

論文の内容の要旨

論文題目 **microRNA-200a**による子宮のプロゲステロン・シグナル調節機構

氏名 原口 広史

【背景・目的】着床とは胚と子宮との間の器質的な結合が成立した状態であり、妊娠の始まりともいえる現象である。着床については様々な因子の関与が指摘されているが、その詳細なメカニズムは分かっていない。様々な因子が着床に重要であることがわかってきたが、最も重要なものとして、卵巣より分泌されるエストロゲン (E_2)・プロゲステロン (P_4)が挙げられる。 E_2 ・ P_4 により、子宮は制御され、着床できるようになることが知られている。

ヒトの着床研究は倫理的に制約があるため、着床において重要な E_2 ・ P_4 のホルモン動態と排卵から着床までの期間がヒトと類似しているマウスを用いた研究が多くなされている。

マウスの着床においては、膣栓を認めた日を day 1 とすると、day 2 から卵巣からの P_4 産生が増加し、 P_4 の持続的な影響下に、day 4 において子宮体部の上皮細胞の増殖抑制と間質細胞の増殖亢進というダイナミックな変化がおこり、子宮が着床能を獲得する。この子宮内膜の増殖能の変化は、その後の胚の活性化に向けて子宮が準備できていることを示す変化である。day 4 深夜に子宮への接着反応が始まる。続いて胚は間質に侵入する一方で、子宮では脱落膜化が進み、着床が成立する。

着床異常の例として、子宮体部以外のところに受精卵が着床してしまう異所性妊娠が挙げられる。なかでも子宮頸管妊娠は異所性妊娠の 1%以下と非常に稀なことから、子宮頸部には、子宮体部と比較して着床しにくいメカニズムがあるのではないかと考えた。

本研究では、着床のメカニズムの解明の手掛かりとして、着床期の細胞の分化・増殖の変化に着目し、着床可能な子宮体部と着床しない子宮頸部を比較することとした。着床期の子宮体部と子宮頸部を比較することで、着床に関わる重要な因子を抽出することを目的とした。

【方法】マウスおよびヒトの子宮体部・子宮頸部を比較検討した。なお、ヒト検体については研究倫理委員会の承認のうえ、患者同意を得たものを研究に用いた。検討方法としては、免疫染色、ウエスタンブロッティング、in situ hybridization (ISH)、quantitative PCR (qPCR)を行った。qPCR で用いた一部の検体については、Laser Capture Microdissection (LCM)で抽出した検体を利用した。microRNA の解析は、qPCR、ISH、ウエスタンブロッティング、Luciferase reporter assay を用いて行った。

【結果】分化・増殖の指標となる Ki67 の免疫染色により、マウスの子宮体部と子宮頸部を Day 3 と Day 4 で比較検討したところ、子宮体部では、Day 3 で上皮細胞の増殖が見られたのに対し、着床期である Day 4 で上皮の増殖が消失し、Day 3 にはなかった間質での増殖が亢進した。一方、子宮頸部では、Day 3・Day 4 とともに、上皮細胞の増殖を認めた一方、間質での増殖は認め

なかった。同様のことが、Ki67 とは別の細胞増殖のマーカーである *proliferating cell nuclear antigen* の免疫染色でも認められた。ヒトについても、着床の起こる分泌期と、着床前にあたる増殖期について、子宮体部と子宮頸部の Ki67 の免疫染色を行った。増殖期においては、子宮体部・頸部、いずれも上皮細胞の増殖を認めた。一方、分泌期では、上皮の増殖が子宮頸部で持続しているのに対し、子宮体部では上皮の増殖が消失し、間質の増殖亢進を認めた。以上の結果から、ヒトもマウスも、子宮体部と同様のホルモン状態であるにも関わらず子宮頸部では着床能が獲得できないこと、上皮細胞の増殖が消失し分化を開始することと間質細胞の増殖が亢進することが子宮体部の着床能の指標となることが示唆された。

細胞の分化・増殖の劇的な変化が起こる Day 4 は、 P_4 が優位なホルモン環境になっていることに着目し、子宮体部・頸部での分化・増殖に対する P_4 シグナルを評価するために、プロゲステロン受容体 (PR) のアンタゴニストである RU486 の投与実験と、子宮の P_4 抵抗性を示すマウスモデルで知られる *Fkbp52*^{-/-} マウスを用いた実験を行った。RU486 の投与実験では、Day 3 の RU486 投与により、Day 5 において着床が完全に障害され (n=3/3, 100%)、Day 4 の子宮体部では上皮の増殖が持続し、間質の増殖を認めなかった。子宮において P_4 -PR シグナルが低下している *Fkbp52*^{-/-} マウスの実験では、RU486 投与群と同様に、Day 4 の子宮体部で上皮の増殖は持続し、間質の増殖亢進を認めなかった。*Fkbp52*^{-/-} マウスに P_4 補充し P_4 -PR シグナルを改善させたところ、WT と同様に、Day 4 の子宮体部の上皮の増殖は消失し、間質の増殖亢進を認めた。一方、子宮頸部では、WT、RU486 投与群、*Fkbp52*^{-/-} マウスのいずれの群も変化なく、上皮の増殖は持続し、間質の増殖を認めなかった。以上のことから、子宮体部では、 P_4 -PR シグナルが作用し着床期の細胞の分化・増殖を制御しているのに対し、子宮頸部では P_4 に対する反応性が低下して子宮体部で起こる細胞の分化・増殖の変化が起こらないことが示唆された。

