

BMP type II receptor (BMPR2) は着床後の妊娠維持に必須である

長島 隆^{1,2,3)}, Martin M. Matzuk³⁾, 丸山 哲夫¹⁾, 吉村 泰典¹⁾

1) 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

2) 稲城市立病院産婦人科

3) バイラー医科大学病理学教室

緒言

妊娠初期に開始される子宮内の脈管形成は、妊娠を維持・継続するために必要不可欠なイベントである。特に子宮内膜に存在するラセン動脈は、酸素と栄養素を胎児と胎盤に供給するため、血管壁を再構築し拡張させるリモデリングを行い、その血流量を増加させることが知られている [1]。一方、ラセン動脈のリモデリングは、母体の妊娠に対する適応プロセスの1つであり、正常な機能を有する胎盤を形成するために必須であると考えられている [2]。よって、このプロセスが障害されると胎児および胎盤への血流が減少し、子宮内胎児発育遅延や胎盤早期剥離などの妊娠関連疾患の原因になると考えられている [3, 4]。しかし、妊娠期間中における子宮内の脈管形成と、そのリモデリングに関するメカニズムは、未だ解明されていない。今回、われわれは、子宮内の BMPR2 (bone morphogenetic protein type2 receptor) が妊娠期間中の生理的变化に及ぼす影響について検討し、BMPR2がラセン動脈の脈管形成とリモデリングを制御していること、その機能不全の結果として子宮内胎児発育遅延と胎盤早期剥離が発生することを明らかにした。さらに、これら妊娠関連疾患の発生メカニズムについて検討した。

BMP 蛋白とその受容体 BMPR2に関する知見

BMP 蛋白は、TGF- β スーパーファミリーに属し、骨や軟骨の形成を促進する成長因子として発見され [5, 6]、のちに、多くの細胞機能に関与し、哺乳類の発生や多くの雌性生殖器の機能にも関与することが明らかにされた [7, 8]。そのシグナル伝達系は、BMP タンパクがセリ

ンスレオニンキナーゼである I 型受容体と II 型受容体により形成された 2 量体に結合することで開始され、リン酸化 SMAD1, SMAD3, および SMAD5 を介し、細胞のさまざまな内分泌機能を制御する [9]。一方、BMPR2 は BMP タンパクの II 型受容体の 1 つであり、近年、その変異と機能不全が肺高血圧症の原因であり、脈管形成に重要な因子であることが判明した [10]。しかし、BMPR2 の機能不全マウスは発生早期に胎生致死をきたすことから、生殖器官における BMPR2 の役割は不明であった [11, 12]。そこで今回、われわれは、胎生致死の問題を回避し、妊娠子宮における BMPR2 の機能を解明するため、BMPR2 を子宮特異的に欠損するノックアウト (*Bmpr2* cKO) マウスを作成し、BMPR2 欠損による妊孕性への影響、妊娠子宮に生じる構造的および機能的な変化、ならびにそのメカニズムを解析・検討した。

Bmpr2 cKO マウスでの子宮内胎児発育遅延と胎盤早期剥離の発生

Bmpr2^{flax/flax} マウスを *Bmpr2*^{+/+} マウスならびにプロゲステロン受容体 (PGR) と同じ分布で Cre を発現する *Pgr*^{cre/+} マウス [13] と交配させることにより *Bmpr2* cKO (*Bmpr2*^{flax/flax} *Pgr*^{cre/+}) マウスを作成し、その妊孕性を確認するため、妊孕性の確認された雄マウスとともに 6 ヶ月間同居させた。その結果、*Bmpr2* cKO マウスは 1 匹も産仔を得なかったことから、BMPR2 は妊娠に必須であることが判明した。そこで、妊娠期間中の異常に関して検討したところ、着床期および妊娠初期では異常を認めなかったが、胎生 9 日目から *Bmpr2* cKO マウスの着床部位で出血が始まり、次第に拡大していくことが確認された (図 1 A)。さらに、胎生 10 日目からは子宮内胎児発育不全もきたし、妊娠経過とともに増悪を示した (図 1 B)。最終的には、胎生 12 日目に胎盤早期剥離をきたし、胎児とともに胎盤組織が子宮から脱出した (図 1 C)。

