

博士論文

子宮における低酸素誘導因子の機能解析

松本玲央奈

## 目次

|      |    |
|------|----|
| 目次   | 2  |
| 要旨   | 3  |
| 序文   | 4  |
| 目的   | 16 |
| 方法   | 17 |
| 結果   | 24 |
| 考察   | 48 |
| まとめ  | 51 |
| おわりに | 53 |
| 謝辞   | 54 |
| 引用文献 | 55 |

## 要旨

本研究では、マウスモデルを用いて子宮の低酸素誘導因子(HIF: Hypoxia inducible factor)の意義を調べた。子宮のHIFに着目し、子宮のHIF1 $\alpha$ 欠損マウス(HIF1 $\alpha$ KO: HIF1 $\alpha$ コンディショナルノックアウトマウス)およびHIF2 $\alpha$ 欠損マウス(HIF2 $\alpha$ KO: HIF2 $\alpha$ コンディショナルノックアウトマウス)を作成し妊娠の表現型を調べた。HIF2 $\alpha$ KOから産仔が1匹も得られず、HIF1 $\alpha$ KOは産仔数が減少したことから、妊娠における子宮のHIFの重要性が示された。次にHIF2 $\alpha$ KOの妊娠異常の詳細を調べた。HIF2 $\alpha$ KOでは着床に異常を認め、胚接着位置の異常、接着部位の子宮内膜管腔上皮の消失の異常が認められた。本研究により、子宮のHIFが着床を調節しているメカニズムが明らかとなった。

## 序文

### 不妊症における着床障害の位置づけ

少子・高齢化が急速に進行する現代において、不妊症に対する診断・治療法の進歩の必要性が高まっている。不妊症の原因として、排卵障害や卵巣予備能低下などの卵巣因子、卵管閉塞や卵管癒着などの卵管因子、子宮筋腫や子宮腔内癒着などの子宮因子、乏精子症などの男性因子などが挙げられる。

不妊症の治療として、タイミング指導や人工授精などの一般不妊治療が有効でない場合に、体外受精・胚移植(in vitro fertilization and embryo transfer: IVF-ET)が行われている。近年、不妊治療における IVF-ET の占める割合が高まっている。1999 年時には新生児の 100 人に 1 人が IVF-ET 児であったものが、2008 年時には 50 人に 1 人、2014 年には約 40 万周期の治療により 4 万 7 千人の児を得ており、実に 21 人に 1 人が IVF-ET 児という状況になっている。このように、不妊症の治療における IVF-ET の重要性が高まっている一方で、IVF-ET の反復不成功が大きな問題になってきている。IVF-ET 反復不成功の要因は、①受精卵(胚)側の要因、②子宮側の要因に分けられる。①については、配偶子(卵子・精子)および受精卵のクオリティの低下、つまり減数分裂の際の染色体不分離などの染色体異常、②については、子宮内膜や子宮内環境の異常による着床障害、が挙げられる。①については、これまでは移植胚を形態学的に選別するしかなかったが、着床前遺伝子スクリーニング(preimplantation genetic screening)などの近年の新しい技術の出現により、倫理的な観点は別として技術的には遺伝学的に胚の選別が可能な時代になっている。一方で、②については、着床障害に対する診断・治療は未だ適切なものがなく、新しい診断・治療法の確立に向けた基礎的知見の蓄積が必要とされている。

着床とは胚と子宮内膜との接着から、胚の子宮内膜への浸潤、胎盤形成に至る一連の過程であり、妊娠の起点となる現象である。着床の成立には胚と子宮内膜の精密な協調作用が必要である。受精卵が分割し形成された胞胚(blastocyst)が子宮内

膜上皮へ接着・浸潤し絨毛構造を形成するまでの一連の現象をいう。これまでの着床に関する研究として、形態学的な研究や、細胞を用いた研究などがなされてきたが、着床の機序やその異常である着床障害の理解にはまだほど遠いというのが現状である。これは、着床という現象が、子宮内という限られた環境下でのみしか成立せず、細胞を用いた研究には限界があること、胚という小さな組織を組織学的に解析することが難しく動物実験モデルを適切に用いた研究が困難であったことが挙げられる。

本研究では、マウスをモデル動物として用い、着床の機構を *in vivo* で解析することとした。着床研究においてマウスは最も用いられている動物である。マウスモデルを用いる利点を次項に述べる。

#### **遺伝子改変マウスを用いた着床研究**

ヒトの着床研究は、倫理的な制約があり、代替となる動物実験ではマウスを用いた研究が多くなされている。ヒトの子宮は単角であるのに対して、マウスは双角であるという構造的相違点がある(図 1)。しかし、着床時期の卵巣由来の性ステロイドホルモンである卵胞ホルモンのエストロゲン(17 $\beta$  エストラジオール、E<sub>2</sub>)と黄体ホルモンのプロゲステロン(P<sub>4</sub>)の変動はマウスとヒトで類似している(図 2)(1, 2)。妊娠期間は大きく異なるものの、排卵から着床までの期間は、マウス 5 日、ヒト 7 日という点が類似している(図 2)。胎盤の形態も円盤状胎盤・血絨毛膜胎盤で類似している。胎盤を形成する主たる細胞である栄養膜細胞(トロホブラスト)が子宮内膜に激しく浸潤するのが共通した特徴である (3)。

着床の成立には胚と子宮の協調が必要で、胚の活性化と、子宮の着床能獲得の両方が必要である(図 3)(4, 5)。子宮体部が着床能を獲得している期間は限られており、implantation window と呼ばれる。この期間の前は着床できず、また、この期間を過ぎると着床できない。ヒトでもマウスでも同様の implantation window が存在することが推測されている(図 2 および図 3)(4, 5)。また、着床前の子宮は卵巣から分泌さ

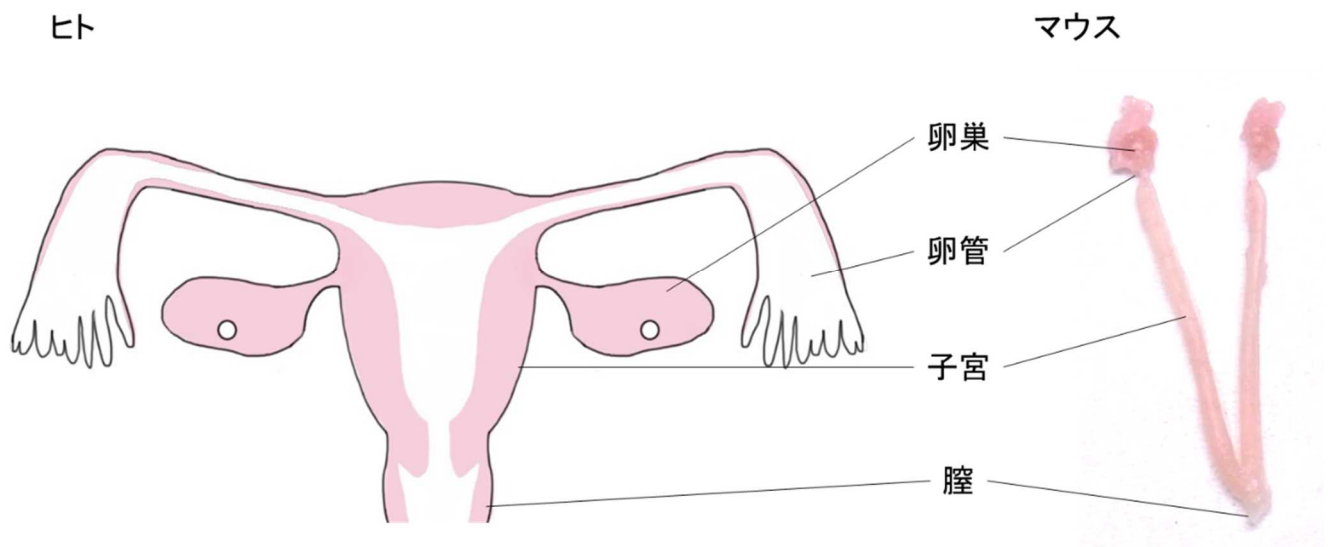


図 1. ヒトとマウスの子宮・卵管・卵巣の構造

マウスは双角子宮で子宮内腔がV字型の構造をしている。一方でヒト子宮は胎児の発生の過程で双角が癒合し内腔が1つになる。ヒト・マウスに共通して、排卵・受精・着床が起こる。卵巣から排卵した卵子は卵管から卵管に取り込まれ、射精後卵管内に進入した精子と卵管内で受精する。受精卵は卵管内で発育し、胚盤胞となって子宮内膜に着床する。

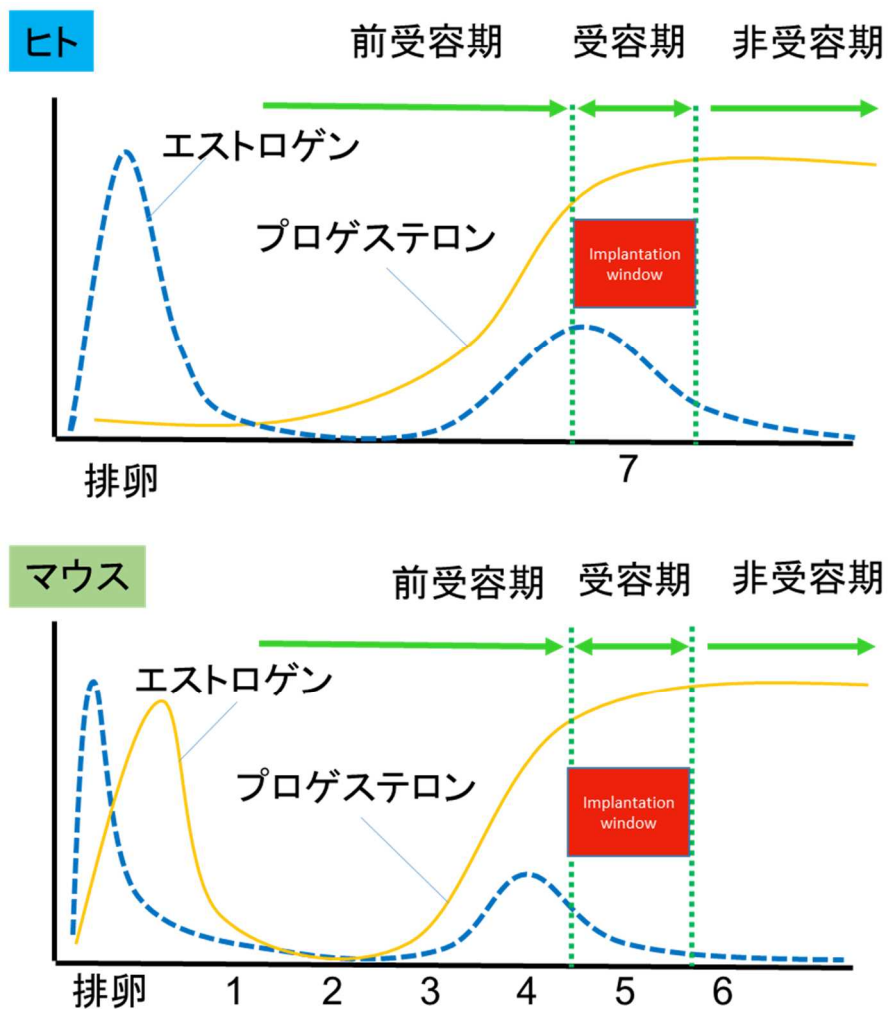


図 2. 妊娠初期におけるヒトとマウスのホルモン動態

妊娠初期におけるヒトとマウスのエストラジオール(卵胞ホルモン)とプロゲステロン(黄体ホルモン)の動態を示す。エストラジオール・プロゲステロンともに妊娠に重要な卵巣ホルモンであり、ヒト・マウスともに前受容期にプロゲステロンが上昇し、その後エストラジオールが軽度上昇することで、着床可能になる。着床が成立しない場合には、子宮内膜は非受容期に至る。(引用文献(1, 2))

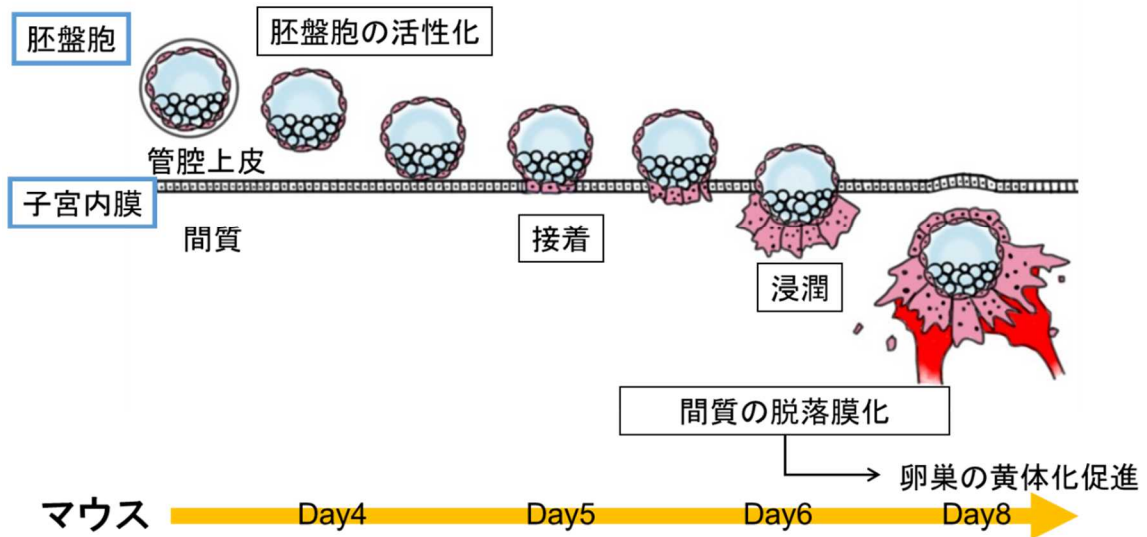


図 3. マウスの着床の過程

胚は子宮内で活性化し子宮内膜上皮に接着する。その後、間質内に浸潤する。その過程で間質細胞は脱落膜化を起こす。脱落膜由来の卵巣黄体化促進因子により、黄体化とそれに伴うプロゲステロン分泌が促進され、妊娠が成立する。



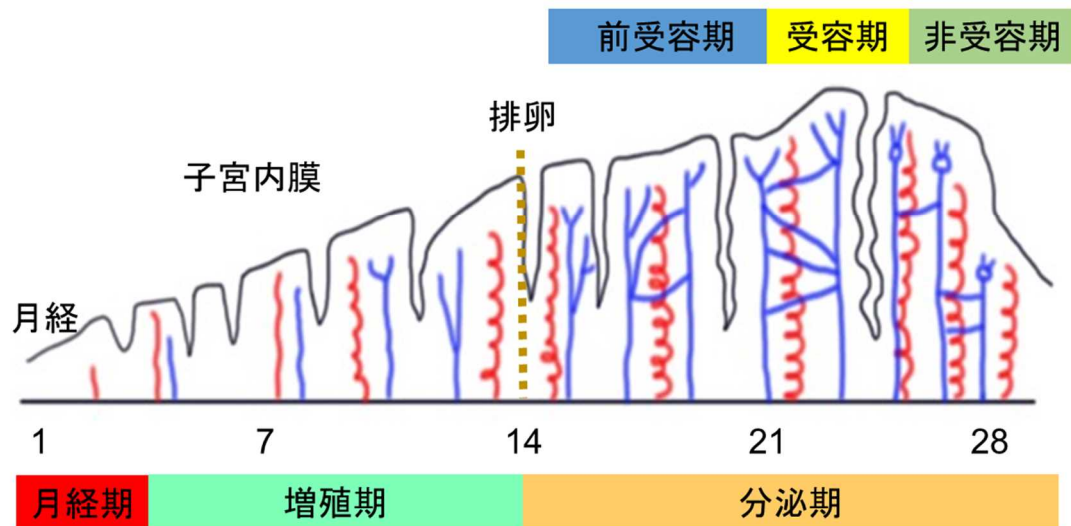


図 4. ヒトの子宮内膜の変化

ヒトの子宮内膜は28日前後の間隔で周期的に変化するが、この周期を月経周期と呼ぶ。月経周期は月経期、増殖期、分泌期に分けられる。卵巣より分泌される $E_2 \cdot P_4$ の作用により、子宮内膜は変化する。エストラジオールの作用により、子宮内膜の厚みは増大していき、排卵後に分泌期に入る。着床は排卵後7日前後の分泌期に起こる。この着床可能な時期を受容期と呼び、その前を前受容期、受容期を過ぎて着床できない時期を非受容期と呼ぶ。受容期は限定された期間と考えられており、implantation windowと呼ばれる。エストラジオールとプロゲステロンが消退すると、子宮内膜は剥脱し、月経となる。(引用文献(6))

