

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02361

研究課題名(和文) 着床メカニズムと母体年齢に関するIn vivo解析

研究課題名(英文) In vivo analysis for the relation of embryonic implantation and maternal age

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：2017年に我が国では年間45万件の不妊治療が実施され、ARTにより誕生した子供は5万7000人、17人に一人であった。ART発達に反し、優良な受精胚を母体に戻しても出産成功率は未だ25%に留まる。原因の多くは不明であるが、母体の着床受容期が非常に短く、母体の高年齢化が考えられる。本研究では、我々のオリジナル(Sox17ヘテロ)着床不全マウスを用いた下位治療候補分子Amphiregulin(Areg)の同定、Sox17ヘテロ個体の恒常性feedback制御が異常である可能性を示すものである。現在、異なる種から子宮内膜移植可能なマウスTgを継続作出し、着床率の改善を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト胚、iPS、ES細胞を動物個体子宮に戻す研究は、国内では現在のところ法的に認められず、母体環境の基礎研究はブラックボックスにある。我が国における研究レベルの躍進を考えると代替え方法確立が必要である。着床過程に関与する遺伝子検索により着床率の改善が期待され、細胞外分泌因子が必要とされている。この度、Sox17下流因子として単離したAregはヘパリン結合型EGF受容体に結合する分泌因子で有り、胚移植の際に添加するなど着床率の向上が期待される。また、異なる個体・種から子宮内膜移植が可能なマウスTgの作出はその解決の糸口となり、いずれも社会的に有意義であると思われる。

研究成果の概要(英文)：The assisted reproductive technology (ART) has been developed remarkably. In Japan, 450,000 infertility treatments are carried out annually, and that number is the highest in the world. The child born by ART was 57,000 and it became one in 17 people in 2017. In contrary to the recent development of ART technology, the success rate of childbirth is still 25% even if a good quality embryo was transferred to the mother. These causes are unknown, however the aging of the mother and the short time window of implantation are major reasons. In this study, we identified a therapeutically molecules among the downstream factors of Sox17 heterozygous mouse and detected Amphiregulin (Areg). Sox17 heterozygotes indicate the possibility of abnormal progesterone feedback regulation. We are currently developing mice capable of endometrial transplantation from different individuals and species.

研究分野：実験動物学

キーワード：着床不全 マウス Sox17

1. 研究開始当初の背景

受精から胎児誕生までの時間は、ヒトでは 266 日、マウスは 20 日である。その一方、着床までの時間はヒト 5.5-6.5 日、マウス 4.5 日と大きく変わらず、マウスはヒトの受精から着床までのモデル動物として非常に有効である。着床不全の原因として、胚側の原因としては染色体の動態異常が考えられ、母体側では子宮や卵巣/黄体機能不全には性ホルモンが大きく関わっている。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る。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を着床可能とする。女性不妊の主な原因の一つに着床不全が考えられるが、我国の体外受精など胚を用いた不妊治療技術の向上に相反し、母体環境に関する研究は立ち遅れている。その原因としてはヒト iPS、ES、受精胚を動物子宮に戻す研究は、現在法的に実施することが出来ないこと、そもそも着床現象に関して、母体環境はブラックボックスであることが挙げられる。そこで、世界的に不妊研究を引率するためには代替方法確立が必須であると考えに至った。Sox (Sry-related HMG box) 17 は Sox F サブファミリーの転写因子で我々がオリジナルに単離した遺伝子である。Sox17 ノックアウトマウス個体を C57BL/6 マウスに遺伝背景をバッククロスしている過程で、ヘテロ個体の妊性が有意に低くなることを幸運にも発見しすでに報告している (Hirate *et al.*, *Sci Rep*, 2016)。本申請では、着床不全と母体要因・更には年齢との関連性について、Sox17 ヘテロ個体をもちいることで解明する計画を立てた。子宮内膜上皮に発現している Sox17 遺伝子の下位分子を *in vivo* 解析することは、母体 whole body と恒常性を考慮した不妊の治療解決に繋がり、独自の分野を切り開くこととなると考え本研究の発想に至った。

2. 研究の目的

女性の社会進出が望まれる一方、社会的ストレスや環境要因から、健康体であるにも関わらず、適齢期に望む妊娠がなされない女性が増えている。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% は妊娠に至らず、また母体年齢はリスクファクターの第一位である (Woods *et al.*, *Nat commun* 2017)。本研究は、着床障害に対して、受精胚や母体をより自然に近い環境で治療するための分子を探索することを目標としている。本申請の独自性としては、申請者らが Sox17 遺伝子の発見者であり、国際的に本分野をリードしていること、Sox17 遺伝子と受精胚の子宮内膜上皮受容性についての研究は殆ど行われていないことにある。そこで、母体に原因がある着床不全ヘテロマウス (Sox17 変異マウスヘテロ個体) を手がかりに、受精胚受容期の子宮内膜上皮のトランスクリプトーム解析を実施し、受精胚の母体への着床プロセスと母体との関連性について、*in vivo* 分子遺伝学を用いて明らかにする。本申請は、高年齢出産への対応策・不妊治療解明への一歩を目指す。

