

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06459

研究課題名（和文）子宮AREG発現を誘導する胚盤胞由来シグナル分子の解明

研究課題名（英文）Elucidation of blastocyst-derived signals that induce uterine AREG expression

研究代表者

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：胚盤胞の子宮への着床は胚盤胞と子宮との間でコミュニケーションを取りながら進むといわれているが、胚盤胞側から放出され、子宮に働きかけるシグナルについてはほとんど何も分かっていない。本研究課題では、胚盤胞由来のプロテアーゼが子宮管腔上皮の上皮性ナトリウムチャネル（ENaC）に作用し、着床に至るシグナルカスケードを開始するという作業仮説に基づき、着床時のENaCの活性化に關与するプロテアーゼ遺伝子の探索を行った。RNA-seqによる解析の結果、胚盤胞で発現が上昇するプロテアーゼ遺伝子のうち、Klk7とPrss8が着床開始シグナルである可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚盤胞が着床に至るには、胚盤胞 - 子宮間のコミュニケーションが重要と考えられている。着床は胚盤胞と子宮が継続的にコミュニケーションを取りながら進行すると考えられている。本研究結果の学術的意義は、胚盤胞由来の最初期のシグナル、すなわち着床開始シグナルの分子の実体が胚盤胞から分泌されるプロテアーゼであることを明らかにした点である。社会的意義は、少子化を解決するうえで大きな課題となっている不妊治療の成績向上や、子宮外妊娠などの妊娠異常の解明につながる極めて重要な知見を得た点である。

研究成果の概要（英文）：Implantation of a blastocyst into the uterus proceeds through communication between the blastocyst and the uterus. However, little is known about the signals released from the blastocyst side and acting on the uterus. In this research project, based on the working hypothesis that a blastocyst-derived protease(s) acts on epithelial sodium channels (ENaC) in the uterine luminal epithelium to initiate the signaling cascade leading to implantation, we searched for protease genes involved in the activation of ENaC during implantation. The RNA-seq results suggest that Klk7 and Prss8, two of the protease genes whose expression is upregulated in blastocysts, may act as signals for the initiation of implantation.

研究分野：実験動物学

キーワード：着床 胚盤胞 マウス プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

近年、日本の全夫婦のうち4.4組に1組が不妊治療 (Assisted Reproductive Technology ; ART) を経て妊娠、出産に至り、体外で卵子と精子を受精させ子宮に戻す体外受精 (In Vitro Fertilization : IVF) では、14.1人に1人が誕生している。ARTによる出産が増加するものの、IVFの1サイクルでの妊娠成功率は平均37.5%にとどまる。その主因の一つとして着床障害が挙げられるが、原因や着床の詳細なメカニズムは未だ解明されていない。

着床プロセスは卵巣ホルモンであるプロゲステロンとエストロゲンによって制御されている。着床は子宮に到達した胚盤胞が受容期 (いわゆる“着床ウィンドウ” ; マウスでは受精した日をDay1とした場合、Day4に相当) の管腔上皮に付着することで開始し、接着部位周囲の間質細胞が脱落膜細胞へと分化し、胚盤胞が間質に侵入することで成立する。着床プロセスは、胚盤胞由来プロテアーゼが子宮管腔上皮の上皮性ナトリウムチャネル (Epithelial Na⁺ Channel ; ENaC) に作用し、脱落膜化に至るシグナルカスケードを活性化することで進行すると考えられている (図1)。

プロテアーゼは、触媒残基の性質に基づいて、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、スレオニンプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、グルタミン酸プロテアーゼ、金属プロテアーゼ (メタロプロテアーゼ)、アスパラギンペプチドリアーゼの7種類に分類され、これらのうち、セリンプロテアーゼが子宮管腔上皮のENaCを活性化すると考えられているが、着床時に働くセリンプロテアーゼ遺伝子は複数存在し、現在のところ、セリンプロテアーゼ内のサブタイプ同定や遺伝子同定までには至っていない。

