

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04282

研究課題名(和文) Sox17ヘテロ不全マウスを用いた着床メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of implantaion process by using Sox17 heterozygous mouse

研究代表者

金井 正美 (KANAI, Masami)

東京医科歯科大学・統合研究機構・教授

研究者番号：70321883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠不成立の最大要因と考えられる受精胚の母体着床プロセスに関する系統だった基礎的研究は、現在のところ殆どなされていない。本研究ではマウスSox17ヘテロ不全個体を用いることで、着床不全の原因について分子病態学的に解析し、不妊要因が母体にあることを証明した。また、子宮内膜上皮を用いたマイクロアレイ解析の結果から、hetero個体でwild typeと比べシグナル比が有意に低下した遺伝子群のうち、Sox17下流遺伝子候補を同定した。

研究成果の概要(英文)：Few basic and systematic research has been done for maternal implantation process of fertilized embryo which is considered to be the factor in the pregnancy failure. In this study, we have done the pathological analysis by using female Sox17 heterozygous mouse. From the result of microarray analysis using endometrial epithelium from female Sox17 heterozygous mouse, we have selected that the gene group in which the signal ratio was significantly decreased as compared with the wild type.

研究分野：実験動物学

キーワード：着床 不妊 マウス Sox17

1. 研究開始当初の背景

女性の社会進出に伴う出産高齢化・少子化現象は深刻な社会問題であり、既婚カップルの10-25%が不妊に悩み、その40%は母体に要因にあると言われている。しかしながら、受精胚の遺伝的要因では無い母体子宮内の環境因子について、また受精胚の着床プロセスに至っては、未だ系統だった基礎的研究は殆どなされていないのが現状である。

本研究では母体環境の多様性に関して、マウス *Sox* (*Sry*-related HMG box) 17 ヘテロ不全個体を用いることで、着床不全の仕組みとその下位の分子カスケードを明らかにし、最終的には、ヒト不妊治療解明への一歩を踏み出すことを目的としている。

Sox17 は *Sox7*, *18* とともに *Sox* ファミリー F グループに属し、哺乳類の精巣決定遺伝子 *SRY* の DNA 結合領域である HMG ボックスに高い相同性を示す転写因子群である。マウスおよびヒトでは 20 数種類の *Sox* 遺伝子群が存在し、発生ステージや組織特異的に発現し、細胞・組織の分化決定に重要な役割を担うことが多くの論文で発表されている。申請者らは 1996 年当初マウス精巣に発現する新規の *Sox* 遺伝子として *Sox17* を単離し、*Sox17* 欠損 ES 細胞を用いたキメラ胚解析から、*Sox17* が胚性内胚葉への分化に必須であることを明らかにした。マウスコロニー維持のバッククロス過程でヘテロ個体の雌が不妊であるという事実を見出した。ヘテロ個体のメスの不妊が観察されたこと、*SOX17* がマウス子宮内においてプロゲステロンレセプターのターゲット遺伝子として機能することを鑑み (Rubel C A et al., Mol. Endocrinol. 2012)、着床不全における母体要因についての詳細な解析を計画した。その関連データを得たのでここに報告する。

2. 研究の目的

着床不全の原因としては、胚の原因として、染色体動態異常が考えられ、母体要因では、子宮や卵巣/黄体機能不全には性ホルモンが大きく関わる。正常妊娠過程では、卵胞刺激ホルモン (FSH) が卵胞の発育を促進してエストロゲン (E) を産生させ、黄体化ホルモン (LH) が急上昇 (LH サージ) して排卵が誘導され、排卵後まもなく卵胞は黄体を形成し、黄体化した卵胞や胎盤から分泌されるプロゲステロン (黄体ホルモン; P) は、子宮内膜を肥厚させ受精卵が着床可能なるが、着床成立にはホルモン制御以外の複雑な環境要因も関与している。一般的に、体外受精胚の移植には、発情期に合わせた偽妊娠状態マウスが使用されているが、この胚のレシピエントとなる偽妊娠マウスの着床に対しての子宮環境の time window に対するタイミングがキーとなり、成功率が左右される。一方、排卵、受精、着床、胚発生の全てのプロセスが成功することで始めて妊娠が成立するが、ヒトでは体外受精しても移植後に着床する胚は約 30%、移植された胚のうち 70% は着床に至らない。本申請では母体サイドの要因である着床不全ヘテロ

