

# 子宮上皮特異的 *Lifr* 遺伝子欠損マウスを用いた 胚着床機構の解明

中村さくら<sup>1)</sup>, 須山あゆみ<sup>1)</sup>, 大友 茉奈<sup>2)</sup>, 寺川 純平<sup>1,2)</sup>, 後藤 拓真<sup>1)</sup>, 和田 賢治<sup>1)</sup>, 畑 明広<sup>1)</sup>,  
川田 由以<sup>1)</sup>, 影山 敦子<sup>1)</sup>, 伊藤 潤哉<sup>1,2,3)</sup>, 柏崎 直巳<sup>1,2)</sup>

1) 麻布大学大学院獣医学研究科

2) 同・獣医学部

3) 同・ヒトと動物の共生科学センター

## はじめに

現在、わが国において不妊症は大きな社会問題の一つとなっており、事実2022年度からは体外受精を含む高度生殖補助医療技術に対する保険適用が開始された。これまでの生殖補助医療技術は主として、より高率に高品質な胚を作出するための技術改良が積極的に行われてきた。しかし、最新の設備・技術を用いて作出した受精卵(胚)を移植してもその妊娠率は20-35%と低く<sup>1)</sup>、妊娠率の向上のためには、子宮や卵巣といった母体側の環境についてさらなる理解が必要である。

われわれは妊娠時における、母体と胎子との最初のコンタクトである(胚)着床に着目し、マウスを用いて胚着床メカニズムについて研究を行っている。マウスの胚着床は交尾確認日をDay1とした時、Day4-5の間着床ウィンドウが開くことで起こる<sup>2)</sup>。また、この着床ウィンドウが開くためには、卵巣から分泌されるプロゲステロン(P4)濃度の上昇の後、エストラジオール(E2)が一過性に上昇することが必要である<sup>2)</sup>。これまでマウスの胚着床に関する分子メカニズムは、遺伝子欠損個体を用いて調べてられてきた。現在ではE2が、子宮内膜腺上皮に存在するE2受容体(Estrogen receptor alpha; ER $\alpha$ )に作用することで白血球抑制因子(Leukemia inhibitory factor; LIF)を分泌させ、子宮上皮に存在するヘテロ二量体のLIF受容体(LIF receptor [LIFR]/Interleukin 6 cytokine family signal transducer [IL6ST; Gp130])に結合し、その下流のSignal transducer and activator of transcription 3 (Stat3)をリン酸化することで着床が誘起されると考えられている<sup>3)</sup>。しかし、LIFRの下流シグナルは詳細には明らかにされていない。本研究

では、子宮上皮特異的 *Lifr* 遺伝子欠損マウス (*Lifr*<sup>flax/flax</sup>; *Lif*<sup>Cre/+</sup>, *Lifr* eKO) を用いてマウス胚着床における LIFR の下流シグナルを調べた。

## 子宮上皮特異的 *Lifr* 遺伝子欠損マウスは 胚着床不全に起因する不妊の表現型を示す

はじめに、子宮上皮の LIFR の役割を明らかにするために *Lifr* eKO マウスを作製した。次に *Lifr* eKO 雌マウスの妊孕性を調べるために野生型雄マウスと交配させ、分娩率および産子数を確認した (*Lifr* eKO 区)。一方、*Lifr*<sup>flax/flax</sup> 雌マウスを用いて同様の実験を行い Control 区とした。その結果、Control 区では交配したすべての雌が出産し、平均5.8 $\pm$ 0.7匹の産子が得られたのに対し、*Lifr* eKO 区では産子が全く得られず不妊の表現型を示した。そこで、不妊の原因を明らかにするために Blue Dye を投与して胚着床部位を確認したところ、Control 区では着床部位が認められたのに対し、*Lifr* eKO 区では着床部位が全く認められなかった。このことから、*Lifr* eKO 雌マウスでは、胚着床不全を伴う不妊の表現型を示すと考えられた。

胚着床不全の原因を明らかにする目的で、着床前日である Day4 の子宮を採取し、組織切片を作製して HE 染色による形態学的観察を行った。その結果、両区において子宮内腔は、着床直前に認められるスリット状構造を形成しており、形態学的に大きな差は認められなかった。マウスでは胚着床前に子宮上皮の細胞増殖が停止し、この細胞増殖の停止が胚着床に重要であることが報告されている<sup>4)</sup>。そこで *Lifr* eKO マウスの Day4 子宮を用いて細胞増殖マーカーである Ki67 を用いた免疫組織化学を行った。その結果、両区の子宮上皮において Ki67 陽性細胞は同様にほとんど認められず、子宮上皮の細胞増殖は停止していた。両区における Day4 の血中 P4 および E2 濃度の測定を行ったが、両区で差は認められなかった。

