

不妊症の新しいメカニズム — 初期妊娠の子宮環境における DEDD 分子の重要性 —

森 真弓, 新井 郷子, 宮崎 徹

東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター分子病態医科学部門

はじめに

現在, 生殖年齢で不妊症を経験する女性は, 10~15% もいるとされている. 明らかな原因として卵管や卵巣の形態・機能的異常, そして子宮内膜症が背景に認められる場合があるが, 原因がまったく不明な例も少なくない. われわれは, 女性不妊症の原因になりうる要素として脱落膜に注目した. 脱落膜は, 胎盤が形成されるまでの間に着床胚に対して栄養源や成長因子を供給し, また胎児と母体の間で免疫的拒絶が起きるのを防ぐバリアの働きをする, 非常に重要な子宮組織である.

マウスでは, 交尾後4.5日で着床が起きた直後に胚の周囲組織が脱落膜に分化し, 8.5日目に胎盤が形成されるまで初期の妊娠維持に重要な役割を果たす. この脱落膜を構成する脱落膜細胞の特徴は, グリコーゲンや脂質などの栄養に富み, プロラクチンやそのファミリータンパクをはじめとする多種多様なマーカーを発現すること, さらに, 4n, 8nを中心として最大64nほどの多核細胞になることである [1]. このような脱落膜細胞分化は, ヒト子宮内膜あるいはマウス子宮間質細胞を単離培養し, エストロゲン・プロゲステロンを加えることにより, *in vitro* で誘導できる [2]. マウスでは7日間の誘導中に, 細胞の増殖・分化マーカーの発現・多核化を伴う成熟という段階を経る.

Death effector domain-containing protein (DEDD) は元々 apoptosis 関連因子として同定された細胞内タンパク質であるが, われわれの解析によれば, cyclinB1-cdk1複合体と相互作用して細胞周期の調節に関与し, また, インスリンシグナル下流に存在する Akt 分子のタンパク質安定性に寄与する [3-6]. 今回われわれは, *Dedd* 遺伝子欠損マウス (*Dedd*^{-/-}) を用いて, 脱落膜の分化に

異常のある不妊の病態を明らかにし, 女性不妊症において脱落膜の機能分化異常が原因かつ治療のターゲットの1つになり得る可能性を示した [7].

Dedd^{-/-}マウスはメス不妊である

最初にノックアウトマウスを作製したとき, 繁殖の過程で遺伝子型-/-のメスがまったく仔を産まないことに気づいた. ヘテロ同士の交配ではメンデル則に従った割合で各遺伝子型の仔が生まれること, およびオスの *Dedd*^{-/-}マウスは正常な生殖能力を有したことから, 原因はメス生殖機能に限定された.

しかし *Dedd*^{-/-}メスの卵巣機能は正常で, 交尾後の性ホルモン血中濃度の変化や受精にいたるまでは間違いなくうまくいっていた. 一方で, 野生型 (*Dedd*^{+/+}) の子宮組織において *Dedd* の発現量を調べると, 着床直後に発現が上昇し, 脱落膜組織が最も拡張する5.5日目でピークを示した (図1a). この遺伝子発現の増加は, *in vitro* でマウスおよびヒトの細胞を脱落膜に分化誘導した時も同様に観察された (図1b, c). したがって, 脱落膜の分化において DEDD が何らかの関与をすることが強く示唆されたのである.

Dedd^{+/+}と *Dedd*^{-/-}のメスマウスの妊娠子宮を組織学的に比較解析すると, 着床時までは着床率も含めて差がなかったものの, 6.5日目以降で *Dedd*^{-/-}子宮内の胚生存率は大きく減少し, 9.5日目までに, すなわち胎盤形成が終わる前に, ほとんどの胚が死んで吸収されてしまっていた (図1d). このことから, *Dedd*^{-/-}マウスのメス不妊の原因は脱落膜にあると考えた.

