

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15596

研究課題名(和文) 低酸素誘導因子による子宮内膜調節と着床

研究課題名(英文) Roles of uterine hypoxia inducible factor in embryo implantation

研究代表者

廣田 泰 (Hirota, Yasushi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40598653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：子宮の低酸素誘導因子(HIF)の妊娠における役割は不明であったため、本研究では子宮特異的HIF欠損マウスモデルを用いて子宮のHIFの意義を調べた。子宮のHIF2a欠損マウスは不妊であり、子宮内膜への胚着床が認められるものの子宮内膜管腔における胚着床位置の子宮血管側への偏位が起こっていた。胚着床後に脱落膜化障害と胚発育停止が認められた。HIF2a欠損マウスへのプロゲステロン投与は脱落膜化障害は改善されたものの、胚発育停止は依然認められ産仔は得られなかった。子宮のHIFが胚着床位置の決定、脱落膜化、着床後の胚発育に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Roles of uterine hypoxia inducible factor (HIF) in early pregnancy remain unknown. In this study, we found that mice with conditional deletion of uterine Hif2a are infertile, and have the dislocation of implantation sites and defective decidualization. We also found that supplementation of progesterone markedly improve decidualization but can not recover full pregnancy in Hif2a conditional knockout mice. These findings suggest that HIF in the periimplantation uterus may support successful implantation and decidualization.

研究分野：産婦人科学

キーワード：着床 低酸素 HIF マウスモデル 子宮 子宮内膜 HIF2 脱落膜化

## 1. 研究開始当初の背景

着床は妊娠の起点ともいえる現象で、受精卵と子宮内膜との物理的結合が成立することで定義される。受精卵と子宮内膜との接触がある特定の条件においてのみ着床が成立することから、受精卵および子宮内膜の時間空間的に精妙な協調作用が着床の成立には必要とされる。着床に関する研究は生命科学の研究対象として興味深いだけではなく、生殖医学の見地からもその成果は不妊治療への応用や避妊法の開発という点で現代社会からの要求が高まっている分野である。世界的に見ると 2050 年には 15% のカップルが不妊となると推定されており、少子化が叫ばれている近年の社会情勢は不妊症治療の更なる発展を必要としているため、着床に関する基礎研究が社会貢献できる可能性は高い。

受精卵が胚盤胞となって子宮内膜管腔上皮に接着し、胚盤胞の外側細胞を構成する栄養膜細胞が子宮内膜間質に浸潤し、子宮内膜における血管新生が活性化され、分化した絨毛外栄養膜細胞と子宮内膜由来の血管内皮細胞によって血管が形成され、子宮からの血液の流入により胎盤・胎児が相対的に高酸素となる。このようにして胎盤が形成され胎児の発育が可能となる。着床前の子宮内膜表面は子宮筋層近くの子宮内膜に比べて低酸素であることから (Genbacev, Science 1997)、子宮内に存在する着床前期胚も低酸素状態である。着床後の子宮内膜には VEGF などの作用により着床部位を中心に血管新生が急速に進み、胎盤形成が促進される。低酸素誘導因子 Hypoxia Inducible Factor (HIF) は低酸素時に誘導される主要な転写因子であり、着床時の子宮、特に子宮内膜間質(脱落膜)に強く発現しているが、その機能については未だ不明である。本研究では、低酸素であることが正常な着床や胚発育に重要であるという仮説のもと、子宮の低酸素応答の重要性を *in vivo* の実験系を用いて検討する。本研究には子宮特異的遺伝子改変マウスを用いる。

HIF- $\alpha$  には HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ 、HIF-3 $\alpha$  が存在し、これらはいずれも HIF-1 $\beta$  とヘテロ二量体と結合し機能する。過去の報告では、胚の子宮内膜への接着は 5 日目 (Day5) で起こるが、着床後のマウス子宮内膜 (Day8) では、子宮内膜間質(脱落膜)を中心に HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$  が強く発現している。一方 HIF-3 $\alpha$  の着床後の子宮内膜での発現は低い。

