

ヒト着床と子宮内膜の EMT

内田 浩, 丸山 哲夫, 小田 英之, 西川 明花, 各務 真紀, 梶谷 宇,
浅田 弘法, 吉村 泰典

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

はじめに

ヒト子宮内膜は、子宮内膜腺上皮細胞層によって物理学的・免疫学的防御バリアを形成している。一方で、ヒト着床における胚の子宮内膜間質への侵入には、この腺上皮バリアの貫通が不可欠である。胚侵入による腺上皮バリアの一時的破壊は、母体子宮のみならず胚への感染防御や着床胚の脱落リスクの観点からも、可及的速やかに修復される必要がある。しかしながら、破壊バリアにフィブリン様物質によるコーティングがなされるという観察記録の他にその修復機序に言及したものはなく、複合的なヒト着床機序にあっても重要なステップであるにも関わらず、その修復機序は全く不明のままである。

I. ヒト着床と複合的細胞機能

ヒトの着床は子宮内膜と胚という異種細胞間のコンタクトに始まる(図1 a)。発生段階の組織構築は別として、およそ生体内で異種細胞間の対峙以降、接着・侵入へと進行していく生体現象は、かなり特殊であり限定されて許諾されたシステムである。ヒト着床の他には、流血中の免疫担当細胞にのみ許されている。生殖現象と初期免疫現象にかなりの類似点があることは、これにとどまらないが、内分泌学にとどまらず免疫学が生殖医学と密接に関連していることを示唆するのは、この点からも生物構造学的に合目的といえるであろう。生理学的にかなり限定された異種細胞間接着・侵入が病的状況で不本意にも許されてしまうのが、癌細胞の浸潤・転移機序であるとも表現できる。

ヒト着床もまた、癌転移や白血球の挙動のように、異種細胞間相互反応の一定のルールに従う。すなわち、対峙(図1 a)、接着(図1 a, b)、貫通(図1 b, c)、浸潤(図1 d)のステップを踏む、複合的多段階生体反応で

ある[1]。段階的な機序の協調的・連続的な生体反応であるが、その内容は細胞の接着・増殖・分化・運動といった基本的機能の組み合わせともとらえられる。したがって、倫理的・社会的制約の多いヒト着床研究においても、接着や運動などの基本的細胞機能の解析に焦点をあてることで、定性的観察のみに依存することなく、定量的統計的解析を可能とする *in vitro* 研究にもち込むことが可能となり、貴重な *in vivo* 研究に先立つ情報を提供してくれる。

II. 破壊腺上皮層の再構築仮説

図1に示したヒト着床の流れは、現在コンセンサスを

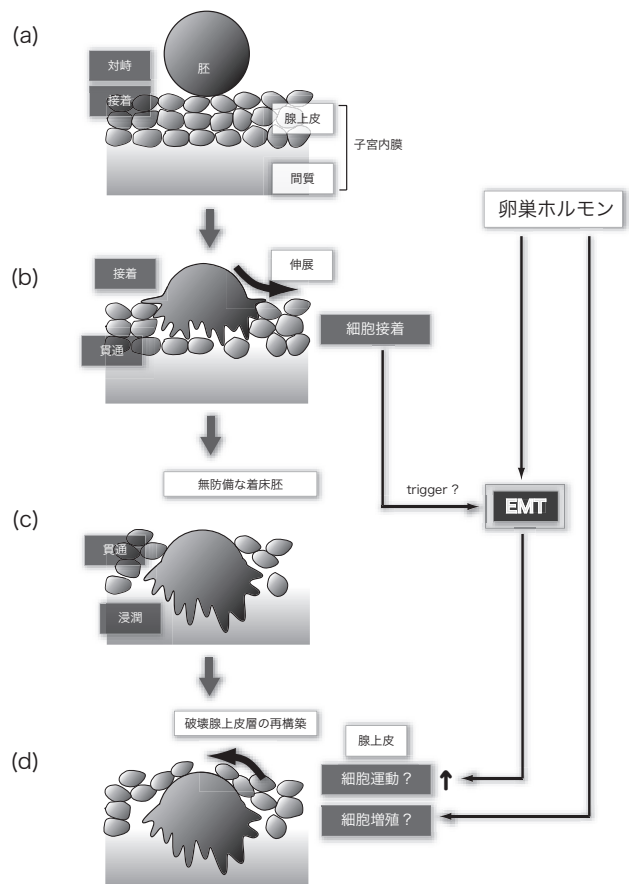


図1 ヒト着床と EMT 仮説

連絡先：内田 浩, 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室
〒160-8582 東京都新宿区信濃町35
TEL : 03-3353-1211
FAX : 03-5363-3819
E-mail : uchida@sc.itc.keio.ac.jp

