

ラット子宮間質細胞の脱落膜化における Calreticulin の役割

吉江 幹浩, 草間 和哉, 田村 和広, 山崎梨沙香, 立川 英一

東京薬科大学薬学部内分泌・神経薬理学教室

はじめに

着床は、受精卵の胞胚（胚盤胞）への正常な発育とそれに協調した子宮側の受け入れ準備（胞胚受容能の獲得）の完了とともに着床ウィンドウと呼ばれる限られた期間内で起こる [1]。着床部位では、血管透過性の高進、胎盤形成の基盤となる内膜間質細胞の脱落膜化といったダイナミックな変化が起こる。ラットやマウスなどの齧歯類では、着床胚を取り囲む子宮間質細胞が増殖・分化し、脱落膜が形成される。これら妊娠の成立に不可欠な胞胚受容能の獲得、着床、ならびに脱落膜化は、卵巣ステロイドホルモンの作用により厳密に調節されている。これまでに、さまざまな遺伝子改変動物を用いた解析から着床や脱落膜化に関わる多数の因子が明らかとなっている [2]。その一方、ヒトにおける着床や脱落膜化の詳細な分子メカニズムは、ヒト妊卵を取り扱う倫理的問題や動物種による脱落膜と胎盤の形成プロセスの種差により、依然として不明な点が多い。妊娠の原点である着床とその周辺時期に起こる子宮内の変化を調節している分子機構を解明することは、その生理学的現象の理解だけでなく、新たな不妊治療法の進歩といった臨床的ニーズにも結びつく可能性がある。

われわれは、これまでにヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化に関わる細胞内シグナル伝達機構に着目し、細胞内セカンドメッセンジャーである cyclic adenosine monophosphate (cAMP) を介するシグナル伝達経路の新たな仲介因子として Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) の重要性を報告してきた [3]。一連の研究では、Epac サブタイプのうち Epac2 をノックダウンした際に発現が著しく減少するタンパク質として Calreticulin を同定し、培養ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化や腺細胞の成熟における役割を明らかにした [4, 5]。Calreticulin は、レクチン様シャペロンタンパク質として知られており、主に小胞体内の新生糖タンパク質

の品質管理や細胞内カルシウムイオン濃度の恒常性維持に関与する [6]。また、Calreticulin は、小胞体以外にも存在しており、細胞接着、免疫反応にも関わり、その機能は多岐にわたる [7, 8]。本研究では、ラット着床周辺期子宮における Calreticulin の発現解析を行い、特に子宮間質細胞の脱落膜化における役割について検討した。

着床周辺期の子宮における Calreticulin の発現

ラットでは、交配後、膣栓が確認された日を妊娠 1 日目とすると、受精卵は妊娠 5 日目までに胞胚となり、この日の深夜に起こる着床に不可欠な卵巣からの少量の E2 サージにより胞胚と子宮内膜は活性化され、通常妊娠 6 日目に着床する。本研究では Wistar-今道系ラットを用い、着床前の妊娠 3、5 日目と着床後の妊娠 7、9 日目の子宮における Calreticulin の発現・局在を調べた (図 1)。子宮内 Calreticulin タンパク質の発現量は、着床前と比較して着床後の妊娠 9 日目に顕著に増加した (図 1 A)。また、各妊娠日における局在を検討したところ、妊娠 3、5 日目の子宮では、主に腺上皮、管腔上皮細胞に Calreticulin が発現していたのに対し、着床後の妊娠 7、9 日目では着床胚を取り囲む脱落膜細胞に強い発現がみられた (図 1 B)。

着床遅延子宮における Calreticulin 発現

妊娠子宮において着床後に Calreticulin の発現上昇がみられたため、着床と Calreticulin の発現との関係について着床遅延モデルを用いて検討した (図 2)。このモデルでは、妊娠 4 日目に卵巣摘除 (OVX) した後、プロゲステロン (P4, 3 mg/day) を数日間、連日投与することにより、着床を人為的に遅延させ、さらに 17 β -エストラジオール (E2, 500ng) の投与により任意に着床を誘起することができる [9]。OVX のみを行った対照群 (Control) と OVX ラットに P4 を連日投与した群 (OVX + P4, 着床遅延状態) では、腺上皮と管腔上皮細胞で Calreticulin の発現が確認された (図 2 A, B)。一方、P4