連絡先: 伊藤潤哉 麻布大学獣医学部  
〒252-5201 神奈川県相模原市中央区淵野辺1丁目17-71  
TEL: 042-850-2484  
FAX: 042-769-1762  
E-mail: ito@azabu-u.ac.jp

また、マウスの子宮上皮では細胞接着因子である CDH1 が発現しており、着床前に C-DH1 の発現は減少することが報告されている<sup>5)</sup>。そこで *Lifr* eKO マウスの Day5 における子宮上皮を用いて CDH1 の免疫蛍光染色を行った。その結果、両区の上皮において同程度の CDH1 が発現しており、差は認められなかった。また、セサミオイルを用いた人工脱落膜化誘起実験では、Control 区では脱落膜反応が確認されたが、*Lifr* eKO 区では反応が認められなかった。以上のことから、*Lifr* eKO マウスは子宮の形態やホルモン濃度には差が認められないにもかかわらず、胚着床不全を伴う不妊であることが明らかとなった。

### 子宮上皮の *Lifr* 遺伝子は、STAT3 のリン酸化を介して間質の ER $\alpha$ の発現を制御する

次にマウスにおける胚着床関連因子に着目し、qPCR を用いて Day4 子宮における mRNA 量を比較した。その結果、P4 受容体 *Pgr* の発現量は *Lifr* eKO 区および Control 区で差が認められなかったが、E2 受容体 ER $\alpha$  (*Esr1*) の発現量は *Lifr* eKO 区で有意に増加していた ( $P < 0.05$ )。また、その他の胚着床関連因子として報告されている Early growth response 1 (*Egr1*) や Amphiregulin (*Areg*) といった成長因子の遺伝子発現は、*Lifr* eKO 区において有意に減少していた ( $P < 0.05$ )。さらに、免疫組織化学によって ER $\alpha$  の発現と局在を調べたところ、*Lifr* eKO 区の子宮では、間質での ER $\alpha$  の発現が Control 区に比べて著しく増加しており、一方で上皮の STAT3 のリン酸化は抑制されていた。このことから、子宮上皮の *Lifr* 遺伝子は STAT3 のリン酸化を介して ER $\alpha$  の発現を制御することが明らかになった。

### 子宮上皮の *Lifr* 遺伝子は、ERBB2 を介して胚着床を制御する

次に胚着床に関するさらなる分子メカニズムを明らかにするため、Day4 の子宮内膜を用いて RNA sequence を行い、トランスクリプトーム解析をした。その結果、Control 区と *Lifr* eKO 区では多くの遺伝子の発現量に違いがあることが明らかになった。そこで、ネットワーク解析を行い、どの遺伝子が Hub 遺伝子として機能しているかを調べた。その結果、上皮成長因子 (Epidermal growth factor; EGF) の受容体の 1 つである *Erb2* (HER2) が候補として挙げられた。さらに *Erb2* は、*Areg* や胚着床関連因子である Msh homeobox 1 (*Msx1*)、Fibro-