れる  $E_2 \cdot P_4$ によって制御されている (1, 2, 4, 5)。マウスの着床においては、膣栓を認めた日を Day1 とすると、Day2 から卵巣からの  $P_4$  産生が増加し(図 2)、 $P_4$  の持続的な影響下に、Day4 において子宮内膜管腔上皮・間質の増殖能のダイナミックな変化、すなわち管腔上皮細胞の増殖抑制と間質細胞の増殖亢進がおこり、子宮が着床能を獲得する (7)。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。そして卵巣由来の  $E_2$  が一時的に増加し(図 2)、この刺激によって子宮が反応し胚活性化の局面に入る(図 3)。Day4 夕方に胚の活性化が起こり、Day4 深夜に子宮への接着反応が始まる(図 3)。胚の接着の刺激が子宮内膜管腔上皮から間質に伝わり、子宮内膜間質には脱落膜化が起こる(図 3)。脱落膜化に伴って子宮内膜間質層の血管の透過性亢進が起こる。Day5 夕方には胚の栄養膜細胞が間質に浸潤する。胚の栄養膜細胞(トロホブラスト)が子宮内膜間質層内に浸潤することで、子宮内膜はさらに肥厚・増殖して脱落膜が完成する。脱落膜由来の卵巣黄体化促進因子により、黄体化とそれに伴う  $P_4$  分泌が促進される(図 3)(8-11)。このように適切な胚の浸潤と脱落膜化により、血管新生が促進され胎盤形成へとつながっていく。

遺伝子改変マウスを用いることで、着床に関わる子宮や胚の細胞に発現している遺伝子の機能を検討できることがその利点である。着床において重要なものとして、卵巣より分泌される  $E_2 \cdot P_4$  の他に、白血病抑制因子 leukemia inhibitory factor(LIF) などのサイトカインや、cyclooxygenase-2(COX2)などのプロスタグランジン産生経路の因子、分化・増殖因子、細胞構築や細胞接着にかかわる因子などの関与が示されてきている (4, 5)。これらの因子の重要性は各種の遺伝子ノックアウトマウスを用いて明らかになった知見である。最近では Cre-loxP システムなどを用いたコンディショナル遺伝子改変マウスが作出され研究に用いられるようになってきているが、産婦人科の分野でも  $P_4$  受容体(Pgr)やラクトランスフェリン(Ltf)のプロモーター領域の下流に Cre 発現遺伝子を導入したマウスを用いて、着床障害だけでなく、早産や子宮体

癌など、様々な疾患モデルが作成され、基礎研究に用いられるようになっている(12-16)。

### **着床に重要な因子**

着床において内分泌系調節因子の主役であるのが、性ステロイドホルモンの E<sub>2</sub> および P<sub>4</sub> である。特に P<sub>4</sub> はヒト不妊治療で着床期に使用される。1995 年に P<sub>4</sub> 受容体欠損マウス(Pgr-KO)が報告された (17)。Pgr-KO は排卵障害や乳腺の発育障害があり、また着床に重要な子宮の細胞分化や脱落膜化に異常が認められた。また、Pgr のコシャペロンである FKBP52 の欠損マウス(FKBP52-KO)では、マウスの遺伝的背景により排卵障害はきたさず、子宮の P<sub>4</sub> の下流シグナルが低下し着床障害をきたすこと、大量の P<sub>4</sub> 投与により子宮の P<sub>4</sub> の下流シグナルおよび着床の表現型が回復することが示され (18)、子宮の P<sub>4</sub>-Pgr シグナルの着床における重要性が明らかとなっている。

LIF は IL-6 と共通のシグナル伝達コンポーネントである GP130 および STAT3 を活性化させるサイトカインである。LIF は着床直前のマウス子宮の腺上皮に発現し、子宮の胚受容能(uterine receptivity)、胚接着に関与していることが示唆されている (19, 20)。ヒトにおいても、分泌期中期から LIF の濃度は上昇し、原因不明不妊や反復着床障害の患者において、子宮内腔液の LIF 濃度が低下している (21, 22)。

### **着床期子宮における子宮の酸素環境と低酸素誘導因子(hypoxia inducible factor: HIF)の発現について**

ヒト妊娠初期の子宮内膜の表面の酸素濃度は、子宮内膜の内部のものと比較して低酸素であることが報告されている (23)。ヒト妊娠初期の子宮内に測定端子を挿入して計測すると、子宮内膜表面の酸素濃度は 18mmHg であり、子宮内膜内の酸素濃度は 40mmHg という結果であった。このことから、子宮内腔は子宮内に比べて低

酸素であることが示唆される。また、マウス子宮においては部位により局所の酸素濃度に違いがあると報告されている (24)。子宮内膜管腔上皮はあらゆる血管からもっとも離れており、子宮内膜間質とは基底膜によって分離されているため、子宮内膜間質や子宮筋層と比較して低酸素環境であることが推測される。

生体内では、低酸素酸素の環境下で効率的に酸素が運搬できるように、造血促進因子であるエリスロポエチン(erythropoietin: EPO)を産生して、赤血球を増加させる。HIF は EPO 遺伝子の発現を低酸素下で上昇させる転写因子として、1995 年に同定された(25)。その後、EPO のみならず、低酸素環境下での代謝、細胞死、血管新生など、多様な生理応答に関与していることが明らかとなった(表 1)。HIF は  $\alpha$ 、 $\beta$  の 2 つのサブユニットで構成される。HIF- $\alpha$  サブユニットには 1 $\alpha$ 、2 $\alpha$ 、3 $\alpha$  の 3 種類が、HIF- $\beta$  サブユニットには ARNT1、ARNT2 の 2 種類が存在する(図 5)(26)。過去の報告において、Day4 の子宮内膜管腔上皮において HIF1 $\alpha$  発現が認められ、同時期の子宮内膜間質において HIF2 $\alpha$  発現が認められている(図 6)(27)。また、脱落膜化が著明となる Day8 の子宮内膜間質に HIF2 $\alpha$  が強く発現している(図 6)(27)。これらの HIF $\alpha$  の発現パターンの解析結果から、着床期子宮における HIF の重要性が推測される。しかし HIF $\alpha$  がどのように機能しているのかは不明である。一方、胚側、特に胎盤の HIF $\alpha$  の重要性は全身性の HIF1 $\alpha$  および HIF2 $\alpha$  ノックアウトマウスを用いた研究で、胎盤の血管形成の異常が認められることなどから明らかとなっている(28)。本研究では、子宮側の HIF に焦点を当て、コンディショナルノックアウトマウスを用いた機能解析を行った。

**表 1. 各種細胞における転写因子 HIF が調節する因子とその多様な機能**

(引用文献(26))

| 下流の遺伝子 | 細胞における機能    | 機能の詳細                   |
|--------|-------------|-------------------------|
| EPO    | 赤血球産生       | 酸素運搬量の増加                |
| VEGF   | 血管新生        | 血流の増大                   |
| GLUT1  | 糖取り込み       | エネルギー源の増加               |
| PDK1   | エネルギー代謝調節   | ピルビン酸から乳酸への代謝を亢進        |
| COX4-2 | ミトコンドリア活性調節 | 酸化的リン酸化の亢進・最適化          |
| CXCR4  | 細胞移動制御      | 転移能の増大                  |
| BNIP3  | 細胞死促進       | 細胞死抑制分子と結合・活性阻害         |
| Bcl-xL | 細胞死抑制       | ミトコンドリアからのチトクロム c 放出の抑制 |

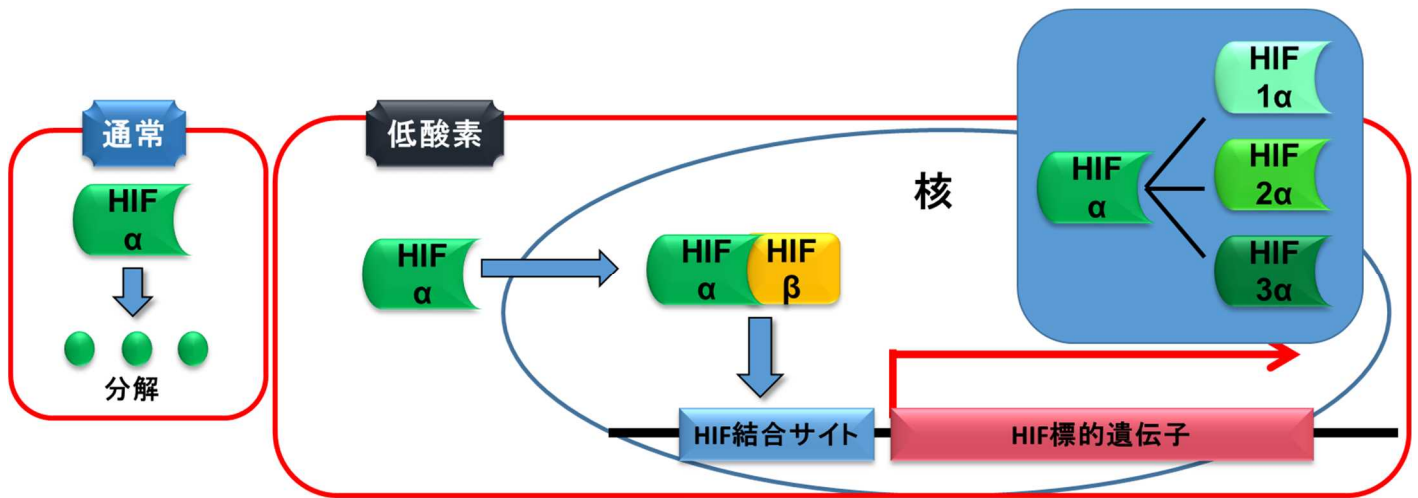
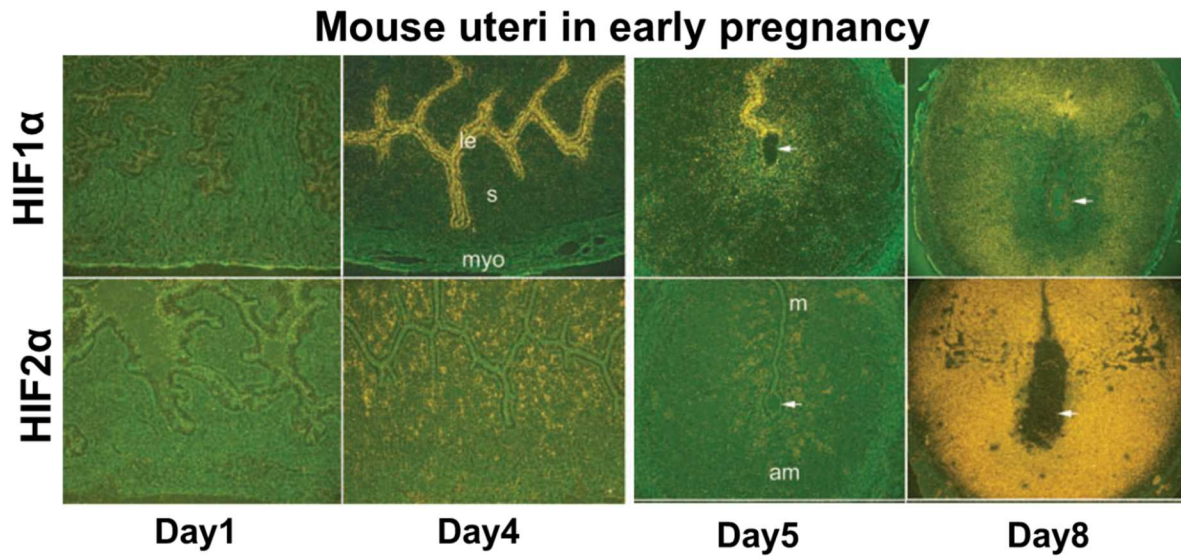


図 5. HIF の構造と細胞における機能

HIF は  $\alpha$ 、 $\beta$  の 2 つのサブユニットにより構成されている。通常酸素濃度では、HIF はユビキチン化されて分解されてしまう。低酸素環境においては分解されず、代謝、細胞死、血管新生など、多様な生理応答に関与する。



**図 6. マウス子宮における HIF1α、HIF2α の mRNA 発現**

In situ hybridization の結果から、HIF1α は Day4 の管腔上皮、HIF2α は Day8 の脱落膜に発現が認められる。黄色のシグナルが mRNA の発現を示す。(引用文献 (27))

## 目的

本研究の目的は、子宮に発現する HIF $\alpha$  に注目して着床のメカニズムを明らかにすることである。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、子宮の HIF $\alpha$  欠損マウスを用いて子宮の低酸素と HIF $\alpha$  の意義を調べた。



## 方法

### マウス

HIF1 $\alpha$ 、HIF2 $\alpha$  を全身性にノックアウトすると胚性致死に至ることが知られていたため、子宮の HIF1 $\alpha$ 、HIF2 $\alpha$  をコンディショナルノックアウトしたマウスを作成することとした。HIF1 $\alpha$ -loxP マウス(遺伝系統 C57BL/6)および HIF2 $\alpha$ -loxP マウス(遺伝系統 C57BL/6)を Pgr-Cre マウス(遺伝系統 C57BL/6/129SV)と交配させ、子宮の HIF1 $\alpha$  欠損マウス(HIF1 $\alpha$ -loxP; Pgr-Cre)、子宮の HIF2 $\alpha$  欠損マウス(HIF2 $\alpha$ -loxP; Pgr-Cre)を作成した(図 7、いずれのマウスも C57BL/6 と C57BL/6/129SV との交配から作成された混合遺伝系統)(15, 29, 30)。Pgr は子宮に発現していることから、Pgr プロモーターの下流に Cre を挿入した Pgr-Cre マウスを用いてコンディショナルノックアウトマウスを作成した。

低酸素の実験では、C57BL/6 の野生型(WT)のメスマウスを用いた。

妊娠の実験については、妊孕性のある C57BL/6 の WT オスマウスを、子宮の HIF1 $\alpha$  欠損メスマウス、子宮の HIF2 $\alpha$  欠損メスマウス、およびそれらのコントロールマウスと交配させ、分娩仔数を確認するとともに、Day4、Day5、Day6、Day8 に屠殺し、妊娠の表現型を調べた。

膣栓を認めた日を Day1 とすると、受精後の胚発育は Day4 に、接着反応は Day5 に、胚の子宮内膜への浸潤は Day6 に、脱落膜化は Day8 に調べた。P<sub>4</sub> 投与実験では、Day2~Day7 に 2 mg/mouse の P<sub>4</sub> を皮下投与した。リコンビナント LIF (rLIF) の投与実験は、day4 に 12 ng/mouse の rLIF を腹腔内投与した。低酸素の検出の実験では、子宮組織摘出 1 時間前に pimonidazole を腹腔内投与した。

本研究で用いたすべてのマウスは、東京大学動物実験実施規則および東京大学動物実験実施マニュアルに従って東京大学の動物飼育施設で飼育した。本実験は、東京大学医学系研究科動物実験委員会の承認を受けており、承認番号は医-P11-018である。

