

# 着床期特異的蛋白 glycodeclin による子宮内膜腺上皮細胞の増殖機能制御

太田 邦明<sup>1,2)</sup>, 丸山 哲夫<sup>1)</sup>, 内田 浩<sup>1)</sup>, 小野 政徳<sup>1)</sup>, 荒瀬 透<sup>1)</sup>, 長島 隆<sup>1)</sup>, 青木 大輔<sup>1)</sup>, 森田 峰人<sup>2)</sup>, 吉村 泰典<sup>1)</sup>

1) 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

2) 東邦大学医療センター大森病院産科婦人科学教室

## はじめに

近年の不妊症に対する生殖補助医療の技術進歩は顕著であるが、受精率の飛躍的向上に比べ妊娠率はやや横ばいを呈している。その主因は、ヒト着床の技術的向上および分子機構の解明が、受精と比して立ち遅れている点にあると考えられる。

ヒト受精卵および子宮内膜の研究は、実験マテリアル入手における倫理的な制約が避けられない。一方、マウスなどの実験動物では、着床の形態様式がヒトとは異なる部分が少なくない。これらのことから、ヒト着床研究は、そのアプローチすら困難である。しかし、ヒトの子宮内膜の研究は、着床やその後の妊娠維持における分子機序にとどまらず、再生を繰り返す特異な分化組織という観点からも、生命科学の研究対象として大変魅力的である。

着床 (implantation) とは胚が子宮壁の一定部位に定着し、子宮内膜上皮を通して内膜内部に侵入して胚の発育の準備を始める現象である。ヒトにおいて、受精成立後、卵管内で桑実胚となった卵は、妊娠5日目までに胞胚を形成し、子宮内膜には胚を受け入れることができる一定の受容期が存在し、この限られた期間が implantation window と呼ばれ胞胚の受容と侵入を可能にする。この時期の子宮内膜は増殖分化して着床の準備を整える。このような胞胚の受容能獲得と着床誘起に役割をもつ分子として、卵巣ステロイドにより制御される母体(子宮)側の leukemia inhibitory factor (LIF), cyclooxygenase-2 (COX-2) 代謝産物などが同定されている。一方、グリコデリンは、着床機構の研究において着床成立時に特異的に発現が上昇する子宮因子として解析が行わ

れており、当研究室でもこれまでに子宮内膜腺上皮におけるグリコデリンのさまざまな働きを報告してきた [1-3]。

グリコデリンは、約28kDaの球状分泌糖タンパク質であり、当初胎盤から抽出され、placental protein 14 (PP14) と名付けられた。その後、子宮内膜腺、子宮頸管腺、卵管、卵巣、乳腺、精漿など生殖領域中心に認められることが明らかとなった。グリコデリンは付帯する糖鎖によって、いくつかのアイソフォーム (グリコデリン-A [子宮内膜腺上皮、羊水など], グリコデリン-S [精漿], グリコデリン-F [卵胞液], グリコデリン-C [卵丘細胞]) が存在し、糖鎖部分を認識する受容体の違いなどが、組織毎のグリコデリンの生物学的活性を規定していると考えられるようになっている。とくに、精子側の受容体に関する解明は進んでいる [4]。ただし、残念ながら子宮内膜腺上皮に発現するグリコデリン (グリコデリン-A) に対する受容体はいまだ同定されていないため、着床におけるグリコデリンの細胞内シグナル伝達経路には不明な点が多く残されている。

これらアイソフォームのなかで、われわれはとくに子宮内膜腺におけるグリコデリン (グリコデリン-A) の子宮内膜での働きに関して報告をしてきた。グリコデリンは、子宮内膜腺上皮において卵巣ステロイドホルモンによって分泌期中期 (LH+4) に誘導され、分泌期後期 (LH+10) に発現ピークを迎えるという時間的に特徴的な発現パターンを有するタンパク質である [5]。その発現パターンはまさに implantation window に一致している。実際にいくつかのグループから、着床不全患者ではグリコデリンの発現が implantation window より遅れ、分泌期後期の局所発現および血中濃度は正常者と比して低いという報告をしている [6, 7, 8]。このことはグリコデリンが着床に機能的に関与していることを示唆しており、当研究室でも *in vitro* でグリコデリンの着床促進効果を明らかにしている [3]。

