

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08502

研究課題名(和文)着床メカニズムにおけるガレクチンとリガンド複合糖質の役割

研究課題名(英文)Role of galectins and ligand glycoconjugates on the mechanism of implantation

研究代表者

小林 純子(仁尾純子)(Junko, NIO-KOBAYASHI)

北海道大学・医学研究院・講師

研究者番号：70447043

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):ガレクチンはガラクトースを認識するレクチンで、雌性生殖器官ではgalectin-1とgalectin-3が主要なサブタイプである。本研究では、ガレクチンとリガンド複合糖質の着床メカニズムにおける役割を明らかにすることを目的とした。galectin-1は主に粘膜固有層の線維芽細胞と筋層に局在し、galectin-3は子宮内膜と全層に分布する免疫細胞に発現していた。Muc1は、ガレクチンの有力なリガンド候補分子であり、galectin-3とMuc1の発現には正の相関が認められた。これらの結果は、galectin-3が子宮内膜におけるMuc1の発現に何らかの影響を及ぼす可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

受精卵の子宮内膜への着床不全は、不妊症を引き起こす。ガレクチンは、ガラクトースを認識するレクチンで、着床に重要な役割を果たすことが示唆されているが、詳細なメカニズムはよくわかっていない。本研究では、子宮組織において特定の細胞にgalectin-1とgalectin-3が発現すること、そして、そのリガンド候補分子であり、着床に重要な役割を果たすことが示されるMuc1の発現にガレクチンが関与することを示唆するものである。本研究により明らかになった成果は、不妊症の新たな診断法や治療法の開発に重要な情報を提供すると思われる。

研究成果の概要(英文):Galectins are galactoside-binding animal lectins, and galectin-1 and galectin-3 are major subtypes expressed in the uterus. We examined the expression and regulation of galectin-1 and galectin-3 as well as their ligand glycoconjugates in the mouse uterus. Changes in gene expression were examined by real-time PCR, and histological analysis was performed in the cycling mice and hormone-treated mice. There was no significant change in galectin expression in cycling mice, while galectin-3/Lgals3 was suppressed by both estrogen and progesterone in ovariectomized mice. Galectin-1 is localized to fibroblasts in the lamina propria and muscular layer, whereas galectin-3 distributed in the endometrium and immune cells. Muc1, a candidate ligand for galectins, are expressed in endometrium and its expression was positively correlated to galectin-3 expression, suggesting that galectin-3 is involved in the expression of Muc1 during implantation.

研究分野：解剖学(組織学)

キーワード：ガレクチン 妊娠 着床 MUC1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠の成立には、受精、卵管を介した受精卵の子宮への輸送、子宮内膜への受精卵の着床の3つのステップが重要であり、いずれの段階における障害も不妊につながる。不妊症は妊娠を望む夫婦にとって精神的に大きな苦痛となり、不妊症の治療は肉体的苦痛を伴う。不妊を引き起こす要因として、加齢に伴う卵子および精子のクオリティーの低下が大きく、これら生殖細胞に注目した研究は世界中で活発に行われている。一方で、正常に発生能をもつ受精卵が子宮腔内に到達したとしても、子宮内膜に着床することができなければ妊娠は成立しない。しかし、子宮腔内において受精卵が正常に着床し、妊娠が成立する過程の詳細な分子メカニズムは不明な点が多い。

ガレクチンは、ガラクトースを認識する動物レクチンで、哺乳類では15種類のサブタイプが報告されている。卵管や子宮などの雌性生殖器では、galectin-1 と galectin-3 が発現し、性周期に伴ってダイナミックに発現変動する。これらの組織におけるガレクチンとそのリガンド複合糖質の役割は明らかでないが、galectin-1 の遺伝子欠損マウスでは、妊娠早期に胎子が消失することが報告されており¹、galectin-1 と糖鎖との相互作用が妊娠の成立に重要な役割を果たすと予想される。しかし、着床のメカニズムにおける役割は不明である。