連絡先：長島 隆、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番地
TEL : 03-3353-1211
FAX : 03-5363-3578
E-mail : CYJ03544@nifty.ne.jp

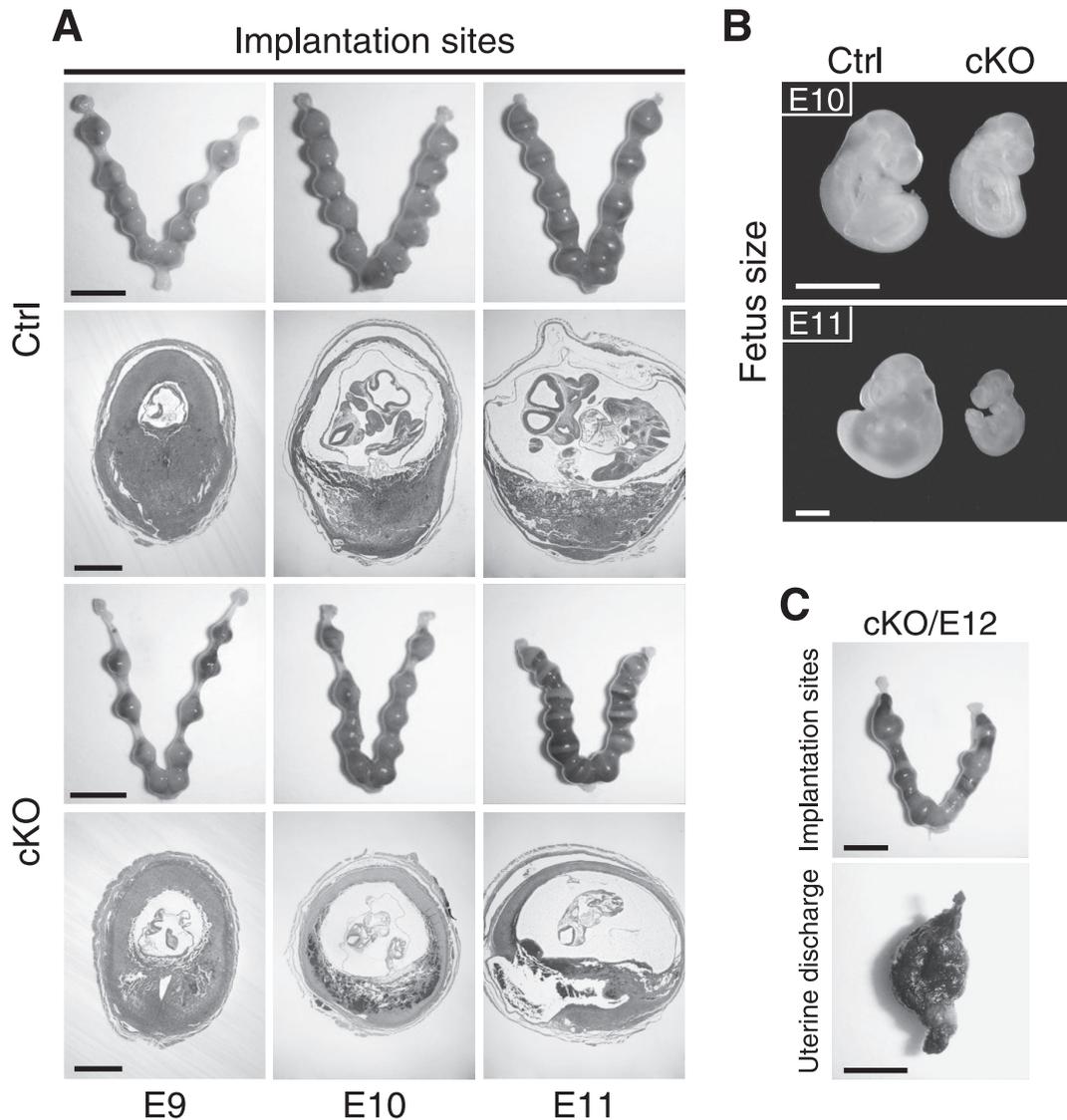


図1 *Bmpr2* cKO マウスで生じる子宮内胎児発育遅延, 着床部出血, および胎盤早期剥離.
 (A) 胎生9日目より発生する子宮内胎児発育遅延と着床部出血. Scale: 1 cm (妊娠子宮); 1 mm (組織断面).
 (B) 胎生10日目から顕著となる子宮内胎児発育遅延. Scale: 1 mm.
 (C) 胎生12日目で生じる胎盤早期剥離と脱出した妊娠部位. Scale: 1 cm (妊娠子宮); 5 mm (脱出した妊娠部位).
 <Nagashima T, et al, JCI 2013より引用>

絨毛膜細胞の子宮内膜への浸潤不全と脱落膜化細胞の細胞増殖の低下

一般的にマウスでは, 胎生8日目から9日目に, 胎児側の絨毛膜組織と妊娠のために形態および機能的に変化した母体側の子宮内膜組織(脱落膜化組織)との間で血管を構築するため, 絨毛膜細胞が子宮内膜組織へ浸潤していく. また, 浸潤した絨毛膜細胞は, ラセン動脈のなかに侵入し, その血管内皮細胞をリモデリングし拡張することで妊娠期間中の酸素と栄養素の需要量増大に対応している [1, 14]. そこで, 胎生8日目から9日目の妊娠子宮に関して検討したところ, *Bmpr2* cKO マウス

では, 着床部位での出血に一致して, 絨毛膜組織の1つである EPC (ectoplacental cone) の形成不全とそのマーカー遺伝子である *Cnr1* と *Faah* の転写レベルの低下に加え (図 2 A), 絨毛膜細胞の子宮内膜への浸潤不全とそのマーカー遺伝子である *Ptgs2* の転写レベルの低下を認めた (図 2 B). EPC と浸潤した絨毛膜細胞では, 著明な TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling) 染色陽性細胞の増加と (図 2 C), *Casp3* (*Caspase-3*) の転写レベルの上昇も認めた (図 2 D). 以上の結果より, 子宮内での *BMPR2* の欠損は, 絨毛膜細胞のアポトーシスを誘発し, その結果, EPC の形成不全と絨毛膜細胞の子宮内膜への浸潤を抑

