

着床期子宮局所における STAT-3 活性の役割

中村 仁美¹⁾, 香山 晋輔¹⁾, 谷口 武²⁾, 荻田 和秀¹⁾, 熊澤 恵一¹⁾, 張 慶¹⁾, 筒井 建紀¹⁾,
古山 将康³⁾, 杉野 法広⁴⁾, 田村 博史⁴⁾, 金田 安史⁵⁾, 木村 正¹⁾

- 1) 大阪大学大学院医学系研究科産婦人科
- 2) 医療法人定正会谷口病院
- 3) 田附興風会医学研究所北野病院産婦人科
- 4) 山口大学大学院医学系研究科産婦人科
- 5) 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学

はじめに

現在の不妊治療において、着床不全にたいする診断方法および治療方法を確立することが求められているが、着床不全の病態だけでなく、生理的な着床現象の物質的な基盤も解明されていないのが現実である。

着床期は短い期間であるにもかかわらず経時的に多数の物質が関与する多段階反応であり、この間子宮内膜は構造的にも機能的にもダイナミックに変化をすることが知られている。この経時的な多段階性を保つためにいくつかの多機能転写因子がこれらを制御しているのと考え、多機能転写因子の1つである signal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3) に着目した。

STAT3はIL-6, leukemia inhibitory factor (LIF) やIL-11などのIL-6ファミリーサイトカインによって活性化されることが知られている[1]。このうち、LIF[2] およびIL-11レセプター α [3-4]の欠損マウスが着床不全を起こしたことから、これらが着床現象において重要な役割を果たしていると考えられてきた。STAT3はマウスおよびラットの着床期子宮内膜においてその活性が報告されたが[5-6]、STAT3の欠損マウスが胎生致死を示したために[7]、STAT3の着床期子宮内膜における機能は不明であった。本稿では、着床期子宮内膜におけるSTAT3の機能を検討するためにマウス一過性子宮局所における遺伝子導入方法を用いた検討を中心に着床期子宮内膜におけるSTAT3活性の役割とその意義についての知見を概説したい。

マウス着床期子宮における STAT3 の機能

遺伝子欠損マウスによる検討では、時にその遺伝子の欠損が致死性であったり、他の遺伝子によって代償されるため、結局その遺伝子自身の機能がわからないことがある。われわれは、着床現象を検討するためには着床期の子宮局所で一過性に遺伝子導入できるシステムが必要と考え、その開発を行った。過去にリポフェクションによるマウス子宮に対する遺伝子導入の報告があるが[8]、遺伝子導入効率の検討はされておらず、われわれの行ったところでは、有効な遺伝子導入効率を得ることができなかった。Naked DNAを子宮腔内に入れる方法も、同様に有効な導入効率を得ることはできなかった。Gene gunを用いた方法では、組織への侵襲があまりに強く、子宮内膜で有効な導入効率を得ることが困難であると考えた。そこで、haemagglutinating virus of Japan (別名：センダイウイルス) envelope (HVJ-E) vectorを用いたシステムの開発を行った。

1. HVJ-E vector system

HVJは別名、センダイウイルスともいわれ、マウスパラインフルエンザウイルスであり、RNAウイルスである。その膜に存在するHNおよびF蛋白により強い細胞融合能をもっている。HVJ-E vectorの概念としては、ウイルス自身のgenomic RNAを不活化し除去、精製してそこへプラスミドDNAだけでなく短い2本鎖オリゴヌクレオチド、siRNA、蛋白、低分子の薬剤などを外殻内に封入し遺伝子導入ベクターとして用いることができる[9]。生体内子宮に対する遺伝子導入においては、リポフェクションに比べ、120倍以上の、HVJ-liposome法に比べ、7倍以上の高い遺伝子導入効率を得られ[9]、また子宮に対してこの導入遺伝子の発現

連絡先：中村仁美、大阪大学大学院医学系研究科産婦人科
〒565-0871大阪府吹田市山田丘2-2
Tel: 06-6879-3356
Fax: 06-6879-3359
E-mail: hitomi@gyne.med.osaka-u.ac.jp

