

マウス胚着床前後の子宮内膜における LIF 受容体の局在変化とその機能解析

並木 貴文¹⁾, 唐釜 春実¹⁾, 中村さくら¹⁾, 大友 茉奈¹⁾, 須山あゆみ¹⁾, 寺川 純平²⁾, 大黒多希子³⁾, 影山 敦子¹⁾, 長谷川嘉則⁴⁾, 小原 収¹⁾, 伊藤 潤哉^{1,5)}, 柏崎 直巳¹⁾

- 1) 麻布大学獣医学部動物繁殖学研究室
- 2) 麻布大学獣医学部比較毒性学研究室
- 3) 金沢大学疾患モデル総合研究センター
- 4) かずさ DNA 研究所
- 5) 麻布大学ヒトと動物の共生科学センター

はじめに

マウスやヒトを含む哺乳類において、体外受精や顕微授精等の技術を用いて作製した受精卵（胚）の産子への発育率は約20–60%といわれる¹⁾。すなわち、母体へ移植された胚の約40–80%は分娩に至らない。このことから、さらなる妊娠率向上のためには、良質な胚を作製するだけでなく、母体の妊娠に最適な環境を整えることで、妊娠初期の早期胚死滅を予防し、家畜および実験動物の効率的生産、さらにはヒト生殖補助医療を改善できると考えられる。

マウスでは、卵巣から17β-エストラジオール（E2）が分泌され、そのE2の下流因子である白血病抑制因子（LIF）が、子宮上皮のLIF受容体（LIF receptor [LIFR] /interleukin 6 cytokine family signal transducer [IL6ST; Gp130])を介して胚着床を誘導する。先行研究において、子宮全体(子宮上皮、間質および筋層)でGp130遺伝子を欠損させたマウス（*Pgr^{cre/+}; Gp130^{flax/flax}*, *Gp130 cKO*）は、胚着床不全を伴う不妊となることが報告されている²⁾。しかし、胚着床には子宮上皮-間質における細胞間でのシグナル伝達が重要である³⁾。そこで、より詳細な胚着床に関わる分子機構を理解するために、本研究では遺伝子改変マウスを用い、子宮上皮のLIFシグナルに着目した解析を行った。

胚着床直前のマウス子宮内膜における Gp130および LIFR の局在

はじめに、胚着床前のGp130の局在を調べるために、

妊娠4日目における野生型マウスの子宮を用いて *in situ* hybridization (ISH) を行った。また、LIFRの局在は、内在性のLIFR発現部位特異的にLacZが発現するマウス（*Cag-Cre; Lifer^{tm1b/+}*）の子宮を妊娠4日目に採取し、β-gal染色を用いて検出した。その結果、Gp130 mRNAは、腺上皮に強く発現しており、間質および管腔上皮ではわずかに発現が認められた（図1a）。一方で、LIFRは腺上皮とともに管腔上皮で発現が認められ、間質の一部でも発現が認められた（図1b）。これらのことから、胚着床前の子宮内膜において、Gp130およびLIFRは、子宮腺上皮に共局在することが明らかになり、腺上皮を介したLIFシグナルの存在が示唆された（図1c）。

子宮上皮の Gp130遺伝子欠損は、胚着床不全による不妊を引き起こす

子宮上皮でのGp130の役割を明らかにするために、*Cre/loxP* システムを用いて、子宮上皮（管腔上皮および腺上皮）でGp130遺伝子を欠損させたマウス（*Lif^{iCre/+}; Gp130^{flax/flax}*, *Gp130 ecKO*）を作製した。対照区（*Gp130^{flax/flax}*）およびGp130 ecKO区の雌を性成熟した野生型の雄と交配を行い、妊孕性を確認した。対照区とGp130 ecKO区の全ての個体で膣栓が確認されたが、対照区では平均7.2匹の産子が得られたのに対して、Gp130 ecKO区では産子が1匹も得られなかった。さらに、Gp130 ecKO区では、妊娠5日目で胚着床部位が観察されず、子宮角から胚盤胞が回収された。このことから、Gp130 ecKOの雌は、胚着床不全を伴う不妊であることが明らかとなった。

血清中のプロゲステロン（P4）とE2の濃度を測定したところ、妊娠4日目において対照区とGp130 ecKO区で同程度であった。また、セサミオイルを用いた人工

連絡先：伊藤 潤哉 麻布大学獣医学部動物繁殖学研究室
〒252-5201 神奈川県相模原市中央区洲野辺1丁目17-71
TEL：042-850-2484
FAX：042-762-1762
E-mail：itoj@azabu-u.ac.jp