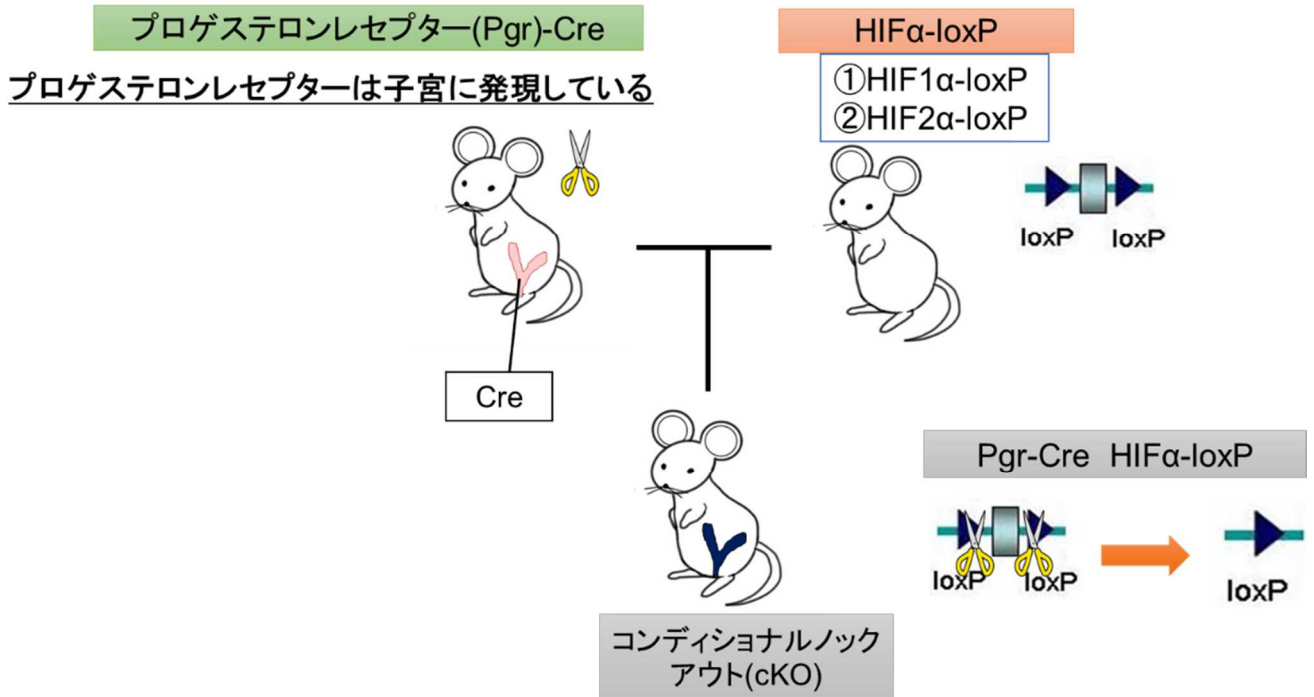


図 7. 子宮の HIF1 $\alpha$  および HIF2 $\alpha$  のコンディショナルノックアウトマウス作成

Pgr プロモーターの Cre マウスを用いて HIF1 $\alpha$ 、HIF2 $\alpha$  の子宮特異的なコンディショナルノックアウトマウスを作成し、妊孕性のある野生型オスマウスと交配させて妊娠の表現型を検討した。

#### **Day4 の着床前胚発育の評価**

Day4 午前 10-11 時に、マウス子宮を摘出し、両側卵管を生理食塩水 0.5mL ずつでフラッシュし子宮内の胚を回収した。実体顕微鏡下に胚盤胞数を数えた。

#### **Day5 の着床数、着床部位の評価**

Day5 午前 10-11 時、午後 5-6 時(17-18 時)、または午後 9-10 時(21-22 時)に Chicago blue dye 溶液を尾静脈注射し、3 分後に解剖を行った。着床部位は血管透過性が亢進しているため、Dye と結合した蛋白が漏出し着床部位が青く染色される。この方法を用いて、着床数を数えた。

#### **Day6 および Day8 の着床数、着床部位の評価**

Day6 午前 10-11 時、または、Day8 午前 10-11 時に、マウス子宮を摘出した。着床部位の子宮内膜間質の脱落膜化により着床部位の子宮が増大化しているため、着床部位を視認可能である。着床数を数え、着床部位の子宮重量を測定した。

#### **卵巣移植**

ノックアウトマウス子宮の表現型を卵巣の影響を取り除いて検討するために、卵巣移植の実験を行った(図 8)。ドナーマウスとしてコントロールマウス、レシピエントマウスとしてコントロールマウスおよびノックアウトマウスを用いた。ドナーマウスの卵巣被膜を切開して卵巣を愛護的に摘出し移植用の卵巣を得た。次にレシピエントマウスの卵巣を同様に摘出後、卵巣被膜内に移植した。術後回復のため 2 週間経過観察後、交配を行い、着床の表現型を検討した。

#### **パラフィン包埋検体の免疫染色**

摘出したマウス組織を中性緩衝ホルマリンにて固定、エタノールにて脱水し、パラ

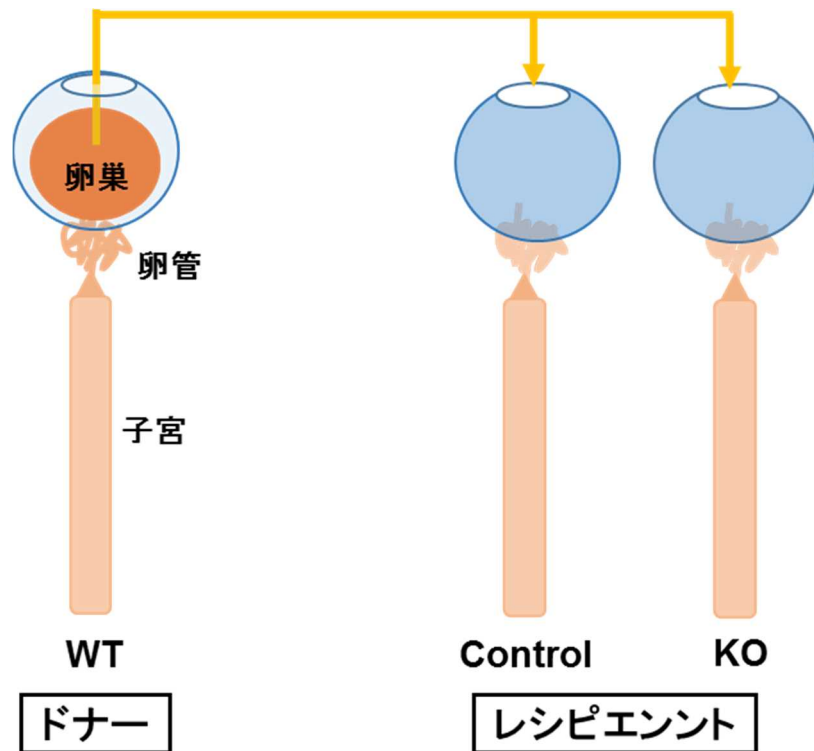


図 8. 卵巣移植

ノックアウトマウス子宮の表現型を卵巣の影響を取り除いて検討するために、卵巣移植の実験を行った。ドナーマウスとして野生型マウス(WT)、レシピエントマウスとしてコントロールマウス(control)およびノックアウトマウス(KO)を用いた。ドナーマウスの卵巣被膜を切開して卵巣を愛護的に摘出し移植用の卵巣を得た。次にレシピエントマウスの卵巣を同様に摘出後、卵巣被膜内に移植した。

フィン包埋したのち、6 $\mu$ m の切片を作成した。切片は脱パラフィン後、10mmol/L クエン酸バッファー(pH6.0)で 1 時間加熱処理し、抗原賦活化した。PBS 洗浄後、3%過酸化水素/メタノールにて 10 分間処理した。PBS 洗浄後、ブロッキング液(DAKO)で 1 時間反応したのち、1 次抗体と 4°C、overnight で反応させた。1 次抗体は、抗 pimonidazole 抗体(Hypoxyprobe, Inc.)、pSTAT3 抗体(Abcam、ab76315)を用いた。1 次抗体反応後に、TBST で洗浄、2 次抗体としてマウスまたはウサギ IgG 用の Envision polymer(DAKO)と 1 時間反応させたのち、DAB(ヒストファイン SAB-PO キット、ニチレイ)にて発色させた。ヘマトキシリンにて核染後に封入して顕微鏡で観察した。

#### **凍結検体の免疫染色**

12 $\mu$ m 厚の薄切を作成し、100%メタノールにて固定、PBS 洗浄後、3%過酸化水素/メタノールにて 10 分間処理した。PBS 洗浄後、ブロッキング液(DAKO)にて 1 時間反応、その後1次抗体と室温 1 時間反応させた。1 次抗体は、COX2(Cayman)、PARD3(Santa Cruz)、E-cadherin(24E10、Cell Signaling)、Cleaved caspase-3 (Cell Signaling) を用いた。TBST で洗浄後、PARD3、E-cadherin は 2 次抗体としては Anti-goat の PE 蛍光標識抗体(Santa Cruz)と 1 時間反応させ、DAPI にて核染後に封入して蛍光顕微鏡で観察した。

cleaved caspase-3 は 2 次抗体としてウサギ IgG 用の Envision polymer と 1 時間反応させたのち、DAB にて発色させた。ヘマトキシリンにて核染後に封入して顕微鏡で観察した。

#### **性ステロイドホルモン測定**

P<sub>4</sub> 測定は Progesterone EIA kit (Cayman)を用いて、E<sub>2</sub>(17 $\beta$ -estradiol)測定は Estradiol ELISA kit (CalBiotech)を用いて、プロトコールにしたがって行った。

### **定量的 PCR**

子宮内膜管腔上皮の *HIF2 $\alpha$*  mRNA を検出するために、Laser Capture Microdissection (LCM) を行い、上皮組織のみを回収した。PEN (polyethylene naphthalate) スライド (Leica Microsystems) に凍結薄切 (20 $\mu$ m 厚) を張り付け、冷却したアセトンで固定し、0.05% トルイジンブルーで染色、エタノールで脱水した。LMD7000 system (Leica Microsystems) を用いて、切片上の目的の領域を切り出し、回収した。

組織からの RNA 抽出は、NucleoSpin kit (Macherey-Nagel) を用いて行った。LCM を用いて回収した組織からの RNA については、Ovation PicoSL WTA system V2 (NuGEN Technology) を用いて増幅した。抽出した RNA を RT-PCR kit (TOYOBO) を用いて cDNA に逆転写した。SYBER Green (TOYOBO) を用いて定量的 PCR を行った。データ解析は Thermal Cycler Dice Real Time System (TAKARA) を用いた。 $\beta$ -actin (Actb) を internal standard として標準化し、表 2 のプライマーを用いて定量 PCR を行った。PCR 条件は 95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 15 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒を 40 サイクル行った。全ての PCR は melting curve を確認した。

### **統計学的解析**

Student's t test, Fisher's exact test にて統計学的解析を行った。P<0.05 を有意とした。

表 2. 各プライマーの塩基配列

| 遺伝子名                                   | 5' 末端                 | 3' 末端                |
|--|-----------------------|----------------------|
| <i>Epas1 (HIF2<math>\alpha</math>)</i> | TGAGGAAGGAGAAATCCCGTG | GGCAACTCATGAGCCAACTC |
| <i>Prlr</i>                            | TCTGGACCTTTTGCACGCTG  | AACATCTGCGATGCTCACCT |
| <i>Prl3c1</i>                          | CTTTCCTGAGCTGGAGGCCA  | AGGAACAGACCCTTCCAGGT |
| <i>Lif</i>                             | GCTATGTGCGCCTAACATGA  | AGTGGGGTTCAGGACCTTCT |
| <i>Actb</i>                            | TGTTACCAACTGGGACGACA  | GGGGTGTTGAAGGTCTCAA  |

## **結果**

### **着床期の子宮内膜は低酸素状態である**

マウスの子宮が着床期に低酸素であることを調べた。WT の妊娠したメスマウスを用いて低酸素プローブである pimonidazole の着床期子宮への取り込みを検討した。pimonidazole 陽性部分は 10mmHg 以下であるため、着床直前 (Day4) の子宮内膜が低酸素であり、着床後 (Day8) 酸素化が促進されることがわかった (図 9)。

### **HIF2 $\alpha$ 欠損マウスは完全な不妊である**

子宮の HIF に着目し、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 $\alpha$ KO) および HIF2 $\alpha$  欠損マウス (HIF2 $\alpha$ KO) を作成し、野生型オスマウスと交配させ妊娠の表現型を調べたところ、HIF2 $\alpha$ KO からは産仔が 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た (図 10)。

### **HIF2 $\alpha$ 欠損マウスは正常なタイミングで着床開始するものの、その後に脱落膜化の異常を呈する**

完全な不妊である HIF2 $\alpha$ KO に着目して以降の研究を行った。

まず、HIF2 $\alpha$ KO 子宮に形態学的な異常がないこと、HIF2 $\alpha$ KO 子宮の HIF2 $\alpha$  mRNA 発現が低下していることを確認した (図 11)。さらに control および HIF2 $\alpha$ KO 子宮における HIF2 $\alpha$  蛋白の発現を検討するため、複数の市販の抗 HIF2 $\alpha$  抗体を用いて HIF2 $\alpha$  蛋白の免疫染色および Western blotting を試みたが、特異的な蛋白のシグナルを検出することができず、本研究では HIF2 $\alpha$  蛋白検出の有効な実験系自体を確立することができなかった。

次に、異常が妊娠のどの段階で起こっているのかを調べた。着床直前である Day4 の HIF2 $\alpha$ KO の胚発育を検討するために胚盤胞数を観察したところ、胚盤胞数は



### Pimonidazole法を用いた低酸素の検出

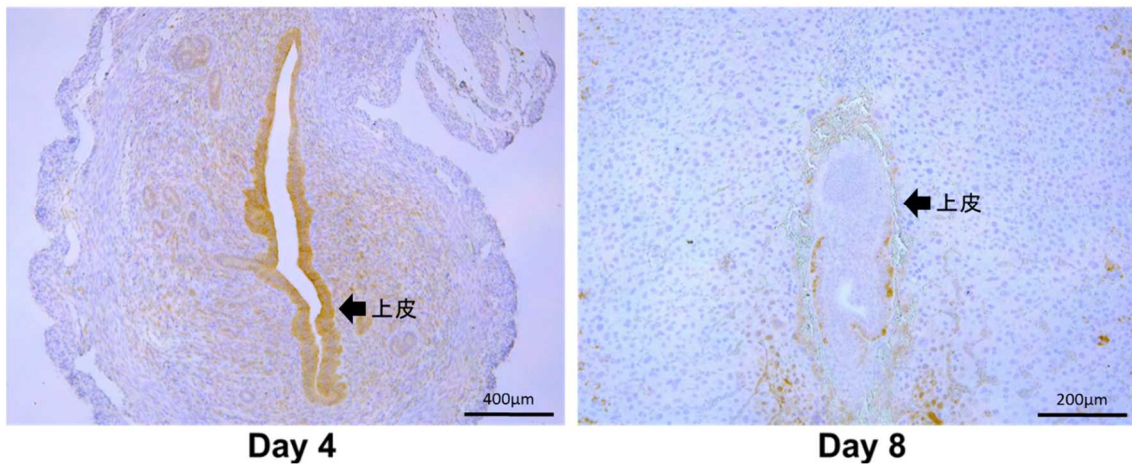


図 9. Pimonidazole の取り込み法を用いたマウス妊娠子宮の低酸素状態の評価

pimonidazole 陽性部分は組織の酸素濃度が 10mmHg 未満とされるため、着床直前の Day4 の子宮内膜は管腔上皮を中心に低酸素状態であること、脱落膜化が顕著な Day8 において酸素濃度が上昇していることが判明した。茶色の染色部位が低酸素領域である。