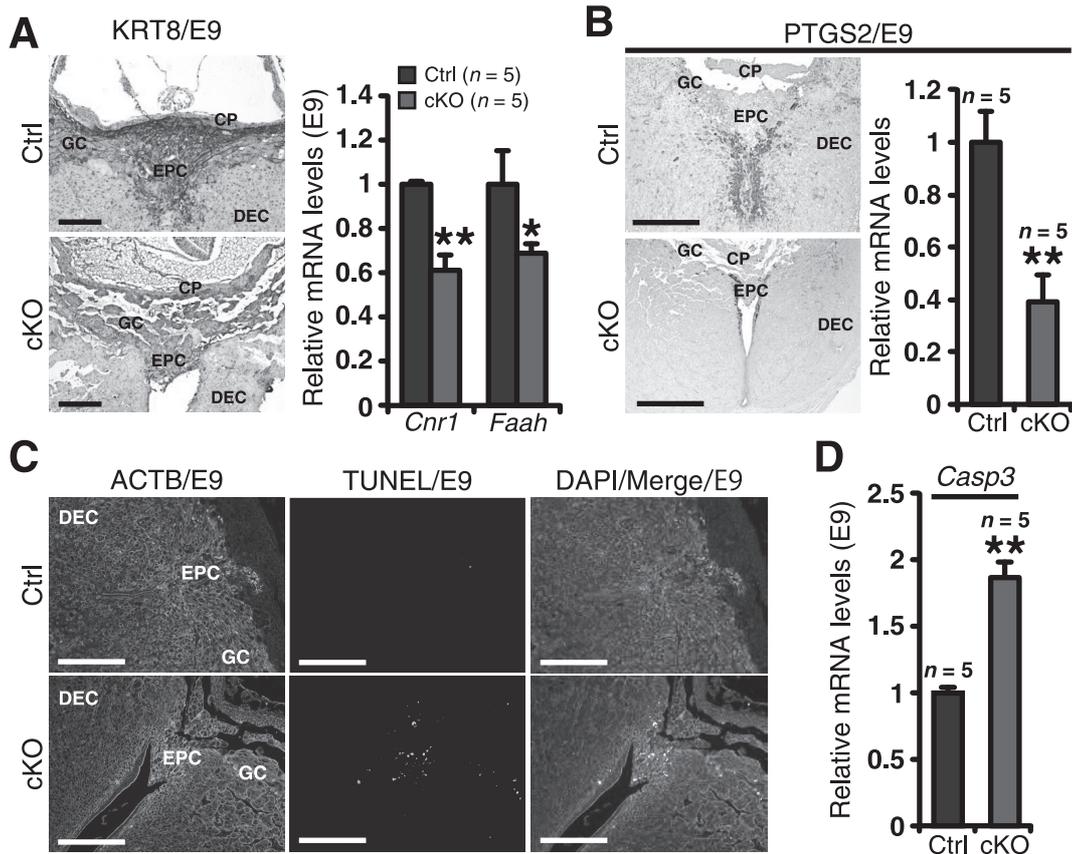


図2 *Bmpr2* cKO マウスにおける絨毛膜細胞の機能不全とアポトーシスの発生。
 (A) EPC (KRT8陽性細胞) の形成不全とマーカー遺伝子である *Cnr1* と *Faah* の転写レベルの低下。CP, chorionic plate; EPC, ectoplacental cone; GC, trophoblast giant cells; DEC, decidua. Scale: 200 μ m.
 (B) 絨毛膜細胞 (PTGS2陽性細胞) の子宮内膜への浸潤減少とマーカー遺伝子である *Ptgs2* の転写レベルの低下。Scale: 500 μ m.
 (C, D) EPC と浸潤した絨毛膜細胞における TUNEL 染色陽性細胞の増加と *Casp3* の転写レベルの増加。Scale: 500 μ m.
 <Nagashima T, et al, JCI2013より引用>

制させると考えられた。一方、脱落膜化細胞へと変化した子宮内膜細胞は、MKI67を標的とした免疫染色で著明な陽性細胞の減少を認め、細胞増殖が低下していた(図3A)。そこで細胞周期を検討した結果、S期およびG2期にある脱落膜化細胞の数が減少していたため(図3B)、G1期を制御する遺伝子を解析したところ、脱落膜化細胞でCCND3の発現が低下していた(図3C, D)。これらの結果から、子宮内でのBMPR2の欠損は、CCND3の発現低下により細胞周期の停滞をもたらし、脱落膜化細胞の細胞増殖も同時に低下させると考えられた。

子宮ラセン動脈の形成不全と拡張不全

続いて *Bmpr2* cKO マウスは着床部位で出血をきたすことから、血管内皮細胞を標的としたACTA2(α -smooth muscle actin)とPECAM1に対する免疫染色を行った。その結果、*Bmpr2* cKO マウスの子宮内膜では、ラセン

動脈のリモデリングが開始される胎生8日目から9日目において、著明な血管数の減少と血管径の縮小を認め、ラセン動脈の形成と拡張が抑制されていた(図4A, B)。さらに、血管内皮細胞の増殖刺激因子であり、脱落膜化における重要な血管形成因子である *Vegfs* [15, 16] のみならず(図4C)、血管の形成と安定化に加え、血管内皮細胞の遊走を制御している *Angpts* (Angiopoietins) [17-19] の転写レベルも、同時に低下していた(図4D)。これらの結果より、子宮内でのBMPR2の欠損は直接的、または間接的にVEGFとANGPTの発現低下をもたらし、子宮内膜における血管形成の低下とその後生じるリモデリングによるラセン動脈の拡張を抑制すると考えられた。