不全のマウス (3 種類の *Sox17* 変異マウスのヘテロ個体) を用いることで、受精胚の母体への着床プロセスを病態学的に解析し、その分子制御を明らかにし、不妊治療解明への一歩を踏み出す。

3. 研究の方法

性周期における *Sox* 関連遺伝子のプロファイリング; 正常マウスを用いた性周期、並びに妊娠前後 *Sox 7, 17, 18* の子宮内膜での発現制御について、ホルモン応答性、着床前後の変化を関連遺伝子群で詳細に検討する。即ち、正常雌マウスの非妊娠期、ホルモン処理 (PMSG 48 時間処理) 後、また着床遅延 (精管結紮 ♂ と交配後、卵管結紮を行い、2-cell 移植、妊娠 5 日、6 日にプロゲステロン; P2 mg、7 日目に P 2mg、エストロゲン:E 25ng をマウス 1 匹あたりに腹腔内投与し、6 時間後に着床オンタイム) の子宮内膜上皮のみを単離し RNA を生成した後、半定量的 RT-PCR を実施し *Sox7, 17, 18* の遺伝子変動を観察する。

卵移植による *Sox17* ヘテロマウスの着床不全原因の同定; 胚発生過程を (1) 排卵 (2) 受精 (3) 胚発生 (4) 着床の 4 ステップで検討する。即ち PMSG/hSG 処理後に採卵した *Sox17* ヘテロ (*Sox17*^{+/-}) と wild type 胚の発生プロセスを *in vitro* (IVF) にて各ステージで確認する。更に、*Sox17*^{+/-} と wild type 胚をそれぞれ wild type 母体、*Sox17*^{+/-} 母体へ移植することで着床率の確認を行う。その際には blue dye (Chen Q et al., Mol Asp Med 2013) により着床部位をマークすることで子宮全体を可視化する。即ち、精管結紮雄マウスと各メスマウス (*Sox17*^{+/-} と wild type) を交配し、その後、各 *Sox17*^{+/-} と wild type 胚移植を実施し、妊娠 5 日齢にて子宮全体を採取、着床率の確認、方法 で確認出来た関連 *Sox* 遺伝子の発現を組織化学的に検討する。*Sox17* ヘテロマウス子宮内膜上皮でのマイクロアレイ解析; *Sox17* ヘテロと wild type の子宮内膜上皮 (*SOX17* の発現が維持されている) 領域から total RNA をそれぞれ精製し、増幅、合成を行い biotin 標識した cRNA プローブを作製する。各々のサンプルをアフィメトリック社の Mouse Expression Set 430 上でハイブリダイズさせ、アレイを洗浄後、専用のアレイスキャナでシグナルを検出し、wild type と比べてシグナル比が有意に偏る遺伝子群を同定する。その中で発現量に 2 倍以上の変化が認められた遺伝子 (*Sox17* 下流遺伝子候補) に対し、qPCR 法により、*Sox17*^{+/-} と wild type 間での発現量の差異を定量化する。また、有意に発現量の変化が認め

られた遺伝子に対し、妊娠後に経時的にサンプリングした横断切片を用いた *in situ* hybridization か、市販抗体を用いて組織化学を実施する。*Sox17* と発現が類似したパターンを示す遺伝子群を標的遺伝子候補として最終選別することを目標にする。

4. 研究成果

性周期における *Sox* 関連遺伝子のプロファイリングについて；性周期に関しては、膣スミアのライトギムザ染色で、ステージの識別が可能になった。同定した性周期（発情前期；P，発情期；E，発情後期；M，発情間期；D）の各ステージの子宮組織を細分した後、Pancreatin, Dispase 処理で、4 1時間、室温1時間、37 15分処理し、子宮内膜上皮1層を単離した。得られた子宮内膜上皮から RNA を抽出し、内在性の *Sox7* と *Sox17*（共に *SoxF* グループであり、同グループに属する *Sox18* は子宮内膜上皮では発現していないことを確認した）の発現パターンを定量的 RT-PCR で確認した（図1）。その結果から、*Sox7* の発現は低値で大きな変動は認められず、一方、*Sox17* 遺伝子発現が E から M にかけて特異的に著しく上昇することが明らかとなった。今後は更に、子宮内膜上皮の細胞増殖と性周期（P, E などのホルモン濃度）との関連性を詳細に解析する。