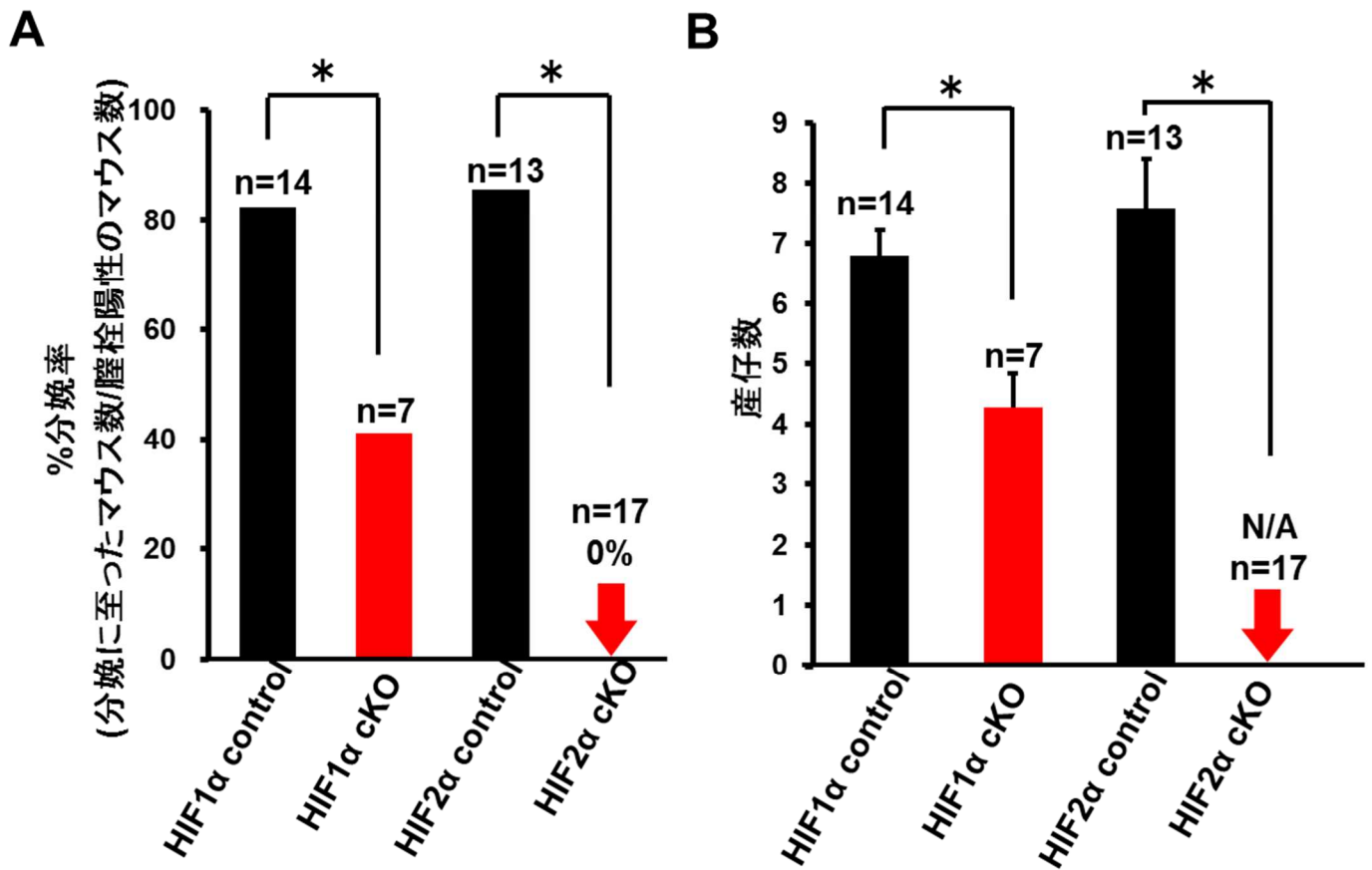


図 10. HIF1αKO、HIF2αKO の産仔数は低下する

A, 分娩率、B, 産仔数。HIF2αKO からは産仔が 1 匹も得られず、HIF1αKO は産仔数がコントロールマウスの 6 割程度まで減少した。\*, P<0.05。

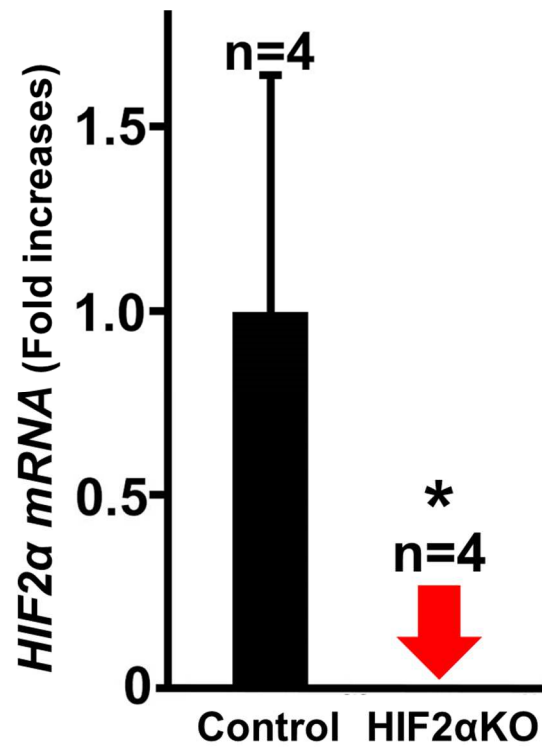


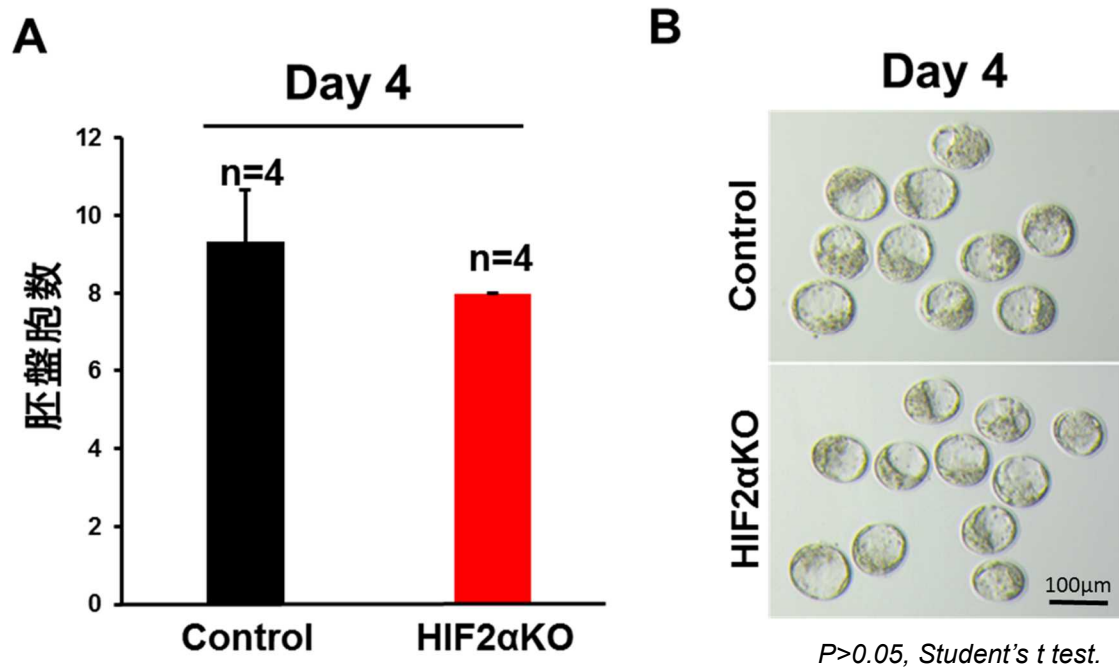
図 11. HIF2αKO 子宮内膜管腔上皮の HIF2α mRNA は低下している

子宮内膜管腔上皮を laser microdissection を用いて回収し、HIF2α mRNA を定量的 PCR で評価し、コントロールと HIF2αKO のマウスで比較した。HIF2αKO では HIF2α mRNA が有意に低下していることが確認できた。\*,  $P < 0.05$ 。

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ることがわかった(図 12)。次に、着床の開始点(子宮と胚との接着反応が起こる時期)である 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(図 13)、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、脱落膜化が促進される時期である Day6 において、脱落膜化によりやや増大した着床部位の個数を数えて着床数を検討したところ、有意な差を認めなかった(図 14)。子宮内膜間質の着床に伴う分化である脱落膜化が最も顕著である Day8 の子宮では、通常着床部位の子宮が増大し着床部位が一見して判定できるが、HIF2 $\alpha$ KO では着床部位の増大部分を全く認めなかった(図 15)。この結果から、HIF2 $\alpha$ KO には脱落膜化に異常があること、脱落膜化異常に付随する着床異常(不妊)が生じている可能性が明らかとなった。

#### **HIF2 $\alpha$ 欠損マウスにおける、脱落膜化異常に伴う脱落膜由来の卵巣黄体活性化因子の発現低下と、それに伴う卵巣のプロゲステロン分泌の低下**

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、これらのプロラクチン関連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 P<sub>4</sub> 分泌を持続させることが知られている (8, 9, 31-34)。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 (18)。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・維持に重要である。脱落膜化の異常を伴う HIF2 $\alpha$ KO では Prlr および Prl3c1 の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、HIF2 $\alpha$ KO では Prlr および Prl3c1 の mRNA 発現が低下していた(図 16)。次に、HIF2 $\alpha$ KO においては脱落膜化異常に伴う卵巣の黄体化抑制が起



**図 12. HIF2αKO の着床直前の胚発育は正常である**

A, Day4 の HIF2αKO およびコントロールマウスの子宮内に認められた胚盤胞数。

B, 胚盤胞の形態。HIF2αKO の着床直前の胚発育に異常を認めなかった。

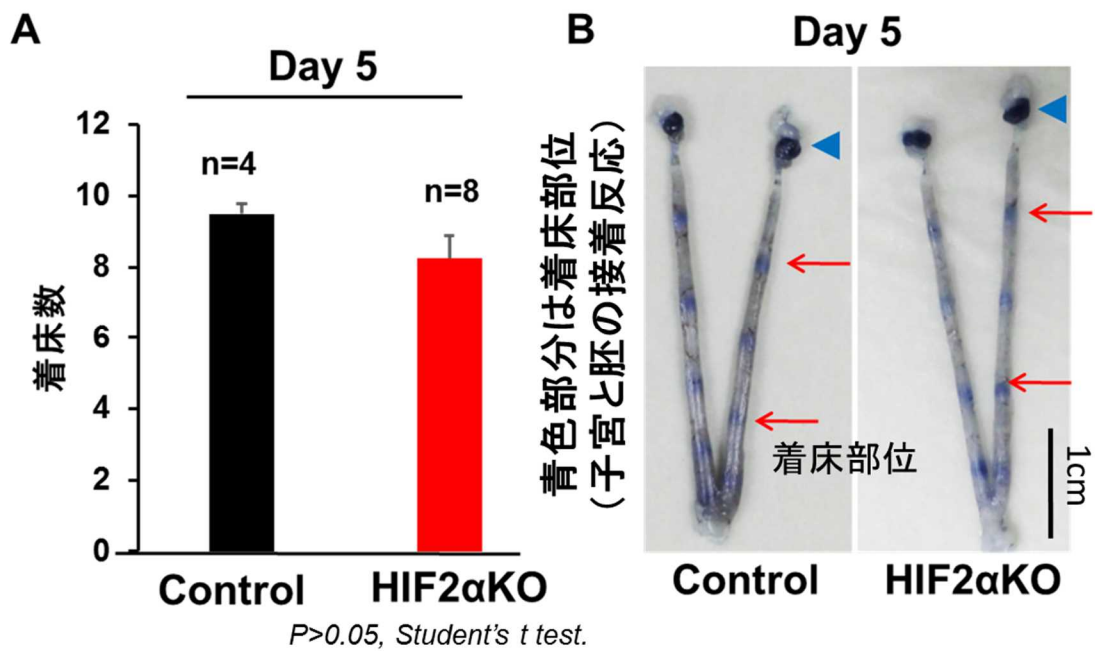


図 13. HIF2αKO の着床開始(接着反応)は正常なタイミングで起こる

A, Day5 の HIF2αKO およびコントロールマウスの着床数。

B, Day5 子宮における着床部位。HIF2αKO の着床(接着反応)は正常なタイミングで起こっていた。赤矢印は着床部位、青矢頭は卵巣。

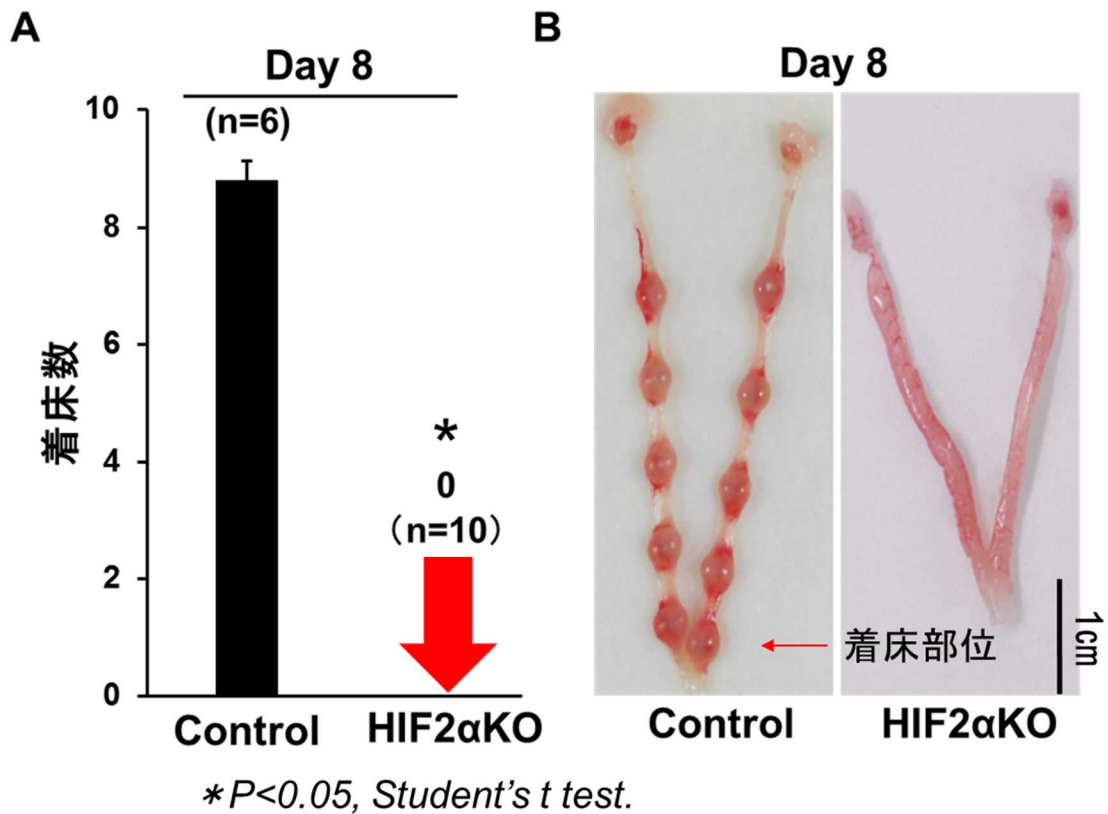


図 14. HIF2αKO の Day6 の着床数はコントロールマウスと同等である

A, Day6 の HIF2αKO およびコントロールマウスの着床数。B, Day6 子宮における着床部位。HIF2αKO において着床部位は視認でき、その数はコントロールと同等であった。