子宮特異的NK細胞の減少とCORINの分泌低下

一方、子宮特異的NK細胞は、VEGFの分泌源であり、

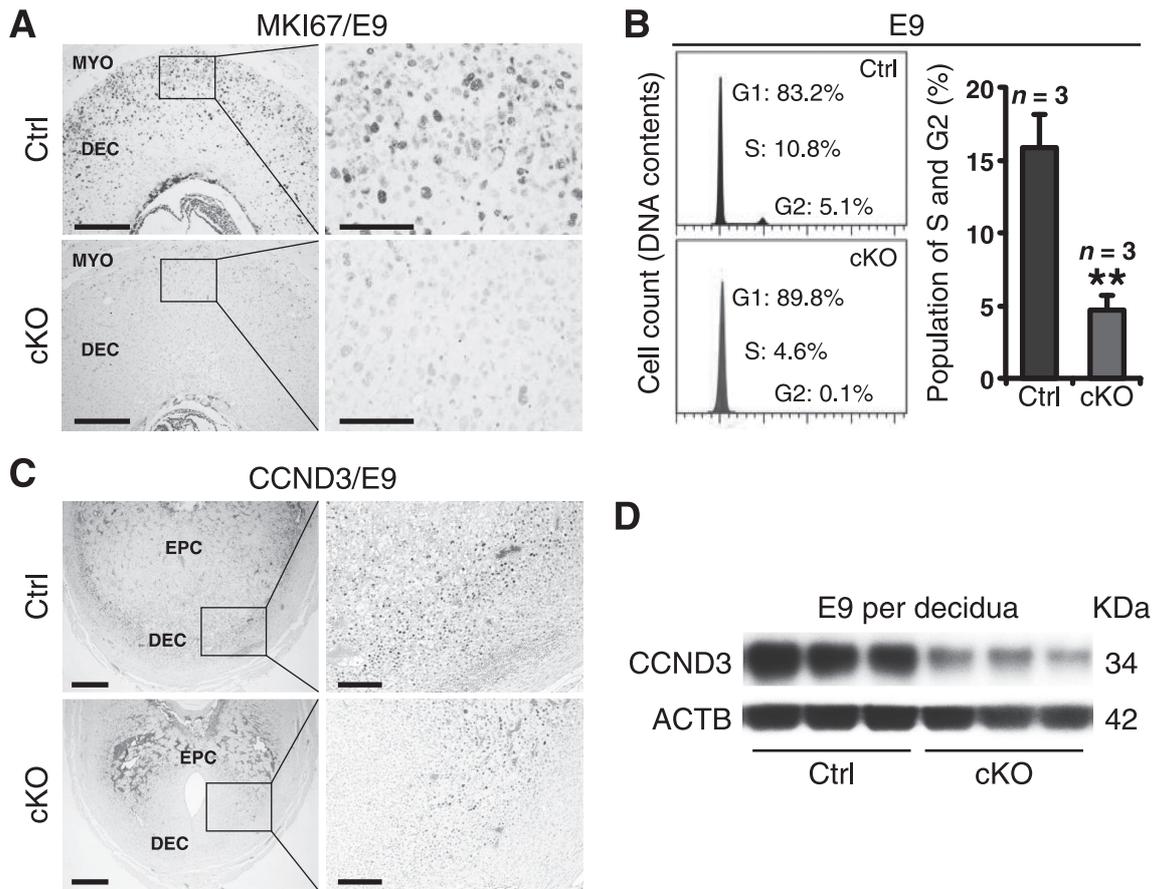


図3 *Bmpr2* cKO マウスにおける脱着膜化細胞の細胞増殖低下。
 (A) 細胞増殖の盛んな脱着膜化細胞 (MKI67陽性細胞) の減少。MYO, myometrium. Scale : 300 μ m (左) ; 100 μ m (右)。
 (B) 細胞周期 S 期および G2 期にある脱着膜化細胞の減少。
 (C, D) 細胞周期 G1 期を制御する CCND3 の脱着膜化細胞における発現低下。Scale : 500 μ m (左) ; 300 μ m (右)。
 <Nagashima T, et al, JCI 2013より引用>