子宮脱落膜化と脱落膜細胞の多核化不全

実際, 子宮脱落膜組織を, 脱落膜マーカーの1つである tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3) の免疫染色により比較したところ, *Dedd*^{-/-}では *Dedd*^{+/+}より有意に染色領域が縮小していた (図2a). 他のさまざまな脱落膜マーカーの発現量も同様に, *Dedd*^{-/-}子宮で

連絡先: 森 真弓, 東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター分子病態医科学部門
〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1
TEL: 03-5841-1437
FAX: 03-5841-1438
E-mail: msmori@m.u-tokyo.ac.jp

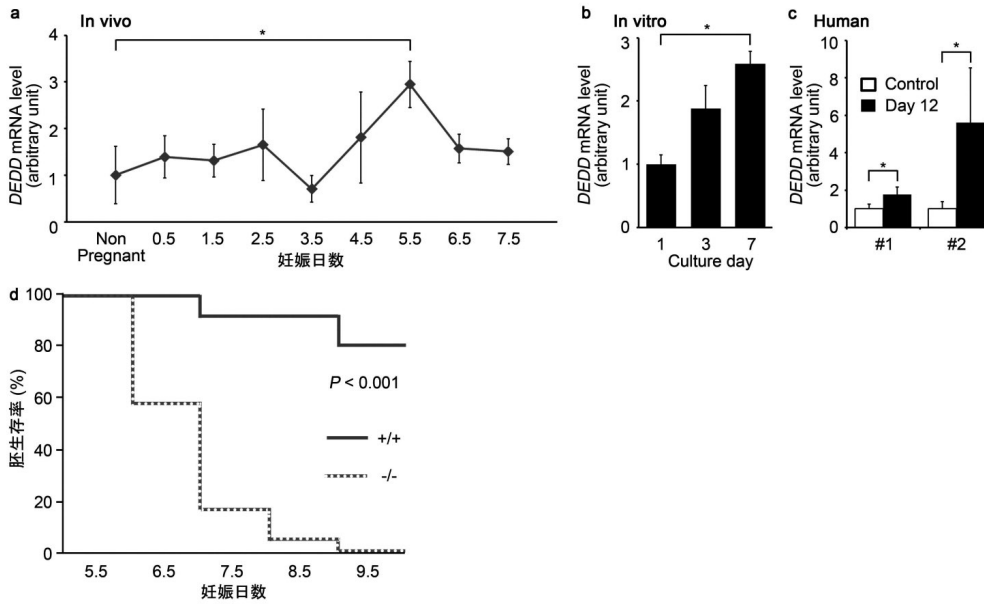


図1 初期妊娠における *Dedd* の発現上昇と *Dedd*^{-/-}マウス子宮内着床後の胚致死
 (a) 着床後の子宮における *Dedd* mRNA 発現量の増加
 (b) *In vitro* 脱落膜分化誘導時のマウス子宮間質細胞における *Dedd* mRNA 発現量の増加
 (c) *In vitro* 脱落膜分化誘導時のヒト子宮内膜細胞における *Dedd* mRNA 発現量の増加
 (d) Kaplan-Meier 法によるマウス子宮内の胚生存率 Log-rank, $\chi^2=13.2$

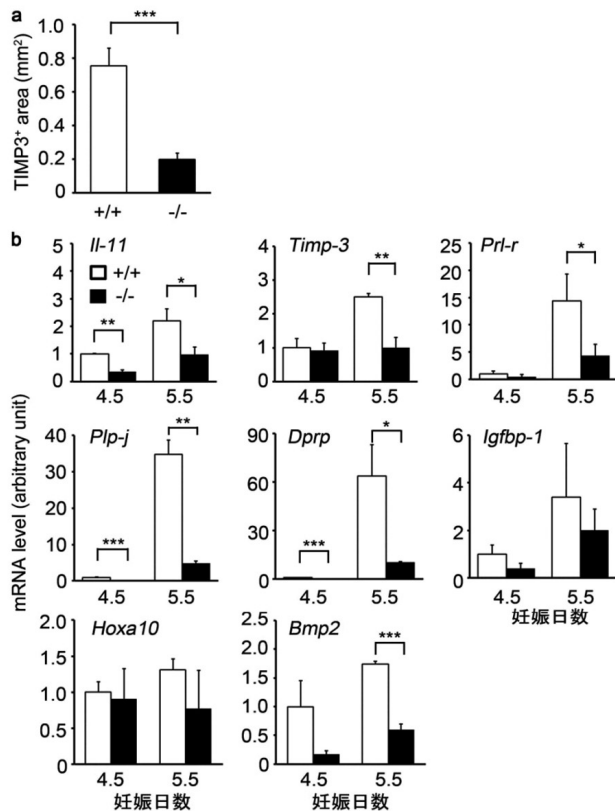


図2 *Dedd*^{-/-}子宮の脱落膜化不全
 (a) 妊娠5.5日目の子宮着床部位の免疫組織染色によるTIMP3発現の定量
 (b) 妊娠4.5-5.5日目の子宮着床部位の脱落膜マーカー遺伝子発現の比較