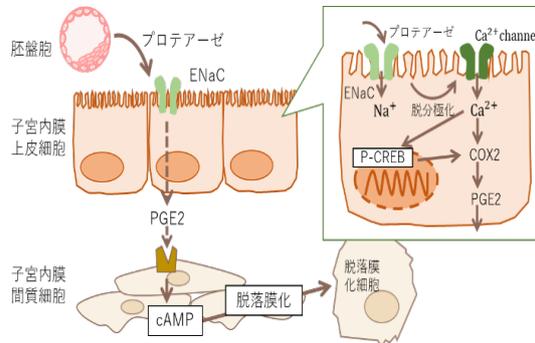


図1. 着床過程におけるシグナルカスケード
胚盤胞由来のプロテアーゼが脱落膜化反応までの一連の反応のトリガーと考えられている。

2. 研究の目的

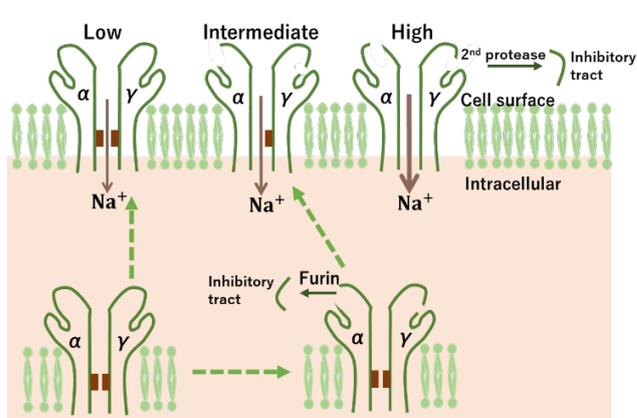


図2. ENaC 活性化メカニズム

ENaC のサブユニットであるαサブユニットとγサブユニットの inhibitory tract が切断され、チャネルが最大に活性化される。

ENaCを活性化するメカニズムは腎臓などを対象に研究が進んでいる。ENaCはαサブユニット、βサブユニット、γサブユニットの3つのユニットから構成され、これらのうち、α、γサブユニット内に inhibitory tract (阻害路) と呼ばれるペプチド鎖が存在する。この inhibitory tract が切除されることにより ENaC が開口し、Na⁺が流入し活性化状態となる。この ENaC の活性が一番高い状態に至るには、2つのプロテアーゼ (第一プロテアーゼ、第二プロテアーゼ) が関与する。ENaCは細胞表面に到達する前に、セリンプロテアーゼの一種である *Furin* タンパク (第一プロテアーゼ) によってαサブユニットとγサブユニット内の inhibitory tract を切断され、その後細胞表面に移動することで中程度の活性を示す。その後別のプロテアーゼ (第二プロ

テアーゼ) がγサブユニット内の inhibitory tract を *Furin* タンパクに加えて切断することで ENaC は最も高い活性を示す (図2)。

ENaCの活性化に働く第二プロテアーゼとして、prostasin (*Prss8*)、transmembrane protease serine 4 (*Tmprss4*)、matriptase (*St14*)、cathepsin B (*Ctsb*)、kallikrein (*Klk*ファミリー)、plasmin (*Plg*) などが報告されている。本研究課題の目的は、これらのプロテアーゼ遺伝子に特に着目して、着床開始シグナルとして働くプロテアーゼを探索することである。

3. 研究の方法

(1) 薬剤投与実験

マウス

本実験では野生型マウス (*Mus musculus*; ICR 系統) を使用した。妊娠状態のメスマウスを用意するため、オスマウスと 17 時~18 時に同居させ交配した。同居させた翌日 8 時~9 時にピンセットを用いて膣栓 (プラグ) の有無を確認した。膣栓が確認されたメスマウスのみ別ケージに移動し、本研究に用いた。加齢による不妊の影響を除くため、8 週齢~18 週齢のメスマウスを使用した。本研究は、承認番号 A2021-192C13、課題名「生殖細胞形成機構および子宮における着床機構の解明」にて学内動物実験委員会により承認され、本学動物実験規則に準じて実施した。