連絡先：吉江幹浩, 東京薬科大学薬学部内分泌・神経薬理学教室

〒192-0392 東京都八王子市堀之内1432-1

TEL/FAX : 042-676-4536

E-mail : yoshie@toyaku.ac.jp

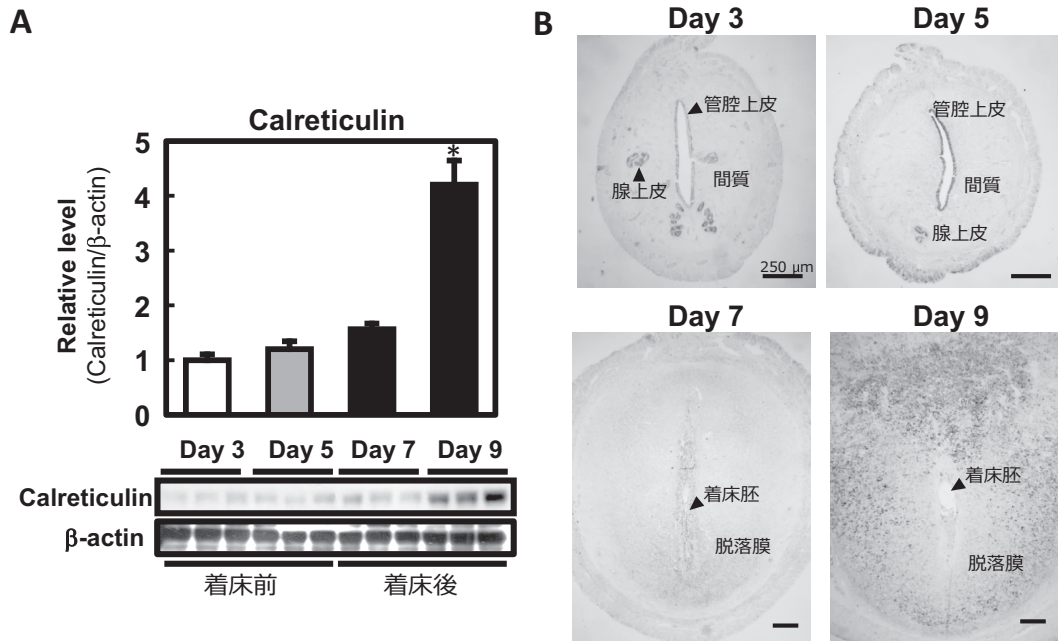


図1 ラット着床周辺期子宮における Calreticulin の発現
 (A) 妊娠3, 5, 7, 9日における子宮内 Calreticulin 発現(ウェスタンブロット, デンシトメトリー解析). * $p < 0.01$ (vs. Day 3).
 (B) 各妊娠日における Calreticulin の免疫染色像.