有意な減少あるいは減少傾向がみられた (図2b)。

子宮間質細胞を脱落膜へ分化誘導した際も、多核化を指標として観察すると、*Dedd*^{-/-}由来の細胞では成熟脱落膜細胞の割合が半減していた (図3)。これは、同一条件下である *in vitro* の系で、受精卵の存在や他のあらゆる因子と無関係に、脱落膜細胞への分化成熟能が低下していることをあらわす。

以上の解析から推定されることは、*Dedd*^{-/-}マウス子宮において脱落膜の分化・多核化が不完全であることが、妊娠初期の胚を育成すべきはずであった子宮環境を悪化させ、その結果着床後早期の胚の成長がサポートされず死に至るため、仔が産まれない、すなわち不妊になるということである。

Akt, cyclinD3を介した分子メカニズムの解明

ここで生まれる疑問は、なぜDEDDがないと脱落膜が成熟分化しにくいのかである。分子レベルでのDEDDの脱落膜分化への関与とそのメカニズムを、以下のように明らかにした。

まず、インスリンシグナル下流のAktに着目した。DEDDはAkt分子に結合してタンパク質レベルで安定化することにより、インスリン感受性に寄与する。このAktはすでに、ヒト脱落膜細胞に発現して脱落膜分化に関与することが報告されていた [8]。そこで子宮組織

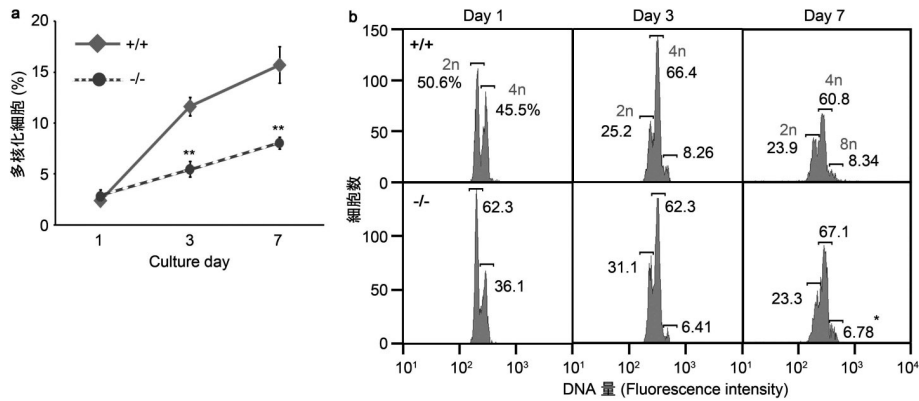


図3 *Dedd*^{+/-}マウス脱落膜化細胞の多核化不全
(a) In vitro 脱落膜分化誘導中の検鏡による細胞多核化の算出
(b) 同細胞のフローサイトメトリーによる DNA 定量

