

博士論文

黄体ホルモン投与による胚着床阻害とその分子機構

松 尾 光 徳

目次

目次	2
要旨	3
序文	4
目的	19
方法	20
結果	27
考察	61
結論	66
謝辭	67
引用文献	68

要旨

黄体ホルモンは避妊薬として使用されるが、その着床阻害を介した作用の詳細については明らかとなっていない。本研究では、黄体ホルモンによる着床阻害効果についてマウスモデルを用いて検討した。黄体ホルモンとして、レボノルゲストレル (levonorgestrel, LNG) および天然型プロゲステロン (progesterone, P₄) を用いて、排卵後から着床直前まで野生型マウスに LNG または P₄ 投与を行い、その着床阻害効果を確認した。さらに、胚の子宮内膜への接着に必須とされる leukemia inhibitory factor (LIF) の分泌低下を介した作用を介して着床が阻害されることを示した。本研究により黄体ホルモンは LIF 分泌を低下させることにより、着床阻害効果を持つことが示された。

序文

着床と黄体ホルモン

着床とは受精卵から初期発生を経て形成された胞胚が子宮内膜に触れ結合することをいい、妊娠のはじまりといえる現象である。また黄体ホルモンは妊娠ホルモンとも呼ばれ、着床の成立・妊娠の維持に重要なホルモンである。黄体ホルモン様作用物質には「天然型プロゲステロン」と、合成された黄体ホルモン様作用物質である「プロゲスチン」とがある。黄体ホルモンは主にプロゲステロンレセプターを介して作用を発現するが、他にアンドロゲンレセプター・グルココルチコイドレセプター・ミネラルコルチコイドレセプター・エストロゲンレセプターにも作用をする。近年黄体ホルモンは多種の製剤が作成され、臨床において使用されている。黄体ホルモン製剤投与の適応症は無月経・月経困難症・子宮内膜症・子宮体癌や切迫早産の治療など多岐に渡るが、妊娠成立に関してはその促進および抑制、すなわち不妊治療の黄体補充および避妊の相対する目的で使用されている。

黄体ホルモンの分泌不全である黄体機能不全では、黄体から産生される黄体ホルモンとエストロゲンの分泌の低下により不妊症・不育症の原因となる。この病態に対して着床率を高め流産率を減少させる目的で、排卵後から着床の時期に合わせて黄体ホルモンや黄体形成を促す薬剤の投与が行われている[1]。不妊症に対する生殖補助医療の中心的治療である体外受精・胚移植 (in-vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET) では、すでに黄体ホルモン製剤が妊娠成立のために欠かせない薬剤となっている。胚

移植を行う際には、着床期の子宮内膜環境を至適に整えるため胚移植を行う数日前から黄体ホルモン製剤の投与が行われており、着床率・妊娠率を上げる黄体ホルモンの効果が示されている[2, 3]。天然型プロゲステロン製剤を中心として用いられている。

不妊治療とは反対の目的、すなわち避妊目的の黄体ホルモン製剤投与も臨床的に行われてきた。緊急避妊法として、無防備な性交渉後に黄体ホルモン製剤を使用する方法が用いられている。日本で最も一般的に行われてきた方法は 1970 年代に発表された Yuzpe 法である。この方法は、性交後 72 時間以内に黄体ホルモン norgestrel 1mg にエストロゲン製剤 ethinylestradiol 100 μ g を含有するいわゆる中用量ピルを内服し、その 12 時間後に同量内服する、というものである[4]。最近では、黄体ホルモンレボノルゲストレル (levonorgestrel, LNG) を単独で含有する製剤がそれよりも避妊効果が高いとして WHO により推奨され、2011 年に日本でも緊急避妊薬として承認された[5]。LNG 投与法は、性交後 72 時間以内に 1.5mg の LNG を内服するものであり、81-84% の妊娠阻止率があるとされる。プロゲスチンは開発された世代別に第一世代から現在では第四世代までのものに分類されるが、LNG は 1960 年代に開発され、第二世代に分類される。第一世代と比較しエストロゲン作用が非常に低く、プロゲステロンレセプターとの親和性が 3 倍と強くなっているのが特徴である[6, 7]。緊急避妊薬としての LNG の作用機序として最も知られているのは、排卵抑制効果である。LNG 投与により、視床下部のネガティブフィードバック作用を介した黄体化ホルモン (LH) 分泌抑制によって排卵が妨げられるという機序であり、ヒトの臨床研究や動物モデルの研究

でこのメカニズムが示されている[8]。また排卵抑制作用以外の LNG の作用機序として、受精障害・頸管粘液・受精卵の着床障害を介した機序も推測されている[9]。受精卵の着床障害を介した機序に関する過去の報告では、ヒトにおいて黄体期に LNG を投与し、その後に子宮内膜組織を採取することでその評価が行われている。LNG 投与後に組織学的な変化は認められないとする報告や[10]、胚受容能に関わる因子に変化は認められないとする報告などがある[11]。しかし、LNG 投与による受精卵の着床障害作用を介した避妊効果の有無やその機序を明らかにする研究は今までになされていない。

このように、黄体ホルモン製剤は妊娠成立の促進・障害の両面で使用され、臨床生殖内分泌学分野において欠かせない製剤となっている一方で、黄体ホルモン製剤の着床に対する作用とその詳細に関して十分明らかとなっていない。具体的には、不妊治療における黄体ホルモン補充療法では、黄体ホルモンを投与することが実際にどのように着床・妊娠を助けているか、その詳細な機序は明らかになっておらず、着床を促進する至適投与量と避妊効果を発揮する用量との境界用量も不明なままである。緊急避妊法の作用機序としての着床障害作用は前述のように明らかになっていない。

本研究の必要性 ～黄体ホルモンの着床への影響～

不妊治療による妊娠は、近年の晩婚化の影響により増加し続けている。不妊症の診断基準を満たすカップルは5～10組に1組ともいわれており、挙児を希望し産婦人科

を受診する患者が増加している。また 1999 年には 100 人に 1 人が体外受精児であったものが 2015 年には約 42.4 万周期の治療により 5 万 1 千人もの児を得ており、20 人に 1 人が体外受精児と、不妊治療による出生児は年々増加している。現在、黄体ホルモン製剤は胚移植時に大半の症例で使用されているが、黄体ホルモン補充によって必ずしも着床が成立するわけではなく、反復不成功の症例が多く認められる。反復不成功の原因として、黄体ホルモンへの子宮内膜の反応性が低下した症例や黄体ホルモンの投与量が適切でない症例が存在することが推測される。本来は着床を補助する目的で黄体ホルモンを投与したにも関わらず、反応性の個人差によって着床を阻害される可能性があるかもしれない。体外受精の成功率を高めるためには、黄体ホルモン着床・妊娠を補助するメカニズムを解明し、その至適用量や個々の反応性を把握することが必要と思われる。

また緊急避妊法においても多くの疑問が存在する。妊娠を望まない女性が避妊せずに行われた性交（レイプや性的暴行を含む）、または避妊したものの避妊手段が適切ではなかった性交後に緊急避難的に用いられる緊急避妊法は、望まない妊娠による母体への負担や、妊娠中絶を減少させるために多くの女性に使用されており、社会的にも重要な役割をもつ。しかし緊急避妊法の機序は排卵阻害・遅延効果ばかりが注目され、着床阻害効果があるのか、どの程度なのか、についての結論は明らかになっていない。黄体ホルモン製剤による緊急避妊法の作用機序が排卵阻害・遅延作用のみであるとすれば、無防備な性交が排卵後のタイミングであった場合に避妊効果は得られな

いことになる。もしそのほかの副作用が起これば、その投与は患者に不利益となる。

以上のことから、黄体ホルモン製剤の着床への影響を明らかにすることは臨床上重要と考えられる。今回、着床と黄体ホルモン、特に黄体ホルモンによる着床阻害作用に焦点をあて、「着床における黄体ホルモンの役割とその作用メカニズムを明らかにすること」を目的として研究を行った。

ヒトとマウスの子宮の構造と機能

ヒトの着床の研究に関しては倫理的な制約がある。例えば、黄体ホルモンによる緊急避妊に関しては、排卵や受精の正確なタイミングを確認してからの投与は困難であり、黄体ホルモン製剤の着床に対する反応を評価観察することはできない。本研究ではマウスモデルを用いて研究を行った。ヒトの子宮は子宮体部・頸部・峡部よりなり、両側に卵巣・卵管を持つ（図 1）。ヒトでは単胎妊娠がほとんどであり、子宮体部に円盤状の血液絨毛膜胎盤を形成することで児を栄養する。子宮体部は、内側より子宮内膜・子宮筋層・子宮外膜に分けることができ、そのうち着床・胎盤形成に重要なのは子宮内膜である。子宮内膜は被膜上皮と内膜腺よりなり、間質は間質細胞・間質器質・血管より構成されている。一方、マウス子宮は双角子宮であり、Y字型をしている。子宮頸部は一つであるが子宮体部は2本あり、その先にそれぞれ卵管・卵巣を附属している（図 2）。マウスは産仔数が6～10匹であり、1仔ずつそれぞれの円盤状の血液絨毛膜胎盤を形成する。子宮体部の組織は子宮内膜・子宮筋層・子宮漿膜に分かれて

おり、着床・胎盤形成には子宮内膜が重要な役割を持つ。子宮内膜は上皮と間質に分けられる。

ヒトの子宮の構造

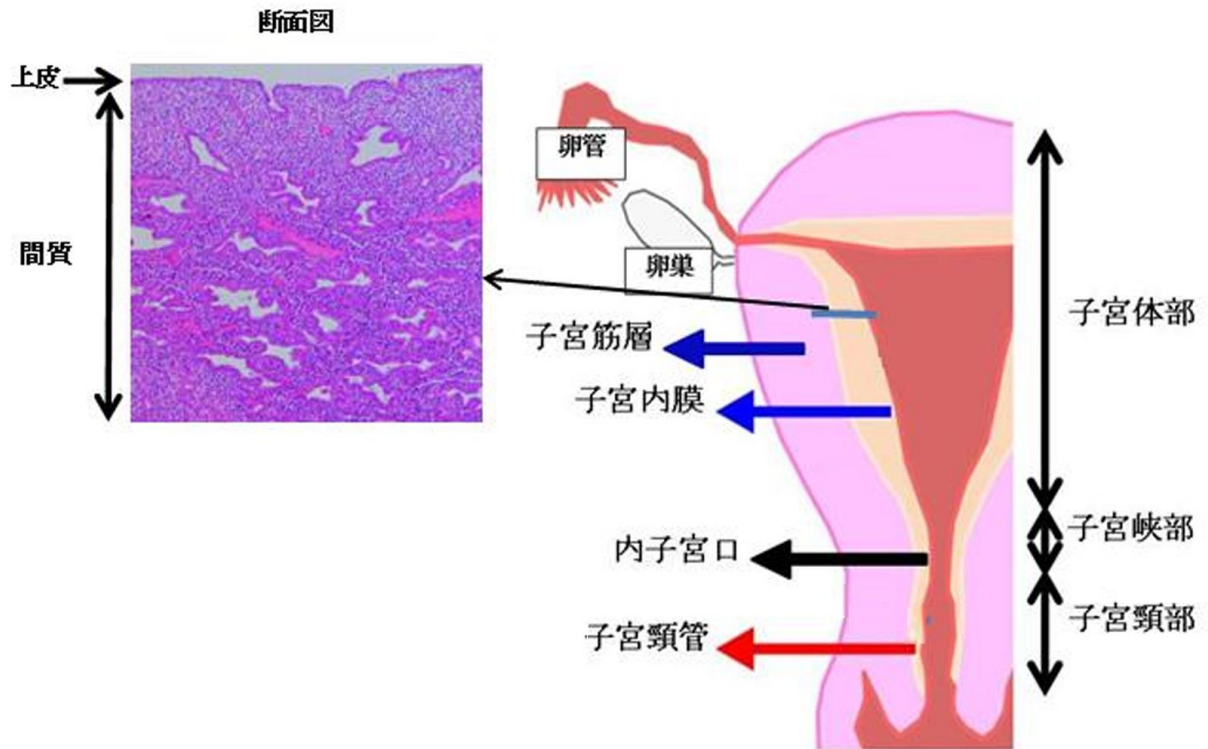


図1.ヒトの子宮の構造

ヒトの子宮は子宮体部・頸部・峡部よりなる。通常妊娠の起きる子宮体部は、内側より子宮内膜・子宮筋層・子宮外膜に分けることができる。子宮内膜は子宮内腔を覆っており、上皮と間質に分かれる。上皮は被膜上皮と内膜腺よりなり、間質は間質細胞・間質器質・血管より構成されている[12]。