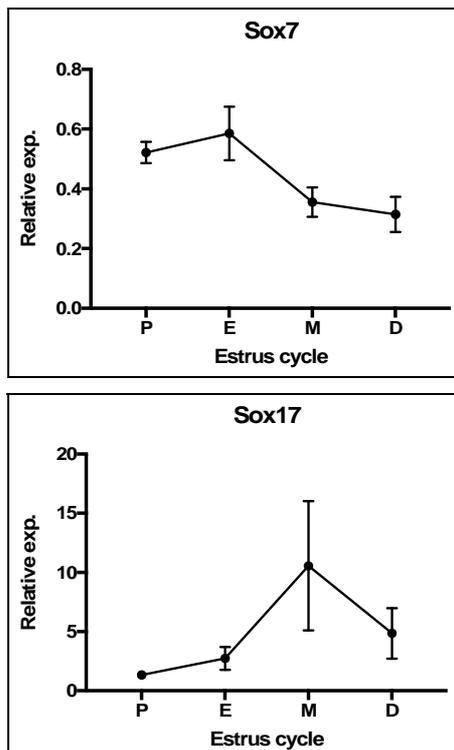


図1 *Sox7* と *Sox17* の性周期における半定量的 PCR

卵移植による *Sox17* ヘテロマウスの着床不全原因の同定について；胚発生過程を (1) 排卵 (2) 受精 (3) 胚発生 (4) 着床の4ステップで検討した。*Sox17* ヘテロマウス(*GFP*+、

+/- 2 系統) を用いて交配したところ、メスがヘテロの場合にのみ、著しい妊性が観察された。ワイルドタイプの C57BL/6 マウスでは平均 8.4 個の胚の着床が認められるが、*Sox17* ヘテロ個体では 1.5 個、一方、*Sox7* ヘテロ個体では 8.8 個の着床率で、*Sox17* ヘテロ個体で特異的な不妊が観察された（図2）。また子宮内から、正常な胚盤胞が回収できたことから、ヘテロ個体は、排卵、受精、胚発生は正常であるものの、母体に何らかの原因があることが明らかとなった。そこで、母体サイドの *Sox17* ヘテロマウス子宮内膜上皮でのマイクロアレイ解析を行うことで、次に下位遺伝子の探索を試みた。

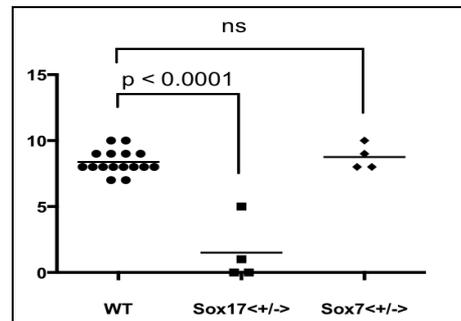


図2 *Sox17*, *7* ヘテロマウスの着床数 Hirate Y et al. *Sci Rep* 2016 より引用

Sox17 ヘテロマウス子宮内膜上皮でのマイクロアレイ解析について；着床前と後の子宮内膜上皮を回収し、wild type とヘテロ個体での *Sox17* 遺伝子発現量を比較した。wild type では妊娠4日目 (DOP4) に *Sox17* の発現ピークが認められる一方、ヘテロ個体ではその発現が減少し、ピークも後半へシフトした。以上の結果は、着床タイミングの調整に *Sox17* 遺伝子が、直接関与することを示唆する (Hirate Y et al. *Sci Rep* 2016)。また wild type と *Sox17* ヘテロ個体の子宮内膜上皮から得た RNA を調整後、DNA array 解析を試みたところ、DOP1 と比較して DOP3, 4 の胚の着床受容期の発現に2倍以上差がある遺伝子が 1449 遺伝子同定された。その中でヘテロ個体において特異的に 1/2 以下に発現が減少する遺伝子は 121 遺伝子であった。これらの遺伝子プールの中から、着床前後の *Sox17* 遺伝子動態と同じパターンを示すものを絞り込んだ。更に、EGF-Rc に結合する細胞外基質にフォーカスを当て、時空間な発現を子宮内膜上皮と胚の栄養膜細胞で組織学的に確認することが出来た。今後は、胚と母体の直接的なクロストークを詳細に解析し、研究を展開していく。