方法

膣栓が確認された日を Day1 とし、着床直前期 Day3 の 16 時 20 分~20 時に子宮管腔内への薬剤投与をした。薬剤投与前に、3 種混合麻酔 (塩酸メドミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルファンール; 10 μ l/1g bw) を腹腔内に投与した。麻酔投与 3 分後、覚醒しないことを確認し、子宮へ薬剤投与をした。38°C に設定したヒーターの上にマウスをうつ伏せ状態に配置し、背側面の毛を剃りアルコール消毒を行った。その後、表皮と腹腔膜をハサミで切除し、子宮の一部をマウス体外に引き出し、クレンメで固定した。マウスは Y 字形に分岐した双角子宮であるため、左右に異なる薬剤 (片側の子宮角には目的薬剤、片側の子宮角にはコントロールとして PBS または超純水) を投与することで着床率の検証を試みた。子宮角へのダメージを最小限にするため、注射器は 30G (ロードーズ™30G インスリン皮下投与用針付注射筒 3/10mL) を使用し、卵巣に極めて近い子宮角部位に注入した。その後子宮と腹腔膜を正常位置に戻し、外側の表皮を実験動物用縫合打針器オートクリップで縫合し、拮抗剤 (アチパメゾール塩酸塩; 10 μ l/1g wt) を投与して覚醒させた。着床経過後 Day5~Day7 の 11 時~13 時にイソフルラン麻酔下で 2% シカゴスカイブルー色素 (150 μ l/body) を眼窩静脈叢から注入し、3 分後に子宮を摘出した。シカゴスカイブルー色素が結合したアルブミン等の蛋白が血管外に漏出し (血管透過性亢進)、着床部位が青く観察される。また薬剤投与をせず、自然交配における実験においても同様の方法を用いて着床部位の可視化をした。なお、左右含めて一か所でも着床が確認されたマウスを着床が確認されたマウスとしてカウントし、着床率を求めた。左右の着床数に関する有意差は二標本 *t* 検定を行った。

投与薬剤

マウス子宮角に投与した薬剤とその機能、濃度、ロット番号を表 1 に示す。Amiloride、ナファモスタットメシル酸塩、E-64 は超純水、Mouse Serpin E2/PN1 は PBS で表 1 に記載した濃度に希釈した。

表 1. 子宮角への投与薬剤一覧

投与薬剤	投与濃度	ロット番号
Amiloride	5mM	Abcam, ab120281, lot:APN20038-1-1
Mouse Serpin E2/PN1	100ng/mL	Funakoshi, 2175-PI-010, lot:NBJ0321101
ナファモスタットメシル酸塩	10 ⁻⁷ M · 10 ⁻⁵ M	Fujifilm, 141-08701, lot:DLQ5684
E-64	10 μ M	SIGMA-ALDRICH, E3132-1MG, Pcode:1003363710, Source:SLCM0898

(2) 桑実胚への薬剤投与実験

方法

本実験では野生型マウス (*Mus musculus*; ICR 系統) を使用した。IVF を行い、受精卵を桑実胚まで培養し、目的薬剤と混合させた培養液の中に桑実胚を移動させ解析を行った。IVF3 日前の 16 時~18 時に妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) または抗インヒビン抗血清混合液 CARD HyperOva (九動) をメスマウスの腹腔に 0.1ml 投与した。その後、IVF 前日 16 時~18 時に hCG (あすか製薬、7.5 unit/0.1ml) をメスマウスの腹腔に投与し超過排卵誘起を行った。IVF 実施日 8 時に、精子と受精卵を培養するディッシュを CARD MEDIUM キット (九動) を用いて作成し、インキュベーター (37.0°C、CO₂ 濃度 5.0%、O₂ 濃度 5.0%) の中に静置した。8 時 30 分にオスマウスの精巣上体尾部から精子を採取し、精子用ディッシュ内のドロップに導入した後、1 時間培養した。その後、超過排卵誘起されたメスマウスの卵管膨大部から、卵子塊を採取し、受精卵用ディッシュ内のドロップに導入した。インキュベーターで 1 時間培養した精子を 3 μ l、卵子のドロップに添加し媒精した。媒精 3 時間後に、形態的に正常な卵子のみをガラスキャピラリーを用いて新しい卵子洗浄用ディッシュの HTF ドロップで 3 回洗浄した。媒精 6 時間後、正常胚を KSOM ドロップに移し培養した。IVF4 日後、桑実胚のみを選別し、同日午前 10 時に目的薬剤と混合した後、30 時間培養し観察を行った。