マウスの子宮の構造

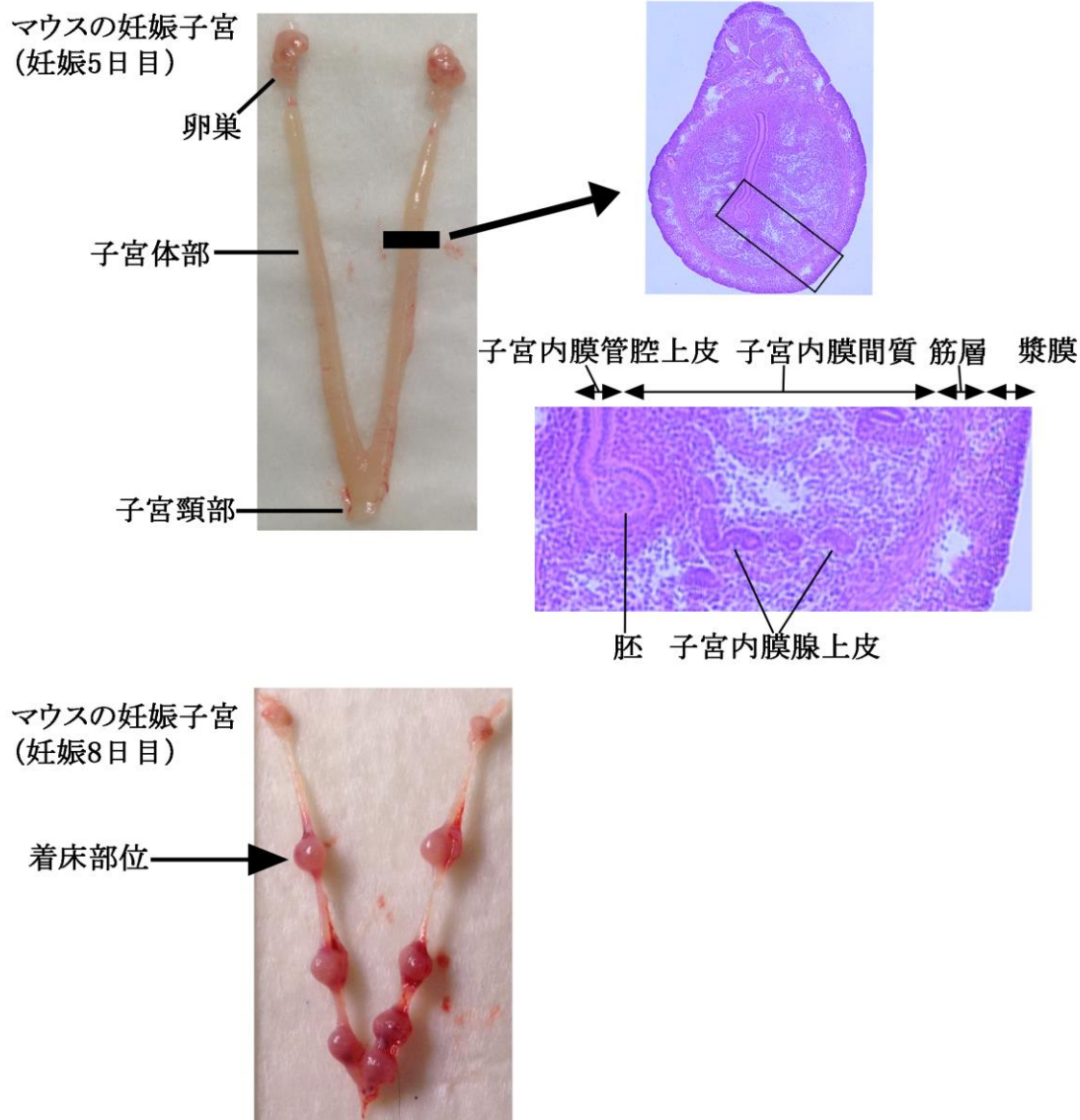


図2.マウスの子宮の構造

マウスの子宮は図上左のマクロ像のようにY字型である。頸部が1つであるのに対し、左右に子宮体部が分かれている。図上右側にマウス妊娠5日目の妊娠子宮のマクロ像を示す(妊娠5日目)。子宮体部の組織は子宮内膜・子宮筋層・子宮漿膜に分かれており、その中で子宮内膜は管腔上皮、腺上皮、間質で構成される。また管腔上皮に胚が着床しているのが確認できる。図下にマウスの妊娠8日目の子宮を示す。両側の子宮体部に着床部位が複数個認められる。

ヒトとマウスの生殖周期

マウス・ヒトには卵形成・排卵・受精・妊娠という生殖周期が周期的に起こる。これは視床下部・下垂体を中心とした内分泌機構により卵巣が刺激を受け起こるものであり、その刺激を受けた卵巣が卵胞ホルモン（エストロゲン, 17β -estradiol, E_2 ）と黄体ホルモン（天然型プロゲステロン, progesterone, P_4 ）という2種類のホルモンを産生し、更に子宮へとその刺激を与える。受精や妊娠が成立しない場合には排卵と卵形成が周期的に繰り返されていく。

ヒトには約28日程度の間隔での性周期がある。これは月経周期とも呼ばれる。卵巣の性周期をもとに「卵胞期—排卵期—黄体期」と分類され、また子宮の生殖周期をもとに「月経期—増殖期—分泌期」とも分類される。

卵巣の性周期は卵胞成熟・排卵・黄体形成・退縮月経開始という流れである。月経開始から約14日程度の排卵が起きるまでの期間を卵胞期と呼ぶ。脳下垂体からの卵胞刺激ホルモン（FSH）の影響を受けた顆粒膜細胞の細胞増殖に伴い成熟した卵胞が形成される。成熟卵胞は下垂体からの黄体化ホルモンによる排卵刺激（LH サージ）に反応し、成熟した卵胞壁が破綻すると排卵に至る。破綻した卵胞に残留した顆粒膜細胞・莢膜細胞は肥大・増殖し、黄体細胞へと変化し、強い血管新生と黄体細胞の増殖により黄体成熟が起こる。ここまでに3～5日程度を要するが、その後黄体機能は7～11日程度持続する。その後妊娠に至らなければ黄体は退縮し黄体期は終了、また次の卵胞期へと移行していく[12]。

子宮の性周期は卵巣によるホルモン産生の影響を受け、子宮内膜に大きな変化を起こす。ヒトの月経周期と子宮内膜の変化を図 3 に示す。月経期に子宮内膜が剥離し、月経が起き菲薄化した子宮内膜は、その後卵胞期に卵巣から分泌される E_2 の作用により子宮内膜腺・間質の著しい発育が起きる。子宮内膜腺は次第にらせん状に発達し、子宮内膜の厚みは大きく増していく。これを増殖期と呼ぶ。そして排卵期の後、黄体期を迎え P_4 分泌が盛んになると、子宮内膜は分泌期という期間になる。子宮内膜腺はその影響を受けますます蛇行した構造となり、更に腺腔にはグリコーゲンが分泌され、内膜腺には核上空胞が認められるようになる。間質は脱落膜変化とらせん動脈の増生が観察され、受精卵が子宮内膜へと着床することのできる環境が整う。これを胚受容期とも呼び、通常排卵後 7 日目前後に起きる。その後着床が起こらず妊娠が成立しなければ、卵巣からのホルモンの低下により子宮内膜は剥脱し月経が起きる[12]。

月経周期と子宮内膜の変化

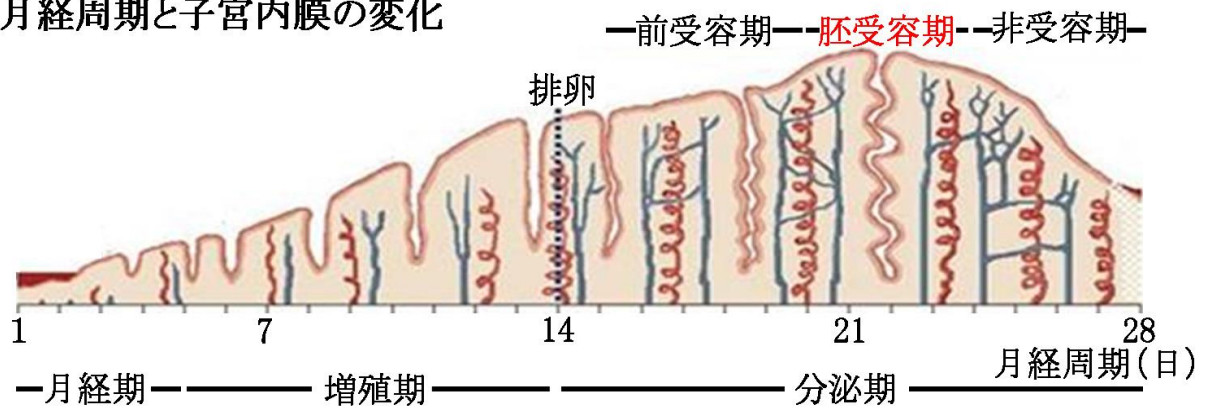


図 3. ヒトの子宮内膜の性周期による変化と胚受容期

ヒト子宮内膜の周期的変化を示す。ヒトの子宮内膜は約 28～35 日の間隔で周期的に変化し、この周期を月経周期と呼ぶ。月経周期は月経期、増殖期、分泌期の三つに分類される。月経期終了後、排卵までの前半期は主に卵巣からの E_2 によって子宮内膜は増殖し、排卵後からは P_4 の働きが加わり、子宮内膜の厚みは増す。子宮内膜には受精卵の受容を容認する胚受容期という期間があると考えられており、ヒトでは排卵後 5～7 日と考えられ、この期間以外は受精卵を受け入れ入れない不応期である。妊娠が起きず、卵巣の黄体からのホルモン分泌が消退すると、子宮内膜は剥脱し、月経となる。[12]

マウスにはヒトの月経のような性器出血はないが、4～5 日間の性周期があり、発情前期・発情期・発情後期・発情休止期の四つに分類される。発情前期には成熟した卵胞が卵巣に形成され、発情期に排卵が起き、発情期から発情後期にかけて黄体形成が起きる。排卵日を妊娠 0 日目とし、その後交尾が成立すると、妊娠 1 日目朝には膣栓を確認することができ、また卵管内に受精卵が確認される。そして妊娠 4 日目の深夜から妊娠 5 日目の朝にかけ着床が起きる。マウスの性周期においても後述する通り、卵巣から分泌される E_2 と P_4 が主要な調節因子となる[13]。排卵後に卵巣より P_4 産生が増加すると、子宮はその持続的な影響を受ける。マウスでは着床前の妊娠 4 日目になると子宮が着床の準備を開始し、子宮内腔が狭小化する。性周期の中で着床のできる時期は、排卵日を 0 日目とするとヒトでは 7 日目前後に、マウスでは 5 日目にある。

ヒト・マウスの胚受容期とホルモン変動

着床を起こすことのできる時期を胚受容期という。胚受容期でなければ着床することとはできない。ヒトとマウスの胚受容期と排卵後のホルモン動態と胚受容期との関係を図 4 に示す。胚受容期は $P_4 \cdot E_2$ の二つのホルモンによりコントロールされ、ヒト・マウスともに、排卵後 P_4 が上昇し、 E_2 の軽度上昇後に胚受容期を迎える。 P_4 は主に核内受容体である P_4 受容体を介し作用するが、 P_4 受容体はシャペロン複合体を形成することが知られている。そのコシャペロンである FK-506 binding protein 4 (FKBP52)

は P₄ と P₄ 受容体の結合を強化する。FKBP52 欠損マウスは、子宮において P₄ の作用低下により着床障害をきたす[14]。FKBP52 欠損マウスの着床障害は P₄ を投与することで着床能が回復する[15, 16]。これは着床における黄体ホルモン刺激の重要性を示すものである。マウスと同様に、ヒトにおいてもホルモン動態と胚受容期の関連が推測されている。体外受精・胚移植（IVF-ET）において、凍結融解胚移植は既に確立した治療技術である。これは採卵し体外受精を行った受精卵を凍結保存し、次回以降の月経周期で融解して胚移植を行うという技術のことである。また凍結融解胚移植により着床を成立させるためには、子宮の胚受容期に合わせて胚移植を行うことが必須となる。そのため子宮の胚受容期を人工的に誘導する方法が用いられており、卵胞ホルモン製剤および黄体ホルモン製剤を用いて前述したようなホルモン変動を再現し胚受容期を作成することができる[3]。これはヒトにおいても卵胞ホルモン・黄体ホルモンにより子宮の胚受容能がコントロールされていることを示唆している。ヒトおよびマウスの胚受容期は類似したホルモン動態によってコントロールされている点が共通しており、マウスモデルを用いた黄体ホルモンの着床における役割を調べる研究はヒトの着床の理解に繋がるものと考えられる。本研究では、排卵後から着床直前まで野生型マウスに LNG または P₄ 投与を行い、その着床阻害作用を調べた。