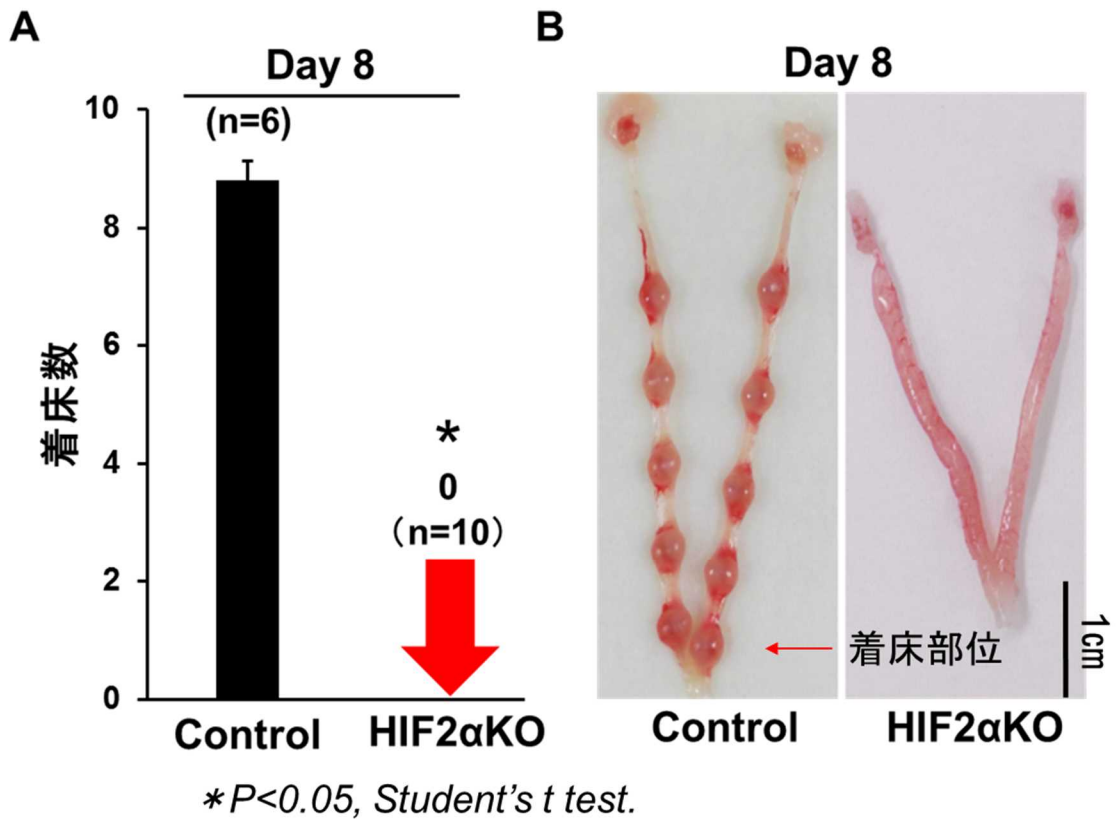


図 15. Day8 において、HIF2αKO の着床部位が認められない

A, Day8 の HIF2αKO およびコントロールマウスの着床数(膨らんだ着床部位の数)。  
 B, Day8 子宮における着床部位。HIF2αKO において、脱落膜化により増大した着床部位は全く視認できず、妊娠が障害されていることが判明した。



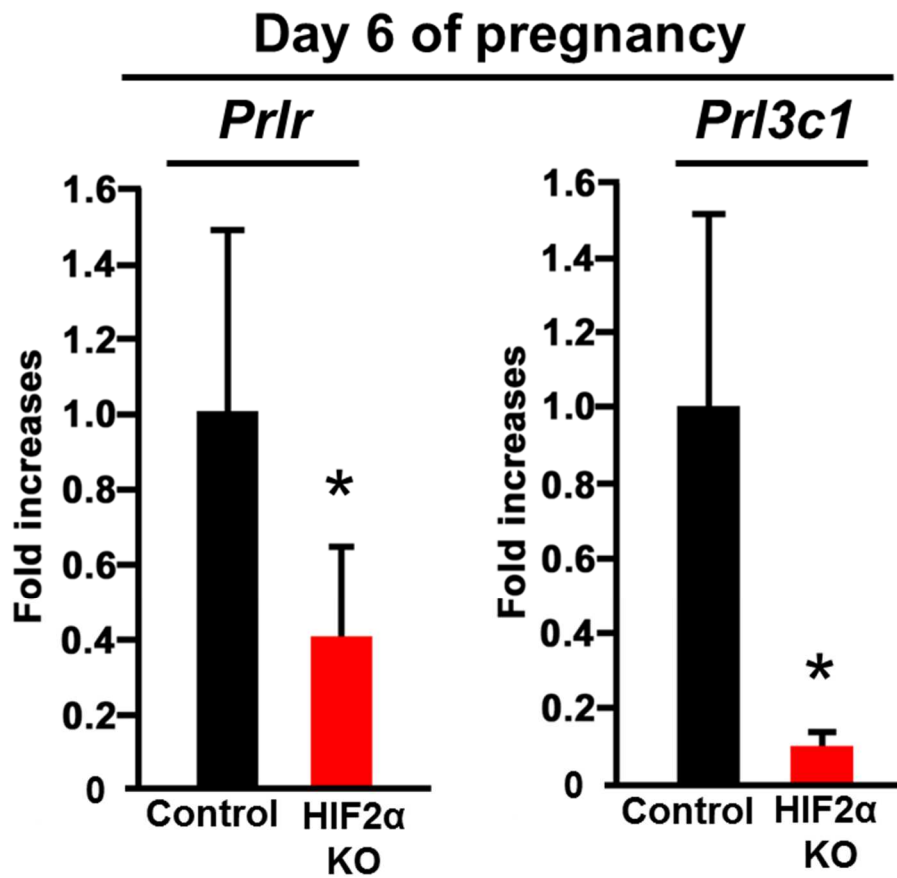


図 16. HIF2αKO では、脱落膜由来の卵巣賦活化に関するプロラクチン関連因子 *Prlr* および *Prl3c1* の発現が低下している

脱落膜化の異常を認める HIF2α cKO では、Day6 において脱落膜由来で卵巣賦活化(活性化)に関与する因子として知られるプロラクチン関連遺伝子 *Prlr* および *Prl3c1* の発現低下を認めた。\*, P<0.05。

こっていることが推測されたため、HIF2 $\alpha$ KO およびコントロールマウスの血中の卵巣ステロイドホルモン濃度 (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と比べて、HIF2 $\alpha$ KO の血中 E<sub>2</sub> 値には差をみとめなかったが、HIF2 $\alpha$ KO の P<sub>4</sub> 濃度は Day6 および Day8 で低値を示した(図 17)。

### **HIF2 $\alpha$ 欠損マウスへの P<sub>4</sub> 補充は着床障害を救済しない**

次に脱落膜化異常とそれに伴う P<sub>4</sub> 低下が HIF2 $\alpha$ KO の着床障害の原因になっているのか、あるいは着床障害の結果として起こっているのか、という疑問を明らかにするため、HIF2 $\alpha$ KO に P<sub>4</sub> を投与し、脱落膜化と妊孕性が改善するかを検討した。Day2 から 2 mg/mouse/day の P<sub>4</sub> を HIF2 $\alpha$ KO 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(図 18)。HIF2 $\alpha$ KO への P<sub>4</sub> 投与により、膨らんだ着床部位が視認可能となった。さらに、この回復した HIF2 $\alpha$ KO 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(図 18)。しかしながら、HIF2 $\alpha$ KO 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(図 18)。さらに、HIF2 $\alpha$ KO においては 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)(図 19)。以上の結果から、HIF2 $\alpha$ KO 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。

### **正常卵巣移植では HIF2 $\alpha$ KO 子宮における着床障害は改善しない**

HIF2 $\alpha$ KO ではプロゲステロン受容体 Pgr のプロモーター作動性の Cre を用いている。Pgr は卵巣にも発現しているため、HIF2 $\alpha$ KO 子宮の表現型を卵巣の影響を除外して検討するために、卵巣移植の実験を行った。野生型マウス卵巣を摘出し、コントロールおよび HIF2 $\alpha$ KO の各レシピエントマウスへ正常卵巣を移植した。卵巣移植マ

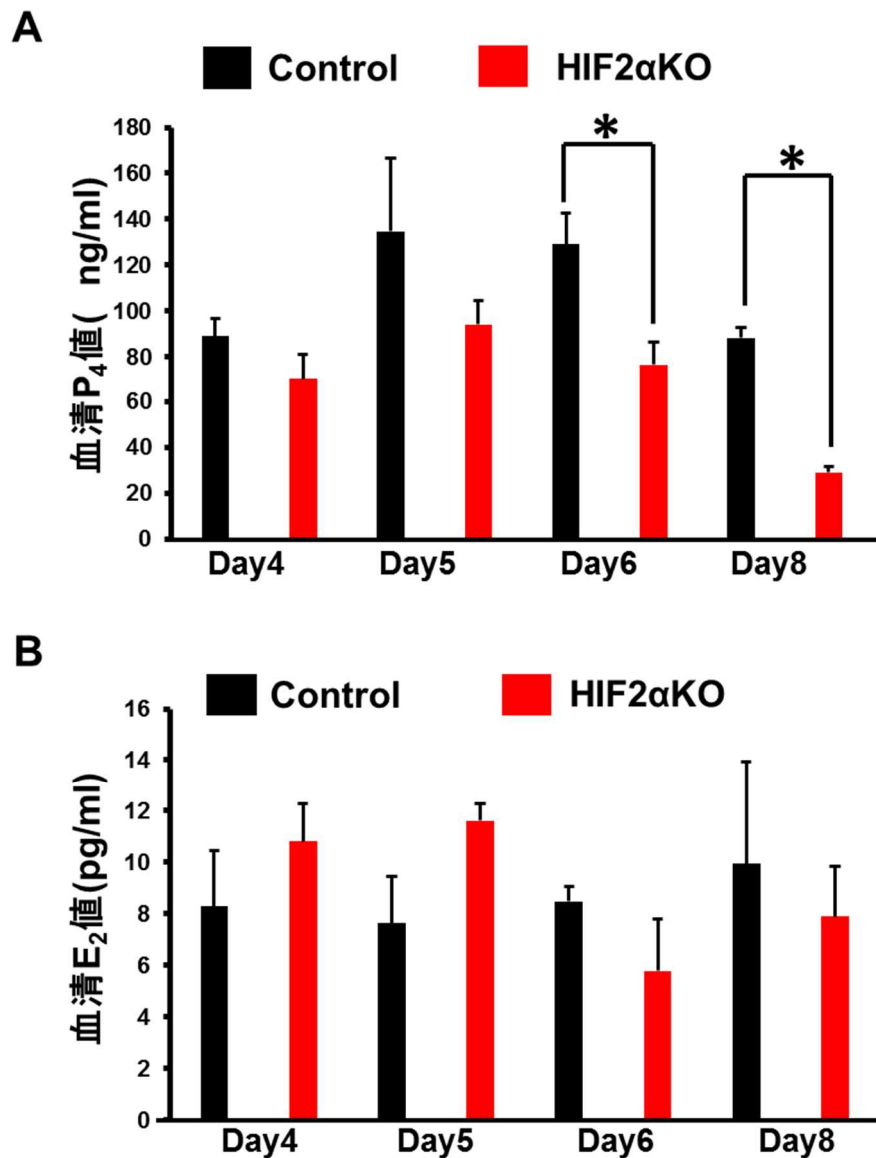


図 17. 着床期の血中の卵巣ステロイドホルモン濃度

着床直前 (Day4) から脱落膜形成 (Day8) までの血清 P<sub>4</sub> 値 (A) および E<sub>2</sub> 値 (B) を測定した。HIF2αKO の血清 P<sub>4</sub> 濃度は Day6 および Day8 において低下した。一方血清 E<sub>2</sub> 値は HIF2αKO とコントロールマウスで差を認めなかった。\*, P<0.05。

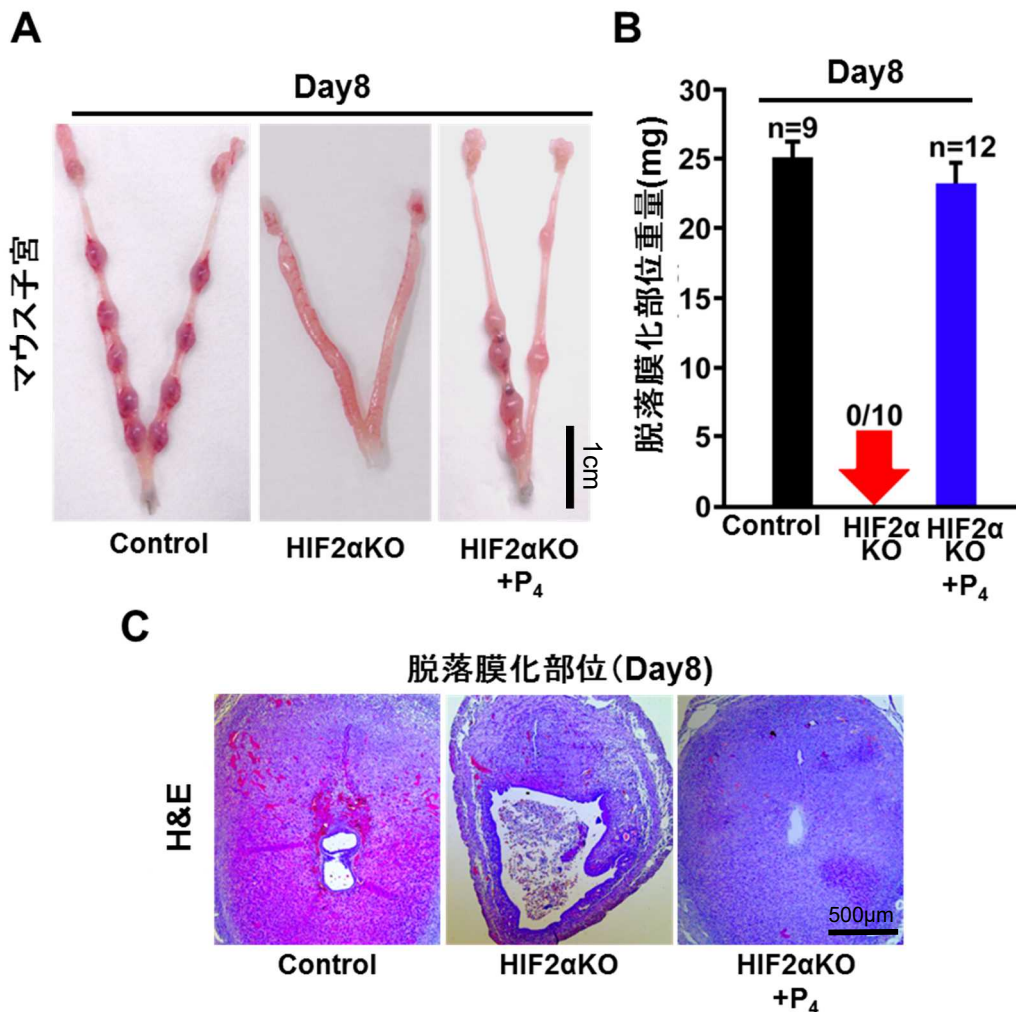


図 18. HIF2αKO の P<sub>4</sub> 補充による着床の表現型の変化—脱落膜化は回復するものの胚着床の異常は回復しない

HIF2αKO に P<sub>4</sub> 補充 (Day2~7、2mg/mouse/day、皮下注) を行った。Day8 に HIF2αKO とコントロールマウスを解剖し子宮を評価した。A, 子宮のマクロ写真。B, 脱落膜化部位重量。C, 脱落膜化部位の組織像 (HE 染色)。P<sub>4</sub> 補充により、HIF2αKO の脱落膜化および脱落膜化部位の重量は改善した。一方で、P<sub>4</sub> 投与でも HIF2αKO の脱落膜化部位に胚を認めなかった。

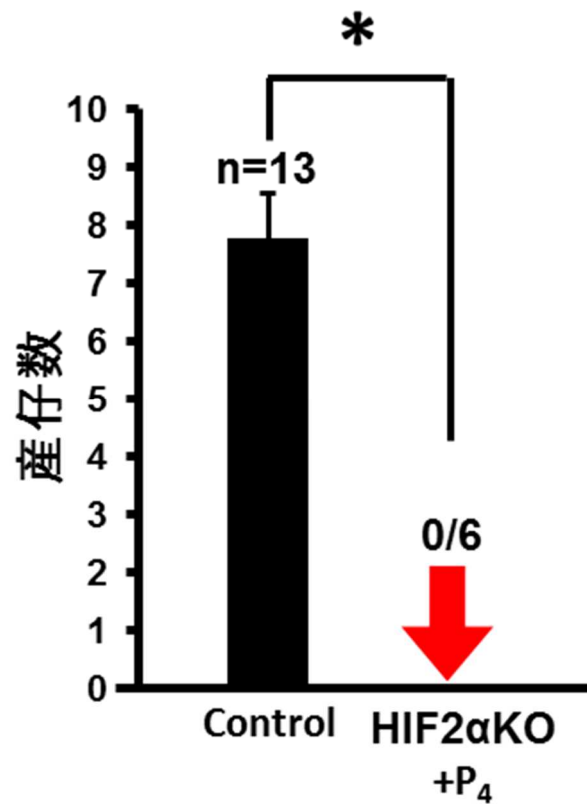


図 19. P<sub>4</sub> 補充では、HIF2αKO の不妊は改善しない

HIF2αKO に P<sub>4</sub> 補充 (Day2~17、2mg/mouse/day、皮下注) を行い、産仔数を評価した。P<sub>4</sub> 補充により、HIF2αKO の不妊は改善しなかった。\*, P<0.05。