ラセン動脈のリモデリングも制御していると考えられていることから [20, 21], 子宮特異的 NK 細胞を標的とした DBA (*Dolichos biflorus* agglutinin) 染色と PAS (Periodic acid-Schiff) 染色を行い, その細胞分布を検討した。その結果, *Bmpr2* cKO マウスの子宮内膜では, 子宮特異的 NK 細胞の数が著明に減少していた (図 5 A)。さらに, 子宮特異的 NK 細胞の分化を制御する脱着膜化細胞での *Prf1*, *Krg1*, *Il15*, *Il15r* の転写レベルも著明に低下していた (図 5 B)。一方, CORIN は, 心房性ナトリウム利尿ペプチドを活性化するプロテアーゼであり, 心臓以外にも妊娠子宮で発現していることが知られ, 絨毛膜細胞の子宮内膜への浸潤やラセン動脈のリモデリングに関与していると考えられている [22]。そこで, 脱着膜化細胞での CORIN 分泌に関して検討したところ, *Bmpr2* cKO マウスの子宮内膜で, その発現が著明に低下していた (図 5 C)。これらの結果から, *Bmpr2* cKO マウスで認めるラセン動脈の形成不全と拡張不全には, 子宮特異的 NK 細胞の分化を制御する因子の発現

低下と, それにより引き起こされる細胞数の減少ならびに脱着膜化細胞における CORIN の分泌低下も関与していると考えられた。

結 語

今回, われわれは, 妊娠子宮における BMPR2 の機能を解明するため, BMPR2 を子宮特異的に欠損するノックアウトマウスを作成し解析した。その結果, 子宮内の BMPR2 は, CCND3 の発現をコントロールすることで, 妊娠子宮の脱着膜化細胞の細胞増殖を制御していることが明らかとなった。さらに, 子宮内の BMPR2 は, VEGF と ANGPT の分泌を制御するだけでなく, 子宮特異的 NK 細胞の分化と CORIN の分泌を制御することで, ラセン動脈の形成と安定化, ならびにそのリモデリングと拡張をコントロールしていることが明らかとなった。よって, 子宮内の BMPR2 は, 子宮内膜の脱着膜化と妊娠期間中の母体胎児間の血管形成に関してきわめて重要

