

令和 6 年 4 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16852

研究課題名（和文）子宮内膜の胚着床におけるプロスタノイドの働き

研究課題名（英文）The function of prostanoids in blastocyst implantation

研究代表者

赤枝 俊（Akaeda, Shun）

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：10898084

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：良好胚移植で妊娠しない着床不全は生殖医療の最大の課題である。本研究は、着床の異常をきたす遺伝子改変マウスを用いて解析で着床を調節する機能的因子、特に機能的脂質の解明を行った。研究成果として、子宮のCOX2はPGE2、PGD2を介して胚浸潤を制御していること、着床不全において抑制的エピゲノム修飾であるH3K27me3の標的遺伝子発現上昇や調節因子EZH2の低下が生じており子宮内膜細胞分化と胚浸潤の過程に異常を生じていること、が判明した。着床における子宮内膜の機能的脂質としてのPGE2とPGD2の存在や、EZH2やH3K27me3を介したエピゲノム修飾による着床制御機構が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、胚浸潤という現象に焦点をあて、着床における機能的因子、特にプロスタグランジンの同定を行った。着床の異常をきたす遺伝子改変マウスを用いて着床を観察する生体モデルにより着床を調節する機能的因子、機能的脂質が解明された。本研究により着床不全の病態の一端が明らかとなり、子宮内膜の着床能の指標として候補分子を見出すことができた。着床不全の新規診断・治療法確立へ向けた科学的基盤構築に繋がる研究成果といえる。

研究成果の概要（英文）：Recurrent implantation failure is a major issue in reproductive medicine. In this study, we focused on the phenomenon of embryonic invasion and identified functional factors in implantation, especially prostaglandins. Using genetically modified mice with implantation failure, we elucidated the functional factors and functional lipids that regulate implantation. The effects of PGE2 and PGD2 as functional lipids regulated by COX2 in the uterus and the control of implantation were demonstrated, as well as the control of implantation through uterine epigenome modification. This research has clarified part of the pathology of implantation failure, and we have discovered candidate molecules as indicators of endometrial implantation capacity, providing important knowledge for the development of future diagnosis and treatment methods for implantation failure.

研究分野：産婦人科学

キーワード：着床不全 子宮内膜 COX2 プロスタグランジン エピゲノム修飾 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

体外受精が不妊治療としてごく一般化し、現在では出生児の11人に1人が体外受精によるものになった現在、良好胚を胚移植しても妊娠しない着床不全は生殖医療の残された大きな課題であり、着床不全の機序の解明、新規診断・治療法の確立を目指した基礎研究が必要である。妊娠初期の現象である着床において、プロスタノイドの重要性は以前から指摘されてきたが、それはCOX2が着床に必須であると考えられてきたことに起因する。過去の知見を改めて正確に解釈すると、COX2が着床の鍵であるという直接的なエビデンスは少ない。着床は胚接着、胚浸潤の過程で進行し、各過程で必須の因子が異なる。過去の知見から着床期子宮においてCOX2がVEGFを誘導することやCOX2がアラキドン酸からプロスタグランジンを産生する経路の律速酵素であることを合わせると、COX2で産生されるプロスタグランジンにより着床部位子宮の血管新生や着床への関与が強く示唆される。