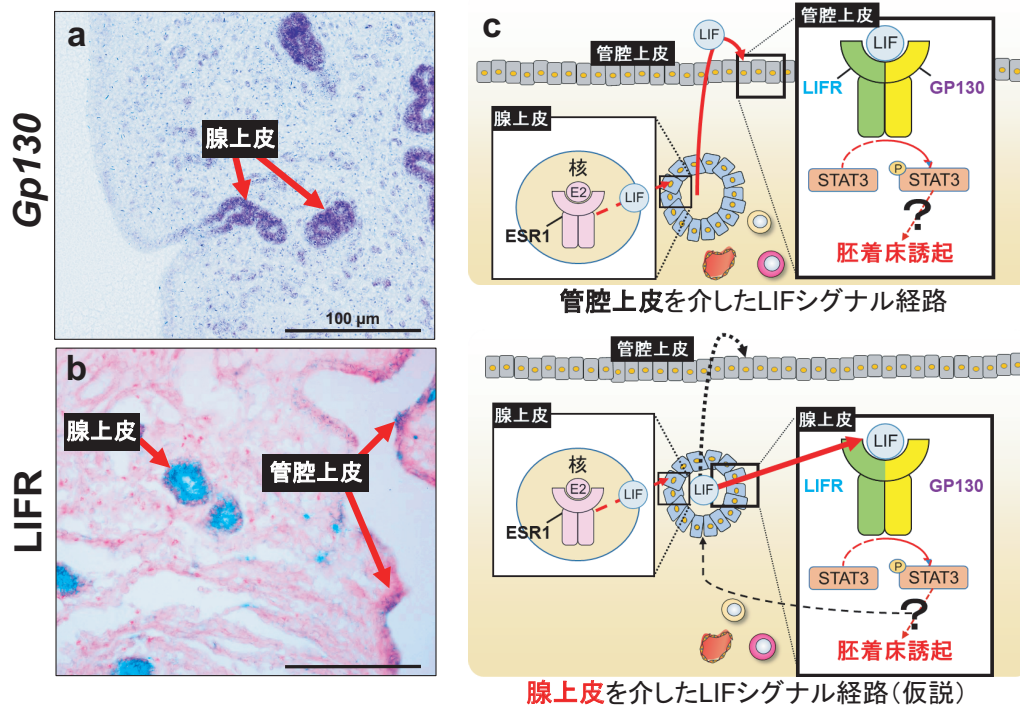


図1 妊娠4日目の子宮組織における *Gp130* mRNA および LIFR の局在
 (a) *Gp130* mRNA のアンチセンスプローブにより検出されたシグナル (暗紫色). (b) 内在性の LIFR 発現部位
 特異的に LacZ が発現するマウス組織での β -gal 染色 (青色). スケールバー=100 μ m. (c) 本研究から考えられ
 る胚着床に関わる LIF シグナル経路.

脱落膜化誘起では、対照区ではセサミオイルに反応して子宮角が膨張したが、*Gp130* ecKO 区では観察されなかった。これらの結果は、*Gp130* ecKO マウスでは、卵巣でのステロイドホルモン産生には異常はないものの、子宮内膜が胚を受け入れる状態になっていないことを示した。

さらに、妊娠4日目の子宮組織を組織学的に観察したところ、対照区および *Gp130* ecKO 区ともに管腔上皮は胚着床前の子宮に特徴的なスリット状の構造を示し、どちらの区とも胚盤胞は正しく反子宮間膜側に位置していた。

子宮上皮の *Gp130* 遺伝子欠損は、ステロイドホルモン応答性因子の発現異常をもたらす

先行研究において、*Gp130* cKO の雌は胚着床不全を示し、その不妊の原因は E2 反応性の亢進により、胚着床直前の管腔上皮細胞の増殖が停止しないことであると報告されている²⁾。そこで、本研究で使用している *Gp130* ecKO において胚着床前の子宮組織で管腔上皮細胞の増殖が停止するかどうかを MKI67 の免疫組織化学にて確認した。上皮細胞の増殖は、対照区および *Gp130* ecKO 区ともに妊娠1日目では観察され、妊娠4日目では停止

していた。このことから、胚着床直前の *Gp130* ecKO の子宮組織では、上皮細胞の増殖状態が正しく制御されていることが示唆された。

また、胚着床に関与する重要なシグナル伝達因子として Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) が知られており、LIF 投与により、胚着床前の上皮細胞において STAT3 のリン酸化 (pSTAT3) が誘導される⁴⁾。胚着床前の子宮組織において、対照区では子宮上皮の核で pSTAT3 が観察されたが、*Gp130* ecKO 区では認められなかった。このことから、子宮上皮の *Gp130* 遺伝子欠損により STAT3 によるシグナル伝達が失われたことが示された。