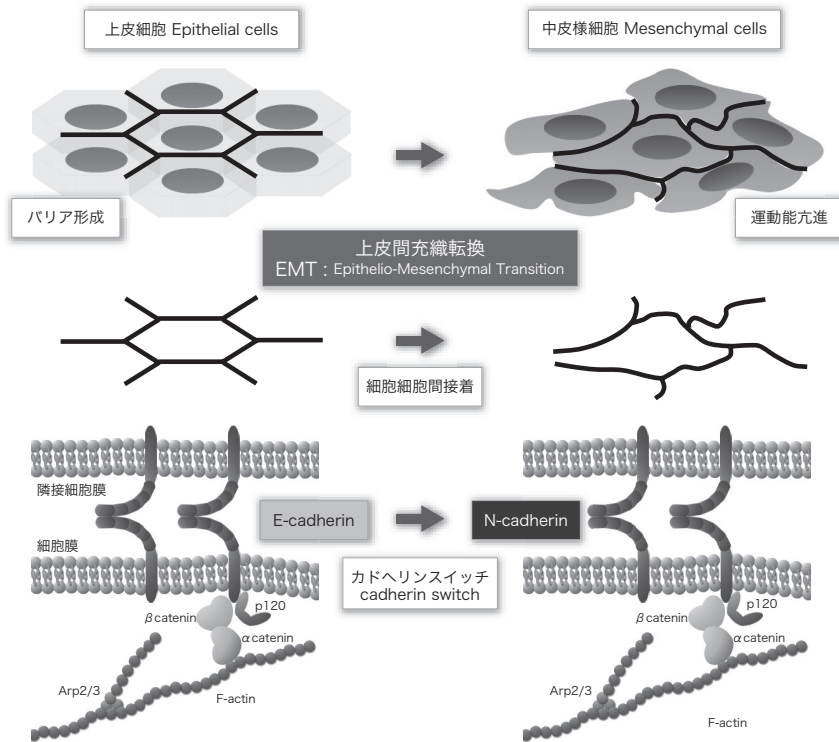


図2 上皮間充織転換 (EMT) とカドヘリンスイッチ

得たものであるが、実は胚の侵入によって破壊されるはずの子宮内膜腺上皮バリアの再構築に関しては、ほぼすべてがブラックボックスのなかにある。レビューによってはフィブリン様物質によってコーティングされている様が描いてあるものもあるが、図1cのように完全に無防備な胚が描かれていることが多い [2, 3]. 子宮内膜腺上皮バリアは物理学的にも、そして着床を許す免疫寛容状態のなかでとくに免疫学的に重要なバリアの役割を果たすはずである。そのため、破壊された子宮内膜腺上皮バリアは即時的に修復される必要に迫られていると考えられる。細胞の基本機能に立脚すれば、その破壊されて形成されてしまった空隙は細胞増殖による充填か、細胞運動による空隙の被覆によって補填されると想定される。一般的な細胞機能速度からは、細胞増殖よりも細胞運動による被覆の方が即時的に空隙を埋め合わせることができることは、飽和培養細胞をスクラッチして空隙を形成させた後の細胞挙動をみる、創傷治癒アッセイの観察からも示唆される。おそらくは、胚侵入によって一時的に破壊された子宮内膜腺上皮細胞層によるバリアは、周辺腺上皮細胞の運動機能の一時的亢進によって応急的に空隙を被覆する。しかし多少の細胞形態の扁平化をもって空隙を完全に埋め合わせることができず、ルーズなカバーとなりうる。そのため同時に、ただし時

間的ギャップを以て増殖機能の亢進が起こり、よりタイトな細胞層バリアを完全に構築するものと考えられる。これが本研究の作業仮説である。

Ⅲ. 破壊腺上皮層の再構築における EMT と N-cadherin の関与

1. 上皮間充織転換 (EMT) とカドヘリンスイッチ

上皮間充織転換 (Epithelio-Mesenchymal Transition ; EMT) は、上皮細胞 (Epithelial cells) が中皮様細胞 (Mesenchymal cells) の形質を獲得する現象である。本来隣接細胞とタイトに接着し上皮層を形成するべきいわゆる静的様態にある細胞が、運動機能を亢進した動的細胞になる生命現象で、初期発生段階において分化した細胞が適所へ生体内移動する際などに欠かせないものである。病的な場合は癌細胞の浸潤・転移機序の際に起こるため、近年 EMT 解析は癌研究のトレンドにもなっている。

