

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006-2008
 課題番号：18591818
 研究課題名（和文） 新規メタロプロテアーゼADAMTSファミリー遺伝子による胚浸潤調節機構の解明
 研究課題名（英文） Regulation of embryonic invasion by novel metalloprotease ADAMTS family genes
 研究代表者
 高橋 祐司（TAKAHASHI YUJI）
 国立成育医療センター（研究所）・周産期診療部・不妊診療科・研究員
 研究者番号：00392499

研究成果の概要：

着床の成立にとって胚浸潤は不可欠な要素であり、複雑な分子間ネットワークが正常に機能することが知られてきた。本研究では、着床を可能にする胚側の因子の同定を目指し、胚におけるメタロプロテアーゼの発現解析を行うとともに、腫瘍細胞の浸潤との相違について明らかにすることを目的とした。

胚におけるADAMTS15の発現は着床期にかけて胚と浸潤性トロフォブラストに強く発現していることが明らかとなった。一方、胚の発生過程においてこれらの分子の標的と考えられるversicanの発現は胚盤胞期から後期胚盤胞にかけて著しく発現亢進しており、versicanの切断が着床準備として重要である可能性が示唆された。Versican以外にも標的となる分子は多数存在する可能性もあり、標的分子を明らかにすることでADAMTS15の役割が解明されるものと考えられる。RNAi発現制御による解析の結果から、初期胚の発生およびトロフォブラストの浸潤性を制御していることを見だし、胚の機能における重要性が示された。

ADAMTS15の胚における役割と比較検討するため、正常顆粒膜細胞および顆粒膜細胞がんを用いてADAMTSファミリー分子の発現解析を行ったところ、ADAMTS15は顆粒膜細胞がんでは亢進せず、異なるファミリー分子であるADAMTS9やADAMTS1に大きな変化が認められた。したがって、胚におけるADAMTS15の役割はがん細胞とは異なるものであり、特異的に必須である可能性が示唆された。ADAMTS15とは異なりADAMTS19はトロフォブラストが分化すると発現が著しく低下することも明らかとなり、分化の促進に不可欠な因子である可能性も示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	570,000	4,170,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード： 生殖医学

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

着床は非常に複雑な胚と子宮のコミュニケーションを介して成立する。着床の成立は挙児を得る上で最も困難なハードルとなっており、生殖補助医療技術においても約40%の妊娠成功率にとどまっている。また、母体の加齢にともないその成功率は著しく低下し、着床率の向上が強く求められている。他方、生殖補助医療技術において、複数個の胚を体内に移植するため例え着床が成立したとしても多胎のリスクが飛躍的に増大する。したがって、母体や胎児の保護のためにも着床成立の制御は大きな課題となっている。

胚は子宮において透明帯より脱出し、子宮内膜との相互作用により着床する。胚の浸潤能は非常に良く知られており、がん細胞の浸潤と同様の分子機構を介した過程を経ると考えられてきた。しかしながら、がん細胞の浸潤に必須とされるマトリックスメタロプロテアーゼ MT1-MMP や MMP-2、MMP-9 は、ノックアウトマウスを用いた解析からいずれも胚浸潤に本質的ではないと考えられた。一方で、胚浸潤には、1)胚の浸潤をメタロプロテアーゼインヒビター (Timp) が阻害することから、メタロプロテアーゼが強く関わっていること、2)未だ本質的な分子の発見に至っていないこと、3)ADAM および ADAMTS 分子群にはメタロプロテアーゼ活性を持つ分子が含まれること、4)浸潤を調節する ADAM 分子が報告されたこと、5)着床期に子宮内膜に発現する Timp3 は ADAM メタロプロテアーゼの阻害分子となりうることなどから、ADAM および ADAMTS ファミリー分子の浸潤への関与が十分に考えられる。したがって、胚浸潤に関わる新規メタロプロテアーゼの候補分子として ADAMTS ファミリー分子は非常に興味深い。

2. 研究の目的

着床の成立にとって胚浸潤は不可欠な要素であり、複雑な分子間ネットワークが時空間的に正常に機能することにより可能となる。しかしながら、本研究では、着床を可能にする胚側の因子の同定を目指し、胚におけるメタロプロテアーゼの発現解析を行うとともに、腫瘍細胞の浸潤との相違について明らかにする。