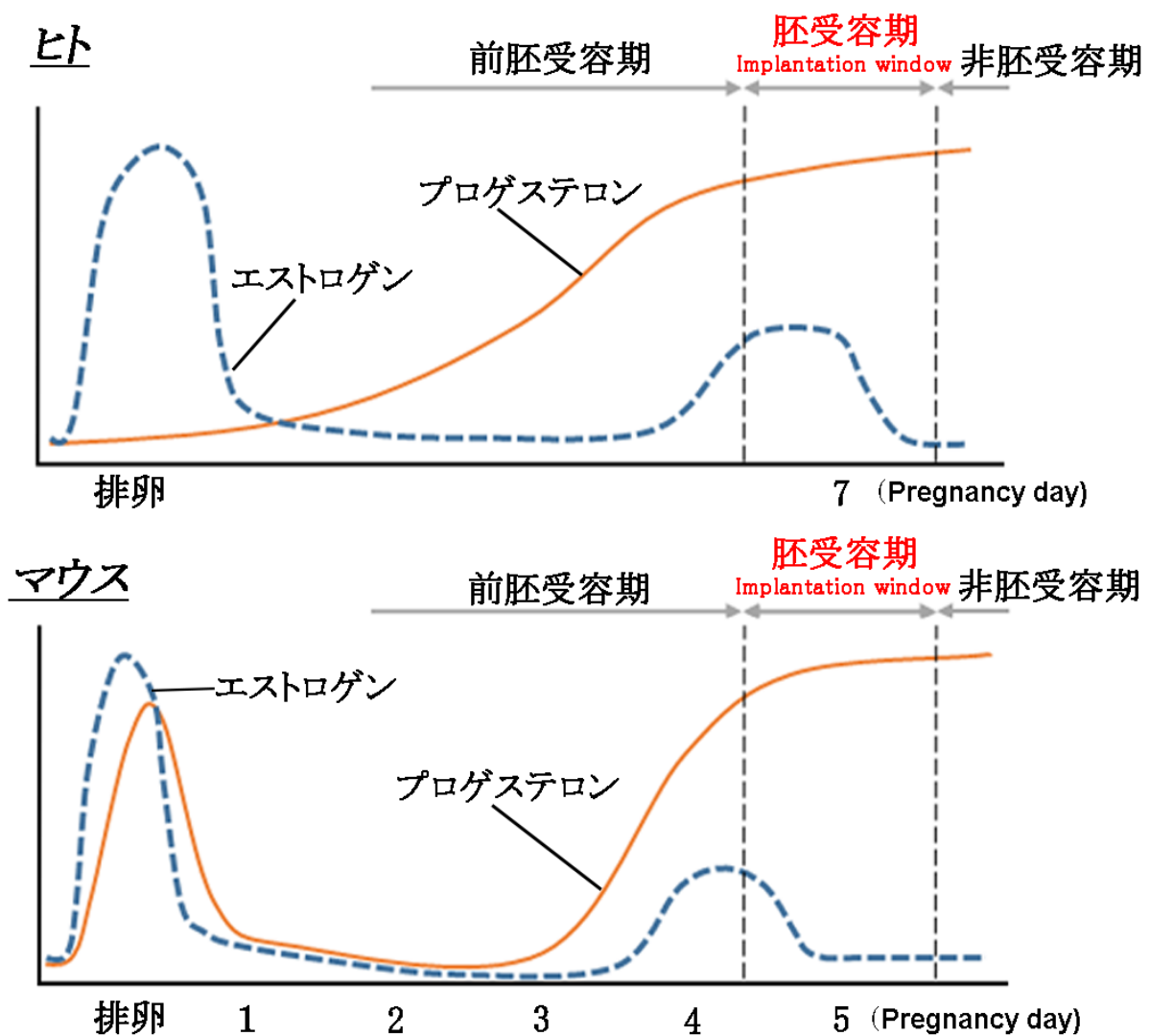


図4 ヒトとマウス妊娠初期のホルモン動態

ヒトとマウスの妊娠初期（排卵後）における E_2 ・ P_4 の動態を示す。ヒト・マウスともに前胚受容期に P_4 が上昇していき、その後 E_2 が軽度上昇し、着床が可能となる胚受容期 (implantation window) を迎える。その後着床できない非受容期に至る[17, 18]。

着床に必須の子宮因子 leukemia inhibitory factor (LIF)

着床において重要とされる因子に leukemia inhibitory factor (LIF) がある。LIF は IL-6 と共通のシグナル伝達コンポーネントである STAT3 および GP130 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内膜の腺上皮に発現し、子宮内膜に胚が接着する機構への関与が示唆されている。LIF 欠損マウスでは、オスでは妊娠能に問題がないものの、雌マウスは着床障害による完全な不妊となる。着床障害をきたす LIF 欠損マウスから回収した胚を偽妊娠させた野生型マウスへ移植しても妊娠は成立するが、野生型マウスから得た胚を偽妊娠させた LIF 欠損したマウスに移植しても妊娠はみられない。さらに交配後に腹腔内に LIF を持続注入すると LIF 欠損マウスでも着床は成立する。LIF は着床する際の母体側の必須因子といえる[19,20]。ヒト子宮内膜における LIF 発現は増殖期に比べ分泌期に上昇しており、その生産の主体は腺上皮である。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ことから、ヒトにおいても LIF は着床に関わる重要な因子であることが示唆される[21,22]。今回、黄体ホルモンの着床阻害作用の機序について、LIF に着目して研究を行った。

目的

黄体ホルモン製剤は緊急避妊薬として臨床的にヒトに使用されているが、その着床阻害作用の有無は明らかとなっていない。本研究では、排卵後の黄体ホルモン投与による着床阻害作用についてマウスモデルを用いて検討した。

方法

実験動物

7 週齢以上の C57BL/6 野生型マウス (WT) を用いた。雌マウスとの交配には生殖能を確認した雄マウスを用いた。17~19 時に交配を開始し、膣栓は翌日の 8~9 時に確認し、膣栓を認めたマウスを妊娠マウスとして用いた。なお、膣栓を確認した日を妊娠 1 日目 (day1) とした。本研究の全てのマウス実験は、東京大学動物実験委員会の承認のもと (実験計画書承認番号 医-P11-018・医-P16-066)、東京大学動物実験実施規則・東京大学動物実験実施マニュアルに基づいて行った。飼育・実験は東京大学の温度・湿度・照明が管理された自由給餌、自由給水の動物飼育施設 (生命科学実験棟および南研究棟産婦人科動物飼育室) で行った。

マウスに対する LNG・P₄・LIF 投与

LNG (ノルレボ®、あすか製薬よりご供与) は水に溶解し、day1 から day4 の 9 時に胃管を用いて経口投与した。投与濃度は 0, 30, 150, 300µg/kg 体重/day とした。Control 群には水のみを投与した。P₄ (和光純薬工業) は Sesami oil (和光純薬工業) に溶解し、day1 から day4 の 9 時に皮下注射で投与した。Control 群には Sesami oil のみを投与した。投与量は 0, 5, 10, 20mg/day とした。リコンビナント LIF (名古屋大学本道栄一先生よりご供与) の投与は day4 の 9 時と 21 時の 2 回、投与量は 1 回 12µg ずつとした。

着床の評価

着床の有無に関する評価は day5 の 9 時に行った。着床部位で最も早くみられる現

象は胚が接着した子宮内膜管腔上皮の直下に間質における血管透過性亢進であるとされ、尾静脈注射によりシカゴブルー色素溶液を投与すると色素が結合したアルブミン等の蛋白が血管外に漏出し、着床部位が青く染色される。シカゴブルー色素溶液を投与3分後にマウスを安楽死させ、着床部位を目視にて確認し評価した。着床部位が認められなければ子宮腔を生理食塩水にて灌流し、灌流液内の受精卵の有無を確認した。正常受精卵の認められないものは非妊娠例として除外した。着床部位が一つでも確認されたマウスは着床ありと評価した。着床部位の有ったマウスは着床個数を数え、着床部位の有ったマウスの平均着床部位個数を求めた。

着床前胚発育の評価

着床前胚の発育・形態的異常の有無を確認するために、day4の9時にマウス子宮を摘出し、子宮腔を生理食塩水にて灌流し、子宮内の胚を回収した。実体顕微鏡下に胚盤胞数を観察評価し、その個数を確認した。

マウス組織採取

マウスの子宮組織採取は day4 の 9 時、day4 の 21 時、または day5 の 9 時に行った。一部を液体窒素で瞬間凍結し、定量 PCR・組織学的評価に使用した。一部は中性ホルマリンにて固定後パラフィン包埋し組織学的評価に用いた。

定量的 PCR

回収したマウス子宮凍結組織から Isogen（ニッポンジーン）もしくは TRI Reagent（MRC）を用いて RNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA

Remover (TOYOBO) を使用し逆転写反応を行った。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。 β -actin (Actb) を internal standard として標準化し、定量的 PCR を行った。プライマー配列は表 1 に示す。また Hoxa10 のみ Takara 社製プライマーを使用している。PCR 反応は 95°C にて 5 秒、60°C にて 30 秒、72°C にて 30 秒で 40 サイクルの反応を行い評価した。

表 1 プライマー配列

遺伝子名	5` 末端	3` 末端
<i>Actb</i>	<i>TGTTACCAACTGGGACGACA</i>	<i>GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA</i>
<i>Areg</i>	<i>TCACAGTGCACCTTTGGAAACGAT</i>	<i>TCCGGTGTGGCTTGGCAATGA</i>
<i>Ihh</i>	<i>GAGAACACGGGTGCCGACCG</i>	<i>CAGCGGCCGAATGCTCAGACT</i>
<i>Hdc</i>	<i>GCCCATCTGTGCCAGTGAGGGA</i>	<i>GAAAGCGCCGGCTCAAGGGG</i>
<i>Ltf</i>	<i>GGAGCCTTGAGGTGTCTGAG</i>	<i>CCAGGTGGCACTCCTTGTAT</i>
<i>Muc-1</i>	<i>GTGCCAGTGCCGCCGAAAGA</i>	<i>CCGCCAAAGCTGCCCCAAGT</i>
<i>Esr1</i>	<i>CGGCCCTCCCGCCTTCTACA</i>	<i>CGGTCTTCCGTATGCCGCCT</i>
<i>Pgr</i>	<i>AGGGCAATGGAAGGGCAGCAT</i>	<i>CCACCGACTGGGGGAGAGCAA</i>
<i>C3</i>	<i>TGTTACCAACTGGGACGACA</i>	<i>GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA</i>
<i>Lif</i>	<i>GCTATGTGCGCCTAACATGA</i>	<i>AGTGGGGTTCAGGACCTTCT</i>

E₂・P₄測定

マウスの血液採取は day4 の 9 時に行い、血清を用いて測定を行った。P₄は EIA 法により計測した。Progesterone EIA kit (Cayman) を用いた。E₂は ELISA 法により計測した。Estradiol ELISA kit (CalBiotech) を用いた。

免疫染色

パラフィン包埋したマウス組織を 6μm に薄切した。切片は脱パラフィン後、10 mmol/L クエン酸バッファー (pH 6.0) 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 分処理した。PBS 洗浄後、ブロッキング液 (DAKO) にて 1 時間処理後、1 次抗体と overnight 反応させた。Dako EnVision System 免疫染色キットを用いて免疫染色を行った。TBST で洗浄後、2 次抗体として Envision polymer for Rabbit IgG (DAKO) と 1 時間反応させ、DAB 染色にて発色させ、ヘマトキシリン染色後、封入し顕微鏡で観察した。1 次抗体には抗ヒト・マウスプロゲステロン受容体抗体 (1:100, abcam)、抗マウスエストロゲン受容体抗体 (1:200, abcam)、抗ヒト・マウス Ki67 抗体 (マウス 1:500, ヒト 1:50, Thermo Scientific) を 1 次抗体として用いた。

In situ hybridization

液体窒素にて凍結したマウス組織を 6 μ m に薄切した。切片は G-Fix (Genostaff) により 30 分間固定、PBS で洗浄後に 0.2 mol/L 塩酸で 10 分処理した。PBS で洗浄後、G-Wash ハイブリ洗浄液 (Genostaff) で 15 分間処理した。プローブ希釈液(Genostaff) で希釈した DIG 標識 RNA プローブによりハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーション後、ハイブリ洗浄液で 60°C 10 分間、50%ホルムアミド-ハイブリ洗浄液 (Genostaff) で 60°C 10 分間、再びハイブリ洗浄液で 60°C 10 分間、0.1 \times ハイブリ洗浄液 60°C 10 分間、計 4 回洗浄した。TBS Tween 20 (TBST; 0.1% Tween20 in TBS)で洗浄後、ブロッキング液 (Genostaff)で 15 分ブロッキングした。TBST で洗浄後、anti-DIG-AP conjugate (Roche) と 1 時間反応させた。TBST で洗浄後、100 mmol/L 塩化ナトリウム - 100 mmol/L Tris-HCl (pH9.5)液で 5 分処理し、NBT/BCIP solution (Sigma)を用い、室温で 3 時間半 overnight 発色反応させ、メチルグリーン (Wako)にて染色後、顕微鏡で観察した。

RNA プローブは DIG ラベリングキット（ロッシュ）を用いて作成した。LIF の RNA
プローブ作成用プラスミドはシンシナティ小児病院 S.K. Dey 先生よりご供与いただ
いた。

統計学的解析

データはエクセル統計（BellCurve for Excel）を用いて解析した。着床率・回収され
た胚の個数・着床部位の個数に関する検討は Fisher's exact test を用いた。定量的 PCR、
血清 E_2 ・ P_4 濃度に関する検討は Student's t test を用いた。 $P<0.05$ を統計学的有意とし
た。