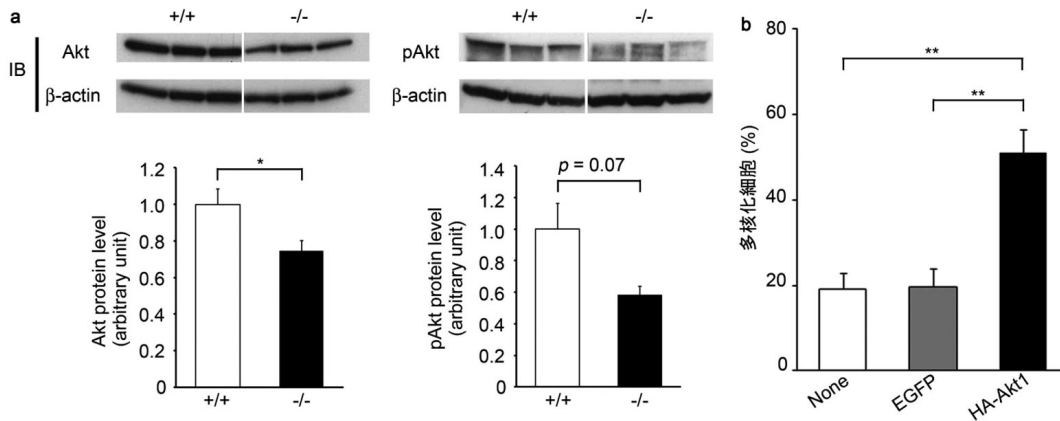


図4 Akt タンパク質発現レベルの多核化への関与
(a) 妊娠5.5日目の子宮着床部位における Akt およびリン酸化 Akt の immunoblot とその定量
(b) In vitro 脱落膜分化誘導時に Akt1 を過剰発現させた時の *Dedd*^{+/-}細胞多核化の改善

でも DEDD によって Akt が安定化されていることを調べるため、妊娠5.5日目の子宮着床部位における Akt タンパク量を比較した。その結果、*Dedd*^{+/-}では *Dedd*^{+/+}より Akt レベルが低く、妊娠子宮で DEDD が Akt 安定化に働くことを確認した (図 4 a)。さらに in vitro で分化誘導中に Akt 発現ベクターを導入すると、*Dedd*^{+/-}由来細胞の多核化が大きく改善された (図 4 b)。DEDD による Akt タンパクの安定化・発現量維持が脱落膜の多核化に働くといえる。なお in vivo でも、Akt シグナル下流のタンパク質発現が脱落膜分化に関与すると推測している。

次に、脱落膜多核化に必須とされる cyclinD3 [9-11] について妊娠5.5日目の子宮で発現レベルを調べると、これも *Dedd*^{+/-}で減少していた (図 5 a)。しかし mRNA レベルには差がなかったことから、cyclinD3 に関してもタンパク質レベルの安定化機構が予想された。この確証を得るために in vitro の系でタンパク分解実験を行った (図 5 b)。薬剤処理によりタンパク合成を停止させると、

Dedd^{+/-}由来細胞では cyclinD3 の半減期が約60分と短くなっていた。ここにプロテアソームインヒビターを加えると cyclinD3 レベルは一定に保たれた。したがって DEDD が cyclinD3 に対してもタンパク質安定化に働くことが示された。Akt の場合と同様に、cyclinD3 の過剰発現によっても *Dedd*^{+/-}細胞の多核化が改善された (図 5 c)。

では、cyclinD3 に対して DEDD は直接相互作用することによって安定化させるのか。このことは、妊娠5.5日目の子宮タンパク質を用いた免疫共沈降実験によって示された (図 6 a)。また、DEDD は cyclinD3 だけでなく、これと複合体を形成する cdk4、cdk6 とも直接結合しうることを明らかにした。さらに in vitro の免疫共沈降実験で各相互作用の再現を得た (図 6 b)。すなわち DEDD は、cyclinD3-cdk4 複合体および cyclinD3-cdk6 複合体と結合することによって、脱落膜細胞の多核化に必要な細胞周期調節に関与していると推察できる。