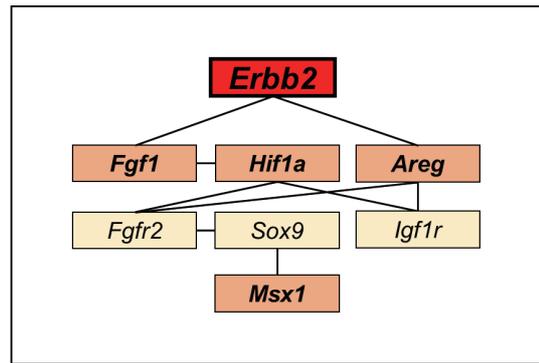


図1 *Lifr* eKO マウス Day4 (16:00) 子宮を用いたネットワーク解析による Hub 遺伝子の探索

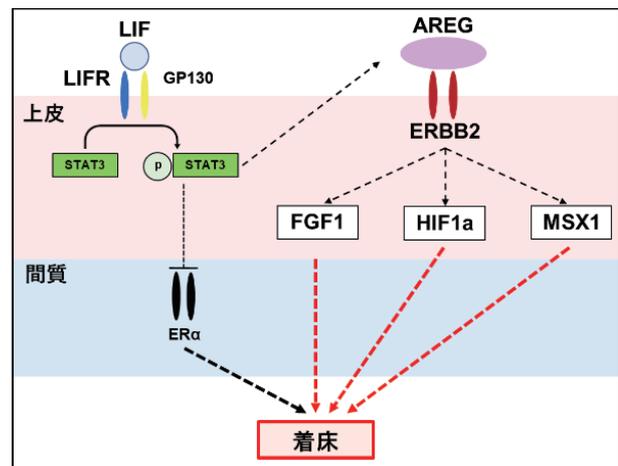


図2 本研究から考えられる子宮内膜上皮の LIFR を介した胚着床メカニズム

blast growth factor-1 (*Fgf1*)、Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (*Hif1a*) にも関連していることがネットワーク解析より明らかになった (図1)。*Erb2* はマウス子宮上皮で発現しており、*Areg* の受容体として機能することが先行研究で報告されている<sup>6)</sup>。そこで、着床時のマウス子宮における ERBB2 の発現を免疫蛍光染色により調べた。その結果、Control 区の Day4 では子宮上皮で ERBB2 の発現が認められたが、*Lifr* eKO 区では発現が著しく低下していた。また、*Lifr* eKO と同様に作製した *Gp130* eKO (*Gp130*<sup>flax/flax</sup>; *Ltf*<sup>Cre/+</sup>) および *Stat3* eKO (*Stat3*<sup>flax/flax</sup>; *Ltf*<sup>Cre/+</sup>) マウスの子宮においても上皮での ERBB2 の発現が低下していた。

以上の結果から、マウスにおいて子宮上皮の LIFR は、STAT3 のリン酸化や *Areg* の発現を促進し、ERBB2 を介して FGF1、HIF1 $\alpha$  および MSX1 といった胚着床関連因子に作用することで胚着床を制御していると考えられた (図2)。

## 終わりに

本研究の結果から、マウス子宮上皮の *Lif* 遺伝子は、STAT3のリン酸化を介して間質の ER $\alpha$  の発現を抑制し、子宮上皮の ERBB2を制御し、胚着床を誘起すると考えられた。近年の報告で、子宮で ERBB2が過剰発現されたマウスでは、不妊の表現型を示すことが報告されているが<sup>7)</sup>、ERBB2の詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。本研究において、LIF シグナルと ERBB2の関連が示唆されたことは、今後新たな胚着床メカニズムを解明する手掛かりとなる可能性があると考えられる。

## 謝 辞

本稿は、令和4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27回学術集会会長 島田 昌之 教授、本誌編集委員の先生方、また、本研究を行うにあたりご指導ご鞭撻賜りました麻布大学 野口 倫子 先生、村上 裕信 先生、金沢大学 大黒 多希子 先生に感謝申し上げます。

## 引用文献

1. 株式会社 野村総合研究所 (2021) 子ども・子育て支援推進調査研究事業 不妊治療の実態に関する調査研究 最終報告書.
2. Wang H, Dey SK (2006) Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet*, 7, 185-199.
3. Hiraoka T, Hirota, Fukui Y, Gebril M, Kaku T, Aikawa S, Hirata T, Akaeda S, Matsuo M, Haraguchi H, Saito-Kanatanani 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.
4. Li Q, Kannan A, DeMayo FJ, Lydon JP, Cooke PS, Yamagishi H, Srivastava D, Bagchi MK, Bagchi IC (2011) The antiproliferative action of progesterone in uterine epithelium is mediated by Hand2. *Science*, 331, 912-916.
5. Namiki T, Terakawa J, Karakama H, Noguchi M, Murakami H, Hasegawa Y, Ohara O, Daikoku T, Ito J, Kashiwazaki N (2023) Uterine epithelial Gp130 orchestrates hormone response and epithelial remodeling for successful embryo attachment in mice. *Sci Rep*, 13, 854.
6. Lim H, Dey SK, Das SK (1997) Differential expression of the erbB2 gene in the periimplantation mouse uterus: potential mediator of signaling by epidermal growth factor-like growth factors. *Endocrinology*, 138, 1328-1337.
7. Yoo JY, Kim TH, Shin JH, Marquardt RM, Müller U, Fazleabas AT, Young SL, Lessey BA, Yoon HG, Jeong JW (2022) Loss of MIG-6 results in endometrial progesterone resistance via ERBB2. *Nat Commun*, 13, 1101.