナミックな変化が起こり、その後の着床成立に必須であること、また P4-PR シグナルにより引き起こされることは明らかであるものの、その詳細は不明である。そこで、マウス *in vivo* の系を用いて、妊娠に必要な子宮内膜上皮の管腔形成の機構の解明、特に、子宮内膜上皮の増殖能や細胞極性の変化に着目した着床の分子機構を明らかにすることを目的として、子宮内膜上皮の P4-PR シグナルの下流に位置する因子について解析を行う。

また、子宮における胚受容能メカニズムを明らかにするには、子宮内膜における増殖の意義や、プロゲステロンシグナルを詳細に解析することは有用であるが、胚受容能を検査する方法として、実際妊娠前後に子宮体部の細胞を採取することは臨床の場では抵抗がある。子宮体部よりは外部に近く採取しやすい、

子宮頸部があり、今までは他の目的 (がんや微生物感染検出等) で使用されてきたが、本研究の子宮の胚受容能の観点から、体部とつながっている頸部の細胞において、着床する子宮体部の状態を反映するようなマーカーを検討した。

3. 研究の方法

動物実験は東京大学医学部・医学系研究科動物実験委員会の承認のもとに行った。ヒト検体を用いた研究は東京大学医学部・医学系研究科倫理委員会の承認のもとに、患者の同意を得て採取した検体を用いて行った。レーザーマイクロダイセクションで着床期のマウスの子宮内膜上皮、および子宮頸部上皮を切除・回収し、RNA-seq で解析した。PR アンタゴニストである RU486 (day3 午後 8mg/kg 体重を投与)、エストロゲン受容体アンタゴニストである ICI182780 (day3 午後 7.5mg/kg 体重を投与)、酸化ストレス誘導剤パラコート (day3 午後 70mg/kg 体重を投与) による3つの着床障害マウスモデルを用いて着床特異的に発現する子宮内膜上皮、および子宮頸部上皮の RNA を抽出した。

4. 研究成果

野生型マウス (C57/BL/6) の着床前期から着床期にかけて子宮頸部上皮に発現する mRNA を RNA-seq で調べ、時系列で比較した。day3 午前から day4 午前にかけて5倍以上増加および減少する transcript はそれぞれ 359 遺伝子および 653 遺伝子であり、day4 午前から day4 午後にかけて5倍以上増加および減少する transcript はそれぞれ 262 遺伝子および 237 遺伝子であった。PGR アンタゴニスト RU486、エストロゲン受容体アンタゴニスト ICI182780、酸化ストレス誘導剤パラコートの投与により、day5 午前に胚接着反応認められないことを確認した。子宮頸部細胞において、day3 午前から day4 午前にかけて2倍以上発現増加する transcript のうち、RU486、ICI182780、パラコートによる3つの着床障害マウスモデルでいずれも発現低下したものが、320 遺伝子あった。このように、着床特異的に変動する子宮頸部遺伝子を抽出することが可能であった。これが、マーカーとして機能しうるか、また子宮体部における遺伝子との連動変化があるのかを確かめるために、現在、着床不全のモデルマウスを用いて、プロゲステロンシグナルと胚受容能ならびに、頸部におけるマーカー遺伝子との連関を検証している。

マウスにおいて、着床期に体部で発現上昇する着床因子 *Lif* が、頸部においても同様に発現が上昇することを見出した。*Lif* の発現は、特にマウスの子宮内膜上皮で認められており、着床期のヒトの頸部においても同様に内膜上皮に発現が認められた。マウスにおいて、着床不全を引き起こす、プロゲステロン受容体 (PR) の antagonist (RU486) 投与やパラコ

ート投与(酸化ストレス誘導)によって、頸部の Lif の発現が低下することから、この二つの着床不全モデルにおいても、頸部の Lif が子宮体部の胚受容能を示す有用なマーカー遺伝子であることを明らかにした(論文準備中)。

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 10 件)