## 2. 研究の目的

着床時のヒト子宮内膜表面は子宮筋層近くの子宮内膜と比べて低酸素状態である。マウス着床期子宮において低酸素で誘導される転写因子として広く知られる HIF1 $\alpha$  および HIF2 $\alpha$  が子宮内膜に発現していることが報告されている。着床直後の子宮内膜には VEGF などの血管新生因子が胚周囲に発現し急速に血管新生が進み、子宮内膜の酸素化が促進され胎盤形成が起こる。着床期の子宮内膜とそこに存在する胚は生理的な低酸素状態であり、着床期子宮内膜の低酸素状態が正常な着床・胚発育・胎盤形成に重要であることが推測される。子宮内膜の低酸素状態によって、HIF が子宮内膜に誘導されて作用すると推測されるものの、これまで生体を用いた子宮の HIF の解析はなされておらず、その役割は不明であった。

本研究では、着床期の子宮内膜が低酸素状態であることを確認し、子宮内膜の低酸素応答、特に低酸素誘導因子 HIF が着床、胎盤形成、胚発育に貢献しているかどうかについて、子宮特異的遺伝子改変マウスを用いて検討することとした。

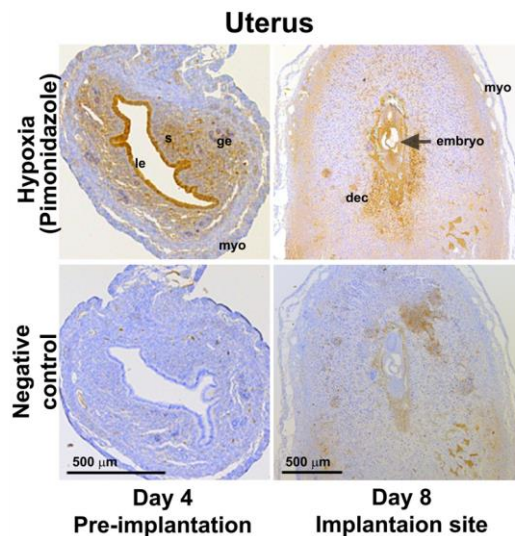


図1. 妊娠子宮は低酸素である

le;管腔上皮, s;間質, ge; , myo; , dec; . Pimonidazole (Pz) をマウスに静注、組織を採取、抗Pz抗体で染色(茶色)。Pimonidazoleは低酸素細胞に取り込まれる。Negative control: pimonidazole静注なし。

## 3. 研究の方法

① 着床前子宮内膜の低酸素状態と HIF の誘導を *in vivo* で確認した。pimonidazole 法では、酸素分圧 10mmHg 以下の領域が検出できる。  
② 子宮の HIF の意義を子宮特異的 HIF 欠損マウスで検討した。Cre-loxP system を用いて子宮特異的 (Hirota Y, JCI 2010; Hirota Y, PNAS 2011; Cha J, JCI 2013.) を用いてマウスを作成した。Cre マウスは Pgr-Cre を用いた。Hif1 $\alpha$ -loxP マウスおよび Hif2 $\alpha$ -loxP マウスを、子宮全体の cre である Pgr-cre とかけ合わせて子宮全体の HIF1 $\alpha$  および HIF2 $\alpha$  欠損マウスを作成した。野生型オスマウスと交配させ妊娠の表現型を調べた。

## 4. 研究成果

① pimonidazole 法によって、着床前のマウス子宮内膜は低酸素状態であること、着床成立後に酸素化が進むことが明らかとなった (図 1)。  
② Hif1 $\alpha$  欠損、Hif2 $\alpha$  欠損マウスの表現型を確認したところ、子宮全体の Hif2 $\alpha$  欠損マウスの産仔は 0 であり、完全な不妊であった (図 2)。  
さらに完全な不妊である Hif2 $\alpha$  欠損マウスの妊娠異常がどの段階で起こっているのかを調べたところ、子宮内膜への胚接着が認められるものの子宮内膜管腔における胚接着位置の子宮血管側への変位が起こっており、胚接着後に脱落膜化不全と胚発育停止が認められ、この異常に並行して血中プロゲステロン濃度低下が起こっていた。そこで Hif2 $\alpha$  欠損マウスにプロゲステロンを投与したところ、Hif2 $\alpha$  欠損マウスの脱落膜化障害は改善されたが (図 3)、胚発育停止は依然認められ産仔を得ることができなかった。in situ hybridization では、Hif2 $\alpha$  mRNA は着床後の子宮の間質(脱落膜)に主に発現してい