今回、われわれはグリコデリンの発現が、子宮内膜腺

連絡先：太田邦明、慶應義塾大学医学部産婦人科学  
〒160-8582 東京都新宿区信濃町35  
TEL : 03-3353-1211 (代)  
FAX : 03-5363-3578  
E-mail : kuniman@wc4.so-net.ne.jp

上皮に対して分化のほかに、分泌期の子宮内膜の増殖は増殖期に比較すると抑制されていることから、グリコデリンを介した子宮内膜の増殖抑制作用について検討を行った [9]。

## 方法

本研究においては、ヒト子宮内膜腺上皮由来 Ishikawa 細胞株に蛍光蛋白 EGFP で標識したグリコデリン遺伝子をリポフェクション法によって遺伝子導入することで、細胞内にグリコデリンを強制発現させた EGFP-glycodelin 発現細胞 (EGFP-Gd 群) を、またコントロールとしては、蛍光蛋白 EGFP のみをリポフェクション法によって Ishikawa に強制発現させた EGFP 単独発現細胞 (EGFP 群) を作成した。これらを用いて 2 群の細胞増殖曲線作成、MTS 法、フローサイトメトリーによる細胞周期解析を行った。また RT-PCR 法を用いて、細胞周期関連の mRNA 発現量の変化を検討した。

## グリコデリンによる子宮内膜腺上皮細胞への増殖抑制効果

分泌期の正常子宮内膜には、プロゲステロンに誘導されるようにグリコデリンが発現している。また、今回使用している Ishikawa においてもプロゲステロンによってグリコデリンを発現し、われわれも、これまでにヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を使用することで

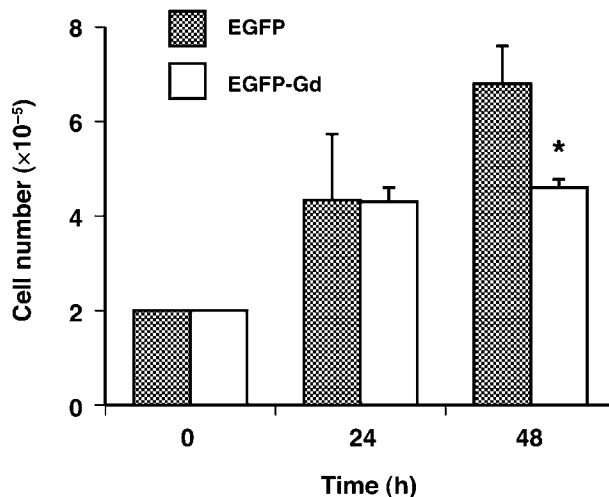


図1 グリコデリンの増殖抑制効果  
Ishikawa (2×10<sup>5</sup>cell) に対して EGFP と EGFP-glycodelin を遺伝子導入し、48時間まで培養し増殖効果を検討した。  
\*P<0.05 versus EGFP (ANOVA and unpaired t-test)

Ishikawa に非プロゲステロン誘導性にグリコデリンの発現を報告してきた。今回、これらの方法とは別に、グリコデリン遺伝子を直接的に遺伝子導入したものを今回の解析で使用した。

図1に示すように EGFP-Gd 群は、グリコデリンが発現すると24時間以降は Ishikawa の増殖を抑制した。また、今回用いたリポフェクション法を用いた場合でも、遺伝子導入効率に EGFP 群と差が出るために (図2A)、より定量化をはかるために、蛍光強度を指標にフローサイトメーターによって発現陽性細胞のみをそれぞれ選別