ウスを野生型のオスマウスと交配させ、Day8 で着床の表現型を評価した。コントロールの卵巣移植マウスでは着床部位を認めた一方で、HIF2 $\alpha$ KO の卵巣移植マウスでは子宮に腫大した着床部位が認められず、正常卵巣を移植しても着床の表現型の改善は認められなかった(図 20)。この結果から、HIF2 $\alpha$ KO の着床障害の表現型は子宮因子によるものであることが明らかとなった。

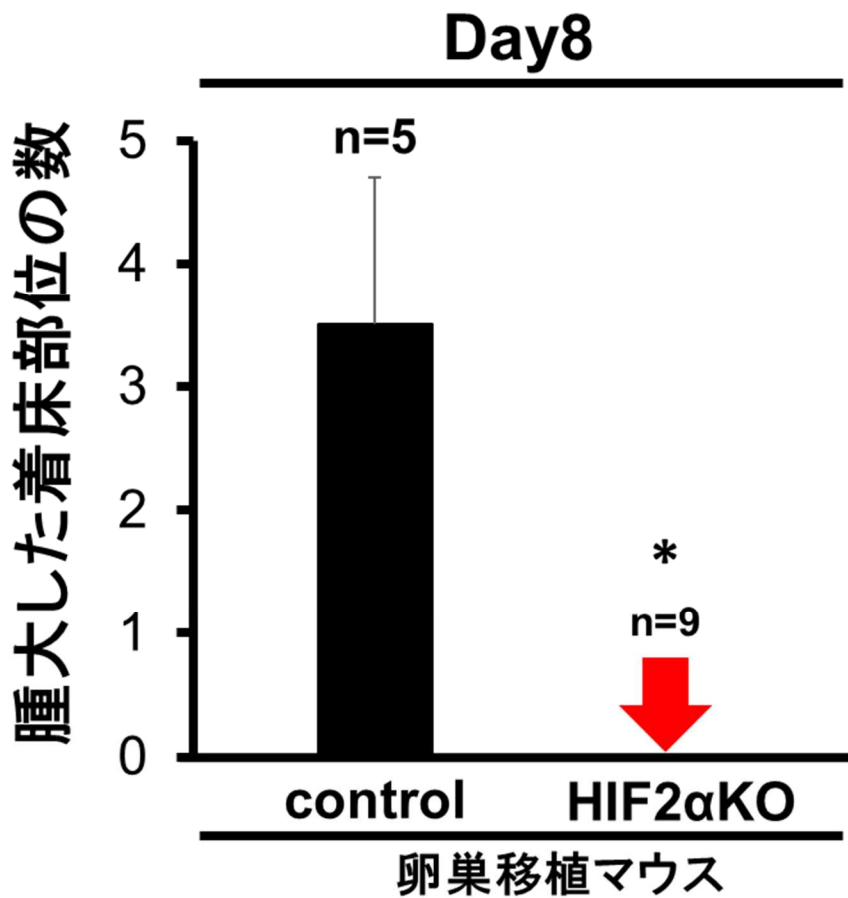
### **HIF2 $\alpha$ 欠損マウスは胚接着位置の異常をきたす**

次に、Day8 の脱落膜化よりも前の段階にさかのぼって HIF2 $\alpha$ KO の組織学的検討を行った。HIF2 $\alpha$ KO 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(図 21)。このことから、Day6 の HIF2 $\alpha$ KO 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 HIF2 $\alpha$ KO 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、HIF2 $\alpha$ KO では管腔の中間部分に接着していた(図 22)。このように HIF2 $\alpha$ KO では、胚接着位置に異常を生じることが判明した。

### **HIF2 $\alpha$ KO の LIF 低下と LIF 補充による胚接着位置の改善**

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 HIF2 $\alpha$ KO で低下していた(図 23A)。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。HIF2 $\alpha$ KO の着床部位子宮内膜の STAT3 の活性化が抑制されていた(図 23B)。



**図 20. 正常卵巣移植マウスを用いた着床の解析**

HIF2αKO の卵巣の遺伝子型の影響を除外して解析を行うために、野生型マウスの正常卵巣を、卵巣摘出後のコントロールマウスおよび HIF2αKO をレシピエントとして移植した卵巣移植マウスを作成した。卵巣移植マウスを野生型オスマウスと交配させ、Day8 に着床の表現型を評価した。コントロール卵巣移植マウスには腫大した着床部位が認められた一方で、HIF2αKO 卵巣移植マウスの子宮には腫大した着床部位が認められなかった。\*, P<0.05 vs control。

## Day6 着床部位

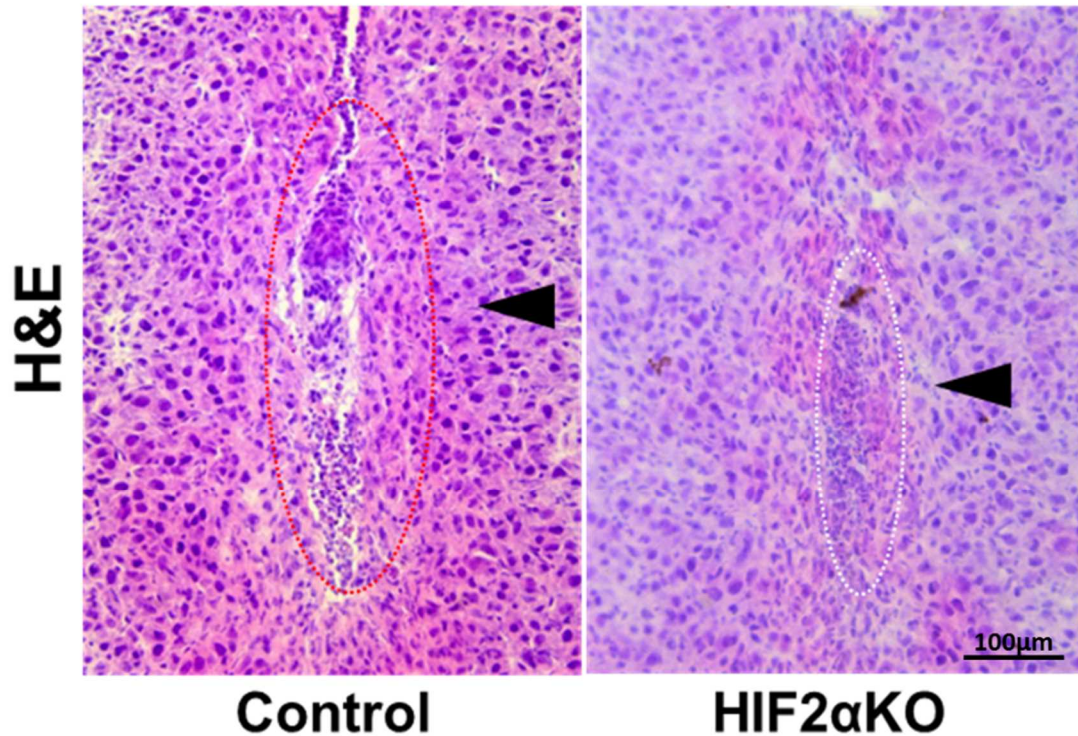


図 21. Day6 の HIF2αKO 子宮における胚の組織構造の異常

HIF2αKO の Day6 の着床部位を組織学的に評価した。矢頭および楕円点線;胚。  
HIF2αKO 子宮において胚様の組織は認められるものの正常な胚の構造ではなく、  
赤血球の集積を伴っていた。HIF2αKO の子宮では Day6 で胚の分解が始まっている  
ことが示唆された。矢頭: 胚。



## Day5 着床部位

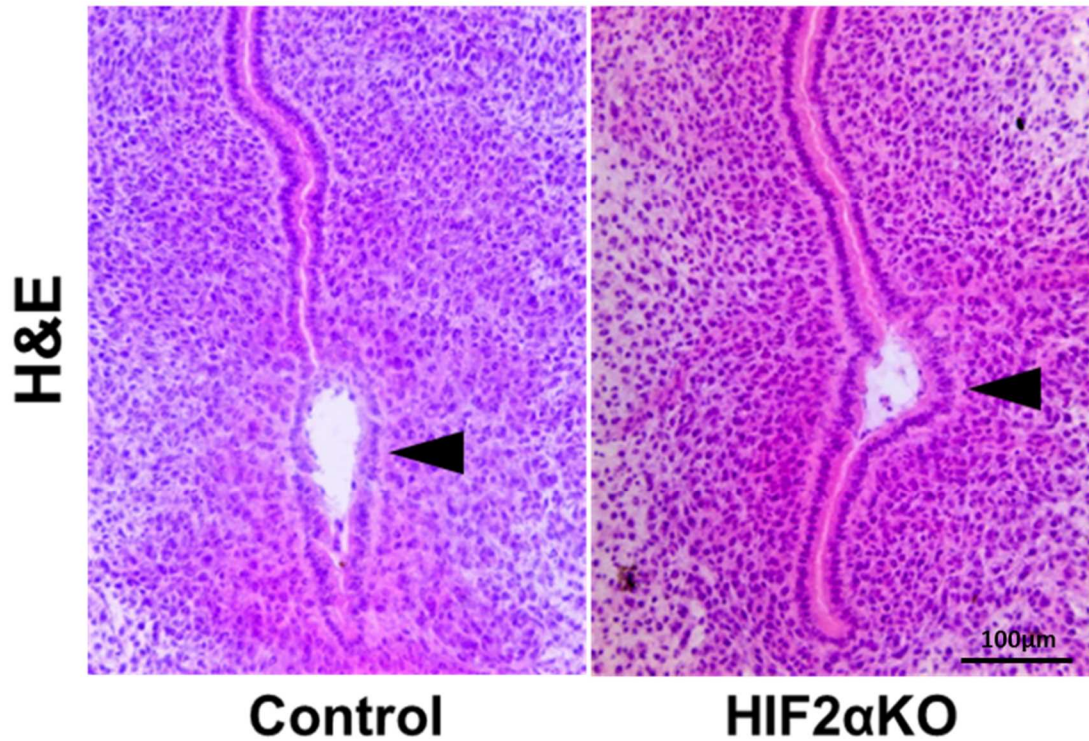


図 22. Day5 の HIF2αKO 子宮内膜管腔における胚接着位置の異常

HIF2αKO の Day5 の着床部位を組織学的に評価した。矢頭;胚。HIF2αKO 子宮において接着反応は認められるものの正常な位置ではなかった。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のに対し、HIF2αKO 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のに対し、HIF2αKO では管腔の中間部分に接着していた。矢頭: 胚。

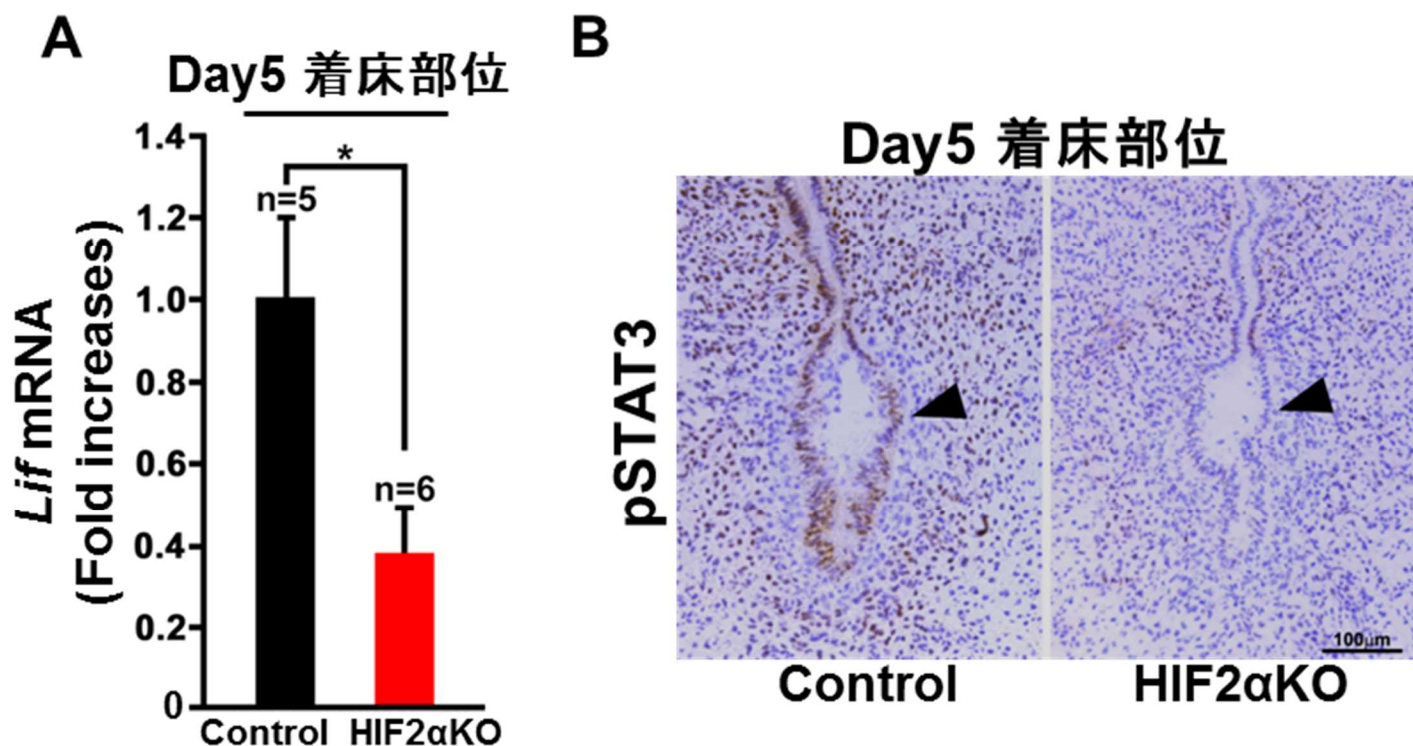
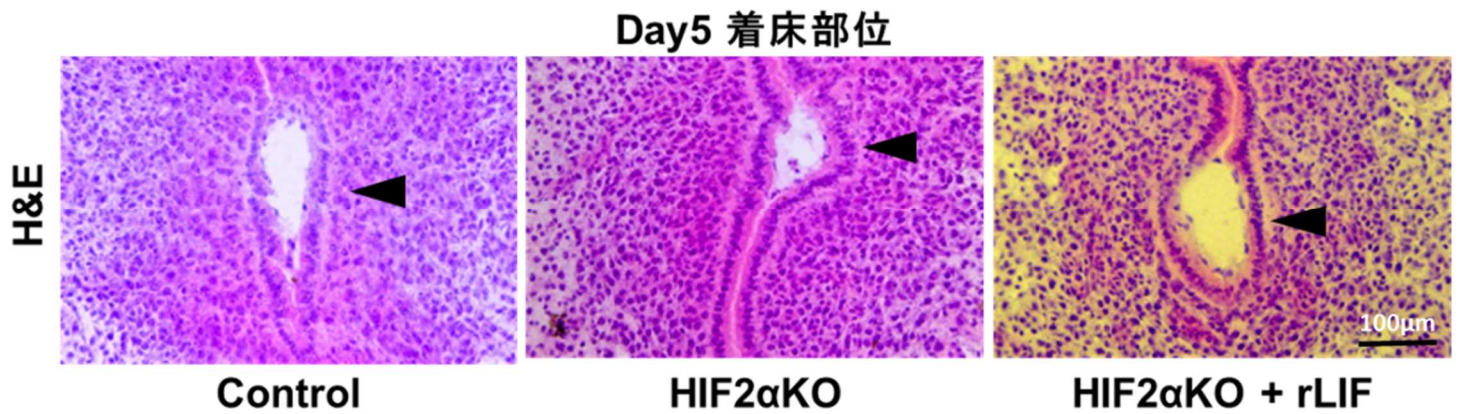