本研究者はこれまでに、遺伝子改変マウスを用いて、胚浸潤の過程における子宮内膜上皮の細胞停止や低酸素誘導因子HIF2の重要性を見出した(EMBO Reports 2021; JCI 2018)。本研究の対象因子であるCOX2が着床に機能的に関わっている可能性は過去の報告で推測されてきた。本研究協力者であるS.K.Dey教授は、全身性のCOX2欠損マウスは排卵および受精が障害され不妊になることを報告したが(Cell 1997)、このマウスは排卵・受精の時点で完全不妊であり、受精後の現象である着床におけるCOX2の生理的役割をこのマウスで検討することが困難であることが示された。そのため、着床後の子宮内膜間質に起こる脱落膜化という妊娠特異的な組織変化を着床胚がない状態で人工的に誘導する非生理的な実験方法(人工的脱落膜腫作成実験)を行ったところ、COX2欠損マウスは人工的脱落膜化が起こらないことが示されたため、これを根拠にしてCOX2欠損は着床障害をおこすだろうと推測した。このCOX2欠損マウスへの胚移植の実験で、プロスタサイクリンPGI2アナログとPGE2投与で着床が回復することからPGI2とPGE2が着床に関わっている可能性を主張したが、ここで用いられたPGI2アナログとPGE2は非生理的な高用量のものであった(Genes Dev 1998)。これらの結果からすると、子宮のCOX2の着床における作用は依然不明であるといえる。COX2が関連する脂肪酸の着床における役割が論じられる際には上記の論文が必ず引用されるわけなのだが、その詳細についての検証はその後十分行われているとはいえない状況である。さらにPLA3欠損マウスやcPLA2欠損マウスがCOX2の低下を伴って着床不全をきたすことが示されているが、同様な理由により、直接的にCOX2が代謝する脂肪酸が着床に関わることを示しているわけではなく、COX2やプロスタノイドの関与を間接的に示している報告と考えるべきである。すなわち子宮における脂質の機能という観点では、COX2による子宮の脂質機能コントロールの詳細は不明のままであり、プロスタグランジンを含むCOX2による脂肪酸の着床における役割について十分に検証されておらず、着床におけるCOX2やプロスタグランジンの意義について新たな手法で検討する必要性がある。

2. 研究の目的

本研究では、胚浸潤という現象に焦点をあて、着床における機能的因子、特にプロスタグランジンの同定を行った。着床の異常をきたす遺伝子改変マウスを用いて着床を観察する生体モデルにより着床を調節する機能的因子、機能的脂質の解明を目的とした。着床不全の新規診断・治療法確立へ向けた科学的基盤構築を目指して研究を行った。

3. 研究の方法

(1)COX1欠損マウス、COX2欠損マウス、COX1/COX2の2重欠損マウスを用いた着床不全の解析

プロスタグランジン合成に関わる律速酵素であるCOX1、COX2に着目し、全身性のCOX1欠損マウス、子宮のCOX2欠損マウス、全身性のCOX1欠損と子宮のCOX2欠損を持つ2重欠損マウスを作成し、着床の表現型を調べた。なお、全身性のCOX1欠損マウスの着床は正常に起こることが報告されているが、自験としても確認した。着床不全の場合には、着床期子宮を採取して、プロスタグランジン量を定量し、着床不全に関連するプロスタグランジンを同定する。着床不全の場合には、プロスタグランジンアナログを投与して、着床の表現型が救済されるかどうかを調べた。

(2)胚浸潤を調節するその他の因子の解析

着床期ヒト子宮内膜組織を用いてRNA-seqを行い、着床不全群と妊孕能を有する対照群の2群間で有意差のある遺伝子群を抽出した。この遺伝子群のプロファイルを調べるため、エピゲノム転写調節データベースを参照し、着床不全患者における変動遺伝子群のエピゲノム調節経路を同定した。ヒストンH3のリジン27トリメチル化(H3K27me3)のヒストン修飾のターゲットとなる分子群をChIP-seqで解析した。

着床期において経時的にマウス子宮を採取、レーザーマイクロダイセクション(LMD)で子宮内膜上皮を採取してRNA-seqを行い、着床期特異的に変動する遺伝子群を選出し、エピゲノム調節経路のデータベースで参照した。そのターゲットとなる分子群をChIP-seqで解析した。

子宮特異的EZH2欠損マウス(EZH2-loxP/PGR-Creマウス(子宮全体のEZH2欠損))を作成し、妊娠・着床の表現型を調べる。PRC2の作用としてのH3K27me3の転写調節のターゲットを同

定するため、着床期子宮を用いて ChIP-seq を行った。

着床期の胚盤胞のエピゲノム修飾を調べるため、着床遅延マウスモデルを用いた。卵巣ホルモンの制御下で、休眠胚盤胞は着床直前に遺伝子発現変化を介して着床能力を獲得すると考えられており、この過程は胚盤胞活性化といわれている。活性化胚盤胞が着床能を獲得した子宮との相互作用で胚盤胞が着床を開始する。休眠胚盤胞と活性化胚盤胞では遺伝子発現レベルが異なるが、この転写制御機構は不明である。マウスでは、着床期に卵巣摘出しエストロゲンを補充せず毎日プロゲステロンを注射することにより、胚盤胞の休眠が人為的に誘導される。そこにエストロゲンを同時に投与すると、胚盤胞の活性化と着床が起こる。このマウスモデルを着床遅延モデルという。本研究では着床遅延マウスモデルから休眠胚盤胞と活性化胚盤胞を採取し、休眠胚盤胞および活性化胚盤胞におけるエピジェネティックマークを分析した。休眠胚盤胞および活性化胚盤胞を使用して RNA-seq、H3K4me3 および H3K27me3 の ChIP-seq、メチル化 DNA 免疫沈降 (MeDIP)-seq を行った。