1. Takehiro Hiraoka, Tomoko Saito-Fujita, Yasushi Hirota
How does Progesterone Support Embryo Implantation? 査読無し
Journal of Mammalian Ova Research 32(3): p87-94. 2015
<https://doi.org/10.1274/jmor.32.87>
2. 藤田知子、廣田泰
子宮内膜における着床制御因子プロゲステロン・シグナルを中心に
HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY 査読無し
22 p176-179 2015
3. Jeeyeon Cha, Kristin E. Burnum-Johnson, Amanda Bartos, Yingju Li, Erin S. Baker, Susan C. Tilton, Bobbie-Jo M. Webb-Robertson, Paul D. Piehowski, ‡ Matthew E. Monroe, Anil G. Jegga, Shigeo Murata, Yasushi Hirota, and Sudhansu K. Dey
Muscle Segment Homeobox Genes Direct Embryonic Diapause by Limiting Inflammation in the Uterus
J Biol Chem. 査読有 2015 290(24): p15337-15349.
doi:10.1074/jbc.M115.655001
4. Takehiro Hiraoka, Yasushi Hirota, Tomoko Saito-Fujita, Mitsunori Matsuo, Mahiro Egashira, Leona Matsumoto, Hirofumi Haraguchi, Sudhansu K. Dey, Katsuko S. Furukawa, Tomoyuki Fujii, and Yutaka Osuga
STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized uterine matrix transplantation
JCI Insight. 査読有 2016 Jun 2;1(8).
doi: 10.1172/jci.insight.87591
5. 藤田知子 若手の最新研究紹介コーナー
「分娩とその異常におけるプロゲステロン受容体の機能解析」
産科と婦人科 査読無し 1(75) 2017 p75-77
6. Alan D. Bolnick, Jay M. Bolnick, Brian A. Kilburn, Tamika Stewart, Jonathan Oakes, Javier Rodriguez-Kovacs, Hamid-Reza Kohan-Ghadr, Jing Dai, Michael P. Diamond, Yasushi Hirota,

Sascha Drewlo, Sudhansu K. Dey, and D. Randall Armant

Reduced homeobox protein MSX1 in human endometrial tissue is linked to infertility

Hum Reprod. 査読有 2016 Sep; 31(9): p2042-2050.

doi: 10.1093/humrep/dew143

7. Wenbo Deng, Jeeyeon Cha, Jia Yuan, Hirofumi Haraguchi, Amanda Bartos, Emma Leishman, Benoit Viollet, Heather B. Bradshaw, Yasushi Hirota, and Sudhansu K. Dey
J Clin Invest. 査読有 2016 1;126(8):p2941-54.
doi: 10.1172/JCI87715
8. 田中智基、廣田泰
プロゲステロンとステロイド受容体
Progesterin Insights 査読無し 2017,1, p6-7
9. Mahiro Egashira, Yasushi Hirota, Ryoko Shimizu-Hirota, Tomoko Saito-Fujita, Hirofumi Haraguchi, Leona Matsumoto, Mitsunori Matsuo, Takehiro Hiraoka, Tomoki Tanaka, Shun Akaeda, Chiaki Takehisa, Mayuko Saito-Kanatani, Kei-ichiro Maeda, Tomoyuki Fujii, Yutaka Osuga
F4/80+ Macrophages Contribute to Clearance of Senescent Cells in the Mouse Postpartum Uterus
Endocrinology. 査読有 2017 Jul 1;158(7):2344-2353.
doi: 10.1210/en.2016-1886.
10. Shizu Aikawa, Kuniyuki Kano, Asuka Inoue, Jiao Wang, Daisuke Saigusa, Takeshi Nagamatsu, Yasushi Hirota, Tomoyuki Fujii, Soken Tsuchiya, Yoshitaka Taketomi, Yukihiro Sugimoto, Makoto Murakami, Makoto Arita, Makoto Kurano, Hitoshi Ikeda, Yutaka Yatomi, Jerold Chun, and Junken Aoki
Autotaxin-lysophosphatidic acid-LPA 3 signaling at the embryo epithelial boundary controls decidualization pathways
EMBO J. 2017 査読有 14;36(14):2146-2160.
doi: 10.15252/embj.201696290.

[学会発表](計 14 件)

1. Hirofumi Haraguchi, Yasushi Hirota, Tomoko Saito-Fujita, Mahiro Egashira, Leona Matsumoto, Mitsunori Matsuo, Takehiro Hiraoka, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii
MicroRNA controls receptivity to the embryo by regulating progesterone signaling in the cervix and uterus.