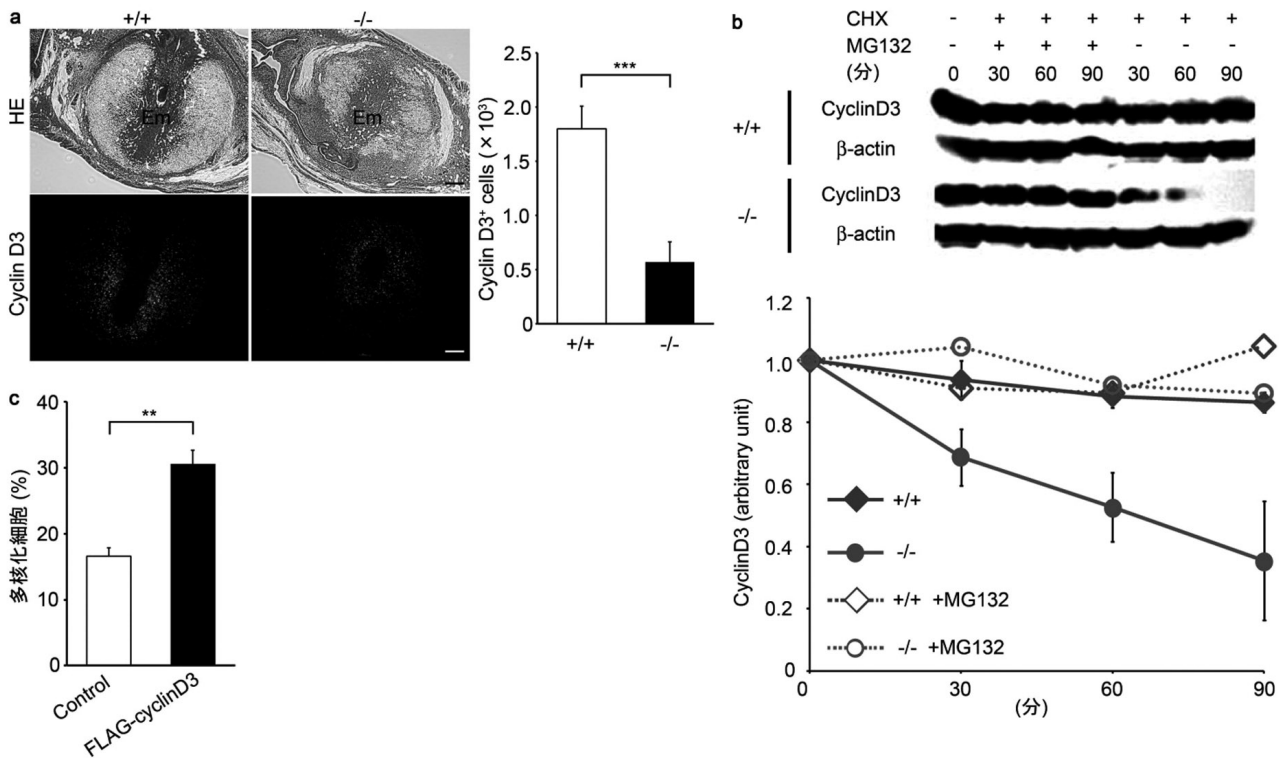


図5 CyclinD3分子の発現安定性と脱着膜多核化への関与
 (a) 妊娠5.5日目における免疫組織染色による cyclinD3発現量の比較定量
 (b) In vitro 脱着膜分化誘導3日目におけるタンパク質分解実験。CHX: cycloheximide, MG132: proteasome inhibitor
 (c) In vitro 脱着膜分化誘導時の cyclinD3過剰発現による *Dedd*⁺細胞の多核化改善

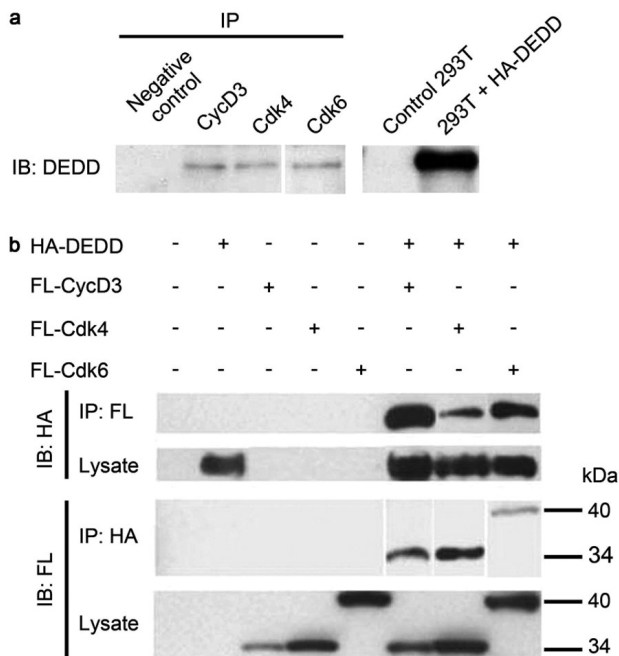


図6 DEDD と cyclinD3分子の免疫共沈降による結合実験
 (a) 妊娠5.5日目の子宮着床部位における cyclinD3, cdk4, cdk6 それぞれと DEDD 結合の検出
 (b) 293T 細胞に DEDD, cyclinD3, cdk4, cdk6を組み合わせるときの結合の検出