我々は、子宮外妊娠をおこしたヒトの卵管組織では、galectin-1 が増加し、galectin-3 が減少することを見出した²。また、galectin-1 と糖鎖との結合を阻害する α 2,6 シアル酸を転移する酵素 (ST6GAL1) を含む数種のシアル酸転移酵素の発現が、子宮外妊娠をおこしたヒト卵管組織で減少することを明らかにした³。シアル酸は、糖鎖の末端に存在し、陰性に荷電することから、細胞同士の接着に抑制的に働く。つまり、シアル酸修飾の低下、および、galectin-1 と糖鎖との相互作用の増加は、受精卵の卵管上皮細胞への異所性着床に関与すると予想された。しかし、シアル酸、特に galectin-1 と糖鎖との相互作用に重要な α 2,6 シアル酸をキャリアする分子は未だ不明である。

ガレクチンのリガンド候補分子であり、着床に関与することが知られる糖タンパク質として、ムチン 1 (MUC1) がある。MUC1 は、高度に糖鎖修飾をうけた膜貫通型の糖タンパク質で、分子上にケラタン硫酸など多くのグリコサミノグリカン糖鎖を含む。MUC1 が卵管上皮や子宮内膜に発現することで、受精卵の着床を防ぐバリアーとなることが知られている。着床時には、内膜表面から MUC1 が消失し、受精卵を覆う栄養膜細胞と子宮内膜上皮細胞が接着することが重要であるが、MUC1 の糖鎖構造の変化や子宮内膜表面から消失するメカニズムには不明な点が多い。

MUC1 上のケラタン硫酸は、ガラクトースと *N*-アセチルグルコサミンの二糖の繰り返しからなり、硫酸化修飾をうける。硫酸化修飾の程度が低いケラタン硫酸はガレクチン、特に galectin-3 のリガンドとなることが知られている⁴。galectin-3 は、細胞表面のリガンド糖タンパク質と相互作用することで、リガンド分子の細胞表面への局在に関与することが知られており、MUC1 分子の局在の変化に関与すると予想される。しかし、子宮内膜における MUC1 上のケラタン硫酸の硫酸化修飾の変化が受精卵の着床メカニズムにどのように関与するかについて、詳細な解析は行われていない。

2. 研究の目的

これまでの解析より、galectin-1 は着床に必須であり、galectin-3 と α 2,6 シアル酸は着床に対して抑制的に働くと予想された。MUC1 上のケラタン硫酸の硫酸化の変化は galectin-3 との相互作用に影響し、受精卵の着床に何らかの役割を果たすと考えられるが詳細は不明である。本研究では、受精卵の着床メカニズムにおけるガレクチンの役割を、1) galectin-1 と糖鎖との結合を阻害する α 2,6 シアル酸の動態と着床における機能、2) MUC1 上のケラタン硫酸の硫酸化の変化とガレクチンの相互作用が受精卵の着床に与える影響に注目して明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

4 週齢の ddY 雌マウスに、PMSG および hCG を投与して排卵を誘起し、PMSG 投与後 24 および 48 時間後 (卵胞期)、hCG 投与 8 時間後 (排卵期)、hCG 投与 1~5 日後 (1~2 日:黄体期、

3~5日：黄体退行期/卵胞期）に子宮を採取した（各群 n=3）。また、雌性ホルモンによる影響を明らかにするため、8週齢の ddY 雌マウスの卵巣を除去し、2週間後にエストロゲンもしくはプロゲステロンを皮下投与し、24時間後に子宮を採取した（各群 n=4）。

採取した子宮のうち一方は、液体窒素により急速凍結し、常法に従い RNA 抽出を行った。他方は4%パラホルムアルデヒドにより一晩 4°Cで浸漬固定し、常法に従いパラフィン包埋した。

得られた RNA より cDNA を作製し、遺伝子特異的プライマーを用いて、リアルタイム PCR 法により遺伝子発現の変化を解析した。解析に使用したプライマーを表 1 に示す。パラフィン包埋した組織より、パラフィン切片を作製し、特異抗体を用いて、Avidin-Biotin complex 法により、ガレクチンと Muc1 の局在を解析した。