そこで、*Gp130* ecKO における胚着床不全の原因を調べるために、対照区および *Gp130* ecKO 区の子宮組織を用いて、RNA sequencing (RNA-seq) による網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、*Gp130* の上流に分布する estrogen receptor 1 (*Esr1*) と *Lif* は有意に増加し ($P < 0.05$)、*Gp130* の下流に分布する *Stat3* と Suppressor of cytokine signaling 3 (*Socs3*) は有意に減少した ($P < 0.05$)。また、Progesterone receptor (*Pgr*) は対照区および *Gp130* ecKO 区で同等の mRNA 発現量であったが、Arachidonate 15-lipoxygenase (*Alox15*)、Amphiregulin (*Areg*) および Early growth response 1 (*Egr*

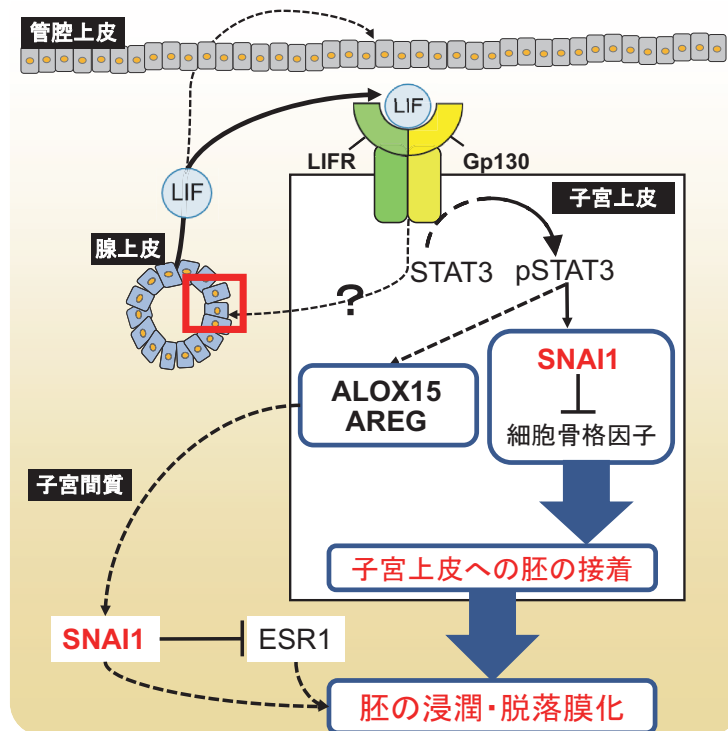


図2 本研究から明らかとなった子宮上皮 Gp130を介する胚着床メカニズム

1) などの P4 応答遺伝子は減少 ($P < 0.1$) または有意に減少する傾向があり, *Gp130* ecKO では P4 応答性遺伝子の発現が乱れていることが示された。

妊娠 4 日目の子宮組織の免疫組織化学 (IHC) では, *Gp130* ecKO では子宮上皮ではなく上皮下の間質で Estrogen receptor alpha (ER α) 陽性細胞が増加していることを確認した。一方で, PGR の発現は, 対照区および *Gp130* ecKO で同等であったが, PGR の下流の標的因子である ALOX15 は, 対照区と比較して, *Gp130* ecKO 区の子宮上皮で有意に減少していた。これらの結果は, *Gp130* ecKO では管腔上皮での P4 応答性が低下した可能性を示唆した。さらに, Gp130 の負のフィードバック制御を行う *Socs3* が, 間質細胞で著しく減少していることを ISH により確認した。これらの結果は, 子宮上皮の Gp130 からのシグナルが間質に伝達され, E2 もしくは P4 応答性遺伝子の発現を制御する可能性を示している。

子宮上皮の *Gp130* 遺伝子は, 胚着床時の子宮上皮のリモデリングに関与する

これまでの *Gp130* ecKO の解析結果は, *Gp130* cKO の雌で観察された管腔上皮細胞の異常な増殖²⁾が, 胚着床不全を引き起こす主な原因ではないことを示した。

そこで, STAT3 により転写制御される上皮性細胞のリモデリング関連因子である SNAI1 に着目した^{5,6)}。SNAI1 は, cytokeratin (KRT)⁷⁻¹⁰⁾ や E-cadherin (CDH1)¹¹⁾ など細胞骨格や細胞接着分子を抑制的に制御する。実際に, *Gp130* ecKO の RNA-seq データでは, *Krt8* mRNA が対照区と比較して有意に増加していた ($P < 0.05$)。RNA-seq では子宮内膜における *Snai1* mRNA の発現に対照区と *Gp130* ecKO 区で有意な違いは見られなかったものの, SNAI1 陽性細胞が子宮組織に広く観察された対照区と比較して, *Gp130* ecKO では上皮と間質の両方で SNAI1 陽性細胞の数が著しく減少していた。さらに, SNAI1 発現の低下に伴い, *Gp130* ecKO の管腔上皮では CDH1 の発現が細胞間境界面で明確に維持されており, 対照区との違いが認められた。これらの結果は, 子宮上皮の GP130 を介した LIF シグナルが, 子宮上皮の性質を変化させることで, 胚の子宮上皮への接着を促す可能性を示唆している (図 2)。