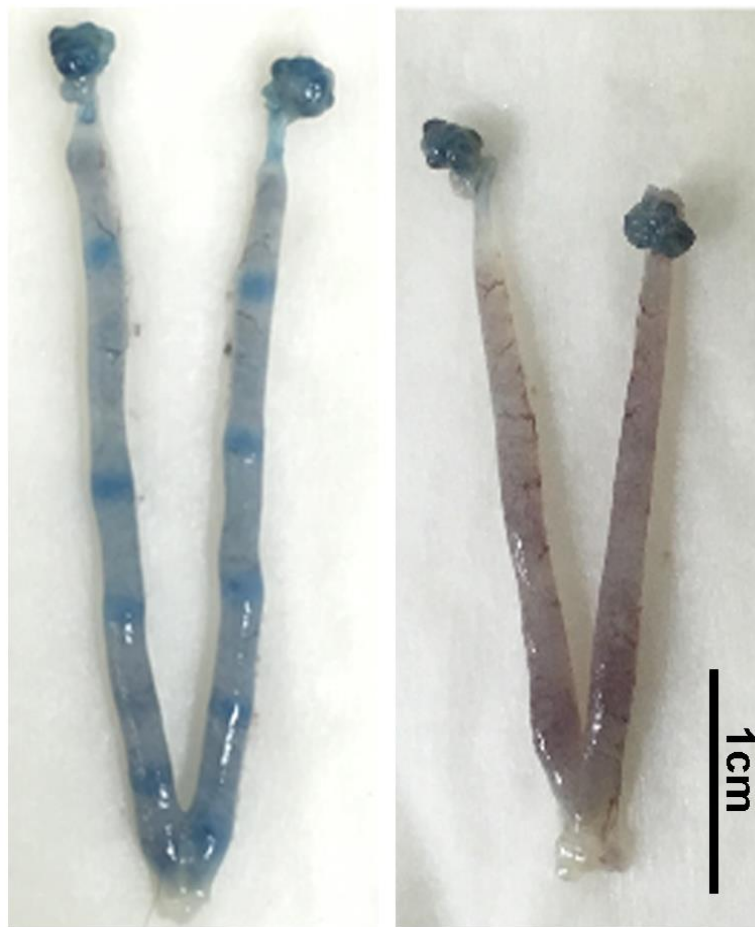
結果

高用量の LNG 投与で着床阻害が起きる

黄体ホルモン製剤が着床阻害を持つかを明らかにするために、排卵・受精が完了したタイミングから着床が起きるタイミングまでの間に LNG 投与を行い、LNG の着床に対する影響を評価した。LNG (0, 30, 150, 300 $\mu\text{g/kg/day}$) を排卵・受精終了後である day1 朝より着床前の day4 朝まで連日経口投与し、day5 の 9 時に尾静脈注射によりシカゴブルー色素溶液を投与した。着床部位で最も早く観察される現象は血管透過性亢進であるとされ、シカゴブルー色素で可視化して観察した。着床部位は Control 群で認められるように、青く染まる様子が確認できた (図 5)。Control 群では 10/10 匹 (100%) で着床部位が確認された。臨床において緊急避妊目的に投与されるのは約 30 $\mu\text{g/kg/day}$ であるが、同様の投与量をマウスに連日投与したところ 4/4 匹 (100%) に着床部位が認められ、着床阻害効果は認められなかった。しかし 150 $\mu\text{g/kg/day}$ まで投与量を増やしたところ 4/5 匹 (80%) となり、さらに 300 $\mu\text{g/kg/day}$ では着床部位の認められたのは 1/9 匹 (11.2%) のみとなり (図 5)、Control 群と比較し有意に着床率は低下した (図 6)。高用量の LNG 投与を行ったマ

ウスのうち 1 個体は着床部位が認められ、着床部位の数は Control 群と同等であった。LNG 投与の影響が各個体のすべての着床部位に均等に影響し、その影響が不十分な個体では着床阻害効果が発揮されない可能性が示唆された。

高用量の LNG 投与は着床を阻害されることが示唆された（表 2）。



Control

LNG

図 5. LNG 投与で着床が阻害される

LNG を day1 朝より着床前の day4 朝まで連日投与し、day5 の朝に尾静脈注射によりシカゴブルー色素溶液を投与した後、青染した着床部位の有無を目視にて確認し評価した。

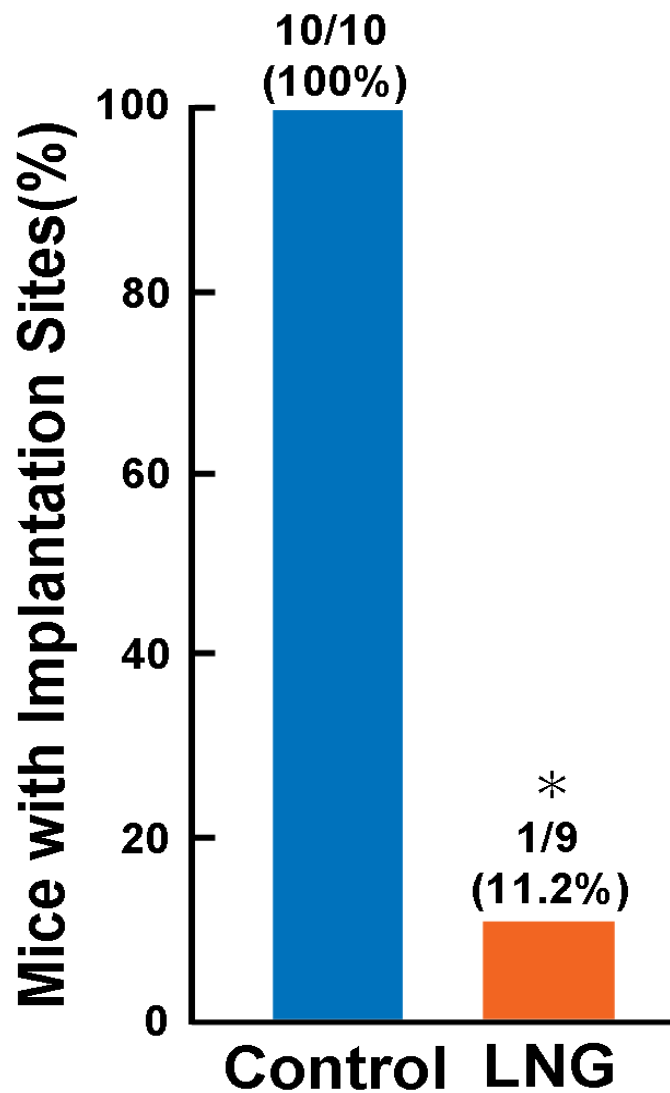


図 6. LNG 投与群では Control 着床率が低下する

LNG を day1 朝より着床前の day4 朝まで連日投与し、day5 の朝に尾静脈注射によりシカゴブルー色素溶液を投与した後、青染した着床部位の有無を目視にて確認し評価した。Control 群 (0 μ g/kg/day) と LNG 投与群 (300 μ g/kg/day) の着床率を比較した。
*は、群間に有意差があることを示す ($P < 0.05$)。

LNG(μg/kg/day)	No.mice with IS	No.of IS(\pmSEM)
0	10/10 (100%)	7.2 \pm 1.3
30	4/4 (100%)	7.5 \pm 0.5
150	4/5 (80.0%)	6.3 \pm 2.1
300	1/9 (11.2%)*	9.0

表 2. LNG 投与により着床率が低下する

LNG (0, 30 ,150, 300 μ g/kg/day) を day1 朝より着床前の day4 朝まで連日投与し、day5 の朝に尾静脈注射によりシカゴブルー色素溶液を投与した後、青染した着床部位 (IS, Implantation sites) の有無を目視にて確認し評価した。着床部位が一つでも確認されたマウスは着床ありと評価した。着床部位の有ったマウスは着床個数を数え、着床部位の有ったマウスの平均着床部位個数を求めた。数値は平均 \pm 標準誤差である。＊は、群間に有意差があることを示す ($P < 0.05$) 。

着床前の胚・子宮の評価

次に、LNG投与による着床阻害機構を調べることにした。着床が正常に起きるためには、受精卵・子宮の双方が着床に向け適切な状態となる必要がある。着床前のタイミング（day4）での受精卵・子宮の双方を評価した。まずLNG投与が胚の成長・移送に影響を及ぼすか否かを確認することとした。マウスの妊娠では妊娠1日目朝までに排卵・受精が起き受精卵となる。受精卵は妊娠1日目から2日目までには卵管内で2細胞期胚から8細胞期胚として観察されるが、妊娠3日目には桑実胚へと成長し子宮へと移動し妊娠4日目になると胚盤胞へと成長する。着床前のタイミングであるday4に胚の形状・子宮内にある個数を確認した。妊娠4日目午前の胚は未着床のため、子宮内を灌流し胚を回収することで、子宮内の胚を観察することが可能である。day4午前に採取した子宮から回収した胚を観察したところ、両群で胚盤胞が観察され、その個数に差を認めなかった（図7および図8）。以上のことから、LNG投与は胚の卵管から子宮への移送・着床前の胚発育に影響を及ぼさないと考えられた。

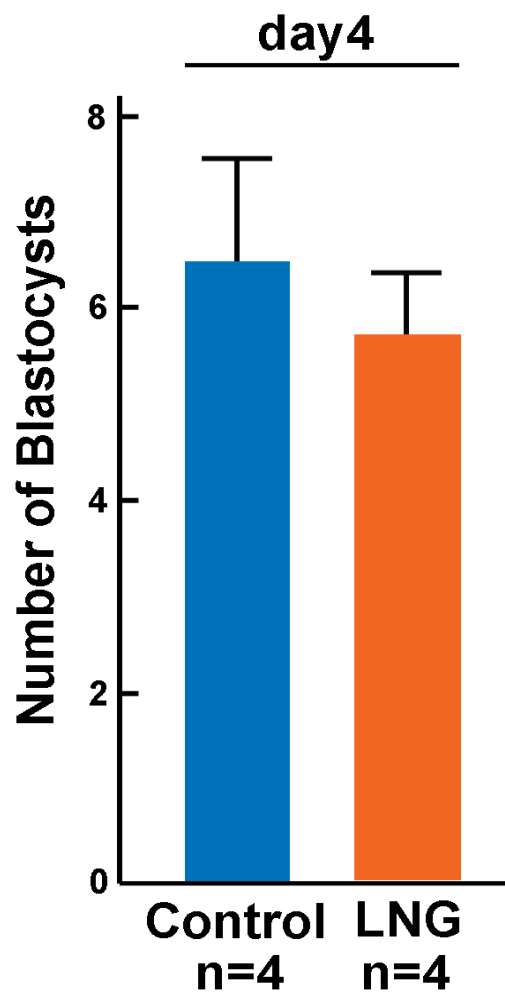
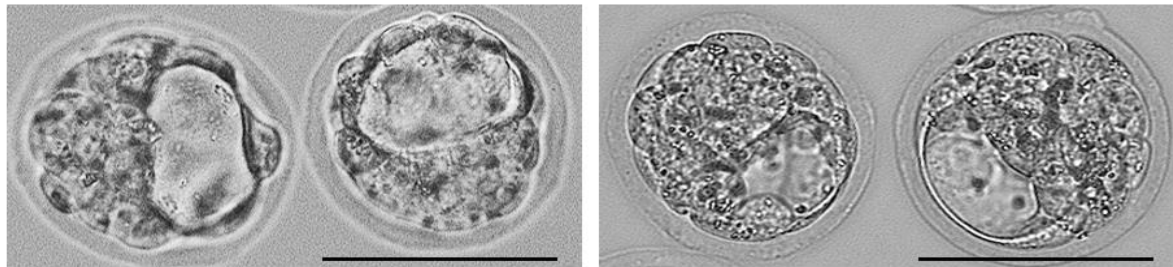


図 7. LNG 投与は胚発育・卵管から子宮への胚の移送には影響しない

LNG投与が胚の移送に影響を及ぼすかどうかを確認するために、着床前のタイミングであるday4午前の子宮を生理食塩水で灌流し、回収した胚の個数を確認した。数値は平均±標準誤差である。(P>0.05)

Blastocysts (Day4 of pregnancy)



Control

LNG

図 8. LNG 投与は胚の発育や形態には影響を与えない

LNG投与が胚の成長に影響を及ぼすかどうかを確認するために、着床前のタイミングであるday4午前の子宮を生理食塩水で灌流し、回収した胚の形状を確認した。図のスケールバーは100 μ mを示す。

次にLNG投与により着床前子宮が着床可能な準備状態となっているかを評価した。

着床前の子宮に求められる環境は、 $E_2 \cdot P_4$ の刺激を受け、胚を受け入れる胚受容能を獲得することである。着床可能な子宮の準備状態の指標として、子宮内膜管腔上皮の増殖抑制と間質の増殖亢進（proliferation-differentiation switching, PDS）がある。排卵後に黄体から分泌される黄体・卵胞ホルモンの影響により、day3まで子宮内膜管腔上皮のみで細胞増殖が強く起こっていたのに対し、day4を迎えると管腔上皮の増殖抑制、間質の増殖の著しい亢進というダイナミックな変化が起きる。管腔上皮はday4に増殖を止め、着床へ分化を開始すると考えられている。この一連の子宮内膜管腔上皮・間質の変化は、その後の胚接着に向けて子宮が準備できていることを示す指標である[23]。Control群・LNG投与群の双方でday4朝に子宮を回収し、細胞増殖を表すKi67免疫染色を行ったところ、管腔上皮の増殖抑制と間質の増殖亢進を認めた（図9）。また子宮内膜管腔上皮におけるKi67陽性細胞の数に有意差は認められなかった。両群ともにPDSが起きていると判断された（図10）。LNG投与でも着床前子宮が卵巣からの性ホルモンにより適切に準備がなされていることが示唆された。LNG投与群では着床前の胚・子宮は共に着床前として適した状態にあることが示された。