投与薬剤

セリンプロテアーゼ阻害剤 Aprotinin、ハンクス液 (HBSS)、KSOM を使用した。Aprotinin は PBS

で希釈後 ($2 \times 10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$)、KSOM で 100 倍希釈し $2 \times 10^2 \mu\text{g}/\text{mL}$ とした。HBSS は KSOM で同様に 100 倍希釈した。希釈後それぞれの薬剤で $50 \mu\text{L}$ のドロップを作成した。

観察・撮影方法

倒立顕微鏡 OLYMPUS CKX41 を用いて観察・撮影を行った。

(3) 遺伝子スクリーニング解析

方法

タンパク質データベースである UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 内の Gene Ontology 機能を用いて、細胞表面において分泌型として作用するセリンタイププロテアーゼの全遺伝子リストを取得した。Gene Ontology のタブから Mouse Proteomes、Catalytic activity、Acting on a protein、Peptidase activity、Serin-type peptidase activity、と選択し”Extracellular”の記載があるものを抽出した。TE 細胞の RNA-seq データは fastp を用いてクオリティーコントロール・アダプタートリミング、HISAT2 を用いてマッピングを実施した。その後、SAMtools を用いてマッピング後のデータを SAM 形式から BAM 形式のファイルに変換し、StringTie を用いてマッピング結果から発現量 (FPKM) を算出した。UniProt を用いて抽出した遺伝子の TE 細胞での発現を検証するため、Python を用いて TE 細胞の発現データと UniProt の遺伝子リストを参照させた。これに対して統計学的手法を用いることで関連遺伝子の特定を試みた。さらに、処理済み発現データ (接合体~胚盤胞) に対して Python を用いて、UniProt 経由で取得した遺伝子に対してのみ階層的クラスタリング処理 (群平均法) を行った。

環境

機械学習や統計学的解析には Python3. 11. 0 を用いた。また使用した PC のスペックは OS : macOS Big Sur ver11. 7. 2
CPU : 1. 3GHz デュアルコア Intel Core i5
GPU : Intel HD Graphics 5000 1536MB
メモリ容量 : 8GB である。

4. 研究成果

(1) 膣栓が確認された無処置マウスでは全個体着床まで確認された

はじめに、膣栓が確認された無処置マウスでの着床率を検証した。膣栓が確認されたマウスを Day7 まで無処置の状態で飼育したのち、シカゴスカイブルー色素の投与により、着床部位を解析したところ、すべてのマウスにおいて着床が確認された ($n=5$)。また、子宮の左右における着床数に対して、統計的な有意差は確認されなかった (Left : 8.4 ± 3.01 (mean \pm SD)、Right : 6 ± 2.97 (mean \pm SD), $p=0.2887$)。膣栓が確認されたマウスでは、無排卵の個体は確認されなかった。

(2) 着床開始シグナルは ENaC 阻害剤 Amiloride により阻害される

着床開始に対する ENaC の影響を検証するために、ENaC 阻害剤 Amiloride を投与した ($n=10$)。投与量は $20 \mu\text{l}$ とし、Day3 の 16 時 50 分~18 時 30 分に薬剤投与、Day7 で子宮摘出をした。Amiloride 投与マウス全 25 匹のうち、左右合わせて 1 箇所以上の着床が確認されたのは 10 匹であり、Amiloride 投与により着床率が有意に低下した (PBS : 3.6 ± 2.58 (mean \pm SD)、Amiloride : 1.4 ± 1.36 (mean \pm SD), $p=0.0403$)。