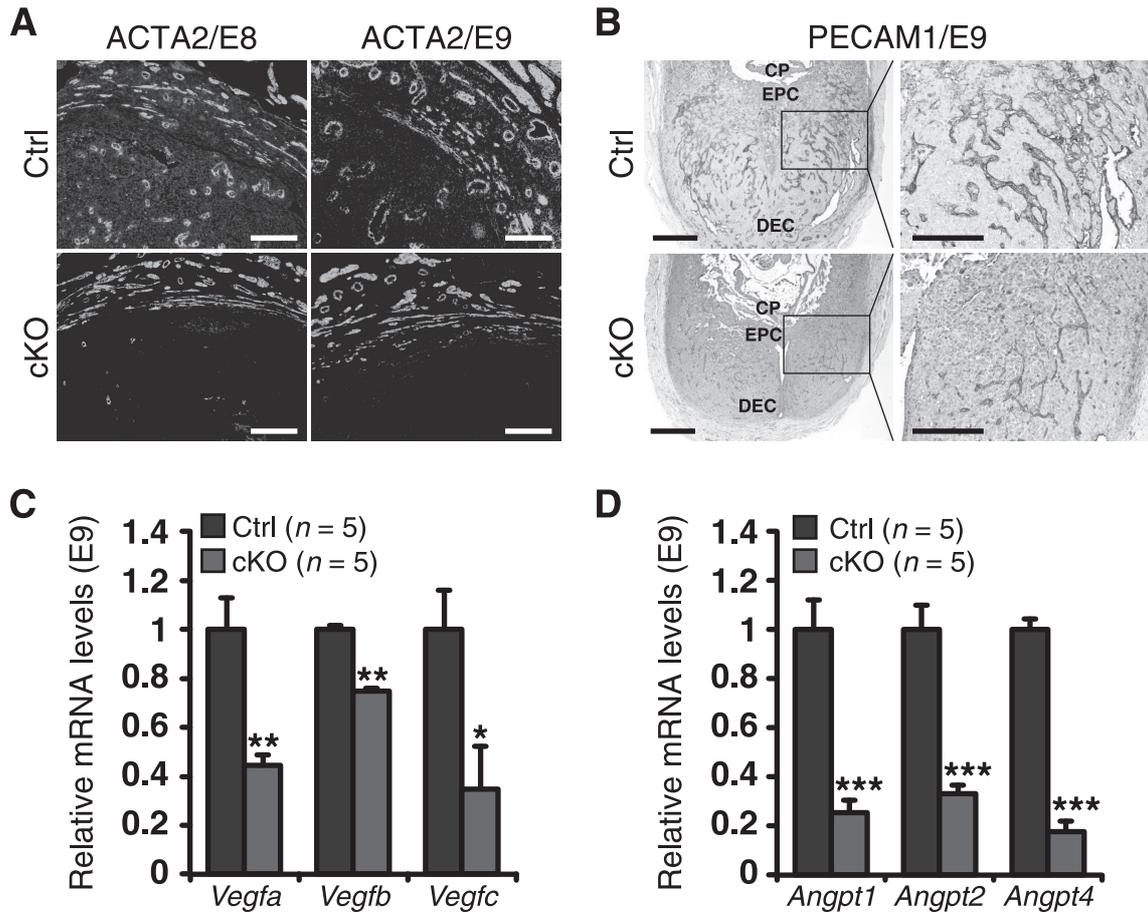


図4 *Bmpr2* cKO マウスでの子宮ラセン動脈の形成不全と拡張不全。
 (A) ラセン動脈 (ACTA2陽性細胞) の形成不全。 Scale: 200 μ m。
 (B) ラセン動脈 (PECAM1陽性細胞) の拡張不全。 Scale: 500 μ m。
 (C, D) 血管内皮制御因子である *Vegfs* と *Angpts* の子宮内膜における転写レベルの低下。
 <Nagashima T, et al, JCI 2013より引用>