4. 研究成果

(1) COX1 欠損マウス、COX2 欠損マウス、COX1/COX2 の 2 重欠損マウスを用いた着床不全の解析

COX1 欠損マウスの着床は正常であることを確認した。COX2 欠損マウスは胚浸潤異常をきたし産仔数が減少し、COX1/COX2 の 2 重欠損マウスは胚接着が障害され完全な不妊となった。子宮内膜における COX1 と COX2 の役割の違いと着床における重要性が示された。COX2 欠損マウスの胚浸潤異常に着目し、胚浸潤直前の COX2 欠損マウス子宮のプロスタグランジンを測定したところ、PGE2、PGD2、PGF2 の低下が認められた。胚浸潤時期子宮には PGE2 受容体 EP2 と EP4、PGD2 受容体 DP1 が着床部位に発現が認められた。PGE2 アナログ、PGD2 アナログの投与により、胚浸潤異常が救済された。COX2 は PGE2、PGD2 を介して胚浸潤を制御していることが示された。

(2) 胚浸潤を調節するその他の因子の解析

ヒト着床期子宮内膜の RNA-seq で健常群と着床不全群とで発現変動のある遺伝子を探索した結果、抑制的エピゲノム修飾であるヒストン H3 のリジン 27 トリメチル化 (H3K27me3) の標的遺伝子群の発現上昇が着床不全群で生じていることを見出した。H3K27me3 の修飾に関わる主要な酵素 Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) 発現が着床不全群で低下した。その他、PRC2 の構成分子 SUZ12・JARID2 の低下も認められた。

着床 2 日前の子宮内膜上皮は細胞周期やプロゲステロン受容体シグナル伝達に関連している遺伝子を発現していること、着床 2 日前と 1 日前の子宮内膜上皮は酸化ストレスから保護するグルタチオン経路関連遺伝子を発現していること、着床直後の子宮内膜上皮は H3K27me3、解糖、細胞増殖の調節に関与する遺伝子を発現していること、が示された。特定の遺伝子発現パターンが着床期の子宮内膜機能を支配し、着床成立に寄与している可能性が示された。

正常な着床期のマウス子宮では EZH2 が上皮及び間質で認められた。機能解析として、子宮特異的 Ezh2 欠損マウスを用いて子宮内膜の EZH2 の機能を解析し、EZH2 欠損マウスでは新生仔数が少なく不妊の表現型を呈すること、不妊の原因として胚浸潤ができないこと、が判明した。マウス着床期子宮内膜を用いて、RNA-seq と H3K27me3 に対する ChIP-seq を行ったところ、EZH2 は H3K27me3 修飾を介し、細胞周期遺伝子の特に有糸分裂に関わる遺伝子群の発現を抑制していることを見出した。この結果と合致して、胚浸潤期の子宮内膜の組織形態学的観察により、Ezh2 欠損マウス子宮では間質細胞が細胞増殖し続け、多核の脱落膜細胞への分化が障害され、胚浸潤が妨げられていることが示された。

活性化胚盤胞で細胞周期に関連する転写が促進された。活性化胚盤胞において転写抑制された遺伝子で DNA メチル化が促進されていた。DNA メチル化とヒストン H3 トリメチル化が関連する特徴的な転写制御が活性化胚盤胞に認められた。DNA メチル化とヒストン修飾は、着床直前の胚盤胞活性化の制御に関連することが示された。

以上の成果をまとめると、本研究により、子宮の COX2 によって調節される機能的脂質としての PGE2、PGD2 の作用と着床の制御、子宮のエピゲノム修飾を介した着床の制御が示された。本研究により着床不全の病態の一端が明らかとなり、子宮内膜の着床能の指標として候補分子を見出すことができ、将来の着床不全の診断・治療法開発に向けた重要な知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fukui Yamato, Hirota Yasushi, Aikawa Shizu, Ishizawa Chihiro, Iida Rei, Kaku Tetsuaki, Hirata Tomoyuki, Akaeda Shun, Hiraoka Takehiro, Matsuo Mitsunori, Osuga Yutaka	4. 巻 29
2. 論文標題 Uterine Receptivity is Reflected by LIF Expression in the Cervix	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproductive Sciences	6. 最初と最後の頁 1457 ~ 1462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s43032-021-00816-8	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 -

