

## 論文の内容の要旨

論文題目 子宮における低酸素誘導因子の機能解析

氏名 松本玲央奈

着床とは受精卵と子宮内膜との間に器質的な結合が成立した状態であり、妊娠の起点といえる現象である。着床が子宮内という特殊な環境下でのみ成立し、適切な実験モデル作成が困難であったこと、allogeneic な細胞間の相互作用がほかの領域での生物現象とは異なっていることなどの要因から、これまでの着床に関する研究は形態学的観察を主とするものであった。着床は時間・空間特異的に変化するため、その現象の理解には生体内 (in vivo) での検討が重要と考えられる。ヒトでは着床の機序を in vivo で観察すること倫理的に不可能であるため、動物モデルによる検討が必要となる。近年、子宮の解析方法として、子宮特異的な欠損マウスを用いることにより子宮因子の機能解析が可能となっている。

妊娠初期のヒト子宮内膜は生理的に低酸素状態であること、マウス着床期子宮において低酸素で誘導される転写因子として広く知られる HIF1 $\alpha$  および HIF2 $\alpha$  が子宮内膜に発現していることが報告されている。子宮内膜の低酸素状態によって、HIF が子宮内膜に誘導されて作用すると推測されるものの、その役割は不明であった。本研究では、マウスモデルを用いて子宮の HIF の意義を調べた。HIF1 $\alpha$ -loxP マウスまたは HIF2 $\alpha$ -loxP マウスを Pgr-Cre マウスと交配させて子宮の HIF1 $\alpha$  欠損マウス (HIF1 $\alpha$  コンディショナルノックアウトマウス、HIF1 $\alpha$ KO) および HIF2 $\alpha$  欠損マウス (HIF2 $\alpha$  コンディショナルノックアウトマウス、HIF2 $\alpha$ KO) を作成し、生殖能を確認した WT オスマウスと交配させ妊娠の表現型を調べた。その結果、HIF2 $\alpha$ KO から産仔が 1 匹も得られず、HIF1 $\alpha$ KO は産仔数がコントロールマウスの 6 割程度に減少することが判明し、妊娠における子宮の HIF の重要性が明らかとなった。

次に、完全な不妊である HIF2 $\alpha$ KO の異常が起こっている時期を調べた。着床直前である Day4 の HIF2 $\alpha$ KO の着床前の胚発育を検討するため、胚盤胞数を観察したところ、胚盤胞数は HIF2 $\alpha$ KO ではコントロールマウスと同等であり、HIF2 $\alpha$ KO の着床前の胚発育は正常であった。着床の開始点 (子宮と胚との接着反応が起こる時期) の Day5 において、Chicago blue dye の尾静脈注射を用いた方法で着床数 (胚の子宮内膜への接着刺激による血管透過性の亢進部位) を可視化して検討したところ、青染部分の数は 2 群で差が認められず、HIF2 $\alpha$ KO において着床が通常のタイミングで開始していることが示された。次に胚が子宮内膜間質に浸潤し、脱落膜化促進の時期である Day6 において、子宮内膜間質の着床に伴う分化である脱落膜化により増大した着床部位を数え着床数を検討したところ、有意差を認めなかった。脱落膜化が最も顕著である Day8 子宮では、本来着床子宮が増大し着床部位が一見で判定できるが、HIF2 $\alpha$ KO では着床部位の増大を全く認めなかった。この結果、HIF2 $\alpha$ KO は脱落膜化異常を有し、それに伴う着床障害が生じている可能性が明らかとなった。

マウスにおいては、Prlr および Prl3c1 は脱落膜に発現するプロラクチン関連因子であり、これらの因子は脱落膜の維持に作用し卵巣の黄体化賦活化に作用し、卵巣のプロゲステロン (P<sub>4</sub>) 分

泌を持続させることが知られている。また一方で P<sub>4</sub> 分泌が子宮に作用し脱落膜化促進に働き正常な胎盤形成を誘導する。このように、卵巣－脱落膜の液性因子を介した相互作用が妊娠成立に重要である。脱落膜化異常を伴う HIF2αKO では Prlr および Prl3c1 低下が推測されたため、まず Day6 の着床部位子宮を用いてこれらの mRNA 発現を定量的 PCR にて検討した。予想通り、HIF2αKO では Prlr および Prl3c1 の mRNA 発現が低下していた。次に、HIF2αKO においては脱落膜化異常に伴う卵巣の黄体化抑制が起こっていることが推測されたため、HIF2αKO およびコントロールマウスの血中卵巣ステロイドホルモン濃度 (17β-エストラジオール (E<sub>2</sub>) および P<sub>4</sub>) を測定した。コントロールマウスに比し、HIF2αKO の血中 E<sub>2</sub> 値に差がなかったが、HIF2αKO の P<sub>4</sub> 濃度は Day6 および Day8 で低値を示した。