3. 研究の方法

1) Sox17 下位着床関連因子のトランスクリプトーム解析; Sox17 ヘテロ マウスと wild type マウス間の自然交配において、母体要因により着床不全になることを報告した (Hirate *et al.*, *Sci Rep* 2016) ので、着床前後の子宮内膜上皮を採取し、wild type とヘテロ個体で Sox17 遺伝子の発現量を qPCR にて確認した結果、wild type では受容期 (妊娠 4 日目; DOP4) に Sox17 発現がピークを向かえる一方、ヘテロ個体では発現のパターンが後半に移動し、着床タイミングの調整に Sox17 遺伝子が直接関与する可能性を見出した。wild type と Sox17 ヘテロ個体の子宮内膜上皮領域から得た total RNA をそれぞれ精製し、DNA array 解析する。DOP1 と比較して妊娠 DOP3, 4 (着床受容期) に発現が 2 倍以上上昇した遺伝子の共通 1602 遺伝子のうち、Sox17 ヘテロ変異体でその発現が 1/2 以下であった 233 遺伝子は Sox17 遺伝子の下位候補であるので、更に、データ精度を向上させ、細胞外基質・細胞接着や極性に関与する因子の絞り込みを行う。

2) 子宮年齢と Sox17 ヘテロ個体のホルモン分泌能の関連について; Sox17 遺伝子は、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であることが報告されている。そこで、個体レベルでのホルモン応答性について、正常に妊娠させた個体の妊娠 5 日目の着床期におけるプロゲステロン量を ELISA 法を用いて測定する。また妊娠に供した個体の年齢との相関関係を検討する。

3) 子宮内膜上皮の機能回復実験; ROSA-ヒトジフテリア毒素受容体 (DT) Flox マウスと Lactferrin-receptor (Ltf; 子宮内膜上皮のみ)、Progesteron-receptor (Pro; 子宮内膜上皮とストローマ) 特異的 cre マウスと掛け合わせる。得られた個体を用いて子宮内膜上皮のみ除去し別個体からの細胞置換が可能な *in vivo* アッセイ系を新規開発する。マウス子宮内膜上皮細胞は 24 時間で置換することがすでに報告されている (Hiraoka T. *et al.*, *JCI insight* 2017) ので、掛け合わせた個体に DT 投与し、wild タイプ雌 (H2B-mCherry / CAG-GFP) の個体から単離した子宮内膜上皮を同時移植する。定着率については、組織学的に *Image-J* を用いて定量し、子宮内膜上皮細胞の再生能を観察する。更に、他個体、並びに多種からの移植を可能とするため、NOG (超免疫不全マウス) にバッククロスし、NOG-Ltr-Treck Tg, NOG-Pro-Treck Tg マウスを作出する。