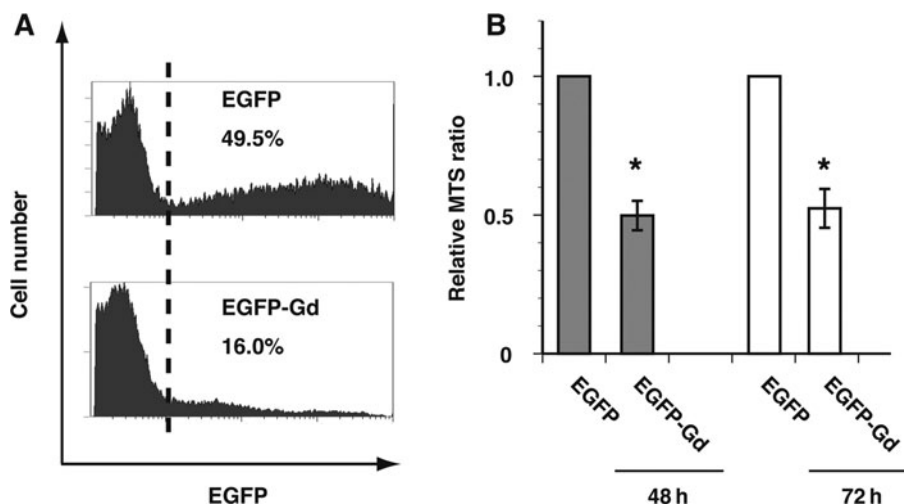


図2 グリコデリンの増殖抑制効果

A: Ishikawa に EGFP と EGFP-glycodelin を遺伝子導入し、24時間後にフローサイトメトリーによってそれぞれの発現陽性細胞群と発現陰性細胞群を選別した。

B: 後に発現陽性細胞 (7×10<sup>3</sup>cell) のみを再培養し、MTS 法にて24時間、48時間後の増殖効果を検討した。

\*P<0.01 versus EGFP (Wilcoxon rank sum test)

した後に細胞を再培養し、MTS 法によって細胞増殖能を検討したところ、図 2B で示すように 48 時間以降は Ishikawa の増殖を抑制した。

### グリコデリンによる細胞周期停止作用

グリコデリンによる直接的な子宮内膜腺上皮細胞に対する増殖抑制効果が示されたことから、そのメカニズムを解明するために、EGFP 発現陽性細胞と EGFP-Gd 発現陽性細胞のみを前述のようにフローサイトメーターを用いて選別し、それぞれに対して生細胞の状態ヘキスト 33342 染色を施し、フローサイトメーターを用いて細胞周期解析を行った。

図 3A,B に示すように、EGFP 群では典型的細胞周期カーブを描いているにもかかわらず EGFP-Gd 群では G1 期に細胞が蓄積しており、DNA 合成の行われている S 期に進行できないことが確認された。

さらに、グリコデリンの発現量による細胞周期に対する影響を検討した。図 3C に示すように、細胞内において EGFP と EGFP-Gd の発現量と蛍光強度は相関することから、蛍光強度を指標にそれぞれの群において低発現

群と高発現群に分けて、ヘキスト 33342 染色によって細胞周期解析を行った。すると、EGFP 群における低発現群と高発現群では細胞周期解析には差が認められなかったが、EGFP-Gd 群においては、高発現群ではさらにその細胞周期の進行が G1 期で停止していることが確認された。

### 細胞周期関連因子の検討

細胞は G1 → S → G2 → M 期からなる細胞周期を制御させることにより増殖をする。細胞周期制御にはサイクリンおよびサイクリン依存性キナーゼ (Cyclin Dependent Kinase ; CDK) と呼ばれるタンパク質が必須である。また、それらを阻害する CDK 阻害因子も存在し、細胞周期制御はきわめて複雑な機構である。われわれは、G1 → S 期への進行を阻害している CDK 阻害因子である p16, p21, p27 に着目し、EGFP 群と EGFP-Gd 群のそれぞれに対して RT-PCR を施行した。すると、グリコデリンが発現している EGFP-Gd 群では優位に発現が認められた。つまり、本研究において、グリコデリンが子宮内膜腺上皮細胞で発現すると細胞周期回転を G1 → S