(3) 着床開始シグナルにはセリンプロテアーゼが関与する

セリンプロテアーゼ阻害剤の一つである Mouse Serpin E2/PN1 (PN1) を投与した ($n=14$)。投与量は $20 \mu\text{l}$ とし、Day3 の 17 時 30 分~18 時 30 分に薬剤投与、Day5~Day7 で子宮摘出をした。個体番号 1~6、9~14 は Day5 で、個体番号 7・8 は Day7 で子宮摘出を行った。Mouse Serpin E2/PN1 投与マウスは全 30 匹で、そのうち、左右合わせて 1 箇所以上の着床が確認されたのは 14 匹であり、投与による影響は確認されなかった (PBS : 2.9 ± 2.53 (mean \pm SD)、PN1 : 2.3 ± 2.02 (mean \pm SD), $p=0.5301$)。

セリンプロテアーゼ阻害剤の一つであるナファモスタットメシル酸塩 (NM) を投与した ($n=7$)。投与量は $20 \mu\text{l}$ とし、Day3 の 17 時~18 時 10 分に薬剤投与、Day5 で子宮摘出をした。個体番号 1~3 は 10^{-7}M 、個体番号 4~7 は 10^{-5}M の濃度で投与した。ナファモスタットメシル酸塩投与マウス全 16 匹のうち、左右合わせて 1 箇所以上の着床が確認されたのは 7 匹であり、投与による影響は確認されなかった (超純水 : 3.1 ± 2.59 (mean \pm SD)、NM : 4.4 ± 2.87 (mean \pm SD), $p=0.4312$)。

IVF で得られた桑実胚を、セリンプロテアーゼ阻害剤 Aprotinin を加えた KSOM 培養液で培養した。ハッチング (孵化 ; 着床可能な状態) までの到達率は 81. 48% であり、コントロール群を下回ることはなかった。また、受精卵の形態において、目立った形態異常は観察されなかった。

システインプロテアーゼ阻害剤 E-64 を投与した ($n=9$)。投与量はそれぞれ $20 \mu\text{l}$ とし、Day3 の 16 時 20 分~17 時に薬剤投与、Day7 で子宮摘出をした。E-64 投与マウス全 11 匹のうち、左右合

わけて 1 箇所以上の着床が確認されたのは 9 匹であり、投与による影響は確認されなかった (PBS : 2.0 ± 1.91 (mean \pm SD), E-64 : 3.5 ± 3.99 (mean \pm SD), $p=0.3553$)。

(4) 着床開始シグナルであるセリンプロテアーゼコード遺伝子の探索

セリンプロテアーゼのうち、着床開始シグナルをコードしている遺伝子をドライ解析で特定することを検討した。タンパク質データベースである UniProt を用いて、マウスにおいて細胞外において発現しているセリンプロテアーゼ遺伝子 152 個のリストを取得した。

胚盤胞の RNA-seq データにおいて、UniProt から抽出した遺伝子の発現を確認した。そのうち、全ステージでの発現平均が 7.000FPKM 以上のものを抽出し (図 3)、階層的クラスタリングを実施した (図 4)。Prss8、St14、Dpp7 は桑実胚以降にかけて発現量が高くなっていることが確認された。また、TE 細胞の RNA-seq データにおいても UniProt から抽出した遺伝子の発現を確認した。TE 細胞での発現平均が 7.000FPKM 以上のものを抽出し (図 5)、階層的クラスタリングを実施した (図 6)。St14 は TE 細胞内でも発現にばらつきが確認された。また、TE 細胞群の平均発現量の上位は Klk7 と Prss8 であり、この二つの遺伝子はクラスター上でも同じグループに分類された。

name	All-Average
Scpep1	54.70941
Ctsc	45.54905
Ctsh	26.85782
Prss8	18.64156
Plat	16.96042
Tmprss11a	12.82348
Dpp7	11.53702
Dcbld1	9.23259
Mmp2	8.817097
Htra1	7.676885
Prtn3	7.585877
St14	7.183956
Prss57	7.11224