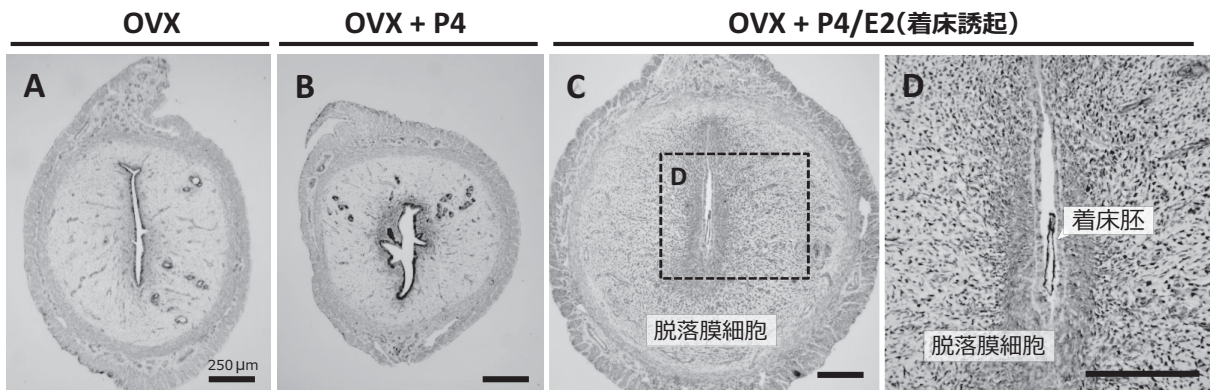


図2 着床遅延モデルを用いた Calreticulin 発現の解析
 交配後, 妊娠4日目に卵巣切除術(OVX)を行い, プロゲステロン(P4; 3 mg/day)を連日投与(妊娠4~10日目)し, 着床遅延状態とした. 着床を誘起するため, 17β エストラジオール(E2; 500ng)を妊娠8日目に投与した. 妊娠10日目に子宮を回収し, Calreticulin の免疫組織染色を行った.
 (A) OVXのみ.
 (B) OVX後, P4を連日投与(着床遅延状態の子宮).
 (C) OVX後, P4を連日投与し, さらにE2を投与(着床を誘起した子宮).
 (D) 図Cの拡大図.

連日投与後, E2を投与して着床を誘起した群(OVX+P4/E2)では, 着床胚を取り囲む脱落膜細胞で Calreticulin の明らかな発現がみられた. このことから, 妊娠子宮において Calreticulin は, 卵巣ステロイドの制御下で起こる胞胚の着床が起点となり, その発現が増加することが判明した.

Calreticulin 発現に対する卵巣ステロイドの効果

通常の妊娠時や着床遅延状態から E2投与により着床を誘導した子宮において Calreticulin 発現の亢進が認められたが, 卵巣ステロイドが直接的にその発現上昇に関与している可能性もある. そこで, 妊娠していないラットを OVX し, 内因性の卵巣ステロイドを消失させた状

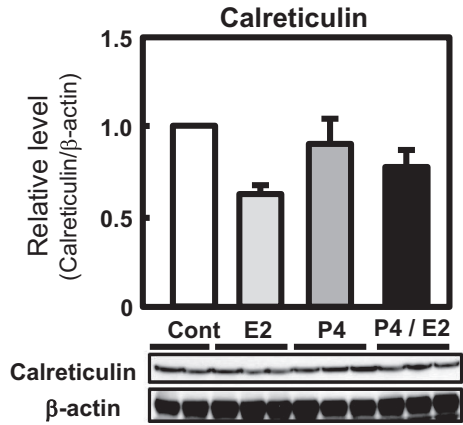


図3 Calreticulin 発現に対する卵巣ステロイドの効果
非妊娠ラットを OVX し、術後2週間目から P4 (3 mg) を3日間連日投与し、E₂ (500ng) を単回投与した。3日間の P4 だけを連日投与した群と E₂ のみを単回投与した群も設けた。投与3日目から24時間後に子宮を摘出し、Calreticulin のタンパク質発現を解析した (ウエスタンブロット, デンシトメトリー解析)。

況下で、上記実験と同用量の P4 と E₂ を単独または共処置し、Calreticulin 発現に対する影響を検討した (図3)。Calreticulin の発現量は、E₂ 単独投与でやや減少する傾向であったが統計的な有意差はなく、また、P4 単独、E₂ /P4 併用投与も Calreticulin の発現に影響を及ぼさなかった (図3)。よって、着床には卵巣ステロイドの作

用が必須であるものの、着床後に起こる Calreticulin 発現への直接的な卵巣ステロイドの関与は否定された。

偽妊娠ラットの人為的脱落膜化における Calreticulin 発現

次に、われわれは、着床に伴って起こる子宮間質細胞の脱落膜化と Calreticulin 発現との関係について人為的脱落膜化モデルを用いて検討した (図4)。これは、精管結紮した雄との交配により偽妊娠ラットを作製し、胞胚受容能を獲得した偽妊娠5日目の子宮にゴマ油を注入することで、胞胚の非存在下で脱落膜化を誘導することができるモデルである [10]。偽妊娠5日目にゴマ油 (図中 Oil) を注入し、48時間経過した子宮角では、Calreticulin の顕著な発現が脱落膜細胞でみられ (図4A)、その発現量は、ゴマ油を処置していない対照群に比べ有意に高かった (図4B)。これらの結果から、着床部位における Calreticulin 発現の上昇と子宮間質細胞の脱落膜化が密接に関連していることがさらに示された。