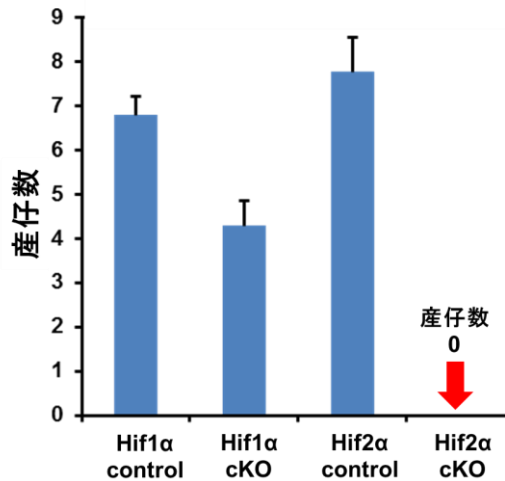


図2. Pgr-creを用いた、子宮のHif1αおよびHif2αの欠損マウスの産仔数

た(図4)。

以上の結果から、着床期子宮内膜が低酸素であること、子宮のHIFが胚接着位置の決定、脱落膜化、着床後の胚発育に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。本研究により、着床期子宮内膜の生理的な低酸素によって誘導されるHIFが胚着床に寄与している可能性が示唆された。

#### 着床後・脱落膜化の過程 (Day 8)

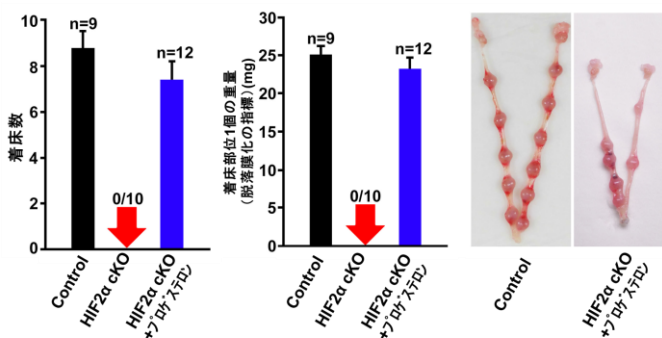


図3. 子宮全体のHIF2欠損マウスは着床障害・脱落膜化異常をきたすが、黄体ホルモン(プロゲステロン)投与により脱落膜化は救済される

#### 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 15 件)

- ①Deng W, Cha J, Yuan J, Haraguchi H, Bartos A, Leishman E, Viollet B, Bradshaw H, Hirota Y, Dey SK. p53 coordinates decidual Sestrin2-AMPK-mTORC1 signaling to govern parturition timing, *J Clin Invest*, 査読有, 2016, in press.
- ②Hiraoka T, Hirota Y, Saito-Fujita T, Matsuo M, Egashira M, Matsumoto L, Haraguchi H, Dey SK., Furukawa KS, Fujii T, Osuga Y.: STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized uterine matrix transplantation. *JCI Insight*, 査読有, 2016, 1, e87591. DOI: 10.1172/jci.insight.87591.

#### Implantation sites (Day 6 of pregnancy)

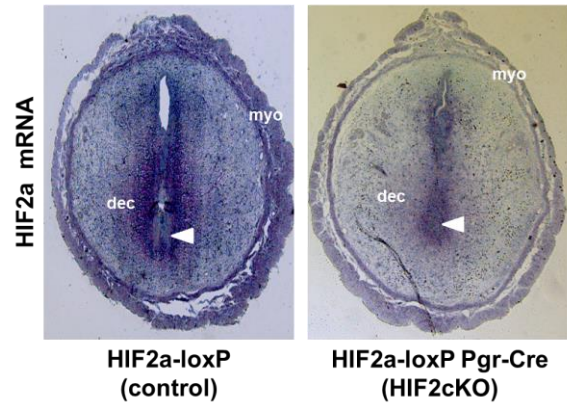


図4. HIF2aは脱落膜細胞(間質細胞)に発現しているHIF2a mRNAのIn situ hybridization myo; 筋層, dec; 脱落膜, arrow head; 胚.