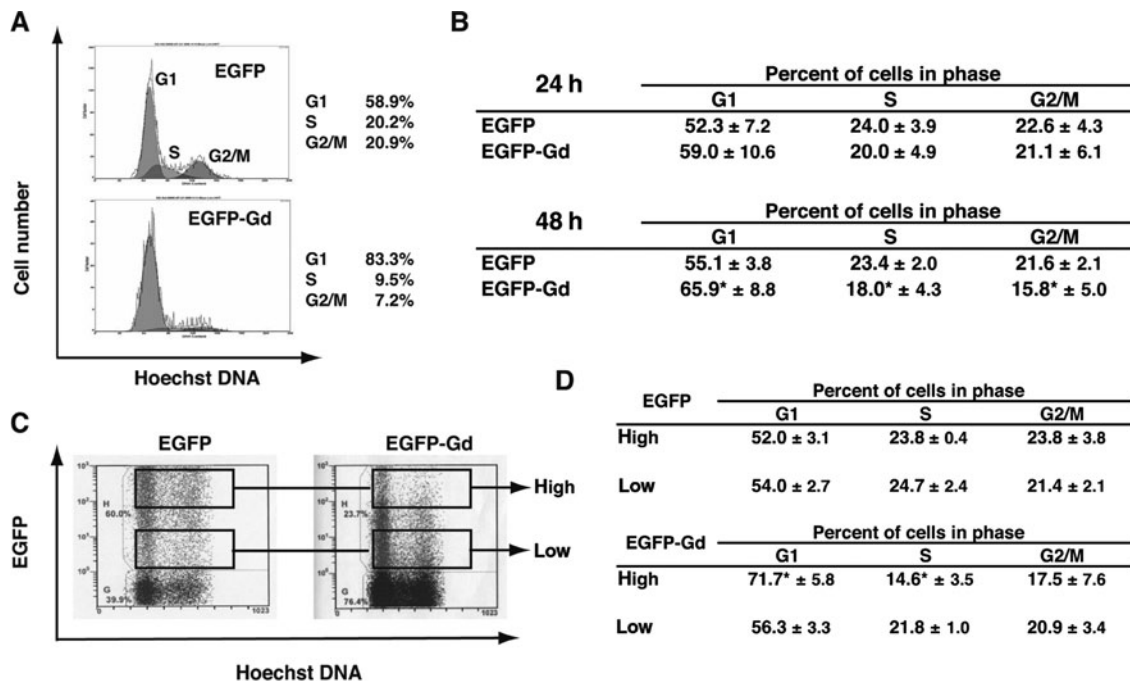


図 3 グリコデリンの細胞周期停止効果

A,B : Ishikawa に EGFP と EGFP-glycodeilin を遺伝子導入し、24, 48 時間後に生細胞の状態ヘキスト 33342 にて染色しフローサイトメトリーによってそれぞれの発現陽性細胞群の細胞周期解析を検討した。

\*P < 0.05 versus EGFP (ANOVA and unpaired t-test)

C,D : EGFP と EGFP-glycodeilin の発現量を EGFP の蛍光強度を指標に、高発現群と低発現群においてそれぞれの細胞周期解析を検討した。

\*P < 0.05 versus EGFP (ANOVA and unpaired t-test)

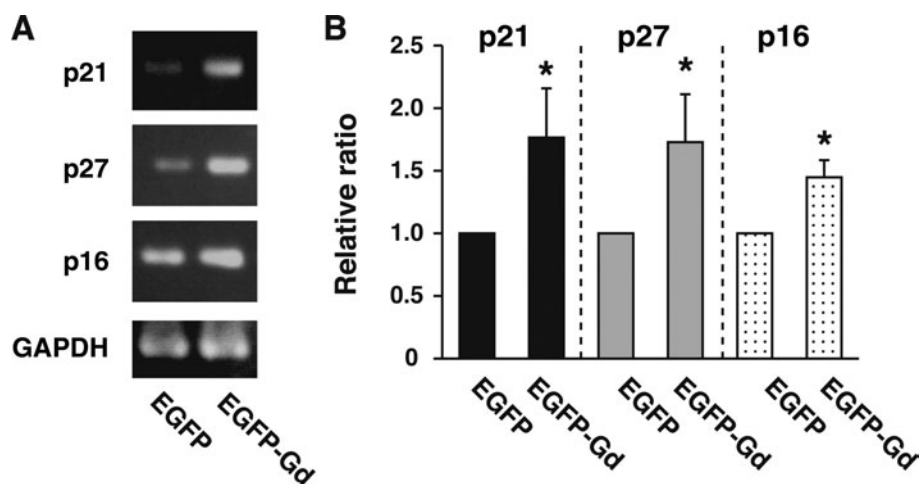


図4 グリコデリンによるCDK阻害因子の発現誘導効果

A,B: Ishikawa にEGFP とEGFP-glycodelin の遺伝子導入48時間後にフローサイトメトリーによって陽性細胞のみを選別し、RNAを抽出し、RT-PCR法によりp16, p21, p27の発現を検討した。

\* $P < 0.05$  versus EGFP (Wilcoxon rank sum test)

期において阻害するp16, p21, p27を発現させるために増殖が抑制されることが確認された。(図4A, B)