子宮間質細胞の *in vitro* 脱落膜化における Calreticulin の役割

着床部位で発現が亢進する Calreticulin の機能につい

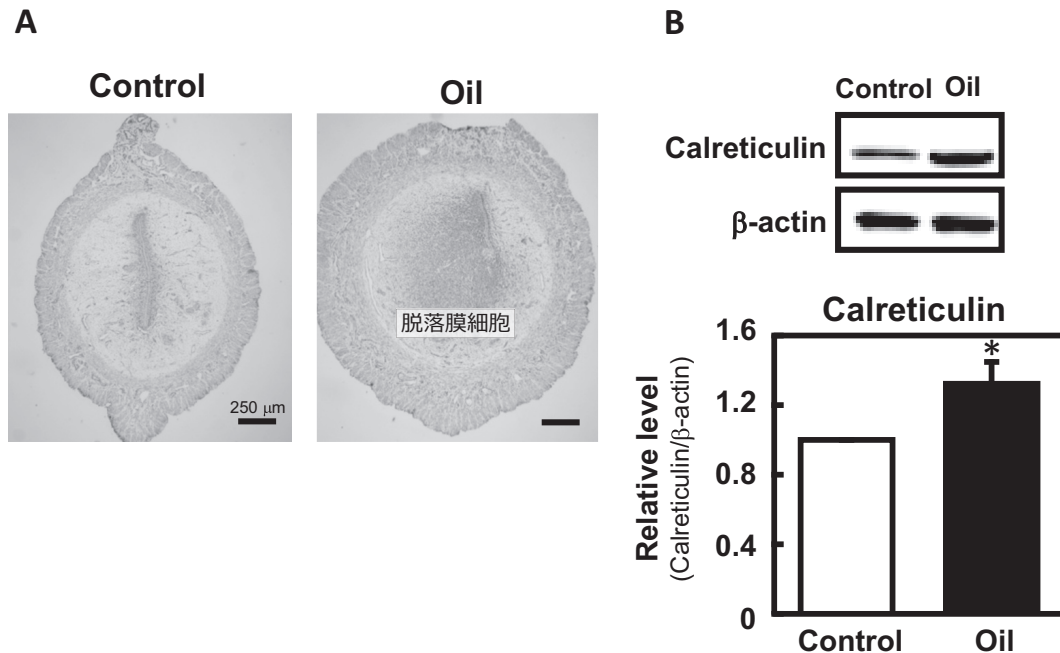


図4 人為的脱落膜化誘導モデルを用いた Calreticulin 発現の解析
偽妊娠5日目の子宮 (片子宮角) にゴマ油 (Oil) を注入し、脱落膜化を誘導した。Oil 注入後、2日目に子宮を回収した。なお、片方の子宮角はオイルを処置しない Control とした。
(A) Calreticulin の免疫組織染色像。
(B) ウエスタンブロット, デンシトメトリー解析。*p<0.05。