- International Federation of Fertility Societies / Japanese Society for Reproductive Medicine International Meeting 2015. 2015 年
2. Yasushi Hirota, Hirofumi Haraguchi, Tomoko Saito-Fujita, Mahiro Egashira, Leona Matsumoto, Mitsunori Matsuo, Takehiro Hiraoka, Sudhansu K. Dey, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii
MicroRNA-200a impairs progesterone signaling in the cervix, disturbing embryo implantation
International Symposium on "Epigenome dynamics and regulation in germ cells" 2016 年
 3. Leona Matsumoto, Yasushi Hirota, Tomoko Saito-Fujita, Hirofumi Haraguchi, Mahiro Egashira, Mitsunori Matsuo, Takehiro Hiraoka, Tomoki Tanaka, Norihiko Takeda, Tomoyuki Fujii, Yutaka Osuga
Crucial role of hypoxia inducible factor 2alpha in the pregnant uterus
31th eshre Annual Meeting 2015 年
 4. 廣田泰
子宮におけるプロゲステロン受容体シグナルと着床
第 60 回日本生殖医学会学術講演会 2015 年
 5. 廣田泰
プロゲステロンと子宮の機能～着床から分娩まで
第 5 回プロゲスチン研究会 2015 年
 6. 伊賀上翔太, 廣田泰, 藤田知子, 原口広史, 松本玲央奈, 松尾光徳, 平岡毅大, 田中智基, 大須賀穰, 藤井知行
Leukemia inhibitory factor in the cervical epithelium is a possible biomarker of uterine receptivity.
第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会 2016 年
 7. 松本玲央奈, 廣田泰, 藤田知子, 原口広史, 江頭真宏, 松尾光徳, 平岡毅大, 田中智基, 武田憲彦, 大須賀穰, 藤井知行
低酸素誘導因子 HIF が着床を調節する
第 61 回日本生殖医学会学術講演会・総会 2016 年 11 月
 8. 松尾光徳, 廣田泰, 藤田知子, 原口広史, 江頭真宏, 松本玲央奈, 平岡毅大, 赤枝俊, 田中智基, 藤田英俊, 本道栄一, 大須賀穰, 藤井知行
黄体ホルモン製剤レボノルゲストレルによる LIF を介した着床阻害機構
第 61 回日本生殖医学会学術講演会・総会 2016 年
 9. 伊賀上翔太, 廣田泰, 藤田知子, 原口広史, 松本玲於奈, 松尾光徳, 平岡毅大, 赤枝俊, 田中智基, 大須賀穰, 藤井知行
着床胚が接着する場の子宮内膜管腔上皮における遺伝子発現プロファイル 第 39

- 回日本分子生物学会年会 2016 年
10. Yasushi Hirota
STAT3 promotes uterine regeneration in a mouse model of decellularized uterine matrix transplantation
Gordon Research Conference on Mammalian Reproduction 2016 年
 11. 廣田泰
黄体ホルモンによる子宮の胚受容能と着床の調節機構
第 5 回プロゲストーン研究会 2016 年
 12. 平岡毅大, 廣田泰, 藤田知子, 田中智基, 赤枝俊, 伊賀上翔太, 大須賀穰, 藤井知行
白血球阻止因子(LIF)による胚の着床誘導機序についての検討
第 40 回日本分子生物学会 2017 年
 13. 藤田知子, 廣田泰, 松本玲央奈, 武田憲彦, 藤田英俊, 原口広史, 松尾光徳, 平岡毅大, 田中智基, 赤枝俊, 大須賀穰, 藤井知行
子宮の HIF2 は胚盤胞の生存と子宮への浸潤を制御する
第 40 回日本分子生物学会 2017 年
 14. Yasushi Hirota, Tomoko Saito-Fujita, Leona Matsumoto, Hirofumi Haraguchi, Mitsunori Matsuo, Takehiro Hiraoka, Shun Akaeda, Tomoki Tanaka, Norihiko Takeda, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii
Uterine hypoxia inducible factor contributes to blastocyst invasion by clearance of luminal epithelium at the site of blastocyst attachment
Society for the Study of Reproduction, 50th Annual Meeting 2017 年

〔その他〕

ホームページ

<https://plaza.umin.ac.jp/kyobgyn/recruit/aboratory/hirota.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 知子

(SAITO-FUJITA Tomoko)

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号： 60375441

(2) 研究分担者

廣田 泰

(HIROTA Yasushi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号： 40598653