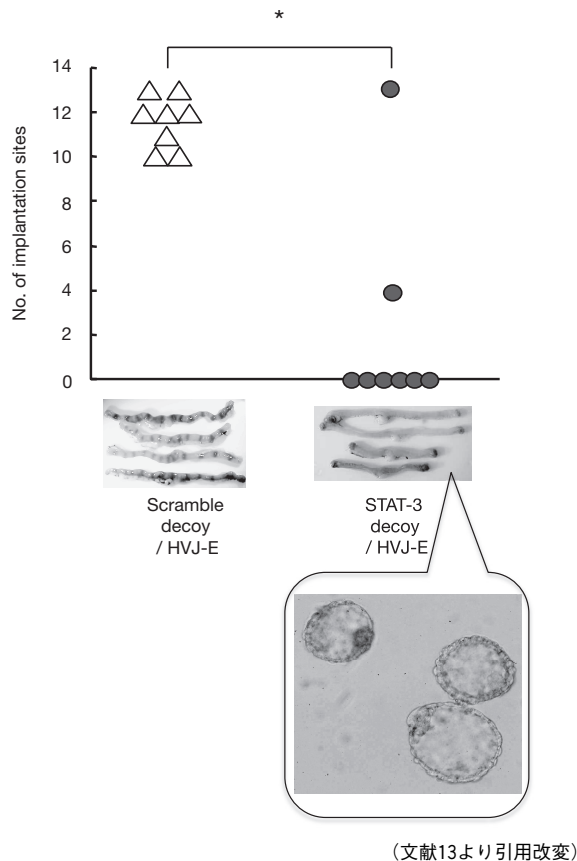


図1 STAT 3 decoy 導入による着床の阻害

STAT 3 decoy またはコントロールとして scramble decoy を交配後1.5日目に導入し、交配後5.0日目に尾静脈より Evans blue を静注し、implantation site を観察した。Scramble decoy 導入群では卵巣を除去しているが、STAT 3 decoy 群ではすべての子宮の両端に青色に染まった卵巣が観察できる。

*P<0.01 by Mann-Whitney's U-test.

STAT 3 decoy 導入群では子宮において着床部位が認められなかったものの、子宮内腔からは正常に発育する胚が確認された。

が一過性であることを確認した [10]。導入遺伝子は胎児に移行せず、この遺伝子導入が妊娠に影響を与えない [10]。さらにこのシステムは着床期だけでなく、妊娠中期から後期マウス子宮にも妊娠を阻害することなく、遺伝子導入を行うこともできることも確認した [11-12]。この方法を用いて、着床期子宮局所における STAT-3 の機能を検討するために、生体内でその活性を抑制できる 2 本鎖 DNA からなる STAT-3 decoy を設計 [13]、導入し、マウス着床期子宮における STAT-3 活性を抑制した。