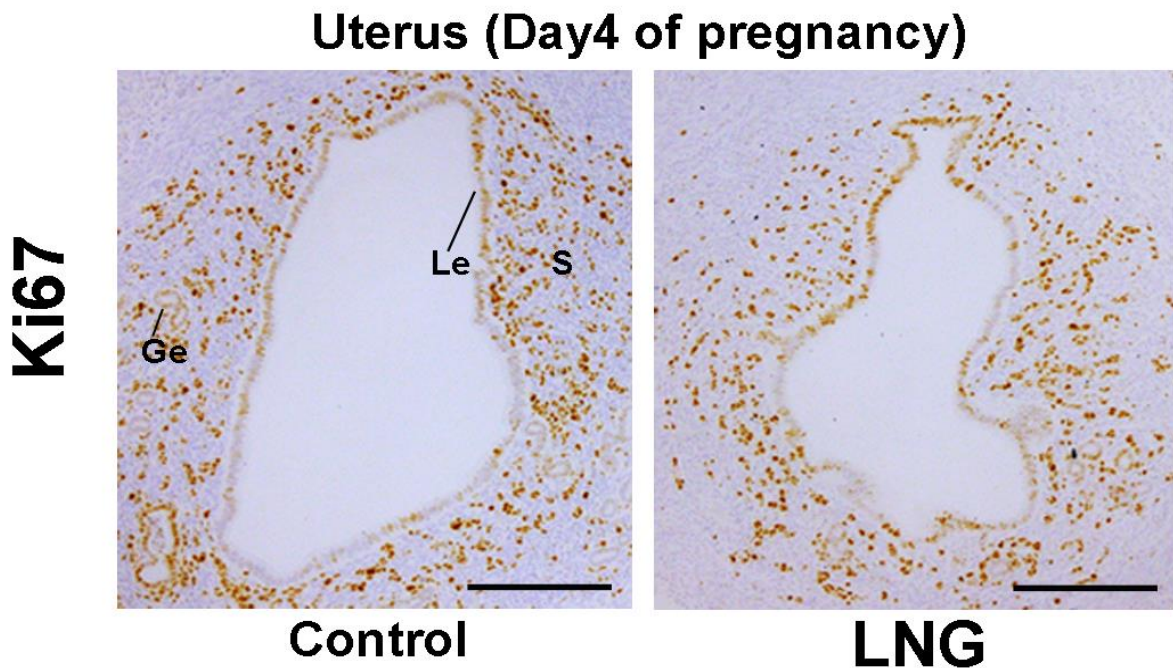


図9. LNG投与は着床直前の子宮内膜の細胞分化・増殖状態に影響を与えない

LNG (0, 300 μ g/kg/day) をday1朝からday4朝まで連続投与し、day4午前での子宮におけるKi67免疫染色を行い着床可能な子宮の準備状態の指標である proliferation-differentiation switching (PDS) が正常に起きているかを検討した。Control群に4検体、LNG投与群に4検体を用いて行った。Leは管腔上皮、Geは腺上皮、Sは間質を示す。図のスケールバーは200 μ mを示す。

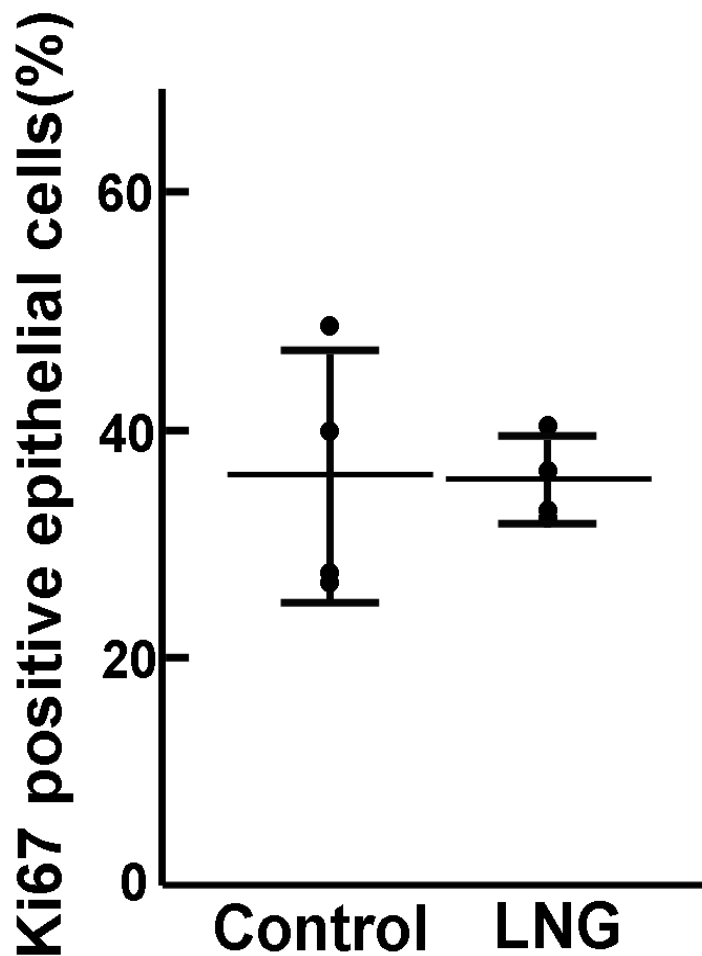


図10. LNG投与は着床直前の子宮内膜管腔上皮の増殖状態に影響を与えない

着床可能な子宮の準備状態の指標であるproliferation-differentiation switching (PDS) が子宮内膜管腔上皮において正常に起きているかを検討した。LNG (0, 300 μ g/kg/day) をday1朝からday4朝まで連続投与し、day4午前での子宮におけるKi67免疫染色を行い、子宮内膜管腔上皮の細胞の個数とKi67染色陽性細胞の割合を算出した。ランダムに選択した各群4セクションを使用し、顕微鏡下(40倍視野)にカウントを行った。数値は平均 \pm 標準誤差である。(P>0.05)

LNG投与による子宮でのホルモン反応遺伝子の変化

LNG投与の子宮への影響はどのような経路で起きているのかを評価するため、E₂・P₄の反応性を確認することとした。子宮におけるE₂・P₄応答遺伝子の発現をqPCRにより評価した。子宮におけるE₂応答遺伝子としてLtf・Muc-1・C3が、P₄応答遺伝子としてAreg・Ihh・Hdc・Hoxa10が知られている[24-27]。day4午前での子宮内膜間質のP₄応答遺伝子であるHoxa10や、子宮におけるE₂応答遺伝子であるLtf・Muc-1・C3にはControl群とLNG投与群との間に変化はみられなかったのに対し、子宮内膜上皮のP₄応答遺伝子であるAreg・IhhはLNG投与群において有意な発現増加が認められた。LNG投与は子宮内膜上皮におけるP₄応答を増強していることが示された（図11）。

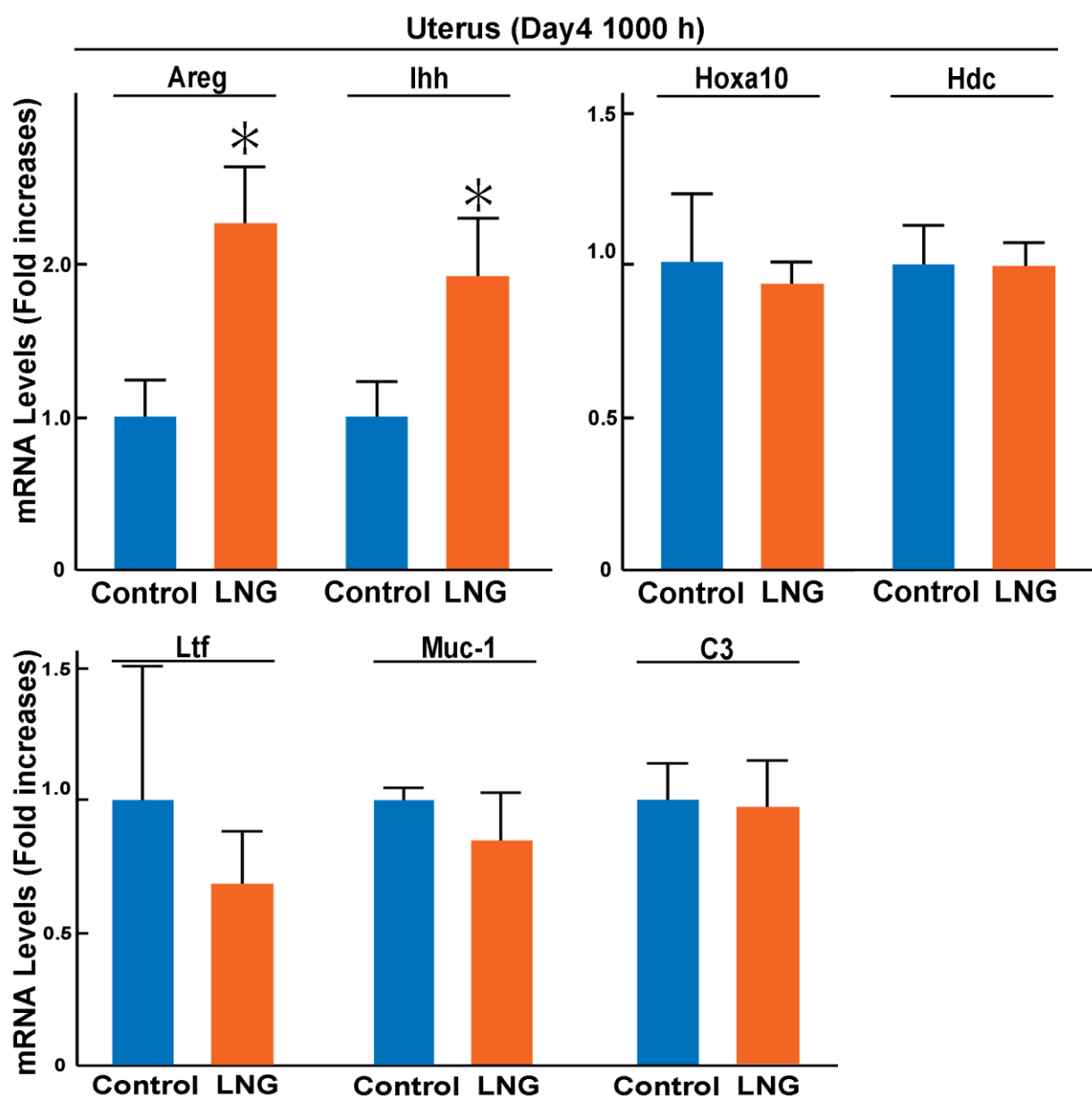


図11. LNG投与は子宮上皮でのP₄応答遺伝子発現を増強する

day4午前での子宮におけるE₂・P₄反応遺伝子の発現をqPCRで検討した。Control群に9検体、LNG投与群に5検体を用いて行い、Actinで標準化した。数値は平均±標準誤差である。*は、群間に有意差があることを示す (P < 0.05)。

LNG投与による子宮でのホルモン受容体の変化

次にLNG投与はE₂・P₄受容体の発現に影響していないかを確認した。E₂刺激に対して作用促進的に働くレセプターにはER α があり、Esr1遺伝子でコードされる。また、P₄受容体はPgr遺伝子でコードされる。qPCRにてEsr1・Pgrの発現を確認したところ、day4午前でのEsr1の発現にLNG投与群とControl群の間に有意差はみられなかったのに対して、Pgrの発現はわずかにLNG投与群で低下していた（図12）。またEsr1・Pgrの発現を免疫染色にて確認したが、その発現に明らかな差は認められなかった（図13）。