図 23. Day5 における HIF2αKO の LIF-STAT3 経路のダウンレギュレーション

A, Day5 の着床部位子宮の Lif mRNA 発現を定量的 PCR で検討した。HIF2αKO では Lif mRNA 発現が有意に低下していた。\*,  $P < 0.05$ 。B, LIF のシグナル経路である STAT3 の活性化を検討するために、リン酸化 STAT3 (pSTAT3) の免疫染色を行った。STAT3 の活性化は HIF2αKO で低下していた。胚: 矢頭。

LIF 低下が HIF2 $\alpha$ KO 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 HIF2 $\alpha$ KO 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 HIF2 $\alpha$ KO の着床位置部位は改善された (図 24)。しかしながら、LIF 投与でも HIF2 $\alpha$ KO 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。



**図 24. LIF 投与による子宮管腔における胚接着位置の改善**

HIF2αKO に対して、リコンビナント LIF (rLIF、day4、12ng/mouse、腹腔内) の投与を行い、胚の接着位置を評価した。rLIF 投与により、胚接着位置は改善し子宮管腔の反血管側末端に接着した。胚：矢頭。

### **Day5 夕方に HIF2 $\alpha$ KO の管腔上皮が消失せず、胚が子宮内膜間質に浸潤しない**

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 (図 25)。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 (図 25)。

### **HIF2 $\alpha$ KO において、胚接着部位の子宮内膜管腔上皮の細胞極性は低下しない**

HIF2 $\alpha$ KO において、妊娠が継続しない原因として、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 (図 26)。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。一方で、子宮内膜管腔上皮のアポトーシスは HIF2 $\alpha$ KO だけでなくコントロールマウスでもほとんど認められなかった (図 27)。



## H&E 着床部位

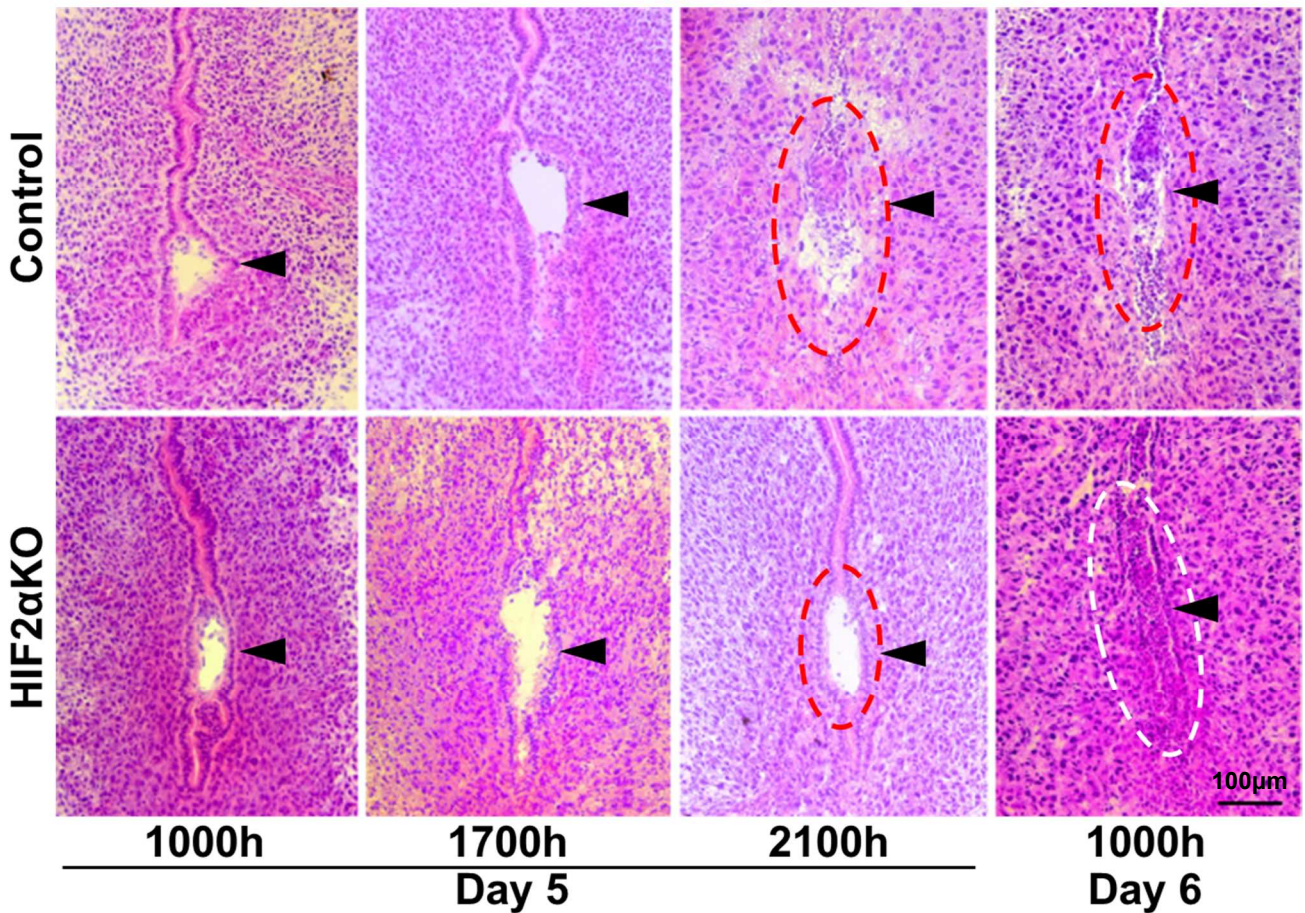


図 25. HIF2 $\alpha$ KO 子宮における、胚の接着から浸潤までの過程の組織学的異常

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。楕円点線部および矢頭：胚。

着床部位 Day5 1700h

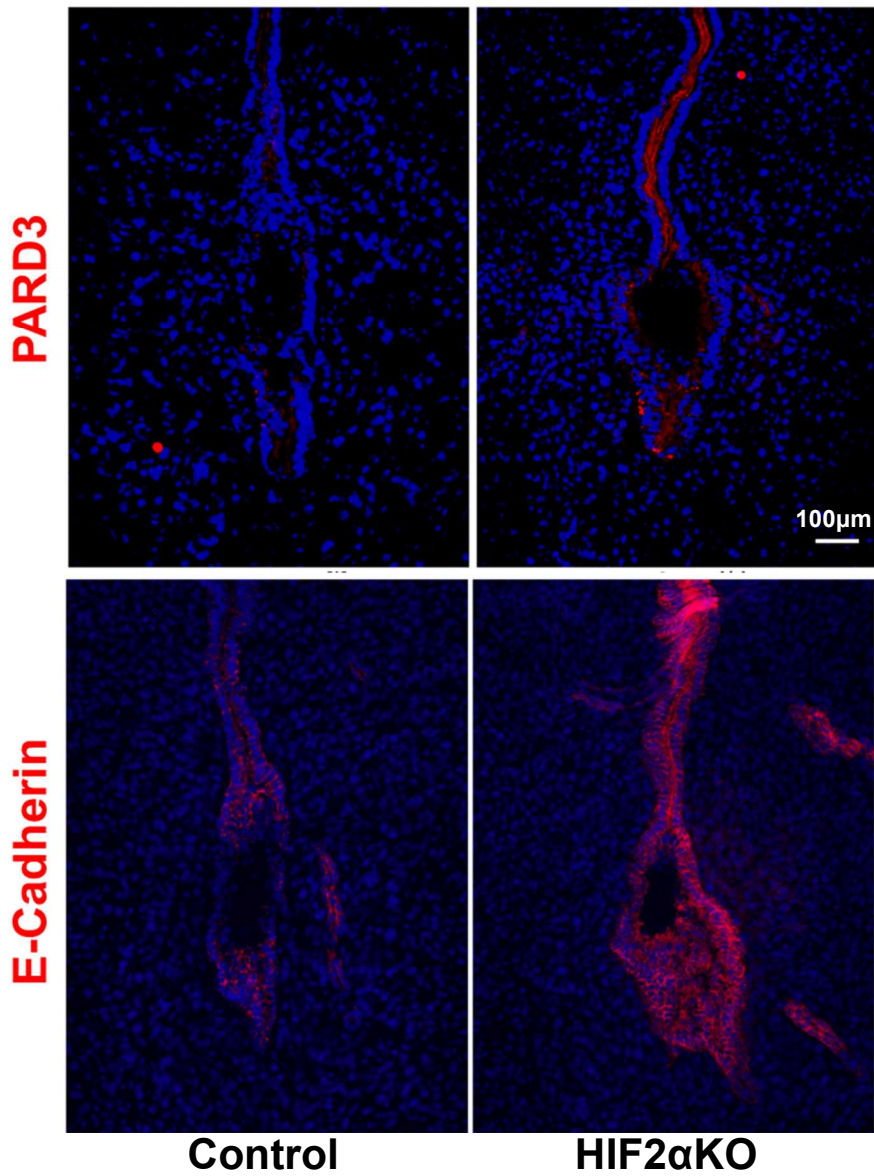


図 26. HIF2αKO では胚接着部位の子宮内膜管腔上皮の細胞極性が低下しない

Day5 午後 5-6 時(17-18 時)の着床部位組織を用いて、細胞極性のマーカーである PARD3 および E-cadherin の蛍光免疫染色を行った。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 HIF2αKO においては、PARD3 および E-cadherin 低下を認めなかった。



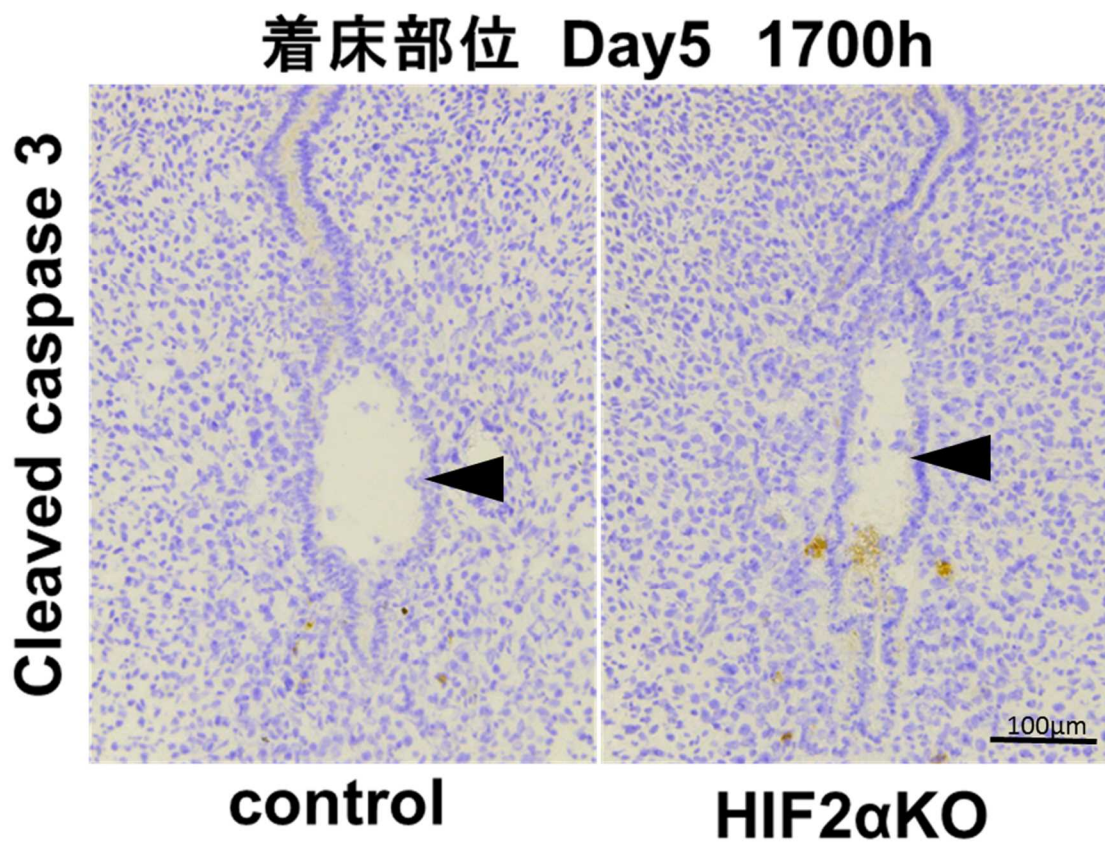


図 27. コントロールおよび HIF2αKO 子宮における胚接着部位の子宮内膜管腔上皮のアポトーシスは明らかでない

Day5 午後 5-6 時(17-18 時)の着床部位組織を用いて、アポトーシスのマーカーである cleaved caspase 3 染色を行った。コントロールマウスおよび HIF2αKO のいずれにおいても管腔上皮のアポトーシスはほとんど認められなかった。矢頭: 胚。



## 考察

着床前の子宮内膜上皮は低酸素であり、着床後に脱落膜化や血管新生が起こり、胎盤が形成され、酸素濃度が上昇する。適切な酸素化の過程が良好な妊娠成立・維持に重要であり、この時期における血管形成の異常は妊娠高血圧症などの周産期合併症の原因になる可能性が示唆されている (35)。胎盤形成における低酸素の意義を調べた研究はこれまで多く、また着床後の高酸素環境となる時期に注目した研究も多い。一方で、着床前の子宮内膜の低酸素環境に注目した研究はこれまで極めて少なかった。本研究では、着床直前の子宮内膜は低酸素状態であり、着床後酸素化が進むことを、マウスモデルで示した。この研究結果に加えて、妊娠初期の子宮内膜に HIF $\alpha$  が発現しているという報告から、着床期の子宮内膜の低酸素が HIF $\alpha$  を活性化させ、着床に寄与している可能性が推測された。このような研究背景から、本研究では子宮の HIF $\alpha$  に着目し、HIF $\alpha$  の着床における役割を追及することとした。

本研究では、子宮特異的 HIF $\alpha$  欠損マウスを作成した。子宮特異的 HIF2 $\alpha$  欠損マウス(HIF2 $\alpha$ KO)が着床障害による完全な不妊になることを示した。子宮由来の細胞を用いた研究は散見されるものの、生体での機能解析はこれまで行われてこなかった。全身性の HIF $\alpha$  欠損マウスは胚性致死になるため成体を得ることができなかったことが大きな理由である。近年生殖臓器である子宮においてもコンディショナルノックアウトマウスのシステムを用いた研究が増えてきている。本研究でもその技術を利用して子宮特異的な HIF $\alpha$  欠損マウスを作成し機能解析を行ったことで、HIF $\alpha$  の新たな機能を見出すことができた。

本研究で用いた HIF1 $\alpha$ KO および HIF2 $\alpha$ KO は C57LB/6 遺伝系統の HIF1 $\alpha$ -loxP または HIF2 $\alpha$ -loxP マウスと C57BL/6/129SV 遺伝系統の Pgr-Cre との交配から作成した混合遺伝系統である。本研究においては、繁殖用のペアマウスから生まれた同腹仔のコントロールマウスとコンディショナルノックアウトマウスを実験に使用し表現型を比較していること、特に、HIF2 $\alpha$ KO はすべてのマウスが着床

障害を示して不妊になることから、混合遺伝系統による今回の妊娠の表現型に与える影響は最小限であったと考えている。一方で、純系の遺伝系統で実験を行った場合には妊娠や着床の表現型が異なる可能性も懸念されるため(18)、純系での HIF1 $\alpha$ KO および HIF2 $\alpha$ KO の妊娠実験が今後の検討課題として挙げられる。

HIF2 $\alpha$ KO において、着床期の LIF 発現が低下し着床位置の異常をきたした。これまでの報告で、ヒト大腸癌細胞株において、低酸素環境下で誘導される HIF1 $\alpha$  でなく HIF2 $\alpha$  が転写調節因子として作用し LIF 発現を誘導することが示されている (36)。本研究結果と合わせると、子宮の HIF2 $\alpha$  が転写調節を介して LIF を誘導している可能性が考えられた。一方で、マウス ES 細胞においては、低酸素で誘導される HIF1 $\alpha$  が転写調節を介して LIF 受容体の発現を直接的に抑制し、LIF-STAT3 シグナルを抑制的に調節していることが示されており (37)、HIF1 $\alpha$  および HIF2 $\alpha$  のそれぞれの LIF-STAT3 シグナル調節機構が存在することも示唆され、複雑な HIF による LIF-STAT3 シグナル調節の仕組みの存在が推測された。子宮においては HIF2 $\alpha$  誘導性の LIF-STAT3 シグナル活性化の経路が優位となっていると考えられた。