2. STAT 3 decoy の導入

STAT 3 decoy の導入により、着床期子宮において約 50% の STAT 3 活性が抑制され、これにより、着床期(交

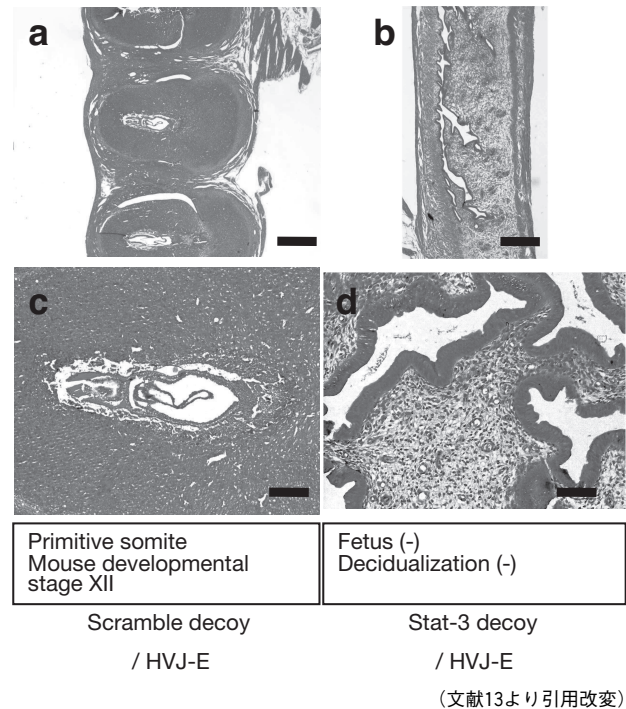


図2 STAT 3 decoy 導入による影響(着床期終了後—交配後8.0日目) Hematoxylin and eosin 染色を行った、交配後8.0日目の子宮。Scale bars: a: 1 mm, b: 500 μ m, c: 250 μ m and d: 100 μ m

配後5.0日目)の子宮において有意に着床が阻害されていることが確認された(図1)。遺伝子導入により、胚の発育が阻害されることによって着床が阻害されたのであろうか? しかしながら、交配後4.0日目の STAT 3 decoy 導入群子宮腔内より正常に発育した胚が確認された(図1)。また通常、着床が既に終了した交配後8.0日目において、コントロールとして scramble decoy を導入した群においては正常な胎仔発育が確認された一方で、STAT 3 decoy 導入群では胎仔成分を認めず、また着床現象において子宮側に不可欠な過程である脱落膜化も認められなかった(図2)。STAT 3 欠損マウスは胎生致死を示した [7] ために、今回の実験系において胚の STAT 3 活性を抑制したわけではないことを証明するために、STAT 3 の dominant negative である mSTAT 3 Y705F の強制発現 plasmid DNA を HVJ-E vector を用いて同様に遺伝子導入を行い、decoy と同様に着床不全が認められること、交配後4.0日目に子宮腔内から採取した胚に導入遺伝子が移行していないことを確認した [13]。

STAT 3 活性の抑制により、脱落膜化が抑制され、それにより着床不全が起こったのではないかと仮定し、実験的な脱落膜化を誘導し、STAT 3 decoy 導入による影

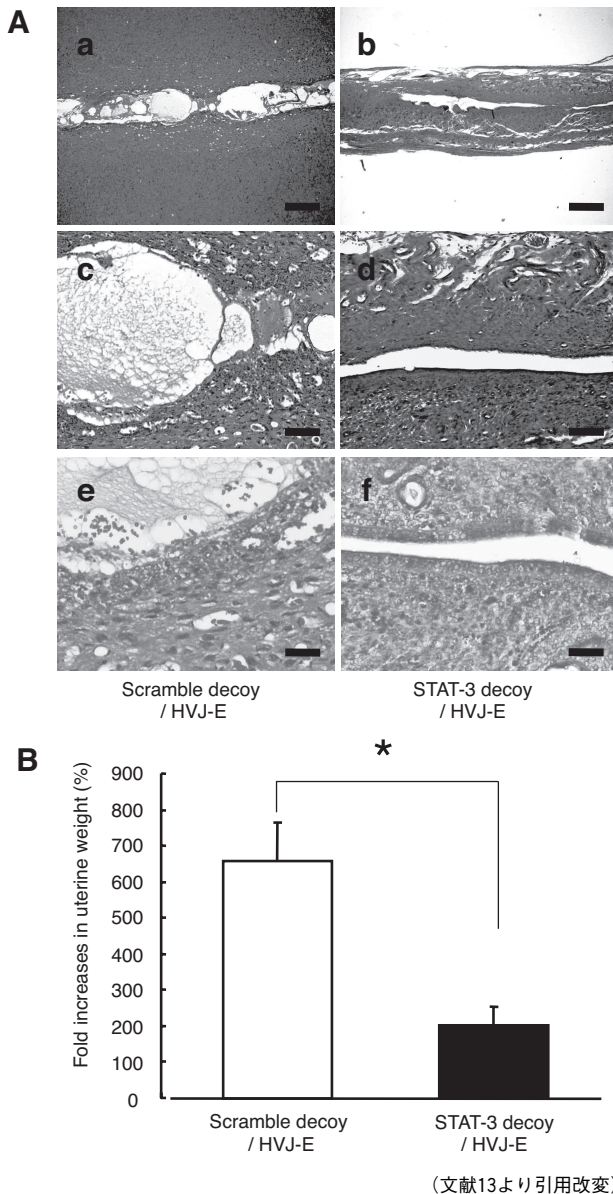


図3 Experimentally induced decidualization.