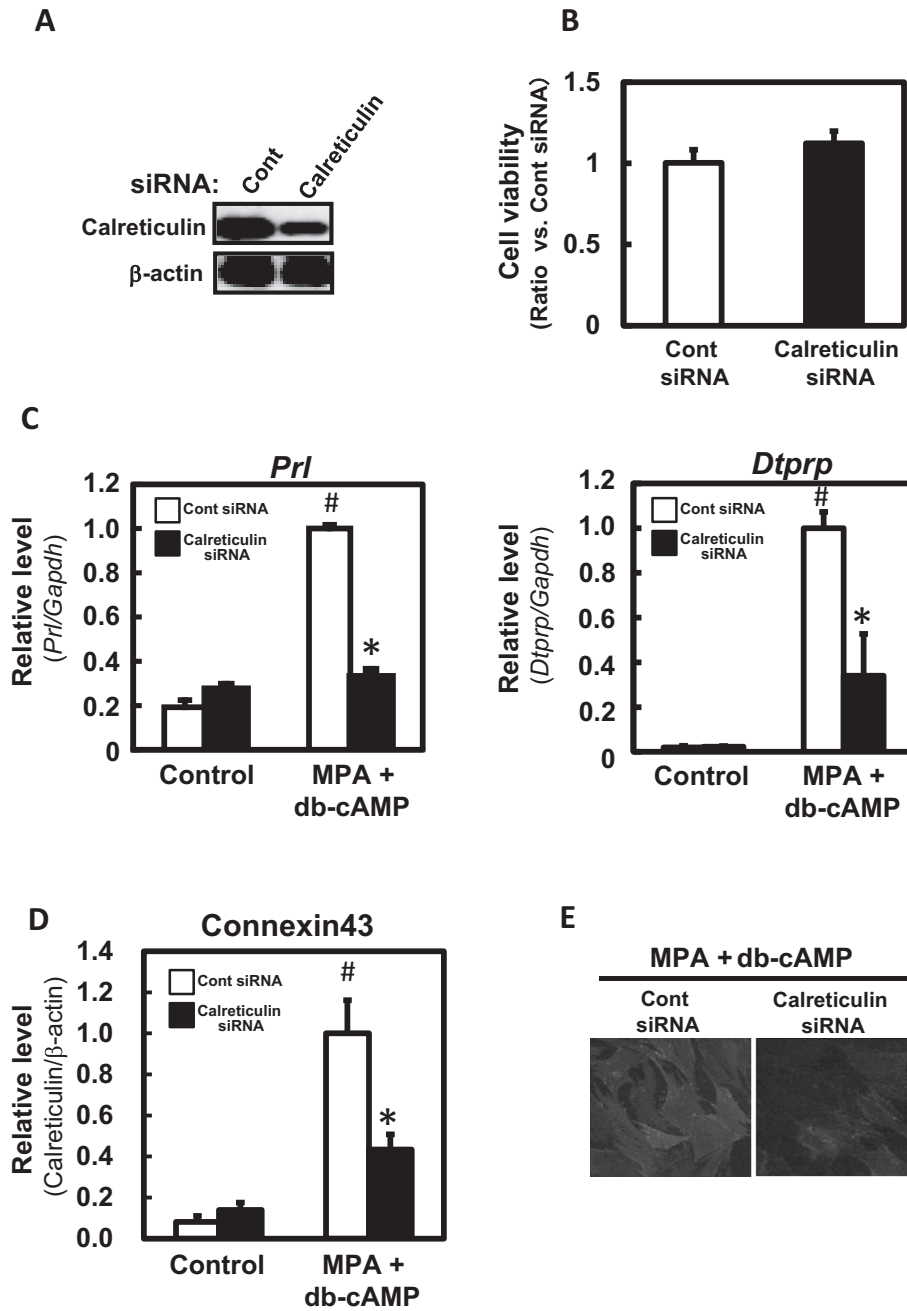


図5 培養子宮間質細胞の *in vitro* 脱落膜化における Calreticulin の役割
 ラット子宮より単離した間質細胞に Calreticulin siRNA をトランスフェクションし、酢酸メドロキシプロゲステロン (MPA; 100nM) とジブチリル cAMP (db-cAMP; 0.5mM) を2日間処置した。
 (A) siRNA 導入細胞における Calreticulin タンパク質発現。
 (B) 細胞生存率。
 (C) 脱落膜化マーカーの発現 (リアルタイム RT-PCR)。* $p < 0.01$ vs. Cont siRNA (Cont), * $p < 0.01$ vs. Cont siRNA (MPA+db-cAMP)
 (D, E) コネキシン43の発現

て検討するため、ラットより単離した子宮間質細胞に Calreticulin siRNA を導入した。siRNA の導入により Calreticulin タンパク質の発現量が減弱すること (図 5 A) を確認した。また、Calreticulin 発現のノックダウンは、本実験期間内において子宮間質細胞の生存率には影響し

なかった (図 5 B)。Calreticulin 発現を siRNA にてノックダウンした後、脱落膜化刺激として酢酸メドロキシプロゲステロン (MPA) と cAMP アナログ (ジブチリル cAMP) を共処置し2日間培養後、脱落膜マーカーであるプロラクチン (*Prl*) [11] と *decidual/trophoblast prolac-*