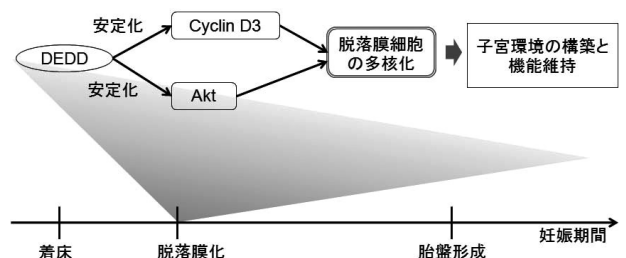


図7 初期妊娠における脱着膜分化・細胞多核化に DEDD が不可欠に働くメカニズム

おわりに

DEDD は, Akt と cyclinD3にそれぞれ直接結合してタンパク質レベルの安定性を維持し, それぞれの経路で脱着膜細胞の分化・多核化に寄与することが明らかとなった(図7). *Dedd*⁺マウスでは Akt と cyclinD3のタンパク質発現レベルがともに低下することにより, 脱着膜の成熟が十分ならず, 胚の発生を支持するに機能が不十分となって不妊の表現型を呈すると考えられる. われわれが示したのは, DEDD が胎盤形成前, 初期の妊娠維持

に非常に重要な因子であるということである。今後、女性不妊症患者を中心に子宮における妊娠時の DEDD 発現制御や遺伝子レベルの変異について解析すれば、診断・治療応用のターゲットとしても有用となるであろう。

謝 辞

本稿を執筆する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 敬先生、第15回日本生殖内分泌学会学術集会会長 並木幹夫先生、また本誌編集委員長 筒井和義先生に感謝申し上げます。

引用文献

1. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H (2004) Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 25, 341-373.
2. Tan Y, Li M, Cox S, Davis MK, Tawfik O, Paria BC, Das SK (2004) HB-EGF directs stromal cell polyploidy and decidualization via cyclin D3 during implantation. *Dev Biol* 265, 181-195.
3. Arai S, Miyake K, Voit R, Nemoto S, Wakeland EK, Grummt I, Miyazaki T (2007) Death-effector domain-containing protein DEDD is an inhibitor of mitotic Cdk1/cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 2289-2294.
4. Miyazaki T, Arai S (2007) Two distinct controls of mitotic cdk1/cyclin B1 activity requisite for cell growth prior to cell division. *Cell Cycle* 6, 1419-1425.
5. Kurabe N, Arai S, Nishijima A, Kubota N, Suizu F, Mori M, Kurokawa J, Kondo-Miyazaki M, Ide T, Murakami K, Miyake K, Ueki K, Koga H, Yatomi Y, Tashiro F, Noguchi M, Kadowaki T, Miyazaki T (2009) The death effector domain-containing DEDD supports S6K1 activity via preventing Cdk1-dependent inhibitory phosphorylation. *J Biol Chem* 284, 5050-5055.
6. Kurabe N, Mori M, Kurokawa J, Taniguchi K, Aoyama H, Atsuda K, Nishijima A, Odawara N, Harada S, Nakashima K, Arai S, Miyazaki T (2010) The death effector domain-containing DEDD forms a complex with Akt and Hsp90, and supports their stability. *Biochem Biophys Res Commun* 391, 1708-1713.
7. Mori M, Kitazume M, Ose R, Kurokawa J, Koga K, Osuga Y, Arai S, Miyazaki T (2011) Death effector domain-containing protein (DEDD) is required for uterine decidualization during early pregnancy in mice. *J Clin Invest* 121, 318-327.
8. Toyofuku A, Hara T, Taguchi T, Katsura Y, Ohama K, Kudo Y (2006) Cyclic and characteristic expression of phosphorylated Akt in human endometrium and decidual cells in vivo and in vitro. *Hum Reprod* 21, 1122-1128.
9. Tan J, Raja S, Davis MK, Tawfik O, Dey SK, Das SK (2002) Evidence for coordinated interaction of cyclin D3 with p21 and cdk6 in directing the development of uterine stromal cell decidualization and polyploidy during implantation. *Mech Dev* 111, 99-113.
10. Das SK (2010) Regional development of uterine decidualization: molecular signaling by Hoxa-10. *Mol Reprod Dev* 77, 387-396.
11. Das SK, Lim H, Paria BC, Dey SK (1999) Cyclin D3 in the mouse uterus is associated with the decidualization process during early pregnancy. *J Mol Endocrinol* 22, 91-101.