- A: 脱落膜化を誘導して72時間後の組織学的検討を行った。Scramble decoy の導入を行った (a, c, e) では特徴的な脱落膜化が観察されるのに対して、STAT 3 decoy の導入を行った (b, d, f) では脱落膜化現象の組織学的特徴が明らかに抑制されている。Scale bars: a, b: 500 μ m, c, d: 100 μ m and e, f: 50 μ m.
- B: 脱落膜化の誘導による子宮重量の変化を検討した。All bars represent the mean + S.E.M. from at least 5 animals. *: p=0.002.

響を検討した。Rider らの方法により [14], 精管結紮雄マウスと交配後3.5日目の偽妊娠マウス子宮腔内に sesame oil を投与し物理的な脱落膜化を誘導した。STAT 3 decoy 導入群では明らかに脱落膜化の誘導が抑制された (図3)。

脱落膜化にはプロゲステロンの作用が不可欠であるこ

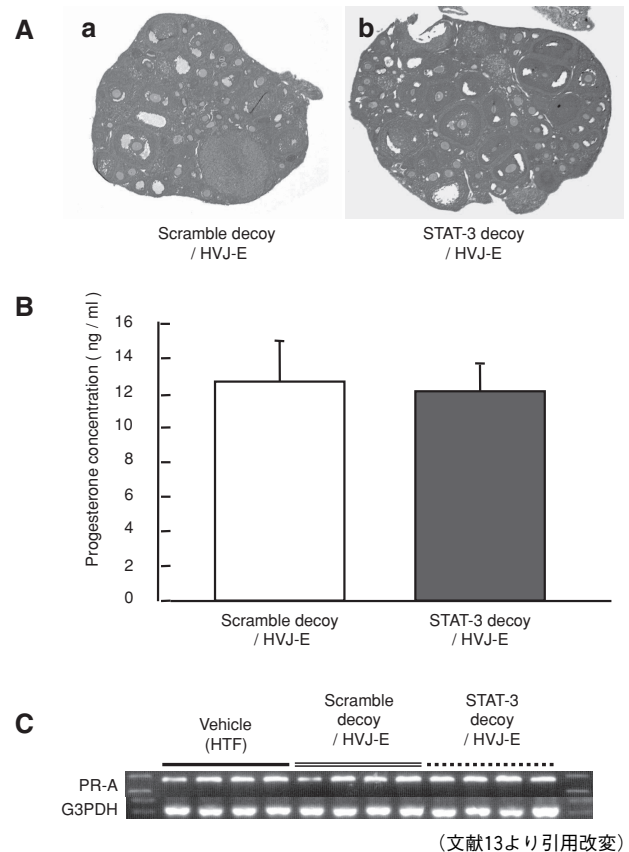


図4 卵巣機能の検討

- A: 交配後5.0日目の卵巣組織に関して、組織学的に検討を行ったが、STAT 3 decoy 導入群と scramble decoy 導入群で、差が認められなかった。
- B: 交配後5.0日目の血中プロゲステロンレベルを測定したが、両群間で差を認めなかった。Bars represent the mean + S.E.M. from at least 5 animals.
- C: 交配後5.0日日子宮における progesterone receptor (PR) - A mRNA の発現について semi-quantitative RT-PCR にて検討を行った。導入時の溶媒として用いた Human Tubal Fluid (HTF) medium のみ導入した群, HVJ-E vector にて scramble decoy 導入群, STAT3 decoy 導入群において差を認めなかった。

とが知られているが、脱落膜化が抑制された STAT 3 decoy 導入群において血中プロゲステロンレベルは正常であり、また卵巣の組織学的検討および子宮局所におけるプロゲステロンレセプター A の mRNA 発現もコントロール群と差が認められなかった (図4)。したがって、STAT-3 decoy の導入により STAT-3 活性が約50%抑制され、プロゲステロン非依存的に脱落膜化の抑制による着床不全を認めたと考えられる [13]。これが着床不全を疑う原因不明のヒト不妊症の状態を再現しているか否かを検討する目的で、ヒト不妊症例において以下の検討を行った。