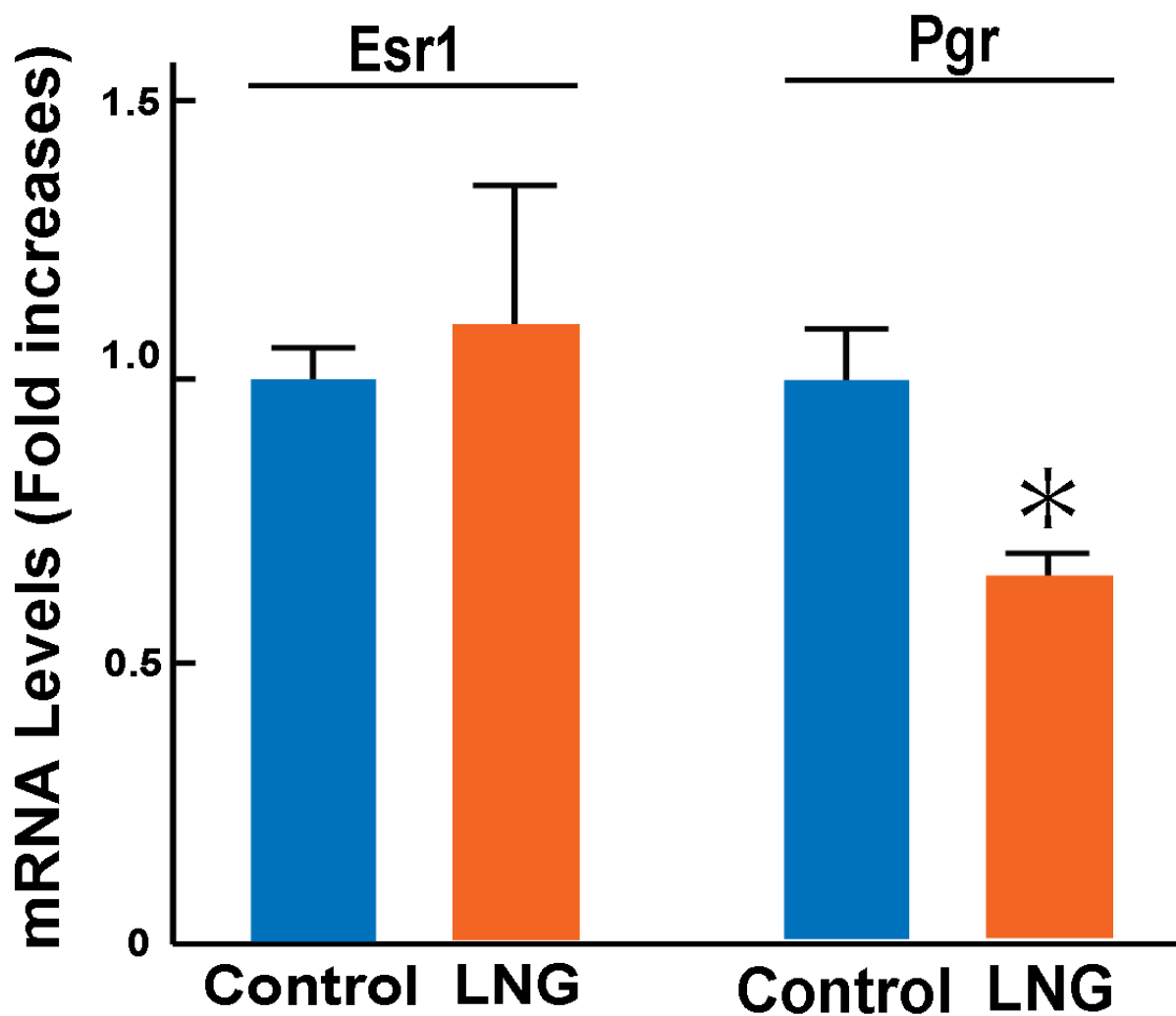


図12. LNG投与時のホルモン受容体のmRNA発現

day4午前での子宮におけるエストロゲン/プロゲステロンレセプターの発現をqPCRで検討した。Control群に9検体、LNG投与群に5検体を用いて行い、Actinで標準化した。数値は平均±標準誤差である。*は、群間に有意差があることを示す ($P < 0.05$)。

Uterus (Day4 1000 h)

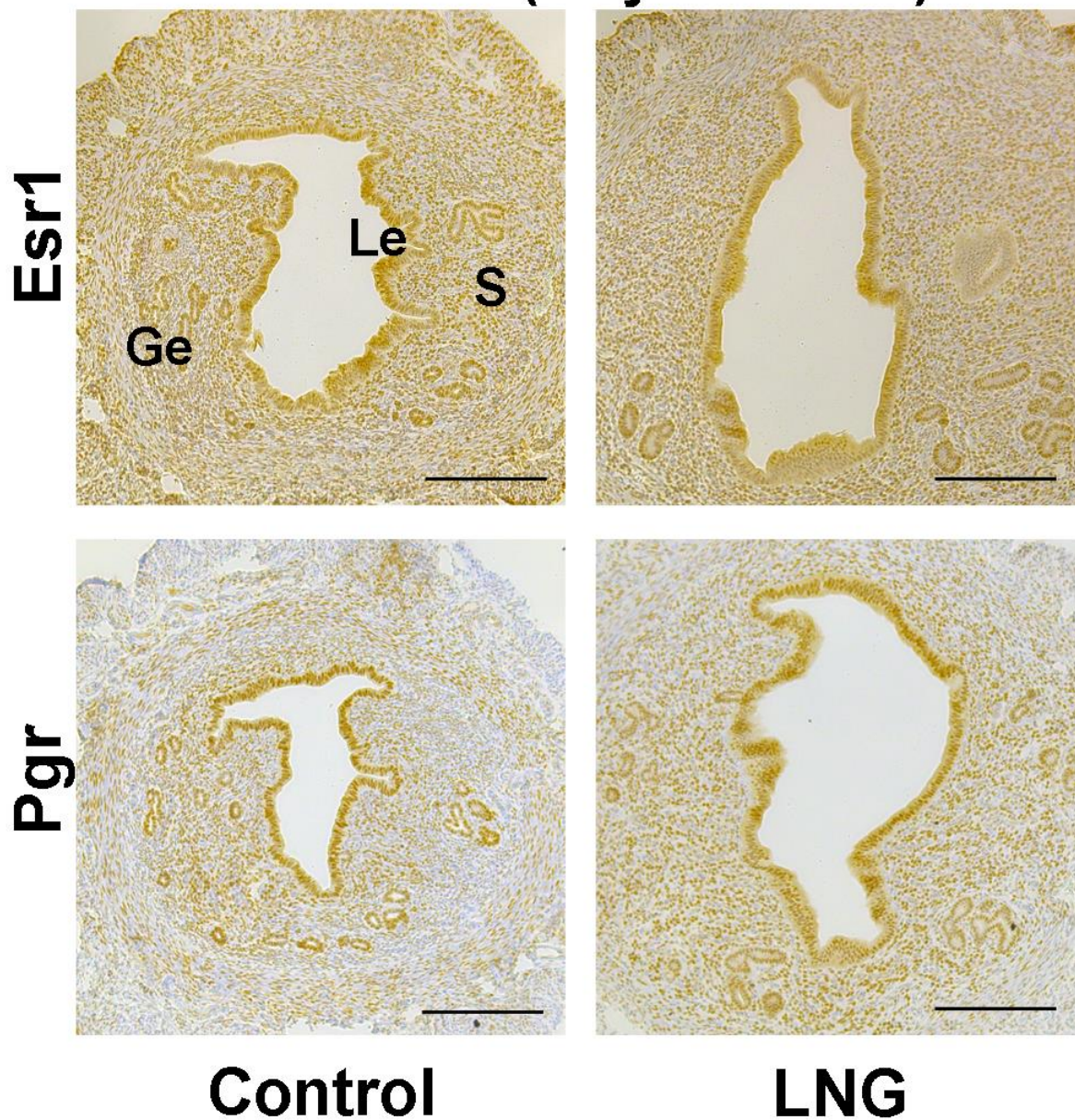


図13. LNG投与時のホルモンレセプターの蛋白発現

LNG (300 µg/kg/day) をday1朝からday4朝まで連続投与し、day4午前での子宮におけるエストロゲンレセプター (Esr1) /プロゲステロンレセプター (Pgr) 蛋白発現を免疫染色で検討した。Control群に4検体、LNG投与群に4検体を用いて行った。Leは管腔上皮、Geは腺上皮、Sは間質を示す。図のスケールバーは200 µmを示す。

LNG 投与時の血中 E₂・P₄濃度

LNG 投与が E₂・P₄ の血中濃度に影響を与えるか否かを検討するため、LNG (0, 300μg/kg/day) を day1 朝より着床前の day4 朝まで連日投与し、day4 の朝に採血を行い、血中 E₂・P₄濃度を計測したが、LNG 投与での変化を認めなかった (図 14)。

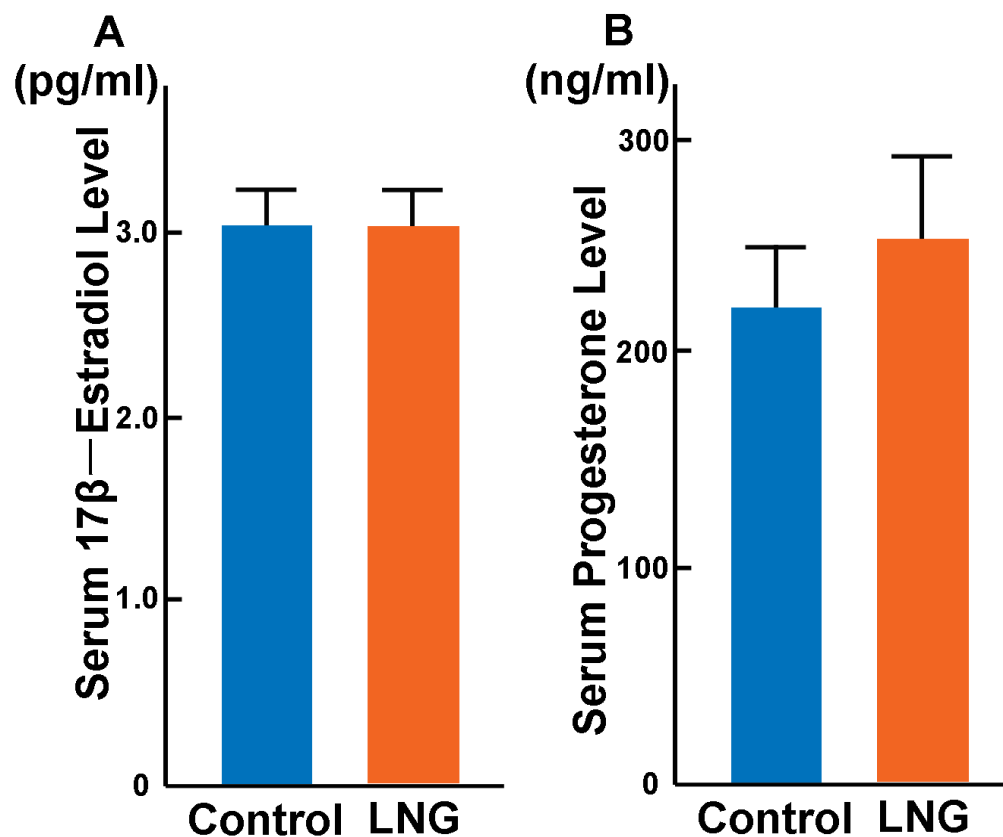


図 14. LNG 投与時の血中 E₂・P₄濃度

LNG (0, 300μg/kg/day) を day1 朝より着床前の day4 朝まで連日投与し、day4 の朝に採血を行い、血中 E₂・P₄濃度を計測した。Control 群に 5 検体、LNG 投与群に 4 検体を用いて行った。数値は平均±標準誤差である。(P>0.05)

LNG投与は子宮内膜からのLIF分泌を抑制する

次に、着床に必須の子宮因子とされるleukemia inhibitory factor (LIF) について検討を行った。LIFは着床直前のマウス子宮内膜腺上皮に発現し、子宮への胚接着に関与しているとされる。LNGをday1～day4まで連続投与したのちに着床直前であるday4午後に子宮を摘出し、LIFのmRNA発現をqPCRで評価したところ、LNG投与群でのLIF発現はControl群と比較し有意に低下していた（図15）。in situ hybridizationにおいてLIFの発現パターンを評価したところ、Control群では子宮内膜腺上皮でのLIF発現が認められるのに対し、LNG群では発現が減弱していることがわかった（図16）。以上の結果から、LNG投与により着床率は低下し、LIF発現も減弱することが確認された。

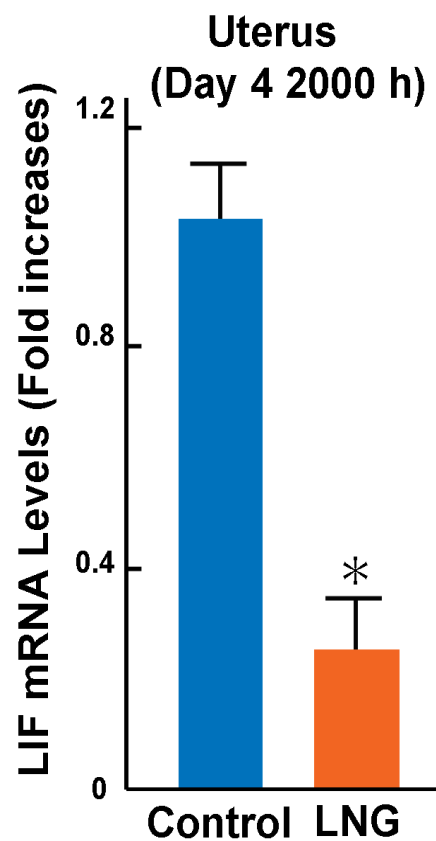


図15. LNG投与は子宮におけるLIF mRNA発現を減少させる

LNG (0, 300 μ g/kg/day) をday1朝からday4朝まで連日投与したのちに、着床直前であるday4午後に子宮を摘出し、LIF発現をqPCRで評価した。Control群に6検体、LNG投与群に5検体を用いて行い、Actinで標準化した。数値は平均 \pm 標準誤差である。*は、群間に有意差があることを示す ($P < 0.05$)。