表 1 リアルタイム PCR 解析に使用したプライマー

Gene name	Accession no.	Forward	Reverse	Product size
<i>Gapdh</i>	NM_008084	ggcattgctctcaatgacaa	aggagatgctcagtggtg	196
<i>galectin-1/Lgals1</i>	NM_008495	ctcaaagtcggggagaggt	cattgaagcaggattgaa	103
<i>galectin-3/Lgals3</i>	NM_010705	ggcatagggcaccgtca	ggcatagggcaccgtca	82
<i>St6gal1</i>	NM_145933	cataagtgccgtcgtc	gatgggtcccacagaatcag	236
<i>Muc1</i>	NM_013605	cctggcagtaccaagcgtag	cctacaagttggcagaagtgg	109
<i>B3GnT7</i>	NM_145222	accttatgccctgacacag	ggtgccaaagtgagactg	122
<i>B4GalT4</i>	NM_019804	gctgaaaacccaaagtgc	cgtggaatacgaagcagtc	274
<i>KSGal6ST</i>	NM_023850	ctgaagcctgaggtgactc	cagcctccaagaacattgc	117
<i>GlcNAc6ST1</i>	NM_018763	tgggctgtaaatcaaggag	tggtaaaagccggagtaatgg	132

4. 研究成果

(1) 性周期に伴う遺伝子の発現変化

ケラタン硫酸は、ガレクチンのリガンド糖鎖である N-アセチルラクトサミン構造の繰り返しからなり、硫酸化修飾をうける。これらの糖の生合成に関与する酵素群は、B3GnT7、B4GalT4、KSGal6ST、GlcNAc6ST1 である（図 1）。

マウスの子宮における両ガレクチンの発現に、性周期に伴う有意な変化は認められなかったが、*St6gal1* の発現は排卵後 1、3、4 日目で有意に低下した。*Muc1* の発現は排卵後 3 日目以降で有意に低かった。ケラタン硫酸合成酵素のうち、*B3GnT7* および *KSGal6ST* の発現は非常に弱く検出限界以下であった。*B4GalT4* および *GlcNAc6ST1* の発現に周期的な変化は認められなかった。

(2) 卵巣除去後の雌性ホルモン投与による影響

エストロゲンおよびプロゲステロン投与により、*galectin-3/Lgals3* の発現が有意に減少した。*St6gal1* の発現はエストロゲンにより抑制されるが、プロゲステロンには影響をうけなかった。*Muc1* の発現は、エストロゲンおよびプロゲステロンにより有意に抑制された（図 2）。ケラタン硫酸合成酵素の発現は、雌性ホルモンにより影響をうけなかった。

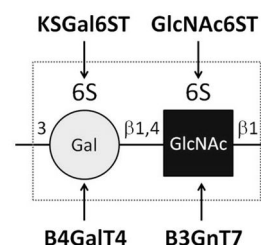


図 1 ケラタン硫酸の構造とマウスにおける合成酵素

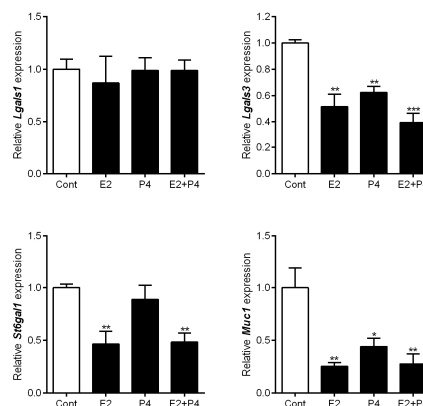


図 2 卵巣除去マウスにおける雌性ホルモン投与の影響
Cont: コントロール、E2: エストロゲン、P4: プロゲステロン
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

(3) 遺伝子発現の相関性

子宮における *Lgals3* と *St6gal1* および *Muc1* の遺伝子発現の相関性を検討したところ、両遺伝子とも正の相関関係が見られ、*Muc1* に関しては有意差が認められた (図3)。

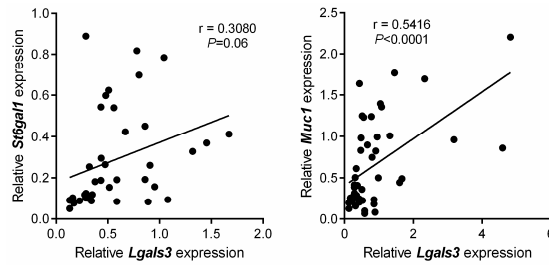


図3 *Lgals3*と *St6gal1* および *Muc1* の相関関係

(4) 組織学的解析

特異抗体を用いた免疫組織化学により解析したところ、galectin-1 は粘膜固有層の線維芽細胞と筋層に主に局在していた。galectin-3 は子宮内膜に発現するほか、全層に散在する免疫細胞に分布していた。*Muc1* は子宮内膜上皮細胞と子宮腺の管腔側表面に局在していた。(図4)。