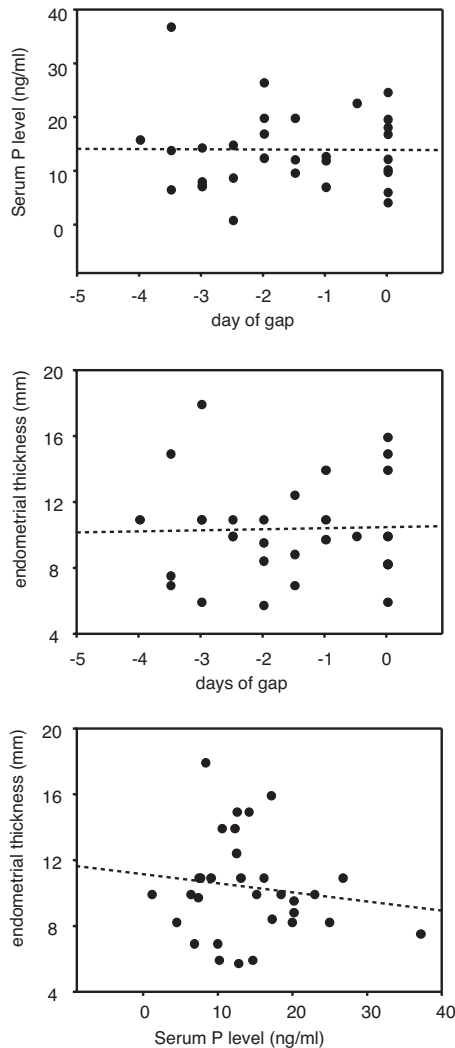


図5 ヒトにおける血中プロゲステロンレベル、超音波下における内膜の厚さ、日付内膜診の検討
 黄体期中期にインフォームドコンセントを得たうえで、日付内膜診を行った。子宮内膜の採取の直前に採血と超音波下における子宮内膜の厚さを測定した。3つのパラメーター間に相関を認めなかった。

ヒト着床不全

ヒトの着床不全はホルモン環境と子宮内膜の形態および機能の不一致により引き起こされると考えられている [15]。そして、子宮内膜の着床能を評価するために、(1) 血中プロゲステロンレベル、(2) 超音波下における子宮内膜の厚さ、(3) 子宮内膜を採取して組織学的に検討した内膜日付診により検討されてきた経緯がある。しかしながら、(1) 血中プロゲステロンレベル、(2) 超音波下における子宮内膜の厚さ、この2つのパラメーターにおいて問題がないにもかかわらず、妊娠に至ら

表 1

No.	Age	Biopsy	En-dometri al dating (POD)	P	EM	ST3	YP-ST3	History
1	37	POD+5	+4-5	6.2	10	+	+	AIHx2
2	39	POD+5	+3-4	7.2	9.8	+	+	IVFx1
3	29	POD+6	+3-4	15.0	10	+	+	hMG-hCG
4	33	POD+4	+2-3	12.3	12.5	+	+	IVFx1
5	41	POD+4	+2-3	9.8	7	-	-	IVFx4
6	43	POD+6	+2-3	6.7	7	-	-	AIHx7, IVFx2
7	23	POD+6	+3-4	1.0	10	-	-	AIHx2
8	44	OPU+4	+3-4	10.0	6	-	-	ICSIx8

POD: post ovulation day, OPU: the day of oocyte pick up, P: serum progesterone levels (ng/ml) on the day of biopsy, EM: Measurement of endometrial thickness (mm) just before endometrial biopsy, ST3: immunohistochemistry for STAT3, YS-ST3: immunohistochemistry for phosphorylated Tyr 705 STAT3, IVF: In vitro Fertilization, AIH: Artificial insemination-husband, ICSI: intra-cytoplasmic sperm injection, hMG: human menopausal gonadotropin, hCG: human chorionic gonadotropin.