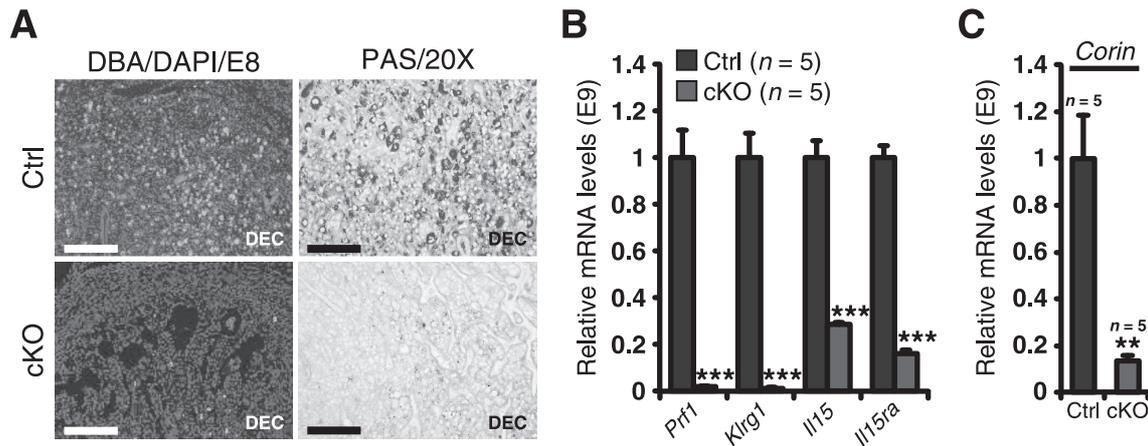


図5 *Bmpr2* cKO での子宮特異的NK細胞の減少とCORINの分泌低下。
 (A) 子宮特異的NK細胞 (DBA染色陽性細胞ならびにPAS染色陽性細胞) の減少。 Scale: 200 μ m。
 (B) 子宮内膜における子宮特異的NK細胞の分化制御因子の低下。
 (C) *Corin* の子宮内膜における転写レベルの低下。
 <Nagashima T, et al, JCI 2013より引用>

であり、その機能破綻の結果として子宮内胎児発育遅延や胎盤早期剥離の発生が考えられた。本研究にて妊娠期間中の脈管形成に対する BMPR2 の中心的役割が明らかとなり、今後の妊娠関連疾患に対する新たな治療戦略として、BMPR2 を介したシグナル伝達系を標的とする遺伝子治療や分子標的治療の可能性が示唆された。

謝 辞

本稿は平成25年度日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞した研究内容をまとめたものである。本稿を執筆する機会を与えていただきました日本生殖内分泌学会理事長 苛原 稔教授、第18回学術集會会長 緒方 勤教授、ならびに本誌編集委員長 筒井和義教授に心から感謝申し上げます。

引用文献

- Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ (2002) Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 23, 3-19.
- Pijnenborg R, Vercruyse L, Hanssens M (2006) The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 27, 939-958.
- Ball E, Bulmer JN, Ayis S, et al (2006) Late sporadic miscarriage is associated with abnormalities in spiral artery transformation and trophoblast invasion. *The Journal of pathology* 208, 535-542.
- Kaufmann P, Black S, Huppertz B (2003) Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 69, 1-7.
- Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, et al (1992) Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem* 267, 20352-20362.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242, 1528-1534.
- Hogan, BL (1996) Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10, 1580-1594.
- Matzuk MM, Lamb DJ (2008) The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Medicine* 14, 1197-1213.
- Chang H, Brown CW, Matzuk MM (2002) Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 23, 787-823.
- Lane KB, Machado RD, Pauculo MW, et al (2000) Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat Genet* 26, 81-84.
- Beppu H, Kawabata M, Hamamoto T, et al (2000) BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev Biol* 221, 249-258.
- Delot EC, Bahamonde ME, Zhao M, et al (2003) BMP signaling is required for septation of the outflow tract of the mammalian heart. *Development* 130, 209-220.
- Soyal SM, Mukherjee A, Lee KY, et al (2005) Cre-mediated recombination in cell lineages that express the progesterone receptor. *Genesis* 41, 58-66.
- Charalambous F, Elia A, Georgiades P (2012) Decidual spiral artery remodeling during early post-implantation period in mice: investigation of associations with decidual uNK cells and invasive trophoblast. *Biochem Biophys Res Commun* 417, 847-852.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, et al (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442.
- Halder JB, Zhao X, Soker S, et al (2000) Differential expression of VEGF isoforms and VEGF (164)-specific receptor neuropilin-1 in the mouse uterus suggests a role for VEGF (164) in vascular permeability and angiogenesis during implantation. *Genesis* 26, 213-224.
- Gale NW, Thurston G, Hackett SF, et al (2002) Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* 3, 411-423.
- Lee HJ, Cho CH, Hwang SJ, et al (2004) Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4. *FASEB J* 18, 1200-1208.
- Suri C, Jones PF, Patan S, et al (1996) Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87, 1171-1180.
- Chakraborty D, Rumi MA, Konno T, et al (2011) Natural killer cells direct hemochorial placentation by regulating hypoxia-inducible factor dependent trophoblast lineage decisions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16295-16300.
- Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, et al (2006) Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature Medicine* 12, 1065-1074.
- Cui Y, Wang W, Dong N, et al (2012) Role of corin in trophoblast invasion and uterine spiral artery remodelling in pregnancy. *Nature* 484, 246-250.