## まとめ

グリコデリンはこれまでに、免疫能、増殖抑制能、分化誘導能についてさまざまな知見が得られてきた。われわれはヒストン脱アセチル化阻害剤を用いて卵巣ステロイドホルモン非依存性にグリコデリンを発現誘導することに成功し、ヒト子宮内膜腺癌細胞株Ishikawaの形態的・機能的分化、そして運動能亢進を引き起こすこと、さらには着床初期における胚接着の促進効果を報告している[1-3]。

今回、われわれはIshikawaにグリコデリンを遺伝子導入させたグリコデリン強制発現モデルを用い、グリコデリンの発現により、発現量依存性に子宮内膜腺上皮細胞の増殖能が抑制されることを見いだした。さらにその増殖抑制のメカニズムが細胞周期に関与しており、細胞周期回転抑制因子の発現量に関与した結果のメカニズムであることを明らかにした[9]。

IVF-ETなど生殖補助医療技術の発達は目覚ましいが、生産率に代表される成績は平均20%以下と依然低いままで、改善はみられていない。この状況で形態良質胚の移植を繰り返しても妊娠に至らない難治性着床障害症例の存在がクローズアップされてきた。着床障害を原因とする不妊患者の大半は内分泌学的治療に対して不応性であり、治療法の開発にはまったく新しい観点からのアプローチが不可欠である。

この問題に対して、上記で紹介した基礎研究で、グリコデリンがヒト子宮内膜腺上皮の胚に対する接着・浸潤能を補助している可能性が導き出されていると考えている。着床不全症例に対する治療法開発として、これらグリコデリンを含めたヒト着床機構のより詳細な解析を基盤とした、従来のホルモン療法以外のパラダイムシフトが期待される。

## 文 献

1. Uchida H, Maruyama T, Nagashima T, Asada H, Yoshimura Y (2005) Histone deacetylase inhibitors induce differentiation of human endometrial adenocarcinoma cells through up-regulation of glycodelin. *Endocrinology* 146, 5365-5373.
2. Uchida H, Maruyama T, Ono M, Ohta K, Kajitani T, Masuda H, Nagashima T, Arase T, Asada H, Yoshimura Y (2007) Histone deacetylase inhibitors stimulate cell migration in human endometrial adenocarcinoma cells through up-regulation of glycodelin. *Endocrinology* 148, 896-902.
3. Uchida H, Maruyama T, Ohta K, Ono M, Arase T, Kagami M, Oda H, Kajitani T, Asada H, Yoshimura Y (2007) Histone deacetylase inhibitor-induced glycodelin enhances the initial step of implantation. *Hum Reprod* 22, 2615-2622.
4. Seppälä M, Koistinen H, Koistinen R, Chiu PC, Yeung WS (2007) Glycosylation related actions of glycodelin: gamete, cumulus cell, immune cell and clinical associations. *Hum Reprod Update. Human Reprod Update* 13, 275-287.
5. Seppälä M, Taylor RN, Koistinen H, Koistinen R, Milgrom E (2002) Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation. *Endocr Review* 4, 401-430.
6. Joshi SG, Henriques ES, Smith RA, Szarowski DH (1980)

- Progestogen- dependent endometrial protein in women : tissue concentration in relation to developmental stage and to serum hormone levels. *Am J Obstet Gynecol* 138, 1131-1136.
7. Waites GT, MacVicar J, Davidson AC, Walker RA, Bell SC (1988) Immunohistochemical localization of pregnancy-associated endometrial  $\alpha 2$ -globulin ( $\alpha 2$ -PEG) in endometrial adenocarcinoma and the effect of medroxyprogesterone acetate. *Br J Obstet Gynaecol* 95, 1292-1298.
  8. Coutifaris C, Myers ER, Guzick DS, Diamond MP, Carson SA, Legro RS, McGovern PG, Schlaff WD, Carr BR, Steinkampf MP, Silva S, Vogel DL, Leppert PC ; NICHD National Cooperative Reproductive Medicine Network (2004) Histologic dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. *Fertil Steril* 82, 1264-1272.
  9. Ohta K, Maruyama T, Uchida H, Ono M, Nagashima T, Arase T, Kajitani T, Oda H, Morita M, Yoshimura Y (2008) Glycodeilin blocks progression to S phase and inhibits cell growth : a possible progesterone-induced regulator for endometrial epithelial cell growth. *Mol Hum Reprod* 14, 17-22.