ない症例があまりに多い。実際に内膜の厚さによってグループに分けて、それぞれのグループにおける妊娠率を比較したときに、子宮内膜の厚さが6mm未満では8mm以上のときと比べて妊娠率が有意に低いという報告がある [16]。しかし一方で、妊娠した群と妊娠に至らなかった群との比較では内膜の厚さに有意差がないという報告もある [17-18]。IVF周期において採卵日から+12日目(胚移植から10日目)におけるプロゲステロンレベルは妊娠した群では有意に高値を示したが、それ以前では両群間に差がないという報告がある [16, 18]。内膜日付診検体の採取は子宮内膜を鋭利な器具で擦過するため、侵襲が大きくルーチンで行うことが困難であるに加え、実際にはその意義と臨床における効果について未だ結論が出ていない。われわれは、これら3つのパラメーターについて、改めて検討を行った。インフォームドコンセントを得たうえで内膜日付診検体は黄体期中期に採取し、採取する直前に超音波下で内膜の厚さを測定、採取日に血中プロゲステロン値を測定した。内膜日付診による組織学的な検討による日数と実際の日数のギャップ、血中プロゲステロン値、子宮内膜の厚さの3つのパラメーターと妊娠の帰結について検討を行った(図5)。この3つのパラメーター間に相関性を認めず、それぞれと妊娠の帰結とも相関を認めなかった。われわれの予備実験として、妊娠に至った4症例と至らなかった4症例について、前述の3つのパラメーターに加え、STAT3活性を検討するために、STAT3およびリン酸化STAT3の免疫染色を行った(表1)。内膜日付診、血中プロゲステロン値および超音波下における内膜の厚さについて、両群間に差を認めなかった。しかしながら、妊娠に至った症例では、子宮内膜においてSTAT3およびリン

酸化 STAT3 の染色性を認めたが、着床不全によって妊娠に至らなかったと考えられた症例においては STAT3 およびリン酸化 STAT3 の染色性が認められなかった。内膜日付診、プロゲステロンレベルおよび超音波下における内膜の厚さ、これら3つのパラメーターにおいて、1つでも問題がある（内膜日付診で2日以上之差がある、プロゲステロンレベルが8 ng/ml 以下、超音波下における内膜の厚さが6 mm 以下）症例では STAT-3 およびリン酸化 STAT3 の染色性が認められず、妊娠に至らなかった。これら結果より STAT-3 が着床不全の診断および治療の分子標的と成り得ることが示唆された。

おわりに

遺伝子欠損マウスの検討から LIF [2] および IL-11 [3-4] が着床現象に重要な役割を果たしていると考えられてきた。ヒトにおける検討で、黄体期中期から後期におけるヒト子宮腔内の flusing 液中の LIF 発現が不妊症で減少していることが報告されている [16-17]。しかしながら、ヒト着床期子宮における LIF 発現の免疫染色法による検討、および mRNA の発現について、着床不全を疑う不妊症と妊孕性の確認されている女性では差がなかったという報告もある [18-20]。IL-11 については、免疫染色方法による検討において、不妊症で黄体期中期の子宮内膜上皮における IL-11 発現が減少していることが報告されている [21]。しかしながら、マウス子宮における LIF の発現ピークがちょうど着床期の直前にあるのに対して、IL-11 発現のピークは交配後5.5日目から7.5日目である [4]。これら IL-6 サイトカインファミリーは、gp130 を介しており、不妊症患者の黄体期中期の子宮内膜では免疫組織染色の検討において、LIF および IL-6 発現に差はないものの gp130 発現が減少しているという報告もある [18]。今後、着床不全の病態の解明には、さらなる、これら物質の基盤とホルモン環境の関係の解明が求められている。

不妊症の患者が治療の休止期に自然に妊娠されることは少なくない。このことから、着床不全を疑う多くの不妊症患者では、結果的に妊娠に至らず、不妊の状態ではあるが、これが遺伝子欠損マウスのような不可逆的な状況というよりも、多くの場合は、たとえばその周期において一時的になんらかの発現低下もしくは発現が過剰というような、何らかの理由で一時的にそのバランスが適当ではない、一過性の可逆的な状況ではないかと思われる。