1. 著者名 Hiraoka Takehiro, Hirota Yasushi, Aikawa Shizu, Iida Rei, Ishizawa Chihiro, Kaku Tetsuaki, Hirata Tomoyuki, Fukui Yamato, Akaeda Shun, Matsuo Mitsunori, Shimizu-Hirota Ryoko, Takeda Norihiko, Osuga Yutaka	4. 巻 163
2. 論文標題 Constant Activation of STAT3 Contributes to the Development of Adenomyosis in Females	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 bqac044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endo/bqac044	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 -

1. 著者名 Aikawa Shizu, Hirota Yasushi, Fukui Yamato, Ishizawa Chihiro, Iida Rei, Kaku Tetsuaki, Hirata Tomoyuki, Akaeda Shun, Hiraoka Takehiro, Matsuo Mitsunori, Osuga Yutaka	4. 巻 21
2. 論文標題 A gene network of uterine luminal epithelium organizes mouse blastocyst implantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 e12435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12435	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 Ishizawa Chihiro, Hirota Yasushi, Iida Rei, Kaku Tetsuaki, Hirata Tomoyuki, Fukui Yamato, Omura Erika, Akaeda Shun, Hiraoka Takehiro, Matsuo Mitsunori, Osuga Yutaka	4. 巻 30
2. 論文標題 Levonorgestrel-Releasing Intrauterine System Improves Menorrhagia-Related Quality of Life in Patients with Symptomatic Adenomyosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproductive Sciences	6. 最初と最後の頁 966 ~ 973
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s43032-022-01077-9	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 -

1. 著者名 Fukui Yamato, Hirota Yasushi, Aikawa Shizu, Sakashita Akihiko, Shimizu-Hirota Ryoko, Takeda Norihiko, Ishizawa Chihiro, Iida Rei, Kaku Tetsuaki, Hirata Tomoyuki, Hiraoka Takehiro, Akaeda Shun, Matsuo Mitsunori, Osuga Yutaka	4. 巻 14
2. 論文標題 The EZH2?PRC2?H3K27me3 axis governs the endometrial cell cycle and differentiation for blastocyst invasion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-023-05832-x	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 Hiratsuka Daiki, Omura Erika, Ishizawa Chihiro, Iida Rei, Fukui Yamato, Hiraoka Takehiro, Akaeda Shun, Matsuo Mitsunori, Harada Miyuki, Wada-Hiraike Osamu, Osuga Yutaka, Hirota Yasushi	4. 巻 23
2. 論文標題 Pregnancy is associated with reduced progression of symptomatic adenomyosis: a retrospective pilot study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Pregnancy and Childbirth	6. 最初と最後の頁 634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12884-023-05956-0	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 Akaeda Shun, Aikawa Shizu, Hirota Yasushi	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Spatial and molecular anatomy of the endometrium during embryo implantation: a current overview of key regulators of blastocyst invasion	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.17077	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3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藍川 志津, 廣田 泰, 有田 誠, 磯部 洋輔, 杉浦 悠毅, 赤枝 俊, 松尾 光徳, 大須賀 穰
2. 発表標題 着床期子宮におけるプロスタグランジンシグナルを介した胚生育巣形成機構
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾 光徳, 廣田 泰, 藍川 志津, 石沢 千尋, 飯田 麗, 平田 知之, 賀来 哲明, 福井 大和, 赤枝 俊, 平岡 毅大, 大須賀 穰
2. 発表標題 子宮腺筋症合併不妊に対する治療指針の探求
3. 学会等名 第67回日本生殖医学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 妊娠・分娩が子宮腺筋症の大きさに与える影響
2. 発表標題 平塚 大輝, 廣田 泰, 大村 恵理香, 石沢 千尋, 飯田 麗, 賀来 哲明, 平田 知之, 福井 大和, 赤枝 俊, 平岡 毅大, 松尾 光徳, 泉 玄太郎, 原田 美由紀, 甲賀 かをり, 平池 修, 大須賀 穰
3. 学会等名 第67回日本生殖医学会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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