3. 研究の方法

A. RT-PCR による発現解析、ADAM および ADAMTS に特異的なプライマーを作製し、未分化および分化トロフォブラスト幹細胞を用いて、差別的発現解析を行った。

B. 細胞の浸潤アッセイ、細胞培養用インサートをマトリゲルでコートし、無血清培地に懸濁した細胞を上部チャンバーに、血清

培地を下部チャンバーに入れて一晚培養した。

C. 免疫染色、C57BL/6 マウスの胚盤胞期胚、着床期子宮を回収し、固定後、10%ヤギ血清でブロッキングし、抗体処理を行った。

D. RNAi 発現制御、合成 siRNA を

4. 研究成果

A. 胚における ADAMTS ファミリー分子の発現

未分化および分化トロフォブラスト幹細胞を用いて ADAMTS 遺伝子の差別的発現プロファイリングを行い、胚浸潤に関連する candidate の選別を行った (図1)。

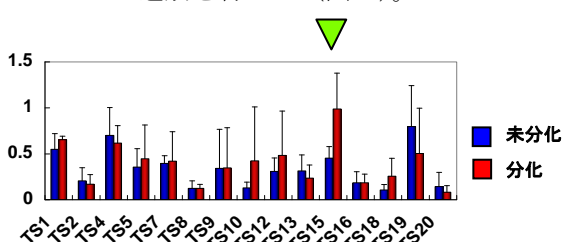


図1 トロフォブラスト幹細胞における ADAMTS 遺伝子の発現
未分化および分化トロフォブラスト幹細胞より total RNA を回収し、RT-PCR により遺伝子発現解析を行った (緑矢頭: ADAMTS15)

未分化および分化いずれの細胞においてもほとんどの ADAMTS 遺伝子の発現を確認できた。これらのうち、特に、ADAMTS15 は分化により強く発現亢進することが明らかとなった。

B. ADAMTS15 およびその候補標的分子 versican の発現

胚における ADAMTS15 の発現を明らかにするため、胚盤胞期胚を用いて免疫染色を行った (図2)。ADAMTS15 はトロフォブラスト細胞のみならず内部細胞塊でも発現していることが明らかとなった。また、未分化および分化 ES 細胞を用いた発現解析から ADAMTS15 が内部細胞塊に発現していることを支持する結果が得られた。

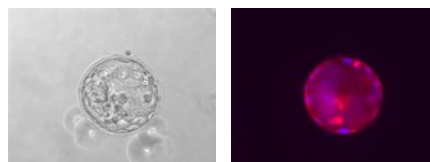


図2 胚盤胞における ADAMTS15 の発現
マウス胚盤胞を用いて ADAMTS15 の免疫染色を行った (赤: ADAMTS15; 青: 核)

一方、ADAMTS15のリガンドとして versicanがすでに報告されていることから、胚および子宮における versicanの発現について検討した(図3)。VersicanはADAMTS15と同様に胚盤胞期のトロフォブラスト細胞、内部細胞塊の両方に強く発現が確認された。さらに、子宮における versicanの発現を確認したところ、子宮内膜に強く発現していることが明らかとなった。したがって、ADAMTS15が着床期に機能を果たしている可能性が強く示唆された。現在のところ、versicanがADAMTS15の標的分子として胚浸潤に関与しているかどうか明らかではないが、非常に興味深い発現相関が認められた。

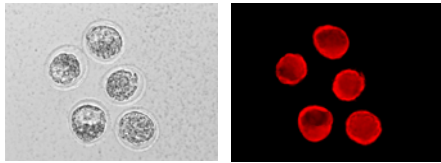


図3 胚盤胞における versican の発現
マウス胚盤胞を用いて versican の免疫染色を行った(赤: versican)

次に、ADAMTS15が、胚発生においてどのような役割を果たしているか詳細に明らかにするため、siRNAを1細胞期胚にマイクロインジェクションしたところ、胚盤胞までの初期発生が阻害されることが明らかになった(図4)。以上の結果から、ADAMTS15は着床期以前から卵子に発現し、発生を制御する分子であることが明らかとなった(投稿準備中)。さらに、これらの胚盤胞では、オートファゴソームの過形成が認められた。これらのADAMTS15発現制御胚盤胞を用いて浸潤アッセイを行ったところ、抑制効果の強いsiRNAをマイクロインジェクションした胚盤胞では浸潤性トロフォブラストが広がらず、浸潤抑制が認められた。

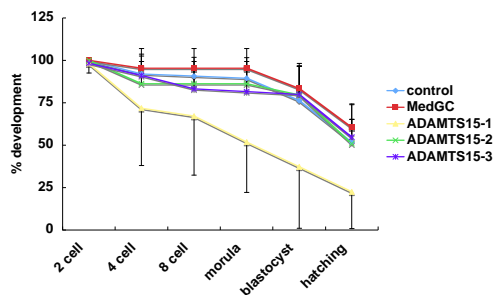


図4 siRNA マイクロインジェクションの初期胚発生に及ぼす影響
マウス1細胞期胚に異なる配列を鋳型としたsiRNAをマイクロインジェクションし、胚盤胞期までの発生能を検討した