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 14 件)

Hirate Y, Suzuki H, Kawasumi M, Takase HM, Igarashi H, Naquet P,

Kanai Y, Kanai-Azuma M. Mouse Sox17 haploinsufficiency leads to female subfertility due to impaired implantation. *Sci Rep.* 6:24171. 2016 (査読有)

Igarashi H, Uemura M, Hiramatsu R, Hiramatsu R, Segami S, Pattarapanawan M, Hirate Y, Yoshimura Y, Hashimoto H, Higashiyama H, Sumitomo H, Kurohmaru M, Saijoh Y, Suemizu H, Kanai-Azuma M, Kanai Y. Murine Sox17 Gene is Essential for Proper Formation of the Marginal Zone of Extraembryonic Endoderm Adjacent to a Developing Placental Disk. *Biol Reprod.* doi: 10.1093/biolre/ ioy079. [Epub ahead of print] 2018 (査読有)

Higashiyama H, Ozawa A, Sumitomo H, Uemura M, Fujino K, Igarashi H, Imaimatsu K, Tsunekawa N, Hirate Y, Kurohmaru M, Saijoh Y, Kanai-Azuma M, and Kanai Y. Embryonic Cholecystitis and Defective Gallbladder Contraction in the Sox17-haploinsufficient Model of Biliary Atresia. *Development* 144(10): 1906-1917. 2017 (査読有)

〔学会発表〕(計 40 件)

Hirate Y, Hayakawa K, Toyomura Y, Igarashi H, Miura K, Kanai Y, Kanai-Azuma M. Sox17 heterozygous mutant females are defective in implantation. [Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists 50th], May 1, 2017, Tower Hall Funabori, Tokyo

Kanai-Azuma M, Hirate Y, Kawasumi M, Suzuki H, Kanai Y. A possible involvement of a dose-dependent Sox17 activity of uterine epithelia in mouse implantation processes, [7th International Symposium Biology of Vertebrate Sex Determination], April 13-17, 2015, Kona, Hawaii

Kanai-Azuma M, Hirate Y, Kanai Y. Molecular pathway downstream of Sox17 in uterine epithelia during mouse implantation process. [8th International Symposium Biology of Vertebrate Sex Determination], April 16-20, 2018, Kona, Hawaii

平手良和, 早川佳那, 豊村友賀, 五十嵐瞳, 三浦健人, 金井克晃, 金井正美, Sox17 ヘテロ変異着床不全マウスにおける子宮上皮遺伝子の発現変化, 「第64回日本実験動物学会」, 2017年5月25日-27日, ビッグパレットふくしま
早川佳那, 平手良和, 上村麻実, 三浦健人, 金井克晃, 金井正美, Sox17ヘ

テロ変異雌マウスの子宮における着床不全のメカニズム解析, 「第160回日本獣医学会」, 2017年9月13日-15日, 鹿児島大学

平手良和, 早川佳那, 中野有紀, 上村麻実, 三浦健人, 金井克晃, 金井正美, マウス子宮上皮における転写因子 Sox17 の発現は着床の成立に必須である, 「第40回日本分子生物学会」, 2017年12月6日-9日, 神戸ポートアイランド

〔図書〕(計 2 件)

木曾康郎・日下部健・金井正美: 「獣医組織学 第七版」第 15 章 胎盤, 学窓社, p.219-224, 2017年3月

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd-cea.jp/eam/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

金井 正美 (KANAI, Masami)

東京医科歯科大学・統合研究機構・教授
研究者番号: 70321883

(2)研究分担者

平手 良和 (HIRATE, Yoshikazu)

東京医科歯科大学・統合研究機構・講師

研究者番号: 70342839