上皮細胞層は、一般に細胞細胞間接着分子 E-cadherin がホモダイマーを形成することで、細胞同士が堅固に結びつけられ形成される (図2)。一方、高い運動能を保持する中皮様細胞の細胞細胞間接着は、E-cadherin も担う一方で、それよりも高頻度と同じカドヘリンファミリーでも N-cadherin によって形成されている (図2)。

すなわち、EMT において細胞細胞間接着を担う分子は、E-cadherin から N-cadherin へと主役の座を交換する。これをカドヘリンスイッチ (cadherin switch) と呼ぶ [4]。

2. 子宮内膜腺上皮細胞の運動とカドヘリンスイッチ

ヒト子宮内膜癌細胞株 Ishikawa は、卵巣ホルモンの受容体としてエストロゲン受容体 α 、プロゲステロン受容体をとともに保持しており [5]、卵巣ホルモンの影響を解析する際に、他の内膜癌細胞株よりも有利であるために、ヒト着床の *in vitro* 解析でヒト子宮内膜腺上皮細胞のモデルとしてよく用いられる。卵巣ホルモン (17 β エストラジオールおよびプロゲステロン) を Ishikawa 細胞に添加すると、軽微ながら E-cadherin の発現減弱、N-cadherin の発現亢進 (カドヘリンスイッチ) を観察することができる。

われわれはこれまでに、卵巣ホルモンを添加すると、Ishikawa 細胞の運動機能が亢進することを、個々の細胞運動を解析するトランスウェルアッセイと、集団としての細胞運動機能を反映する創傷治癒アッセイとで明らかにし報告した [6]。創傷治癒アッセイは、飽和状態の細胞に隣接した空間を形成し、その空間への細胞集団の挙動を観察するアッセイであるので、ヒト着床における胚侵入による子宮内膜腺上皮細胞層の破壊を模倣しているといえる。この創傷治癒アッセイにおいて、E-cadherin の発現量はやや低化し、逆に N-cadherin の発現量が増加することが、スクラッチした創傷近傍、すなわち細胞集団の運動局面において観察される。このことは、卵巣ホルモンの添加の他に、運動の場を提供されることがカドヘリンスイッチのトリガーになりうることを示唆していると思われる。

3. 着床とカドヘリンスイッチ

ヒト子宮内膜癌細胞株 Ishikawa とともに、胚モデルとしてヒト絨毛癌細胞株 JAR を振盪培養することで得られる spheroid (球状の細胞塊) を利用することで、*in vitro* の着床アッセイが可能である [7]。*in vitro* で飽和 Ishikawa 細胞と JAR spheroid を一定時間共培養することで、JAR spheroid は Ishikawa 細胞へ接着したあと、Ishikawa 細胞を押しのける形で伸展していく。胚の接着によって、マウス子宮内膜腺上皮では apoptosis が起こるとされ [8]、ヒト子宮内膜間質細胞では、胚を回避するような運動が観察される [9] が、*in vitro* での胚 (モデル) の接着による同部位の Ishikawa 細胞の欠如は、Ishikawa 細胞の細胞死によるものか、運動によ