今回のマウスモデルでは、子宮局所で着床期一過性に50%の STAT3 活性を抑制するだけでプロゲステロン非

依存的に着床不全を再現することができた。その点において、このマウスモデルは遺伝子欠損マウスなどのように完全にその標的遺伝子の発現を抑制しているモデルに比べて、より臨床の状態を反映しているのではないかと考えられる。今回の検討において、交配後4.0日目の STAT3 decoy 導入群で子宮腔内をフラッシュアウトすることにより、正常に発育した胚を観察することができたが、一方で、コントロールとして scramble decoy を導入した群では胚を回収することがほとんどできなかった。このことから、STAT3 活性は着床現象において脱落膜化だけではなく、胚の接着にも関与しているかもしれない。今後、プロゲステロンと STAT3 の関係性をさらに検討していくことで着床不全の病態の解明に繋がればと期待する。

謝辞

本稿は2008年度第13回日本生殖内分泌学会学術講演会で学術奨励賞を受賞した発表についてまとめたものである。本稿の執筆の機会を与えてくださった日本生殖内分泌学会理事長 峯岸 敬教授、第13回大会長の寺川直樹名誉教授および広報担当理事の筒井和義教授に御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご協力いただいたすべての皆様に感謝いたします。

HVJ-E vector については大阪大学遺伝子治療学金田安史教授のご指導、および遺伝子治療学教室の多くの先生方にご助力いただきました。マウス脱落膜化の誘導には Virginia Rider 教授 (Pittsburg Uni)、マウス子宮の組織学的な検討には木曾康郎教授 (山口大学農学部獣医学科)、今川和彦准教授 (東京大学農学部) にご指導いただきました。mouse STAT3 の dominant negative である mSTATY705F の強制発現プラスミド DNA は独立行政法人 理化学研究所バイオリソースセンターを通して、審良静男教授 (大阪大学微生物病研究所) が御樹立されたものを使用させていただきました。HVJ-E vecor は現在 GenomONE-NEO®として石原産業より商品化されており、本研究においては石原産業のご好意によりご提供いただいたものを使用させていただきました。

引用文献

1. Reich NC, Liu L (2006) Tracking stat nuclear traffic. *Nat Rev Immunol* 6, 602-612.
2. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359, 76-79.
3. Bilinski P, Roopenian D, Gossler A (1998) Maternal il-11 alpha function is required for normal decidua and fetoplacental development in mice. *Genes Dev* 12, 2234-2243.
4. Robb L, Li R, Hartley L, Nandurkar HH, Koentgen F, Begley CG (1998) Infertility in female mice lacking the

- receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation. *Nat Med* 4, 303-308.
5. Cheng JG, Chen JR, Hernandez L, Alvord WG, Stewart CL (2001) Dual control of *lif* expression and *lif* receptor function regulate *stat3* activation at the onset of uterine receptivity and embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 8680-8685.
 6. Teng CB, Diao HL, Ma H, Cong J, Yu H, Ma XH, Xu LB, Yang ZM (2004) Signal transducer and activator of transcription 3 (*stat3*) expression and activation in rat uterus during early pregnancy. *Reproduction* 128, 197-205.
 7. Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S (1997) Targeted disruption of the mouse *stat3* gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 3801-3804.
 8. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Jagers DC, Yoo HJ, Heap RB, Smith SK (1997) In-vivo gene transfer to the uterine endometrium. *Hum Reprod* 12, 17-20.
 9. Kaneda Y, Nakajima T, Nishikawa T, Yamamoto S, Ikegami H, Suzuki N, Nakamura H, Morishita R, Kotani H (2002) Hemagglutinating virus of japan (hvj) envelope vector as a versatile gene delivery system. *Mol Ther* 6, 219-226.
 10. Nakamura H, Kimura T, Ikegami H, Ogita K, Koyama S, Shimoya K, Tsujie T, Koyama M, Kaneda Y, Murata Y (2003) Highly efficient and minimally invasive in-vivo gene transfer to the mouse uterus using haemagglutinating virus of japan (hvj) envelope vector. *Mol Hum Reprod* 9, 603-609.
 11. Koyama S, Kimura T, Ogita K, Nakamura H, Tabata C, Md Abu Hadi Noor Ali K, Temma-Asano K, Shimoya K, Tsutsui T, Koyama M, Kaneda Y, Murata Y (2006) Simple and highly efficient method for transient in vivo gene transfer to mid-late pregnant mouse uterus. *J Reprod Immunol* 70, 59-69.
 12. Koyama S, Kimura T, Ogita K, Nakamura H, Khan MA, Yoshida S, Watanabe M, Shimoya K, Kaneda Y, Murata Y (2006) Transient local overexpression of human vascular endothelial growth factor (*vegf*) in mouse fetomaternal interface during mid-term pregnancy lowers systemic maternal blood pressure. *Horm Metab Res* 38, 619-624.
 13. Nakamura H, Kimura T, Koyama S, Ogita K, Tsutsui T, Shimoya K, Taniguchi T, Koyama M, Kaneda Y, Murata Y (2006) Mouse model of human infertility: Transient and local inhibition of endometrial *stat-3* activation results in implantation failure. *FEBS Lett* 580, 2717-2722.
 14. Rider V, Mcrae A, Heap RB, Feinstein A (1985) Passive immunization against progesterone inhibits endometrial sensitization in pseudopregnant mice and has antifertility effects in pregnant mice which are reversible by steroid treatment. *J Endocrinol* 104, 153-158.
 15. Li TC, Klentzeris L, Barratt C, Warren MA, Cooke S, Cooke ID (1993) A study of endometrial morphology in women who failed to conceive in a donor insemination programme. *Br J Obstet Gynecol* 100, 935-938.
 16. Noyes N, Hampton BS, Berkeley A, Licciardi F, Grifo J, Krey L (2001) Factors useful in predicting the success of oocyte donation: A 3-year retrospective analysis. *Fertil Steril* 76, 92-97.
 17. Leibovitz Z, Grinin V, Rabia R, Degani S, Shapiro I, Tal J, Eibschitz I, Harari O, Paltieli Y, Aharoni A, Zeevi J, Ohel G (1999) Assessment of endometrial receptivity for gestation in patients undergoing in vitro fertilization, using endometrial thickness and the endometrium-myometrium relative echogenicity coefficient. *Ultrasound Obstet Gynecol* 14, 194-199.
 18. Vlaisavljevic V, Reljic M, Gavric-Lovrec V, Kovacic B (2001) Subendometrial contractility is not predictive for in vitro fertilization (IVF) outcome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 17, 239-244.
 19. Mikolajczyk M, Wirstlein P, Skrzypczak J (2007) The impact of leukemia inhibitory factor in uterine flushing on the reproductive potential of infertile women—a prospective study. *Am J Reprod Immunol* 58, 65-74.
 20. Skrzypczak J, Wirstlein P, Mikolajczyk M (2007) Could the defects in the endometrial extracellular matrix during the implantation be a cause for impaired fertility? *Am J Reprod Immunol* 57, 40-48.
 21. Sherwin JR, Smith SK, Wilson A, Sharkey AM (2002) Soluble gp130 is up-regulated in the implantation window and shows altered secretion in patients with primary unexplained infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3953-3960.
 22. Sharkey AM, Smith SK (2003) The endometrium as a cause of implantation failure. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 17, 289-307.
 23. Robb L, Dimitriadis E, Li R, Salamonsen LA (2002) Leukemia inhibitory factor and interleukin-11: Cytokines with key roles in implantation. *J Reprod Immunol* 57, 129-141.
 24. Dimitriadis E, Sharkey AM, Tan YL, Salamonsen LA, Sherwin JR (2007) Immunolocalisation of phosphorylated *stat3*, interleukin 11 and leukaemia inhibitory factor in endometrium of women with unexplained infertility during the implantation window. *Reprod Biol Endocrinol* 5, 44-51.