Uterus(Day4 2000 h)

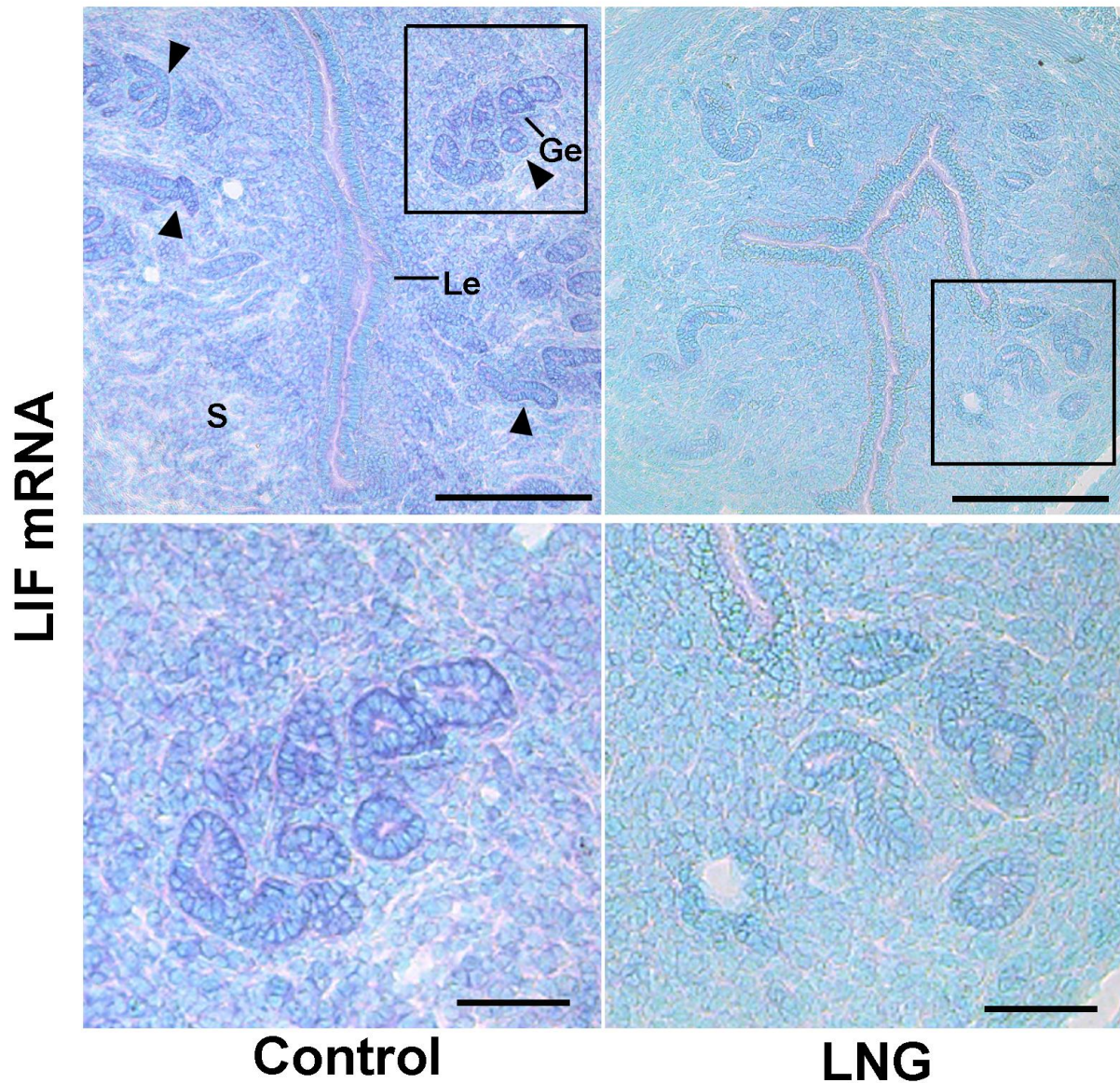


図16. LNG投与は子宮内膜腺上皮におけるLIF mRNA発現を減少させる

LNG を day1 朝から day4 朝まで連日投与したのちに着床直前である day4 午後に子宮を摘出し、in situ hybridization において LIF 発現を評価した。Le は管腔上皮、Ge は腺上皮、S は間質を示す。矢印は LIF の発現位置を示す。上段の図の四角に囲まれた部分を下段の図にてそれぞれ拡大した。上図のスケールバーは 200 μ m を示す。拡大図のスケールバーは 50 μ m を示す。

またLIF低下がLNG投与群での着床阻害の原因になっているかどうかを評価するために、LNGをday1～4の午前にまでに連続投与し、リコンビナントLIF (12 μ g/匹) をday4朝・夕に2回投与し、day5朝に着床の有無を評価したところ、5匹のうち4匹 (80%) で着床部位を確認することができた。LIF投与は有意に着床率を改善させることがわかった。LIFの分泌低下がLNG投与による着床阻害の直接的な原因である可能性が示された (図17)。

また、LIFはエストロゲンによって誘導される因子であるため、LNG投与群に対して、卵胞ホルモン (17 β -estradiol, E₂) をday4午前に20ng投与し、day5午前に着床を評価したところ、6匹のうち5匹 (83.3%) で着床部位が確認できた (図18)。またE₂を投与した後にday4午後に子宮を回収しLIFの発現をin situ hybridizationにより確認したところ、E₂投与群ではLIFが子宮内膜腺上皮に誘導されることが確認できた (図19)。それに加えて、E₂投与でLIFが子宮内膜管腔上皮にも誘導されていた (図19)。LNGによる着床阻害は、着床直前のE₂投与で発現誘導されたLIFによって救済される可能性が示唆された。

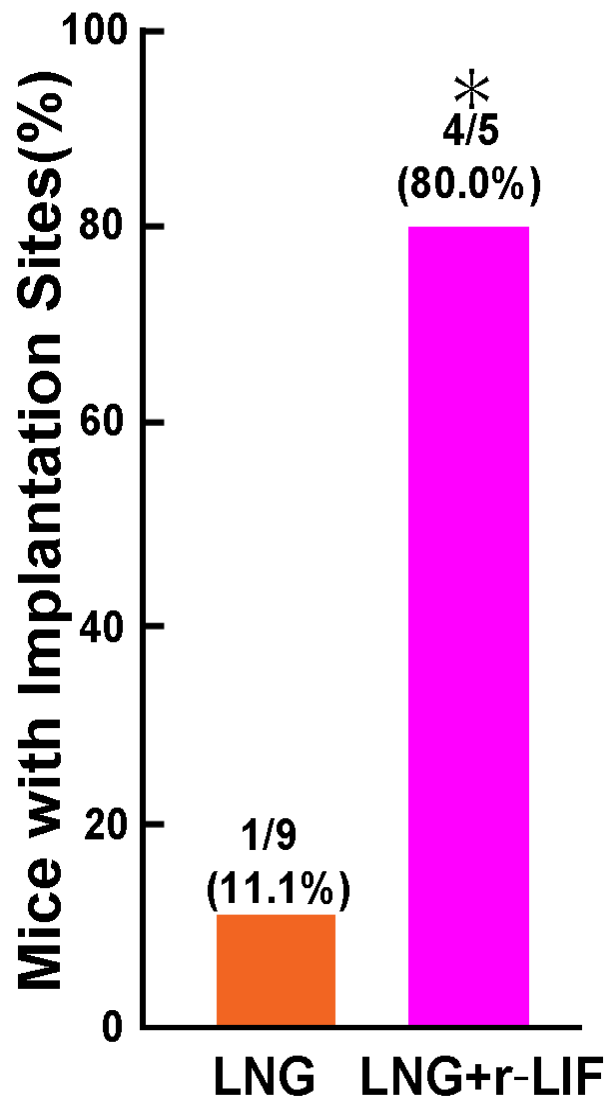


図 17. LNG による着床阻害は LIF の投与により救済される

LIF低下がLNG投与群での着床阻害の原因になっているかどうかを評価するために、LNG (300 μ g/kg/day) をday1朝よりday4朝まで連日投与し、リコンビナントLIF (r-LIF, 12 μ g/匹) をday4朝・夕に2回投与し、day5朝に着床の有無を評価した。5匹のうち4匹 (80%) で着床部位を確認することができた。*は、群間に有意差があることを示す ($P < 0.05$)。

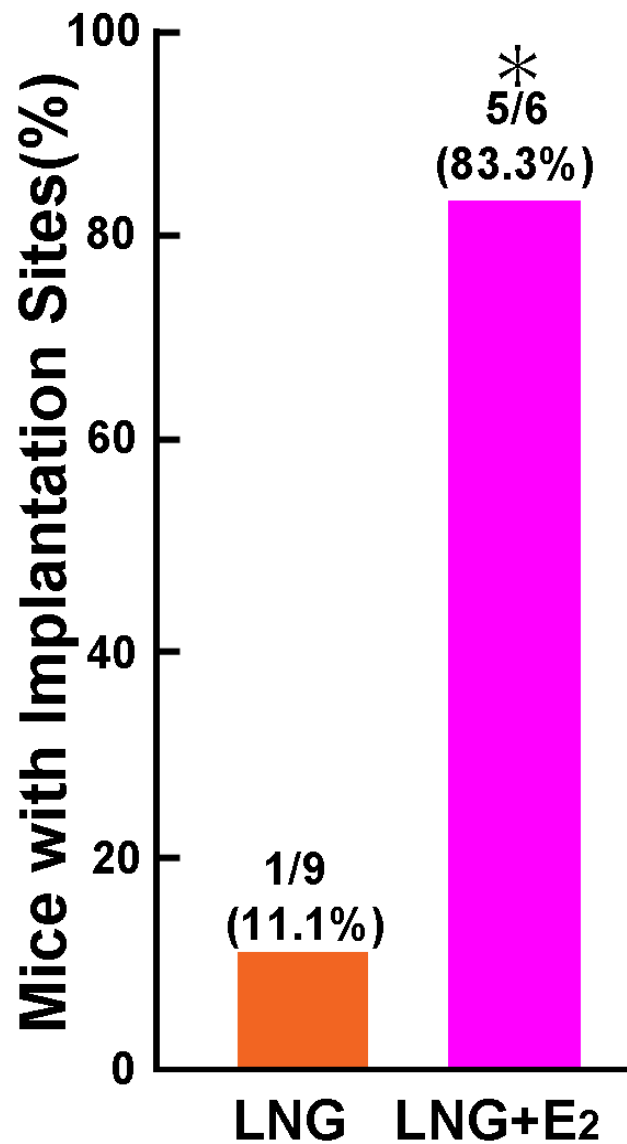


図 18. LNG による着床阻害は E₂ の投与により救済される

LNG (300μg/kg/day) を day1 朝より day4 朝まで連日投与し、E₂ (20ng/匹) を day4 朝に投与し、day5 朝に着床の有無を評価した。6 匹のうち 5 匹 (83.3%) で着床部位を確認することができた。*は、群間に有意差があることを示す (P < 0.05)。

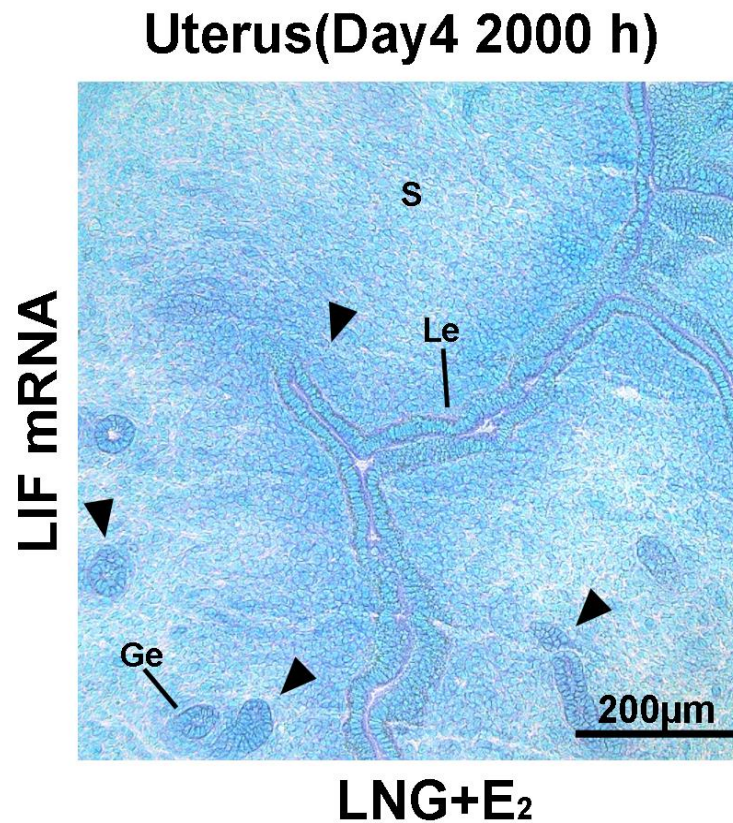


図19. E₂投与は子宮内膜上皮におけるLIF mRNA発現を増加させる

LNG (300μg/kg/day) を day1 朝より day4 朝まで連日投与したのちに day4 朝に E₂ (20ng/匹) を投与し、着床直前である day4 20 時に子宮を摘出し、in situ hybridization において LIF 発現を評価した。LNG 投与群では子宮内膜上皮での LIF 発現が低下していたのに対し (図 16 参照)、E₂ 投与群では発現が増強していることがわかった。E₂ 投与により、子宮内膜上皮、特に腺上皮からの LIF 分泌が誘導していることが示された。Le は管腔上皮、Ge は腺上皮、S は間質を示す。矢印は LIF の発現位置を示す。図のスケールバーは 200μm を示す。