本研究による新たな知見として、HIF2 $\alpha$  による子宮内膜管腔上皮の消失という現象が、胚の子宮への浸潤メカニズムとして重要であること明らかとなった。またこのメカニズムに細胞極性に関わる因子が関与している可能性が推測された。一方で、胚が接着する部位の子宮内膜上皮細胞の消失の直接的な原因解明には至らなかった。正常な(あるいはコントロールの)マウスにおいて、着床部位の子宮内膜上皮にアポトーシスはほとんど認められないことから (38, 39)、アポトーシスによる上皮消失のメカニズムは考えにくい。栄養膜細胞による子宮内膜上皮の貪食(エントーシス)という機構が最近報告されており (38)、子宮内膜上皮の HIF2 $\alpha$  が栄養膜細胞による食べられやすさをコントロールしている可能性も考えられる。また、上皮間葉転換による上皮消失の可能性も考えられる。これらの疑問を解決するために、今後の検討が必要である。

低酸素によって HIF $\alpha$  が誘導されることはよく知られた事実である (40-43)。転写因子 HIF の下流遺伝子による低酸素応答としては表 1 に示す因子が挙げられるが、本研究では妊娠子宮における機能的に重要な直接の HIF2 $\alpha$  のターゲットを同定するには至らなかった。これについても、今後の研究課題として挙げられる。

着床における分子細胞生物学的な変化は非常に複雑であり、HIF2 $\alpha$  のみにしても、妊娠の様々な段階で、様々な役割を負っていると考えられる。本研究において、子宮の HIF2 $\alpha$  の着床における重要性は示すことができたと考えられる。

### **まとめ** (図 30)

1. 着床直前のマウスの子宮内膜は低酸素である。
2. 子宮の HIF2 $\alpha$  は着床に必須の因子であり、欠損すると着床障害になる。
3. 子宮の HIF2 $\alpha$  は LIF 発現調節を介して、胚の子宮管腔への接着位置をコントロールしている。
4. 子宮の HIF2 $\alpha$  は子宮内膜管腔上皮の細胞極性低下と細胞の消失を誘導し、胚の子宮内膜間質への浸潤を調節している。

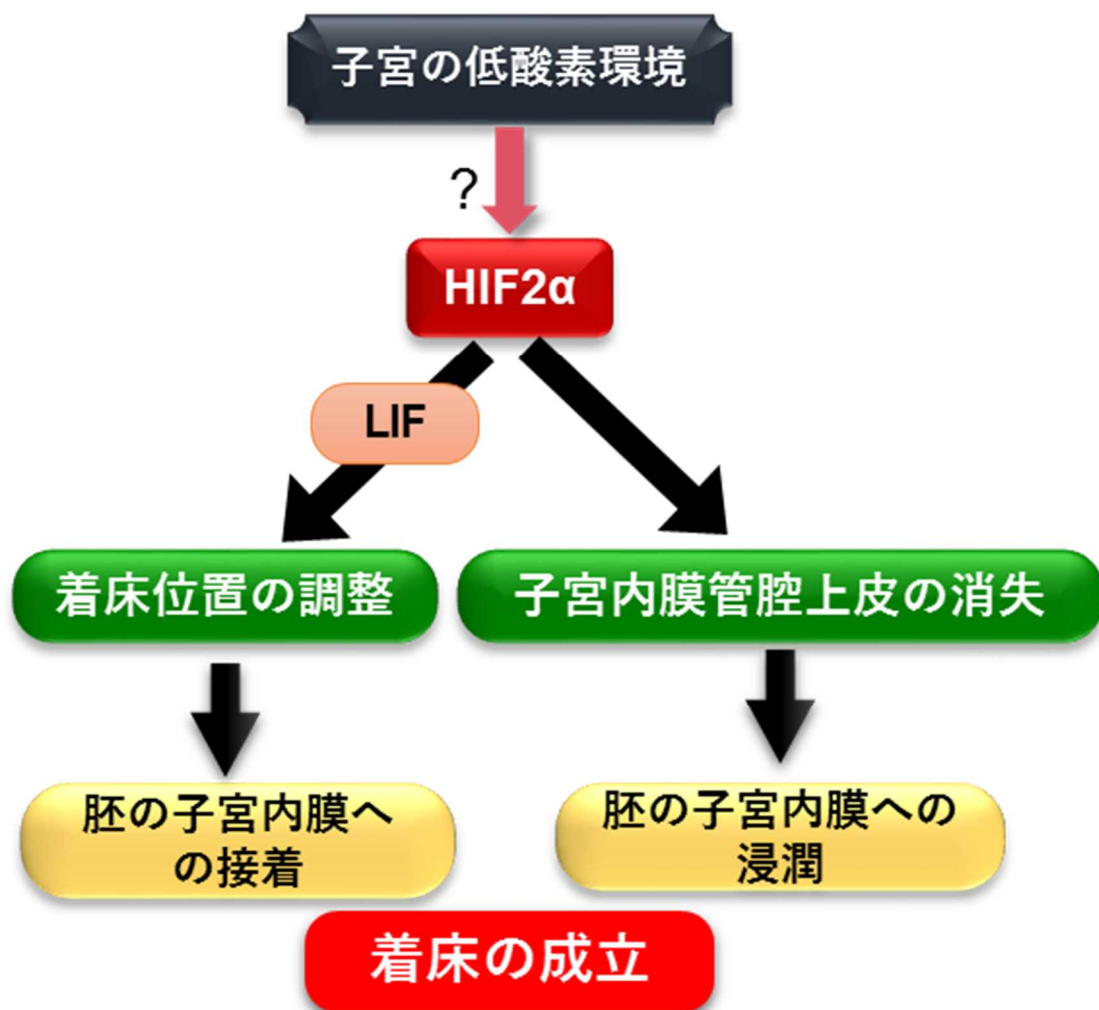


図 30. 本研究結果のまとめ図

## おわりに

本研究によって、子宮の HIF2 $\alpha$  が着床に必須の因子であることが明らかになった。しかしながら HIF の転写調節の下流因子の同定には至っていない。転写因子 HIF2 $\alpha$  がどの下流因子を介して細胞極性や細胞消失を誘導しているのか、またそのメカニズムの詳細を解明することが今後の課題である。また、着床期子宮内膜へ HIF 誘導のメカニズムが低酸素によるものか、胚接着の物理的刺激など他の因子によるものなのか、についても今後明らかにする必要がある。

着床に関する研究は生命科学の研究対象として非常に魅力的であるとともに生殖医学の見地からもその成果は不妊治療や避妊薬の開発などに応用することが可能である。HIF や低酸素の観点から着床を考えると同時に、着床障害などの臨床医学の観点からも研究を進めていきたい。

## **謝辞**

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導いただきました廣田泰講師、大須賀穰教授、藤井知行教授に心よりお礼を申し上げます。

## 引用文献

1. Egashira M, and Hirota Y. Uterine receptivity and embryo–uterine interactions in embryo implantation: lessons from mice. *Reproductive Medicine and Biology*. 2013;12(4):127-32.
2. Hiraoka T, Saito-Fujita T, and Hirota Y. How does Progesterone Support Embryo Implantation? *Journal of Mammalian Ova Research*. 2015;32(3):87-94.
3. 江頭真宏、廣田泰. 種差からみた着床—ヒトとの共通点と相違点—. *HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY*. 2015;22(3):11-7.
4. Cha J, Sun X, and Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med*. 2012;18(12):1754-67.
5. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, and Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev*. 2004;25(3):341-73.
6. Munro SK, Farquhar CM, Mitchell MD, and Ponnampalam AP. Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*. 2010;16(5):297-310.
7. Haraguchi H, Saito-Fujita T, Hirota Y, Egashira M, Matsumoto L, Matsuo M, Hiraoka T, Koga K, Yamauchi N, Fukayama M, et al. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Mol Endocrinol*. 2014;28(7):1108-17.
8. Herz Z, Khan I, Jayatilak PG, and Gibori G. Evidence for the secretion of decidual luteotropin: a prolactin-like hormone produced by rat decidual cells. *Endocrinology*. 1986;118(6):2203-9.
9. Bao L, Tessier C, Prigent-Tessier A, Li F, Buzzio OL, Callegari EA, Horseman ND, and Gibori G. Decidual prolactin silences the expression of genes



- detrimental to pregnancy. *Endocrinology*. 2007;148(5):2326-34.
10. Jayatilak PG, Glaser LA, Basuray R, Kelly PA, and Gibori G. Identification and partial characterization of a prolactin-like hormone produced by rat decidual tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(1):217-21.
  11. Gibori G, Rothchild I, Pepe GJ, Morishige WK, and Lam P. Luteotrophic action of decidual tissue in the rat. *Endocrinology*. 1974;95(4):1113-8.
  12. Hirota Y, Daikoku T, Tranguch S, Xie H, Bradshaw HB, and Dey SK. Uterine-specific p53 deficiency confers premature uterine senescence and promotes preterm birth in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(3):803-15.
  13. Daikoku T, Hirota Y, Tranguch S, Joshi AR, DeMayo FJ, Lydon JP, Ellenson LH, and Dey SK. Conditional loss of uterine Pten unfailingly and rapidly induces endometrial cancer in mice. *Cancer Res*. 2008;68(14):5619-27.
  14. Daikoku T, Ogawa Y, Terakawa J, Ogawa A, DeFalco T, and Dey SK. Lactoferrin-iCre: a new mouse line to study uterine epithelial gene function. *Endocrinology*. 2014;155(7):2718-24.
  15. Soyak SM, Mukherjee A, Lee KY, Li J, Li H, DeMayo FJ, and Lydon JP. Cre-mediated recombination in cell lineages that express the progesterone receptor. *Genesis*. 2005;41(2):58-66.
  16. Daikoku T, Cha J, Sun X, Tranguch S, Xie H, Fujita T, Hirota Y, Lydon J, DeMayo F, Maxson R, et al. Conditional deletion of Msx homeobox genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity. *Dev Cell*. 2011;21(6):1014-25.
  17. Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Jr., Shyamala G, Conneely OM, and O'Malley BW. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev*.

- 1995;9(18):2266-78.
18. Tranguch S, Wang H, Daikoku T, Xie H, Smith DF, and Dey SK. FKBP52 deficiency-conferred uterine progesterone resistance is genetic background and pregnancy stage specific. *J Clin Invest.* 2007;117(7):1824-34.
19. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, and Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature.* 1992;359(6390):76-9.
20. Song H, Lim H, Das SK, Paria BC, and Dey SK. Dysregulation of EGF family of growth factors and COX-2 in the uterus during the preattachment and attachment reactions of the blastocyst with the luminal epithelium correlates with implantation failure in LIF-deficient mice. *Mol Endocrinol.* 2000;14(8):1147-61.
21. Mariee N, Li TC, and Laird SM. Expression of leukaemia inhibitory factor and interleukin 15 in endometrium of women with recurrent implantation failure after IVF; correlation with the number of endometrial natural killer cells. *Hum Reprod.* 2012;27(7):1946-54.
22. Mikolajczyk M, Wirstlein P, and Skrzypczak J. The impact of leukemia inhibitory factor in uterine flushing on the reproductive potential of infertile women--a prospective study. *Am J Reprod Immunol.* 2007;58(1):65-74.
23. Rodesch F, Simon P, Donner C, and Jauniaux E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1992;80(2):283-5.
24. Gassmann M, Fandrey J, Bichet S, Wartenberg M, Marti HH, Bauer C, Wenger RH, and Acker H. Oxygen supply and oxygen-dependent gene expression in differentiating embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

- 1996;93(7):2867-72.
25. Wang GL, and Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1995;270(3):1230-7.
26. 中山恒、合田亘人. 多彩な生命現象に働く低酸素応答システム. *実験医学*. 2012;30(8):1246-51.
27. Daikoku T, Matsumoto H, Gupta RA, Das SK, Gassmann M, DuBois RN, and Dey SK. Expression of hypoxia-inducible factors in the peri-implantation mouse uterus is regulated in a cell-specific and ovarian steroid hormone-dependent manner. Evidence for differential function of HIFs during early pregnancy. *J Biol Chem*. 2003;278(9):7683-91.
28. Cowden Dahl KD, Fryer BH, Mack FA, Compornolle V, Maltepe E, Adelman DM, Carmeliet P, and Simon MC. Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha regulate trophoblast differentiation. *Mol Cell Biol*. 2005;25(23):10479-91.
29. Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, and Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res*. 2000;60(15):4010-5.
30. Gruber M, Hu CJ, Johnson RS, Brown EJ, Keith B, and Simon MC. Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(7):2301-6.
31. Burnum KE, Hirota Y, Baker ES, Yoshie M, Ibrahim YM, Monroe ME, Anderson GA, Smith RD, Daikoku T, and Dey SK. Uterine deletion of Trp53 compromises antioxidant responses in the mouse decidua. *Endocrinology*. 2012;153(9):4568-79.
32. Toft DJ, and Linzer DI. Prolactin (PRL)-like protein J, a novel member of the PRL/growth hormone family, is exclusively expressed in maternal decidua.

- Endocrinology*. 1999;140(11):5095-101.
33. Alam SM, Konno T, Sahgal N, Lu L, and Soares MJ. Decidual cells produce a heparin-binding prolactin family cytokine with putative intrauterine regulatory actions. *J Biol Chem*. 2008;283(27):18957-68.
34. Cha J, Bartos A, Egashira M, Haraguchi H, Saito-Fujita T, Leishman E, Bradshaw H, Dey SK, and Hirota Y. Combinatory approaches prevent preterm birth profoundly exacerbated by gene-environment interactions. *J Clin Invest*. 2013;123(9):4063-75.
35. Patel J, Landers K, Mortimer RH, and Richard K. Regulation of hypoxia inducible factors (HIF) in hypoxia and normoxia during placental development. *Placenta*. 2010;31(11):951-7.
36. Wu L, Yu H, Zhao Y, Zhang C, Wang J, Yue X, Yang Q, and Hu W. HIF-2alpha mediates hypoxia-induced LIF expression in human colorectal cancer cells. *Oncotarget*. 2015;6(6):4406-17.
37. Jeong CH, Lee HJ, Cha JH, Kim JH, Kim KR, Kim JH, Yoon DK, and Kim KW. Hypoxia-inducible factor-1 alpha inhibits self-renewal of mouse embryonic stem cells in Vitro via negative regulation of the leukemia inhibitory factor-STAT3 pathway. *J Biol Chem*. 2007;282(18):13672-9.
38. Li Y, Sun X, and Dey SK. Entosis allows timely elimination of the luminal epithelial barrier for embryo implantation. *Cell Rep*. 2015;11(3):358-65.
39. Yue L, Daikoku T, Hou X, Li M, Wang H, Nojima H, Dey SK, and Das SK. Cyclin G1 and cyclin G2 are expressed in the periimplantation mouse uterus in a cell-specific and progesterone-dependent manner: evidence for aberrant regulation with Hoxa-10 deficiency. *Endocrinology*. 2005;146(5):2424-33.
40. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological

- responses to hypoxia. *J Appl Physiol* (1985). 2000;88(4):1474-80.
41. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J*. 2002;16(10):1151-62.
42. Wenger RH, Rolfs A, Spielmann P, Zimmermann DR, and Gassmann M. Mouse hypoxia-inducible factor-1alpha is encoded by two different mRNA isoforms: expression from a tissue-specific and a housekeeping-type promoter. *Blood*. 1998;91(9):3471-80.
43. Wenger RH, Rolfs A, Kvietikova I, Spielmann P, Zimmermann DR, and Gassmann M. The mouse gene for hypoxia-inducible factor-1alpha--genomic organization, expression and characterization of an alternative first exon and 5' flanking sequence. *Eur J Biochem*. 1997;246(1):155-65.