tin-related protein (Dtprp) [12] の mRNA 発現を調べた。その結果、対照群 (Cont siRNA) でみられる脱落膜化刺激による *Prl* と *Dtprp* の mRNA 発現の上昇が、Calreticulin 発現のノックダウンにより有意に抑制された (図 5 C)。次に、細胞間ギャップジャンクションの構成因子であり脱落膜の形成に関わるコネキシン43 (Cx43) の発現について検討した。マウス子宮間質細胞において Cx43 発現をノックアウトすると、ギャップジャンクションの崩壊による脱落膜組織内での血管形成が阻害され脱落膜化に異常をきたすことやヒト子宮内膜間質細胞での Cx43 発現の脱落膜化への関与 [13] が報告されている。ラット子宮間質細胞に MPA とジブチリル cAMP を処置すると対照群では、Cx43 タンパク質の発現上昇が起こったが、Calreticulin のノックダウンは、これを抑制した (図 5 D)。さらに、ギャップジャンクションの形成を示す細胞膜への Cx43 の斑点状集積も Calreticulin のノックダウンにより阻害された (図 5 E)。このことから、着床後の子宮間質細胞で発現が亢進する Calreticulin は、Cx43 の発現を介して脱落膜化細胞への分化誘導に関与することが示唆された。

おわりに

本研究では、ラット着床周辺期子宮における Calreticulin の発現と子宮間質細胞の脱落膜化における役割について検討し、1) 妊娠子宮において Calreticulin は着床部位で発現が増加すること、2) 胞胚の有無にかかわらず脱落膜化に伴い発現が誘導されること、3) 培養子宮間質細胞の Calreticulin 発現を抑制すると *in vitro* 脱落膜化が阻害されることを明らかにした。ラットで見られた着床部位 (脱落膜) における Calreticulin 発現の増加が、ヒトの脱落膜でもみられるのかについては不明であるが、ヒトの子宮内膜腺細胞と間質細胞における Calreticulin の発現していること、オナガザルでは、非妊娠子宮や妊娠子宮の非着床部位と比較して着床部位で Calreticulin が高発現していることが報告されている [14]。また、マウスでは、着床周辺部位で発現が増加すること、Calreticulin のアンチセンスオリゴ DNA を子宮内に投与すると着床が阻害されることが報告されている [15]。この報告は、Calreticulin と着床との関係を推察するものである。われわれは、ヒト子宮内膜腺上皮細胞株を用いて、着床関連因子として知られる白血病抑制因子 (LIF) [16, 17] とシクロオキシゲナーゼ 2 [18] の発現に *Epac2* を介した Calreticulin 発現が関与することを報告した [5]。ラットにおいても着床前の子宮では

子宮上皮細胞に強い Calreticulin 発現がみられたが、詳細な着床機構における Calreticulin の役割については、今後のさらなる検討が必要である。

今回、われわれは、着床後に起こる間質細胞の脱落膜化とともに発現が増加する Calreticulin が、脱落膜細胞への分化に重要な役割を担うことを明らかとした。Calreticulin 発現の抑制がどのように脱落膜マーカーの発現誘導を阻害したのか、そのメカニズムについては現在、検討中であるが、興味深いことに Cx43 発現は、Calreticulin のノックダウンにより減弱した。Calreticulin 欠損マウスの線維芽細胞では、Cx43 発現量が低下していることが報告されており [19]、今回の結果とも合致する。ホメオボックス遺伝子の *Hoxa10* は、子宮内膜の発達や胞胚受容能に関する転写因子である [20]。Hoxa10 欠損マウスは着床と脱落膜化が阻害されて不妊となるが、*Hoxa10* 欠損マウスの子宮間質細胞において Calreticulin 発現が減少している [21]。これらの知見は Calreticulin の脱落膜化における役割の重要性を支持する知見である。その一方、これまで報告されてきた Calreticulin の小胞体シャペロン機能、カルシウムイオンの恒常性維持、細胞接着、免疫機能など多彩な役割と脱落膜化との関連性についても明らかにしていきたいと考えている。

以上、本研究によりラット妊娠初期子宮において着床後の内膜間質細胞で発現が亢進する Calreticulin が、脱落膜形成過程に関与する因子であることが示唆された。

謝辞

本稿は、平成26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くださいました日本生殖内分泌学会理事長 青原 稔教授、第19回学術集會会長 北脇 城教授、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