4. 研究成果

- 1) *Sox17* 下位着床関連因子のトランスクリプトーム解析; DOP (mating 初日) 1 と比較して DOP4 (着床受容期) に発現が2倍以上上昇した 1602 遺伝子を同定した。うちヘテロ個体において特異的に DOP4 で減少した 340 を掛け合わせ 233 遺伝子を抽出し、この中に *Sox17* の下位遺伝子の候補が含まれることを想定した。EGF 受容体ヘパリン結合型因子である *Areg* が wild タイプでは DOP1 から DOP4 までで 48.65 倍、DOP4 の wild と hetero 個体の比較では 1/47.65 と大幅な変化を呈した。一方 EGF 受容体そのものの大きな変化は観察されなかった。qRT-PCR で wild タイプと hetero 個体の *Areg* 発現変化を確認したところ、wild 個体では DOP3 で上昇し、DOP4 で有意な上昇を示した。一方、hetero 個体では DOP1 から DOP5 を通じて低値を示した。更に、組織化学的手法にて DOP4 の着床部位の *Areg* の局在を確認したところ、wild タイプでは受精胚を取り囲む様に陽性像が観察され、一方、*Sox17* ヘテロ個体においてはその発現は確認されず、受精胚は子宮腔で浮遊しており、着床期特有のクリプト構造が観察されなかった。以上から *Areg* が *Sox17* の下位に位置する因子であり、胚と母体の着床過程に重要な役割を担うことが示唆された (Hirate Y et al., *Sex Dev* 2021)。
- 2) 子宮年齢と *Sox17* ヘテロ個体のホルモン分泌能の関連について; DOP1 から DOP4 血中プロゲステロン量を ELISA にて測定した。*Sox17* hetero 個体は、wild 個体と比較してプロゲステロン量が増加しており、特に DOP3 から DOP4 では wild 個体の 5 倍以上になった。免疫組織化学により卵巣のプロゲステロン産生酵素である 3 β -HSD の発現を検出したところ、wild 個体の卵巣に比べて *Sox17* hetero 個体の方が全体的に染色シグナルが強かった。以上より、*Sox17* ヘテロ変異マウスでは卵巣全体で 3 β -HSD の発現が上昇していることが示唆されたものの、コロナ禍において、マウス実験の継続が困難となり、本実験に関しては今後の課題として残すこととした。ゲノム解析上、*Sox17* 上流にプロゲステロン応答性の配列が存在することから、卵巣からのプロゲステロン分泌子宮内膜上皮に発現するプロゲステロン受容体 *Sox17* のフローの実証が今後の課題となると思われる。シングルセル解析で、先行研究のマイクロアレイ解析により SOX17 下流候補遺伝子であるとされた 203 遺伝子について解析を行ったが、特異的下流候補遺伝子は見出せなかった。
- 3) 子宮内膜上皮の機能回復実験; まず子宮内膜上皮特異的作用する Pgr-Cre、Ltf-iCre の 2 種類のマウスを ROSA-tdTomato と掛け合わせ、Cre による組換えが生じた部位を赤色蛍光により可視化した。そのうち、子宮内膜上皮特異的に DTR を発現するマウス (Ltf-iCre, Pro-iCre; ROSA-iDTR) を作製し、遺伝背景を NOG-Tg マウスに置換した。子宮内膜上皮細胞の細胞死は毒素 4 μ g/kg 投与後 24 時間までに誘導された。上皮細胞の接着性の消失により上皮構造が崩壊し、球形に変化した上皮細胞は子宮管腔内へと脱落し、毒素投与後 30 時間で管腔上皮、子宮腺上皮共に消失した。一方、毒素投与 4 - 7 日後には Ki67 陽性の増殖期上皮細胞が観察された。再生した上皮細胞は E-cadherin 陽性で、細胞死を免れた一部の上皮細胞から再構築される像が認められた。毒素投与後に他個体 (H2B-cherr) 内膜上皮を移植したところ、細胞生着が一部に観察された。本研究により、子宮内膜上皮選択的な細胞死の誘導法を確立し、上皮細胞置換が可能な系となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Uemura M, Higashi M, Pattarapanawan M, Takami S, Ichikawa N, Higashiyama H, Furukawa T, Fujishiro J, Fukumura Y, Yao T, Tajiri T, Kanai-Azuma M, Kanai Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Gallbladder wall abnormality in biliary atresia of mouse Sox17+/- neonates and human infants.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dmm.042119.	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 -

1. 著者名 Hirate Y, Hayakawa K, Nakano Y, Kumazawa S, Miura K, Kanai Y, Kanai-Azuma M.	4. 巻 14(1-6)
2. 論文標題 Early Crypt Formation Defects in the Uterine Epithelia of Sox17 Heterozygous Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sex Dev .	6. 最初と最後の頁 40-50.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000513386.	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 -

1. 著者名 Yomogita H, Miyasaka N, Kanai-Azuma M.	4. 巻 10(2)
2. 論文標題 A Review of Delayed Delivery Models and the Analysis Method in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 20-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jdb10020020	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7件（うち招待講演 4件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hirate Y, Kanai Y, Kanai-Azuma M
2. 発表標題 Molecular pathways downstream of Sox17 in uterine epithelia during mouse implantation processes,
3. 学会等名 Eighth International Symposium on Vertebrate Sex Determination（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平手良和、早川佳那、中野友紀、上村麻実、三浦健人、金井克晃、金井正美
2. 発表標題 子宮SOX17の着床受容期における下流候補遺伝子の探索
3. 学会等名 第65日本実験動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金井正美
2. 発表標題 着床過程における胚と子宮内膜の相互作用, ワークショップ「哺乳動物胚発生研究の新展開」
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 子宮内膜上皮SOX17の胚盤胞接着および脱落膜形成への関与
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平手良和、中野有紀、吉田達見、伊藤日加瑠、上村麻実、金井克晃、金井正美
2. 発表標題 TRECK 法による細胞死の誘導と細胞移植による子宮内膜上皮置換法の確立
3. 学会等名 第 66 回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanai-Azuma M
2. 発表標題 Defects of the early crypt formation of the uterine epithelia in Sox17 heterozygous mice
3. 学会等名 Vth international SOX resarch meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanai-Azuma M
2. 発表標題 Mouse model of human female infertility
3. 学会等名 The 8th Japan-Sino-Korea Mouse resource workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 金井正美	4. 発行年 2019年
2. 出版社 学窓社	5. 総ページ数 13
3. 書名 獣医発生学 第二版 第1章分担	

1. 著者名 金井正美	4. 発行年 2020年
2. 出版社 学窓社	5. 総ページ数 14
3. 書名 獣医組織学 第8版 翻訳分担	

〔産業財産権〕

〔その他〕

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

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
研究分担者	平手 良和 (HIRATE YOSHIKAZU) (70342839)	東京医科歯科大学・統合研究機構・講師 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------