図 3. 全ステージにおける発現上位遺伝子
接合体から胚盤胞における発現量の平均値が 7.000FPKM 以上の遺伝子。数値の単位は FPKM。

name	TE-Average
Klk7	110.689138
Prss8	103.751724
Scpep1	62.485359
Htra1	45.608926
St14	41.527738
Prss32	41.526017
Klk8	20.832016
Tmprss2	20.082852
Prtn3	16.156196
Prss36	7.453646

図 5. TE 細胞における発現上位遺伝子
接合体から胚盤胞における発現量の平均値が 7.000FPKM 以上の遺伝子。数値の単位は FPKM。

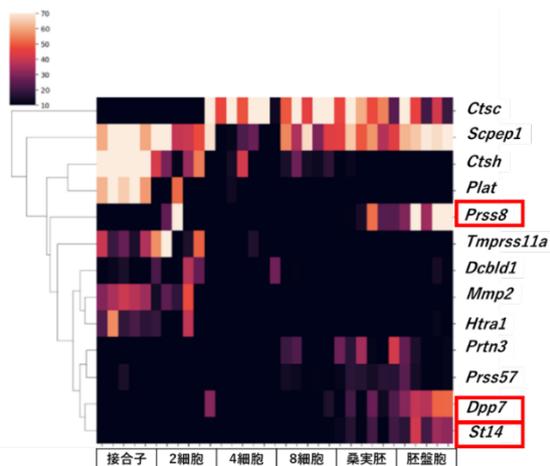


図 4. 時系列データ (接合体～胚盤胞) における発現上位遺伝子の階層的クラスタリング
横軸は接合体～胚盤胞の細胞種、縦軸は遺伝子名を示して。カラーバーで示しており、数値は発現量 (FPKM)。

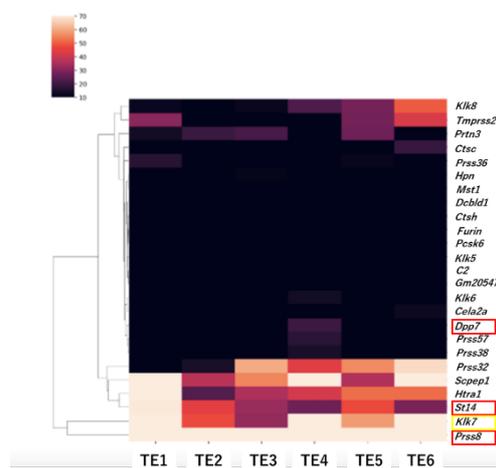


図 6. TE 細胞における発現上位遺伝子の階層的クラスタリング
横軸は接合体～胚盤胞の細胞種、縦軸は遺伝子名を示して。カラーバーで示しており、数値は発現量 (FPKM)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirate Yoshikazu, Hayakawa Kana, Nakano Yuki, Kumazawa Shiori, Miura Kento, Kanai Yoshiakira, Kanai-Azuma Masami	4. 巻 N/A
2. 論文標題 Early Crypt Formation Defects in the Uterine Epithelia of Sox17 Heterozygous Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sexual Development	6. 最初と最後の頁 1-11
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平手 良和, 早川 佳那, 中野 有紀, 熊澤 栞, 三浦 健人, 金井 克晃, 金井 正美
2. 発表標題 SOX17による着床初期の陰窩形成とSOX9およびAmphiregulinの発現制御
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 柚希, 平手 良和, 藤岡 慶史, 今井松 健也, 遠藤 壘, 畠中 秀樹, 金井 克晃, 金井 正美
2. 発表標題 着床開始を制御する胚由来セリンプロテアーゼの特定
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
研究協力者	田中 柚希 (Tanaka Yuki)		

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
---------	---------