- ③Miyashita M, Koga K, Izumi G, Sue F, Makabe T, Taguchi A, Nagai M, Urata Y, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Effects of 1,25-dihydroxy vitamin D3 on endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 査読有, 2016, in press. DOI: jc20161515.
- ④Takahashi N, Harada M, Hirota Y, Zhao L, Yoshino O, Urata Y, Izumi G, Takamura M, Hirata T, Koga K, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. A potential role of endoplasmic reticulum stress in development of ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 428, 査読有, 2016, 161-169. DOI: 10.1016/j.mce.2016.03.032.
- ⑤Taguchi A, Koga K, Kawana K, Makabe T, Sue F, Miyashita M, Yoshida M, Urata Y, Izumi G, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Resveratrol Enhances Apoptosis in Endometriotic Stromal Cells. *Am J Reprod Immunol*, 査読有, 75, 2016, 486-492. DOI: 10.1111/aji.12489.
- ⑥Takamura M, Koga K, Izumi G, Hirata T, Harada M, Hirota Y, Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Simultaneous Detection and Evaluation of Four Subsets of CD4+ T Lymphocyte in Lesions and Peripheral Blood in Endometriosis. *Am J Reprod Immunol*, 査読有, 74, 2015, 480-486. DOI: 10.1111/aji.12426.
- ⑦Harada M, Nose E, Takahashi N, Hirota Y, Hirata T, Yoshino O, Koga K, Fujii T, Osuga Y. Evidence of the activation of unfolded protein response in granulosa and cumulus cells during follicular growth and maturation. *Gynecol Endocrinol*. 査読有, 31, 2015, 783-787. DOI: 10.3109/09513590.2015.1062862.
- ⑧Miyashita M, Koga K, Izumi G, Makabe T, Hasegawa A, Hirota Y, Hirata T, Harada M, Fujii T, Osuga Y. Drospirenone induces decidualization in human eutopic endometrial stromal cells

and reduces DNA synthesis of human endometrial stromal cells. *Fertil Steril*, 査読有, 104, 2015, 217-224.

DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.03.023.

- ⑨ Cha J, Burnum-Johnson KE, Bartos A, Li Y, Baker ES, Tilton SC, Webb-Robertson BJ, Piehowski PD, Monroe ME, Jegga AG, Murata S, Hirota Y, Dey SK. Muscle Segment Homeobox Genes Direct Embryonic Diapause by Limiting Inflammation in the Uterus. *J Biol Chem*, 査読有, 290, 2015, 15337-15349.  
DOI: 10.1074/jbc.M115.655001.
- ⑩ Izumi G, Koga K, Nagai M, Urata Y, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Ogawa K, Inoue S, Fujii T, Osuga Y. Cyclic stretch augments production of neutrophil chemokines, matrix metalloproteinases, and activin A in human endometrial stromal cells. *Am J Reprod Immunol*, 査読有, 73, 2015, 501-506.  
DOI: 10.1111/aji.12359.
- ⑪ Hiraoka T, Saito-Fujita T, Hirota Y. How does Progesterone Support Embryo Implantation? *J Mamm Ova Res*, 査読有, 32, 2015, 87-94.  
DOI: 10.1274/jmor.32.87
- ⑫ 平岡毅大, 廣田泰. 着床における黄体ホルモンの作用, 産科と婦人科, 査読無, 82, 2015, 740-745.
- ⑬ 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, 22, 2015, 176-179.
- ⑭ 江頭真宏, 廣田泰. 種差からみた着床 ヒトとの共通点と相違点, *HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY*, 査読無, 22, 2015, 183-189.
- ⑮ 松尾光徳, 廣田泰. プロテオミクスを用いた妊娠成立・維持機構の研究, *HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY*, 査読無, 22, 2015, 11-17.

[学会発表](計 14件)

- ① Hirota Y, Haraguchi H, Saito-Fujita T, Egashira M, Matsumoto L, Matsuo M, Hiraoka T, Dey SK, Osuga Y, Fujii T. MicroRNA-200a impairs progesterone signaling in the cervix, disturbing embryo implantation. *International Symposium on Epigenome Dynamics and Regulation in Germ Cells*, 2016年2月18日, 京都大学百周年時計台記念館(京都府京都市).
- ② Hiraoka T, Hirota Y. Endometrial regeneration in the mouse model of decellularized matrix transplantation. *International Symposium on Epigenome Dynamics and Regulation in Germ Cells*, 2016年2月18日, 京都大学百周年時計台記念館(京都府京都市).
- ③ Hiraoka T, Hirota Y. Endometrial regeneration in the mouse model of

decellularized matrix transplantation. 平成27年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」冬期シンポジウム, 2016年2月8日, 一橋講堂 学術総合センター(東京都千代田区).