終わりに

マウス胚着床における子宮上皮の LIF シグナルは, 子宮上皮の Gp130 を介して, ER α の発現および E2 および P4 関連因子の発現を抑制し, 子宮上皮の性質変化を促進することで, 子宮の胚受容能獲得に貢献すると考え

られた。また近年、*Stat3* または *Lifr* 遺伝子を子宮上皮特異的に欠損させたマウスの解析からも、着床直前の管腔上皮の細胞増殖が抑制されても胚着床不全となることが報告されているが^{12,13)}、そのシグナルは十分には明らかになっていない。本研究で明らかになった子宮上皮の Gp130 を介したシグナルが、子宮上皮細胞の性質を変化させるという結果は、これからの胚着床研究をさらに推進させ得る新たな視点を提示したと考える。今後は、子宮上皮-間質のシグナル伝達を含めて、single-cell RNA sequencing 等の解析方法を用いることで、母体と胎児の初めてコミュニケーションの場である胚着床という生命現象を明らかにできるのではないかと考える。

謝 辞

本稿は、令和3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主に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 杉野法広教授、第26回学術集会会長 藤原浩教授、また、本誌編集委員の先生方に感謝申し上げます。

引用文献

1. Cha J, Sun X, Dey SK (2012) Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med* 18, 1754-1767.
2. Sun X, Bartos A, Whitsett JA, Dey SK (2013) Uterine deletion of Gp130 or Stat3 shows implantation failure with increased estrogenic responses. *Mol Endocrinol* 27, 1492-1501.
3. Namiki T, Ito J, Kashiwazaki N (2018) Molecular mechanisms of embryonic implantation in mammals: Lessons from the gene manipulation of mice. *Reprod Med Biol* 17, 331-342.
4. Kobayashi R, Terakawa J, Kato Y, Azimi S, Inoue N, Ohmori Y, Hondo E (2014) The contribution of leukemia inhibitory factor (LIF) for embryo implantation differs among strains of mice. *Immunobiology* 219, 512-521.
5. Wendt MK, Balanis N, Carlin CR, Schiemann WP (2014) STAT3 and epithelial-mesenchymal transitions in carcinomas. *Jakstat* 3, e28975.
6. Li B, Huang C (2017) Regulation of EMT by STAT3 in gastrointestinal cancer (Review). *Int J Oncol* 50, 753-767.
7. Lambert AW, Weinberg RA (2021) Linking EMT programmes to normal and neoplastic epithelial stem cells. *Nat Rev Cancer* 21, 325-338.
8. Dongre A, Weinberg RA (2019) New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 69-84.
9. Xu W, Yang Z, Lu N (2015) A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition. *Cell Adh Migr* 9, 317-324.
10. Yang J, Antin P, Berx G, Blanpain C, Brabletz T, Bronner M, Campbell K, Cano A, Casanova J, Christofori G, Dedhar S, Derynck R, Ford HL, Fuxe J, Garcia de Herreros A, Goodall GJ, Hadjantonakis AK, Huang RYJ, Kalcheim C, Kalluri R, Kang Y, Khew-Goodall Y, Levine H, Liu J, Longmore GD, Mani SA, Massague J, Mayor R, McClay D, Mostov KE, Newgreen DF, Nieto MA, Puisieux A, Runyan R, Savagner P, Stanger B, Stemmler MP, Takahashi Y, Takeichi M, Theveneau E, Thiery JP, Thompson EW, Weinberg RA, Williams ED, Xing J, Zhou BP, Sheng G (2020) EMT International Association (TEMTIA). Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 341-352.
11. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83.
12. Fukui Y, Hirota Y, Saito-Fujita T, Aikawa S, Hiraoka T, Kaku T, Hirata T, Akaeda S, Matsuo M, Shimizu-Hirota R, Takeda N, Ikawa M, Osuga Y (2021) Uterine Epithelial LIF Receptors Contribute to Implantation Chamber Formation in Blastocyst Attachment. *Endocrinology* 162, 10.1210/endo/bqab169.
13. Hiraoka T, Hirota Y, Fukui Y, Gebril M, Kaku T, Aikawa S, Hirata T, Akaeda S, Matsuo M, Haraguchi H, Saito-Kanatani M, Shimizu-Hirota R, Takeda N, Yoshino O, Fujii T, Osuga Y (2020) Differential roles of uterine epithelial and stromal STAT3 coordinate uterine receptivity and embryo attachment. *Sci Rep* 10, 15523.