

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

The regulatory mechanisms of embryo implantation
in mice

論文題目 (マウスにおける胚着床の制御機構)

氏名 小林 良祐

論文内容の要旨

産業動物の生産性を高め、動物食資源の確保を目指すことは農学研究分野にとって重要な課題である。家畜の生産性向上を目指し、古くから家畜の育種選抜が行われてきた。その一方で畜産の現場では今、家畜の受胎率の低下が非常に深刻な問題となっている。この多くは、胚の着床期に集中して発生する自然流産である。近年の生殖医療技術の発展により、排卵のコントロールや人工授精法は大きな進歩を遂げたが、主要な産業動物であるウシの受胎率は4割程度にとどまっておき、依然として大きな問題である。この問題の所在は、胚着床の成功率に著しい改善が見られないことにある。

胚着床の不全は、ヒトにおいても深刻な問題のひとつである。ヒトの妊娠では、全体のおよそ70%で妊娠喪失が起こると言われており、その割合は加齢とともに増加する。妊娠の高齢化が進む昨今、習慣性流産の発生が増加している。妊娠喪失のうち、およそ75%が胚着床期に集中するとされる。したがって、着床効率の改善・向上を図ることは産業動物医療のみならず、ヒトの不妊症治療の観点からも重要である。

胚着床は哺乳動物の妊娠において最初に起こる重要な現象であり、その成立には胚と子宮内膜との母子間相互作用が必要不可欠である。子宮内膜は妊娠初期の限られた期間でのみ胚に対する受容能を獲得し、この期間は「着床ウインドウ (the window of implantation)」と呼ばれている。胚着床は連続的な過程であり、まず子宮管腔内にて胚が正しい位置取りを行うことから始まる。続いて、胚は着床ウインドウの開いた子宮内膜に対して接触を開始し、以降は接着、浸潤の段階を踏む。

胚着床に関わる子宮や胎子の形態は動物種によって様々で、その過程に共通の機構を見出すことは難しい。しかし、胚着床の過程が、これまでに調べられたいずれの種においても卵巣ステロイドホルモンであるエストロジェン(主に 17β エストラジオール、以下 E2) およびプロジェステチン(主にプロジェステロン、以下 P4) の制御下にあることを考えると、上で述べた胚着床の過程を制御するステロイド下流の分子機構

が動物種間で保存されている可能性は高い。本研究では、将来、産業動物およびヒトの着床機構解明への外挿を念頭に、マウスにおける胚着床の制御機構の解明を目指した。

最初に、着床ウインドウ閉鎖の制御機構について研究を行った。近年、着床ウインドウが開かれる仕組みが明らかとなり、P4 の作用により子宮上皮細胞での細胞増殖が抑制されることによって子宮内膜の胚に対する受容能がもたらされることが明らかとなった (Li *et al.* 2011, *Science*)。本研究では、着床ウインドウを閉鎖する仕組みについて調査を行ったところ、E2 が上皮細胞の増殖再開を引き起こすことによりウインドウが閉鎖されることが明らかとなった。続いて、E2 の下流でウインドウ閉鎖を実行する分子経路を調査するため、RNA-Seq を用いたトランスクリプトーム解析を行なった。その結果、ウインドウが閉鎖された子宮内膜では、閉鎖されていない時と比較して FGF 経路に関わる *Fgf2* 遺伝子、および IGF1 経路に関わる *Igf1* 遺伝子の発現が高いレベルにあることが明らかとなった。関連組換えタンパク質の投与により、各シグナル経路がウインドウの閉鎖に寄与するかについて調査したところ、IGF1 経路の活性化は子宮上皮における細胞増殖を誘起し、着床ウインドウを閉鎖することが明らかとなった。一方、FGF 経路の活性化は上皮細胞の増殖を誘導しなかった。以上より、マウスの着床ウインドウの閉鎖は、E2 の IGF1 経路を介した作用によって実行されることが明らかとなった。

次に、マウス胚着床における LIF 作用の系統差について研究を行った。着床ウインドウが開いた子宮におけるマウス胚の接着開始に必須の因子は、着床期の子宮で E2 作用によって分泌が促される白血球阻止因子 (LIF) であると信じられてきた。これは LIF 欠損マウスが着床不全の表現型を示したためである (Stewart *et al.* 1992, *Nature*)。しかし、これまで着床研究に用いられてきた LIF 欠損マウスは C57BL/6J (B6) および MF1 系統のマウスに限られていた。まず、抗 LIF 抗体の腹腔内投与による着床阻害の結果を様々なマウス系統で検討し、着床阻害の程度は系統ごとに大きく異なることが判明した。B6 および MF1 マウスでは抗体投与によって完全な着床阻害が認められた一方、ICR などの系統における着床阻害は部分的であり、一部では着床が成立した。このことは、例えば野生マウスでは LIF は着床に必須ではない可能性を示している。LIF が属する IL-6 ファミリー分子は、ファミリー間で代償作用および相互作用を持つことが知られている。LIF 作用が阻害された ICR マウスの子宮では IL-6 ファミリーの分子が着床作用を代償したのではないかと考え、子宮内膜における遺伝子発現パターンの解析を行った。その結果、実際に ICR マウスの子宮では、LIF 阻害後に *Ctfl* および *Cntf* の発現上昇が認められた。*Ctfl* によってコードされる CT-1 タンパク質をマウスに投与したところ、LIF を投与した場合と同様、子宮上皮細胞において JAK/STAT3 経路の活性化が観察された。また、CT-1 の投与は実際に胚の接着を誘導した。一方、胚の接着を誘導することができなかった CNTF の投与では、JAK/STAT3 経路を活性化することができなかった。以上の結果より、マウス胚の接着開始には子宮上皮における JAK/STAT3 経路の活性化が最も重要であることが強く

示唆された。

最後に、子宮内膜への新規遺伝子導入法の開発を試みた。本研究によって明らかとなった分子経路を生体内で操作することを目的として、*in vivo* エレクトロポレーション法を用いた子宮上皮特異的な遺伝子導入法を開発した。非妊娠の雌マウスに対し、麻酔下で子宮管腔内に EGFP 発現プラスミドを注入し、即座にピンセット型電極を用いて子宮組織に電気パルスを与えた。その結果、子宮上皮細胞で明瞭な EGFP 発現が認められた。さらに、子宮上皮細胞における EGFP 発現は通電時に正電極が置かれた部位に限られていた。すなわち、本手法を用いることにより子宮内膜の任意の部位および方向に遺伝子導入を行うことができ、着床期子宮において時空間的に厳密な制御を受ける遺伝子発現パターンの再現が可能となった。

本研究により、マウス胚着床における着床ウインドウの開閉のしくみが明らかとなった。また、マウスの胚着床に必須だと考えられてきた分子が実は必須ではないことが明らかとなり、さらにその下流にある JAK/STAT3 経路が中心にある可能性が強く示唆された。本経路の活性化が、哺乳動物共通の胚着床（接着）の本質かもしれない。