子宮頸部での P_4 シグナルの作用低下の原因を調べるため、Day4 の PR の蛋白発現を検討した。PR のウエスタンブロッティングおよび免疫染色では、子宮体部に比べ子宮頸部で発現が有意に低下していた。

次に、 P_4 -PR シグナルの下流である P_4 応答遺伝子について、マウスの子宮体部と子宮頸部で検討を行った。LCM を用い子宮体部と子宮頸部の上皮を採取し、子宮体部の上皮の P_4 応答遺伝子である *amphiregulin*、*histidine decarboxylase*、*Indian hedgehog* について、qPCR と ISH を行った。全ての P_4 応答遺伝子が子宮体部に比べ、子宮頸部で有意に低下していた。このことから、子宮頸部では P_4 の応答性が低下している可能性が示唆された。

PR の mRNA レベルでの発現について、LCM で得られた子宮体部・頸部の上皮と間質を用い qPCR を行ったところ、蛋白と異なり、mRNA レベルでは、上皮・間質ともに、子宮体部と子宮頸部に有意な差を認めなかった。そこで、子宮頸部における PR 蛋白の低下の原因として、転写後調節、特に microRNA に着目した。 P_4 シグナルを低下させる microRNA として、子宮筋の *microRNA-200a* (*miR-200a*) が分娩時に、 P_4 シグナルを低下させるという報告がある。着床期の子宮体部と子宮頸部の *miR-200a* の発現を qPCR と ISH で検討すると、子宮体部と比較して、子宮頸部で *miR-200a* の発現が有意に亢進していることが分かった。また、マウスと同様に、ヒトの

分泌期の ISH においても子宮体部と比較して、子宮頸部で *miR-200a* の発現が亢進していた。

miR-200a が PR の発現に影響するか検討を行った。MCF-7 細胞株に *miR-200a* を導入したところ、ウエスタンブロッティングで PR が低下したことから、*miR-200a* が PR を低下させることが分かった。この *miR-200a* が直接 PR (gene code は *Pgr*) を標的としているか調べるため、luciferase reporter assay を行った。luciferase の下流にヒト *PGR* 3' UTR の *miR-200a* の推定結合部位を含む reporter のプラスミドと、*miR-200a* または control の miRNA mimic を導入し、luciferase reporter assay を行った。*miR-200a* を導入すると、luciferase 活性は有意に低下したが、control では影響なかった。また、*PGR* に *miR-200a* が結合しないように *miR-200a* の推定結合部位を変異させたものでは、*miR-200a* を導入しても、luciferase 活性は変化しなかった。以上のことから、PR は *miR-200a* の直接の標的であることが示唆された。

分娩時、子宮筋の *miR-200a* が Stat5 を抑制することで、 P_4 の代謝酵素である 20 α -HSD を亢進させることから、着床期の子宮体部・子宮頸部について、Stat5・20 α -HSD の発現を検討した。qPCR・ウエスタンブロッティング・免疫染色を行ったところ、子宮頸部では子宮体部に比べ、Stat5 は低下し、20 α -HSD は亢進していた。以上のことから、子宮頸部の *miR-200a* は PR の発現を抑制するだけでなく、Stat5 の低下を介し、 P_4 代謝酵素である 20 α -HSD を亢進させることで P_4 代謝を促進し、 P_4 シグナルを低下させていることが示唆された。

着床期における子宮体部の *miR-200a* の発現を検討した。着床期である Day 4 では、Day 3 に比べ *miR-200a* の発現が有意に低下していた。このことから、子宮体部では、着床期に *miR-200a* が低下し、 P_4 -PR シグナルが増強され、着床能を獲得している可能性が示唆された。

【結論】本研究により、着床期の子宮体部の細胞の分化・増殖の変化は、 P_4 -PR シグナルで調節され、子宮の着床能の指標となり得ることが明らかになった。また、*miR-200a* が直接作用し PR の発現を低下させることが判明した。子宮頸部では高発現の *miR-200a* によって P_4 シグナルが低下し、子宮体部のような着床期の細胞の分化・増殖の変化が起こらず、着床能を獲得できないこと、子宮体部では着床期に *miR-200a* が低下して P_4 シグナルが増強され、細胞の分化・増殖の状態が変化し、着床能を獲得することが示唆された。