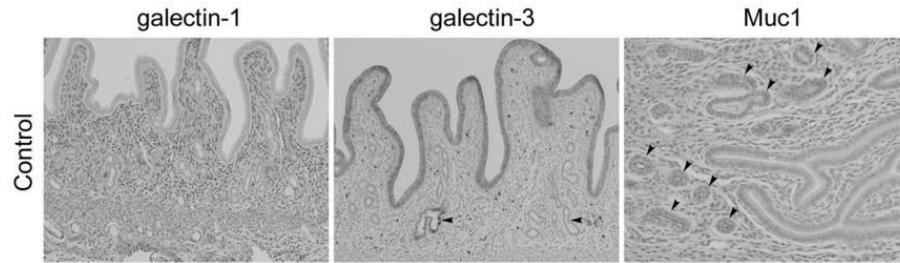


図4 ガレクチンおよび *Muc1* の子宮内膜における局在

(5) 考察

マウスの子宮組織では、胎盤形成に伴い galectin-1 と galectin-3 の発現が増強することが報告されている。また、galectin-1 遺伝子欠損マウスでは、妊娠早期に胎子が消失する。galectin-1 は免疫抑制に働くことが知られており、galectin-1 遺伝子欠損マウスにおける着床不全は、胎子への免疫寛容の異常によるものである。galectin-1 は、主に粘膜固有層の線維芽細胞に発現することから、受精卵と子宮内膜との接着に直接関与する可能性は低いと思われた。galectin-3 は主に子宮内膜上皮に発現することから、受精卵との接着もしくは接着阻害に関与することが予想される。*Lgals3* と *Muc1* の mRNA の発現には正の相関関係が認められることから、galectin-3 が子宮における *Muc1* の発現に何らかの影響を与える可能性が考えられた。結果には示していないが、ニコチンを投与したマウスの子宮では、galectin-3 の発現が低下するとともに、子宮内膜表層からの *Muc1* の発現も低下していたことから、galectin-3 は *Muc1* の細胞表面への局在に重要な役割を果たすと予想される。

(6) 今後の展望

申請時の研究計画では、着床遅延モデルマウスおよび *St6gal1* 遺伝子欠損マウスを用いた解析も計画していたが、正常マウスを用いた解析に時間がかかり、これらの実験を遂行することができなかった。現在、*St6gal1* 遺伝子欠損マウスを繁殖中であるが、産子数や受胎率に大きな異常は今のところ検出できていない。また、培養細胞を用いた *in vitro* 着床アッセイも実施し、アッセイ系を確立したが、残念ながら結果を得るに至らなかった。マウス組織では、ケラタン硫酸の検出が困難であったため、他の動物や培養細胞を用いた解析が必要である。

(引用文献)

1. Blois et al. *Nat Med* 13:1450-1457, 2007
2. Nio-Kobayashi et al. *Cells Tissues Organs* 200:424-434, 2015
3. Nio-Kobayashi et al. *Mol Reprod Dev* 83:1083-1091, 2016
4. Iwaki et al. *Biochem Biophys Commun* 373:206-212, 2008

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 小林 純子	4. 巻 51
2. 論文標題 着床メカニズムにおけるガレクチンとリガンド複合糖質の役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 30-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nio-Kobayashi J	4. 巻 30
2. 論文標題 Histological mapping and subtype-specific functions of galectins in health and disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Trends Glycosci Glyc	6. 最初と最後の頁 SE86-SE96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.4052/tigg.1737.1SE	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小林純子、岩永敏彦
2. 発表標題 喫煙がマウス子宮のガレクチン発現に与える影響
3. 学会等名 第37回日本糖質学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchgate個人ページ
https://www.researchgate.net/profile/Junko_Nio-Kobayashi
研究室ホームページ
<https://anatomy3.hokkaido.university/>
Researchgate個人ページ
https://www.researchgate.net/profile/Junko_Nio-Kobayashi
Researchmap個人ページ
<https://researchmap.jp/niojun5212/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----