1. Dey SK (1996) Implantation. Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z (eds) Reproductive endocrinology, surgery and technology, Lippincott-Raven Publishers, New York, pp. 421-431.
2. Cha J, Sun X, Dey SK (2012) Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. Nat Med. 18, 1754-1767.
3. Kusama K, Yoshie M, Tamura K, Kodaka Y, Hirata A, Sakurai T, Bai H, Imakawa K, Nishi H, Isaka K, Nagai T, Nagao T, Tachikawa E (2013) Regulation of decidualization in human endometrial stromal cells through exchange protein directly activated by cyclic AMP (*Epac*). Placenta 34,

- 212-221.
4. Kusama K, Yoshie M, Tamura K, Nakayama T, Nishi H, Isaka K, Tachikawa E (2014) The role of exchange protein directly activated by cyclic AMP 2-mediated calreticulin expression in the decidualization of human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 155, 240-248.
 5. Kusama K, Yoshie M, Tamura K, Imakawa K, Tachikawa E (2015) EPAC2-mediated calreticulin regulates LIF and COX2 expression in human endometrial glandular cells. *J Mol Endocrinol* 54, 17-24.
 6. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M (2009) Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 417, 651-666.
 7. Ihara Y, Inai Y, Ikezaki M (2011) Alteration of integrin-dependent adhesion and signaling in EMT-like MDCK cells established through overexpression of calreticulin. *J Cell Biochem* 112, 2518-2528.
 8. Gold LI, Eggleton P, Sweetwyne MT, Van Duyn LB, Greives MR, Naylor SM, Michalak M, Murphy-Ullrich JE (2010) Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J* 24, 665-683.
 9. Kusama K, Yoshie M, Tamura K, Daikoku T, Takarada T, Tachikawa E (2014) Possible roles of the cAMP-mediators EPAC and RAP1 in decidualization of rat uterus. *Reproduction* 147, 897-906.
 10. Abrahamsohn PA, Zorn TM (1993) Implantation and decidualization in rodents. *J Exp Zool* 266, 603-628.
 11. Soares MJ (2004) The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. *Reprod Biol Endocrinol* 2, 51.
 12. Roby KF, Deb S, Gibori G, Szpirer C, Levan G, Kwok SC, Soares MJ (1993) Decidual prolactin-related protein. Identification, molecular cloning, and characterization. *J Biol Chem* 268, 3136-3142.
 13. Laws MJ, Taylor RN, Sidell N, DeMayo FJ, Lydon JP, Gutstein DE, Bagchi MK, Bagchi IC (2008) Gap junction communication between uterine stromal cells plays a critical role in pregnancy-associated neovascularization and embryo survival. *Development* 135, 2659-2668.
 14. Parmar T, Nimbkar-Joshi S, Katkam RR, Gadkar-Sable S, Chaudhari U, Manjramkar DD, Savardekar L, Jacob S, Puri CP, Sachdeva G (2009) Differential expression of calreticulin, a reticuloplasm in primate endometrium. *Hum Reprod* 24, 2205-2216.
 15. Cheng SQ, He JL, Dong YL, Liu XQ, Ding YB, Gao RF, Tan Y, Ye Q, Tian ZL, Wang YX (2009) Characterization of calreticulin expression in mouse endometrium during embryo implantation. *Biol Res* 42, 505-516.
 16. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, Abbondanzo SJ (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* 359, 76-79.
 17. Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L, Stewart CL (2000) Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology* 141, 4365-4372.
 18. Matsumoto H, Ma WG, Daikoku T, Zhao X, Paria BC, Das SK, Trzaskos JM, Dey SK (2002) Cyclooxygenase-2 differentially directs uterine angiogenesis during implantation in mice. *J Biol Chem* 277, 29260-29267.
 19. Groenendyk J, Michalak M (2014) Disrupted WNT signaling in mouse embryonic stem cells in the absence of calreticulin. *Stem Cell Rev* 10, 191-206.
 20. Benson GV, Lim H, Paria BC, Satokata I, Dey SK, Maas RL (1996) Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development* 122, 2687-2696.
 21. Daikoku T, Tranguch S, Friedman DB, Das SK, Smith DF, Dey SK (2005) Proteomic analysis identifies immunophilin FK506 binding protein 4 (FKBP52) as a downstream target of Hoxa10 in the periimplantation mouse uterus. *Mol Endocrinol* 19, 683-697.