次に脱落膜化異常とそれに伴う P<sub>4</sub> 低下が HIF2αKO の着床障害の原因か、あるいは結果か、という疑問を明らかにするため、HIF2αKO に P<sub>4</sub> を投与し、脱落膜化と妊孕性の改善効果を検討した。Day2 から 2 mg/mouse/day の P<sub>4</sub> を HIF2αKO とコントロールマウスに皮下投与し、Day8 の表現型を検討した。HIF2αKO への P<sub>4</sub> 投与により膨大した着床部位が視認可能となり、この回復した HIF2αKO の着床部位 (脱落膜化部位) の重量はコントロールマウスと同等であった。しかし、HIF2αKO の着床部位の組織学的解析では、脱落膜化が回復したものの、連続切片作成による検討で全く胚を検出することができなかった。さらに、HIF2αKO において Day2 から Day17 までの P<sub>4</sub> 投与で生児を一匹も得ることはできなかった (n=6)。以上の結果から、HIF2αKO において P<sub>4</sub> 補充では着床障害を回復することができないことが判明し、P<sub>4</sub> 低下による脱落膜化異常は着床障害の結果として起こっている可能性が示唆された。

次に、Day8 よりも前の段階にさかのぼって HIF2αKO の組織学的検討を行った。HIF2αKO の脱落膜化部位を連続切片で検討したが、脱落膜由来の卵巣黄体賦活化因子や血中 P<sub>4</sub> 値の低下が始まる Day6 の時点では、正常胚の形態を認めず、胚の組織成分と推測される部分に赤血球の集積が認められるのみであった。このことから、Day6 の HIF2αKO 胚は分解過程にあることが推測された。

さらにさかのぼり、胚の接着反応が起こる Day5 午前の子宮で HIF2αKO の組織学的検討を行った。胚盤胞は子宮内膜管腔上皮に接着していたが、接着した胚の位置に異常を認めた。コントロールマウスでは子宮内膜管腔の反血管側の末端部分に胚が接着するが、HIF2αKO では管腔の中間部分に接着していた。このように HIF2αKO では、胚接着位置に異常を生じることが判明した。子宮内膜管腔上皮への胚接着に重要と推測されているサイトカイン LIF の発現を検討した。Day5 の着床部位における LIF mRNA の発現を定量的 PCR で検討した。LIF mRNA 発現は HIF2αKO で低下していた。LIF のシグナル伝達物質である STAT3 の活性化を評価するため、Day5 着床部位組織を用いて STAT3 の活性化の指標であるリン酸化 STAT3 (pSTAT3) の免疫染色を行った。HIF2αKO の着床部位子宮内膜の STAT3 の活性化が抑制されていた。LIF 低下が HIF2αKO の胚接着位置異常を引き起こしている可能性を念頭に置き、リコンビナント LIF (rLIF) を HIF2αKO に投与し (Day4、12ng/mouse、腹腔内投与) 着床部位を評価した。LIF 投与により、Day5 における HIF2αKO の着床位置部位は改善された。しかし LIF 投与でも HIF2αKO の Day8

以降の胚の組織学的検出はできず、産仔も得られなかった。

胚接着の位置が改善しても着床が障害される根本的な原因を検索するため、胚の子宮内膜への接着 (Day5 午前) から浸潤 (Day5 夜~Day6) までの過程を組織学的に検討した。コントロールマウスでは、Day5 夜までに胚が接着している部分の子宮内膜管腔上皮の消失が起き、胚が子宮間質へ浸潤することが可能になった。一方、HIF2 $\alpha$ KO においては胚が接着している部分の子宮内膜管腔上皮の構造が Day5 夜になっても保たれており、胚が子宮間質へ浸潤できず、その直後に胚の分解が始まっていた。

HIF2 $\alpha$ KO において、妊娠が継続しない原因として、胚と接着している部分の子宮内膜管腔上皮が消失しないことにより胚が間質に浸潤できない可能性が考えられた。子宮内膜管腔上皮は通常着床期に細胞極性を低下させること、細胞極性の低下が起こらないマウスでは着床に異常が認められることから、子宮内膜管腔上皮の細胞極性に注目した。Day5 夕方の着床部位の子宮内膜管腔上皮を、細胞極性のマーカーである PARD3、および E-cadherin の免疫染色で評価した。コントロールマウスでは胚接着部位の子宮内膜管腔上皮の PARD3 および E-cadherin 発現減弱が認められた。一方で HIF2 $\alpha$ KO においては、PARD3 および E-cadherin 低下を認めなかった。この結果から、HIF2 $\alpha$ KO の子宮内膜管腔上皮の細胞極性が減弱しないことが、胚が浸潤できない原因である可能性が示された。

以上の結果から、着床期子宮内膜が低酸素であること、子宮の HIF が胚接着位置の決定、胚の子宮内膜への浸潤に関与していることが明らかとなった。本研究により、子宮の HIF が着床を調節している重要な因子であることが示された。将来的には、HIF を調べることで着床障害の診断が可能になったり、HIF をターゲットとした避妊薬の開発が可能になったりする可能性が考えられ、ヒトの着床における HIF の意義を検討していくことが今後の課題であると考えている。