- ④ 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回プロゲステロン研究会(招待講演), 2016年2月6日, ホテル椿山荘(東京都文京区).
- ⑤ Hiraoka T, Hirota Y, Saito-Fujita T, Tanaka T, Matsuo M, Egashira M, Matsumoto L, Haraguchi H, Furukawa KS, Osuga Y, Fujii T. Endometrial regeneration in the mouse model of decellularized matrix transplantation. 第38回日本分子生物学会年会(BMB 2015), 2015年12月2日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市).
- ⑥ 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. 子宮の低酸素誘導因子 HIF2 $\alpha$  は妊娠成立に必須である, 第33回日本受精着床学会総会・学術講演会, 2015年11月27日, TFTホール(東京都江東区).
- 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. 着床における低酸素誘導因子 HIF の意義, 第30回日本生殖免疫学会, 2015年11月21日, くまもと県民交流館パレア(熊本県熊本市).
- ⑧ 廣田泰. 黄体ホルモンが調節する子宮内膜の胚受容能, 第6回金沢大学学際科学実験センターシンポジウム(招待講演), 2015年11月13日, 金沢大学附属医学図書館(石川県金沢市).
- ⑨ Hiraoka T, Hirota Y. The presence of ovarian hormone-independent endometrial epithelial growth in endometrial remodeling and regeneration. *The Second International Meeting for Epithelial Tubulology*(招待講演), 2015年8月22日, 北海道大学医学部学友会館(北海道札幌市).
- ⑩ Matsumoto L, Hirota Y, Saito-Fujita T, Haraguchi H, Egashira M, Matsuo M, Hiraoka T, Koga K, Dey SK, Fujii T, Osuga Y. Crucial role of hypoxia inducible factor 2 $\alpha$  in the pregnant uterus. *31st ESHRE Annual Meeting (ESHRE 2015)*, 2015年6月15日, FIL International Lisbon Fair (Portugal, Lisbon).
- ⑪ 廣田泰. 黄体ホルモンによる妊娠成立・維持のしくみ, 第38回東京成長ホルモン成長因子セミナー(招待講演), 2015年5月22日, 新宿住友ホール(東京都新宿区).
- ⑫ 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(招待講演), 2015年4月27日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).
- ⑬ Egashira M, Hirota Y, Saito-Fujita T, Haraguchi H, Matsumoto L, Matsuo M, Hiraoka T, Osuga Y, Fujii T. The presence of cellular senescence and its possible roles in the postpartum uterus. *IFFS/JSRM International Meeting 2015*, 2015年4月26日, パシフィコ横浜(神奈川県



横浜市).

- ⑭Haraguchi H, Hirota Y, Saito-Fujita T, Egashira M, Matsumoto L, Matsuo M, Hiraoka T, Koga K, Dey SK, Osuga Y, Fujii T. MicroRNA controls receptivity to the embryo by regulating progesterone signaling in the cervix and uterus, IFFS/JSRM International Meeting 2015, 2015年4月26日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

[図書](計 1 件)

- ①Hirota Y. Springer, Uterine Endometrial Function. 2016, in press.

[その他]

1. ホームページ

- ①Researchmap: 廣田泰  
<http://researchmap.jp/yhirota-tky/>

2. 受賞

- ①原口広史(大学院生、博士課程 4 年):平成 27 年度日本生殖医学会学術奨励賞  
②松本玲央奈(大学院生、博士課程 3 年):第 30 回日本生殖免疫学会学会賞  
③松本玲央奈(大学院生、博士課程 3 年):31st ESHRE Annual Meeting (ESHRE 2015) (Portugal, Lisbon) ベストポスター賞

6. 研究組織

(1)研究代表者

廣田 泰 (HIROTA, Yasushi)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 40598653

(2)研究分担者

藤田 知子 (FUJITA, Tomoko)  
東京大学・医学部附属病院・特別研究員  
研究者番号: 60375441

(3)研究協力者

原口 広史 (HARAGUCHI, Hirofumi)  
東京大学・大学院医学系研究科・大学院生  
松本 玲央奈 (MATSUMOTO, Leona)  
東京大学・大学院医学系研究科・大学院生  
江頭 真宏 (EGASHIRA, Mahiro)  
東京大学・農学生命科学研究科・大学院生  
松尾 光徳 (MATSUO, Mitsunori)  
東京大学・大学院医学系研究科・大学院生  
平岡 毅大 (HIRAOKA, Takehiro)  
東京大学・大学院医学系研究科・大学院生