ADAMTS15が胚と同様にがん細胞においても発現亢進しているかどうか明らかにするため、正常顆粒膜細胞および顆粒膜細胞がんを用いてADAMTSファミリー分子の発現解析を行った。ADAMTS15は顆粒膜細胞がんでは亢進せず、異なるファミリー分子であるADAMTS9やADAMTS1に大きな変化が認められた。また、顆粒膜細胞がんにおいてRNAi発現制御による浸潤能の変化について検討したが、予想通り浸潤能に大きな変化は認められなかった。したがって、ADAMTS15は胚の生物学的機能を制御する分子であり、がん細胞とは異なる役割をしていることが強く示唆された。

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 8件)

- ① 齊藤英和、中川浩次、高橋祐司、生殖医療における女性のエイジング、臨床婦人科産科、60、1341-1345、2006(査読なし)
- ② 齊藤英和、中川浩次、児島梨絵子、高橋祐司、GnRHアゴニストの臨床応用—体外受精、日本臨床、64、80-84、2006(査読なし)
- ③ 高橋祐司、宮戸健二、齊藤英和、生殖における酸化ストレスの生理的役割と不妊症疾患、実験医学、26、586-590、2008(査読なし)
- ④ 齊藤英和、中川浩次、高橋祐司、女性の加齢に伴う生殖の異常、日本医師会雑誌、137、35-38、2008(査読なし)
- ⑤ Ito M, Muraki M, Takahashi Y, Imai M, Tsukui T, Yamakawa N, Nakagawa K, Ohgi S, Horikawa T, Iwasaki W, Iida A, Nishi Y, Yanase T, Nawata H, Miyado K, Kono T, Hosoi Y, Saito H, Glutathione S-transferase theta1 expressed in granulosa cells as a biomarker for oocyte quality in age-related infertility. Fertility and Sterility, 90, 1026-1035, 2008(査読あり)
- ⑥ Horikawa T, Nakagawa K, Ohgi S, Kojima R, Nakashima A, Ito M, Takahashi Y, Saito H, The frequency of ovulation from the affected ovary decreases following laparoscopic cystectomy in infertile women with unilateral endometrioma during a natural cycle. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 25, 239-244, 2008(査読あり)
- ⑦ Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toahimori K, Nakamura A, Ito M,

Miyado M, Mekada E, Umezawa A, The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 105, 12921-12926, 2008 (査読あり)

- ⑧ Imai M, Muraki M, Takamatsu K, Saito H, Seiki M, Takahashi Y, Spontaneous transformation of human granulosa cell tumours into an aggressive phenotype: a metastasis model cell line, BMC Cancer, 8, 319, 2008 (査読あり)

[学会発表] (計 5件)

- ① Takahashi Y, Saito H, Autophagic control of the development of murine oocytes, The 47th annual meeting of American Society for Cell Biology, Washington DC, USA, 2007
- ② Imai M, Seiki M, Saito H, Takahashi Y, Spontaneous transformation of human granulosa cell tumor into aggressive phenotype, The 47th annual meeting of American Society for Cell Biology, Washington DC, USA, 2007
- ③ Muraki M, Kono T, Saito H, Takahashi Y, GSTT1 as an aging marker in granulosa cells, The 47th annual meeting of American Society for Cell Biology, Washington DC, USA, 2007
- ④ 高橋祐司、村木美帆、伊藤めぐむ、今井美沙、齊藤英和、新規卵巣老化マーカーとしての抗アポトーシス分子Bag-1、第61回日本酸化ストレス学会学術集会、京都、2008
- ⑤ 伊藤めぐむ、宮戸健二、齊藤英和、高橋祐司、ヒト顆粒膜細胞におけるp38MAPKの加齢変化、第61回日本酸化ストレス学会学術集会、京都、2008

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 祐司 (TAKAHASHI YUJI)

国立成育医療センター (研究所)・周産期診療部・不妊診療科・研究員

研究者番号：00392499

(2)研究分担者

齊藤 英和 (SAITO HIDEKAZU)

国立成育医療センター (研究所)・周産期診療部・不妊診療科・医長

研究者番号：90125766

宮戸 健二 (MIYADO KENJI)

国立成育医療センター (研究所)・生殖医療研究部・室長

研究者番号：60324844

(3)連携研究者