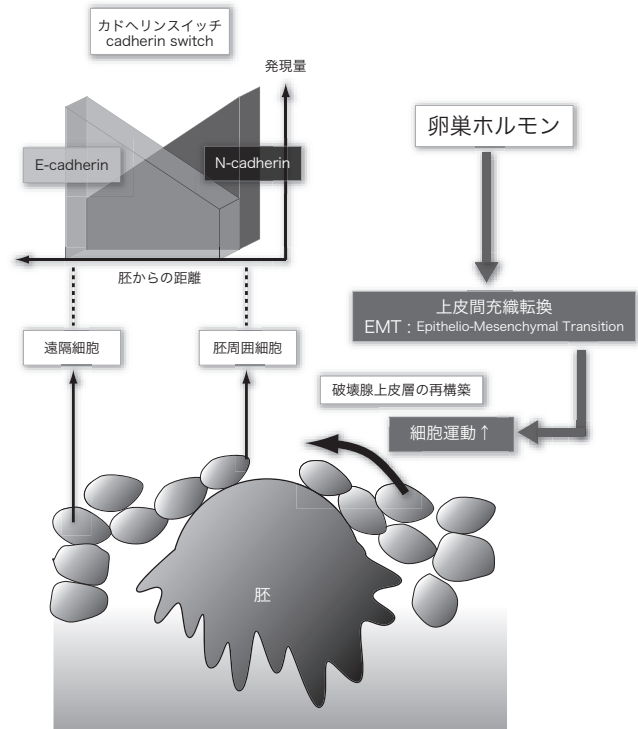


図3 N-cadherin による子宮内膜腺上皮層再構築モデル

る回避移動であるのかは不明である。いずれにせよ *in vivo* の着床を模倣した *in vitro* 着床を再現できる。

in vitro 着床アッセイにおいて、カドヘリンの発現様式をみてみると、Ishikawa 細胞全体における E-cadherin の発現減弱、N-cadherin の発現上昇が JAR spheroid の添加によって認められる。さらに詳細にその発現分布を観察すると、N-cadherin の発現亢進は、JAR spheroid の近傍で顕著であり、腺上皮細胞層の欠損領域を取り囲むように起こっていることが示された (図3)。これらの結果は、段階的なカドヘリンスイッチによる合目的な子宮内膜腺上皮細胞層の再構築が行われていることを示唆していると思われる。すなわち、前項で述べたように着床に先立つ卵巣ホルモンによる暴露によって、軽度のカドヘリンスイッチが認められるが、これは来るべき腺上皮細胞層の欠損に備えた準備段階と考えられる。そして、胚の対峙に始まる実際の着床プロセスが進行を始めると、その対峙がトリガーとなって、カドヘリンスイッチのエンジンがドライブする。さらに胚の侵入による腺上皮細胞層の欠損は、周囲の子宮内膜腺上皮細胞に対して運動の場を提供することになり、最終的に本格的なカドヘリンスイッチが起動し腺上皮細胞層の運動能を飛躍的に高めることで、迅速な再構築の中心的機序を担うのではないであろうか。きわめて合目的なシステムといえ

るであろう。

このカドヘリンスイッチが胚との対峙によって起動され、その後 N-cadherin 主導で行われていることは、N-cadherin の機能阻害抗体 (N-cadherin のホモダイマーとしての結合部位に結合することで、細胞細胞間接着を阻止する抗体) の投与実験によって明らかとなる。つまり、N-cadherin の機能阻害実験において、N-cadherin の細胞運動局面への集中的な発現亢進 (再分布) はキャンセルされてしまう。また、N-cadherin の再分布は、胚モデルである JAR spheroid の接着伸展が進行するとともに、時間依存的に進行していく。そして N-cadherin の機能阻害実験において、JAR spheroid の Ishiakwa 細胞への対峙・接着には何ら影響を及ぼさないことからわかる。

また、N-cadherin に限定せず、中皮様細胞のマーカーとなりうる vimentin の発現も、JAR spheroid の接着によって上昇してくることからも、ヒトの *in vitro* 着床においては、接着以降、胚侵入を経て、子宮内膜腺上皮細胞層の再構築に EMT がアシストしていることを示唆していると考えられる。

IV. 今後の展望

N-cadherin の子宮内膜腺上皮細胞層の組織内再分布が、ヒト着床における破壊された腺上皮細胞層の再構築に重要な役割を果たしていることは、上記の一連の解析結果が明らかに示唆していると考えられる。しかしながら、接着は成立するものの、早期に妊娠組織が剥脱していく習慣流産などの機序へのアプローチとして本研究を捉えた場合、N-cadherin の再分布に関わる機序や、N-cadherin の再分布後、子宮内膜腺上皮細胞の細胞運動を亢

進していくための、分子機序の解明も必要とされるであろう。今後は本研究を臨床での実際の生体現象へと近づけていくために、そして検査や治療へのヒントとなりうるストーリーの構築のためにも、上に述べてような N-cadherin 周辺の分子機序についても併せて解析を行っていきたいと考えている。

引用文献

1. Kimber SJ, Spanswick C (2000) Blastocyst implantation: the adhesion cascade. *Semin Cell Dev Biol* 11, 77-92.
2. Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA (2005) Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* 11, 613-630.
3. Staun-Ram E, Shalev E (2005) Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol* 3, 56.
4. Anastasiadis PZ, Reynolds AB (2001) Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol* 13, 604-610.
5. Nishida M (2002) The Ishikawa cells from birth to the present. *Hum Cell* 15, 104-117.
6. 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 glycodeilin. *Endocrinology* 148, 896-902.
7. 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 glycodeilin enhances the initial step of implantation. *Hum Reprod* 22, 2615-2622.
8. Kamijo T, Rajabi MR, Mizunuma H, Ibuki Y (1998) Biochemical evidence for autocrine/paracrine regulation of apoptosis in cultured uterine epithelial cells during mouse embryo implantation *in vitro*. *Mol Hum Reprod* 4, 990-998.
9. Grewal S, Carver JG, Ridley AJ, Mardon HJ (2008) Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 16189-16194.