天然型プロゲステロン投与による着床阻害効果

LNG以外の黄体ホルモン製剤でも同様の現象がみられるかどうかについて評価を行った。天然型プロゲステロン (P₄; 0, 5, 10, 20mg/day) を連日皮下注射し、着床の有無を評価したところ、着床部位が確認されたマウスは、0mg/day、5mg/dayのP₄投与でそれぞれ8/8匹 (100%)、3/3匹 (100%) であったのに対し、10mg/day、20mg/dayではそれぞれ0/6匹 (0%)、0/4匹 (0%) となった (図20)。LNG投与時と同じく、P₄投与においても投与量を増加することで着床阻害が認められた。

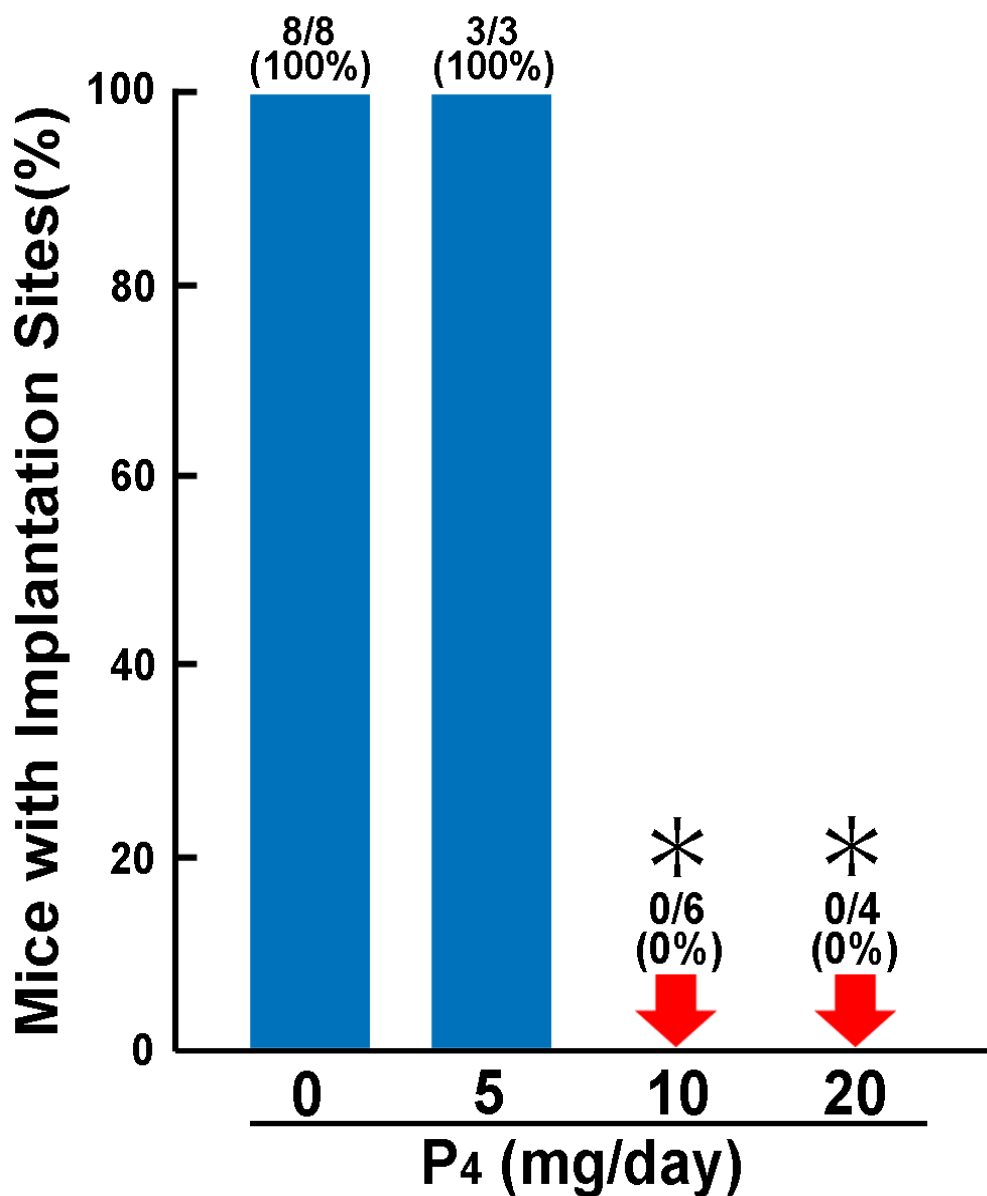


図 20.天然型プロゲステロンの投与でも着床率が低下する

LNG 以外の黄体ホルモン製剤でも同様の現象がみられるかどうかについて評価を行った。P₄ (0, 5, 10, 20mg/day) を連日皮下注射し、Day5 朝に着床の有無を評価した。着床部位が確認されたマウスは 0mg/day、5mg/day の投与でそれぞれ 8/8 (100%)、3/3 (100%) であったのに対し、10mg/day、20mg/day ではそれぞれ 0/6 匹 (0%)、0/4 匹 (0%) となった。*は、群間に有意差があることを示す (P<0.05)。

天然型プロゲステロン投与時の血中 E_2 ・ P_4 濃度

天然型プロゲステロン投与が血中 E_2 ・ P_4 の血中濃度に与える影響を検討した。天然型プロゲステロン (P_4 10mg/day) を day1 朝より着床前の day4 朝まで連日投与し、day4 の朝に採血を行い、血中 E_2 ・ P_4 濃度を計測した。血中 E_2 には差を認めなかったものの、 P_4 濃度は約 4 倍の上昇を認めた (図 21)。

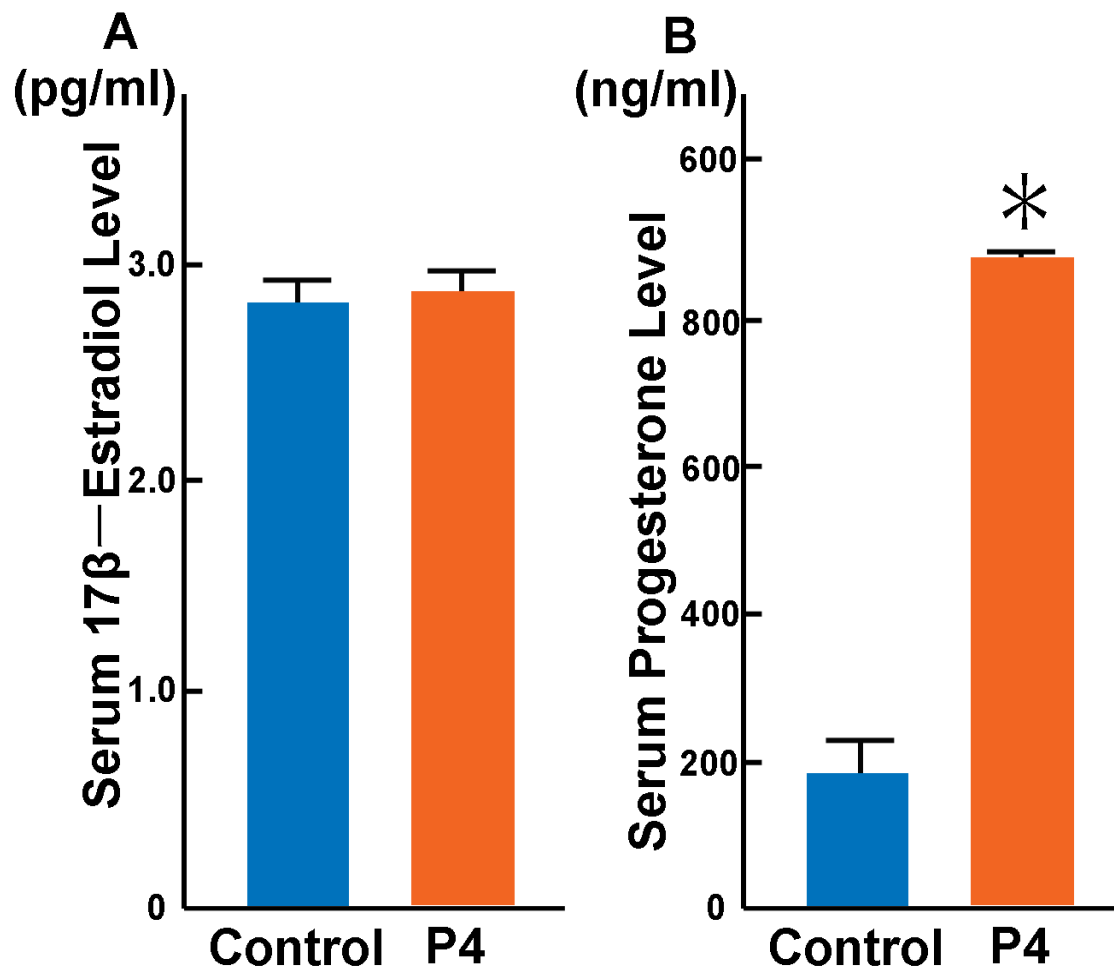


図 21. P₄ 投与時の血中 E₂・P₄ 濃度

P₄ (10mg/day) を day1 朝より着床前の day4 朝まで連日投与し、day4 の朝に採血を行い、血中 E₂・P₄ 濃度を計測した。Control 群に 6 検体、P₄ 投与群に 4 検体を用いて行った。数値は平均 \pm 標準誤差である。*は、群間に有意差があることを示す ($P < 0.05$)。

LNG投与は子宮からのLIF分泌を抑制する

P₄投与群での着床直前であるday4午後の子宮におけるLIF mRNA発現をqPCRで評価したところ、Control群と比較し有意に発現が低下していた（図22）。またLIFシグナルの下流のJak-Stat経路としてのリン酸化STAT3の発現を免疫染色で確認したところ、P₄投与群では子宮内膜管腔上皮での発現低下が認められた（図23）。子宮内膜腺上皮からのLIF分泌が胚接着部位である管腔上皮に作用しSTAT3を活性化していること、LNGがLIF抑制を介して管腔上皮のSTAT3活性化を抑制していると考えられた。

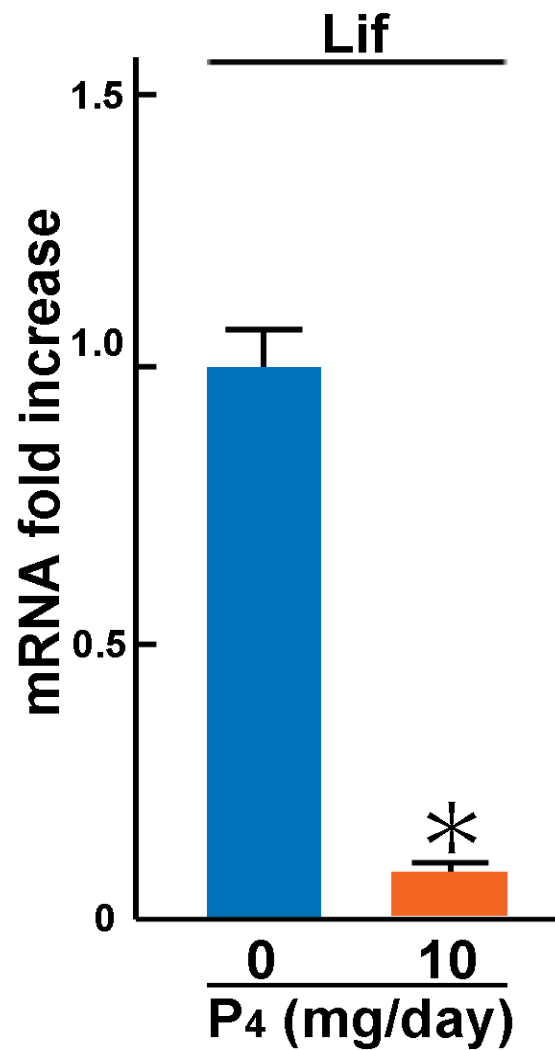


図22. P₄投与は子宮のLIF発現を減少させる

P₄ (0mg, 10mg) を連日皮下注射し、着床直前である day4 午後の子宮における LIF 発現を qPCR で評価した。0mg 投与群に 6 検体、10mg 投与群に 4 検体を用いて行い、Actin で標準化した。数値は平均±標準誤差である。*は、群間に有意差があることを示す (P < 0.05)。

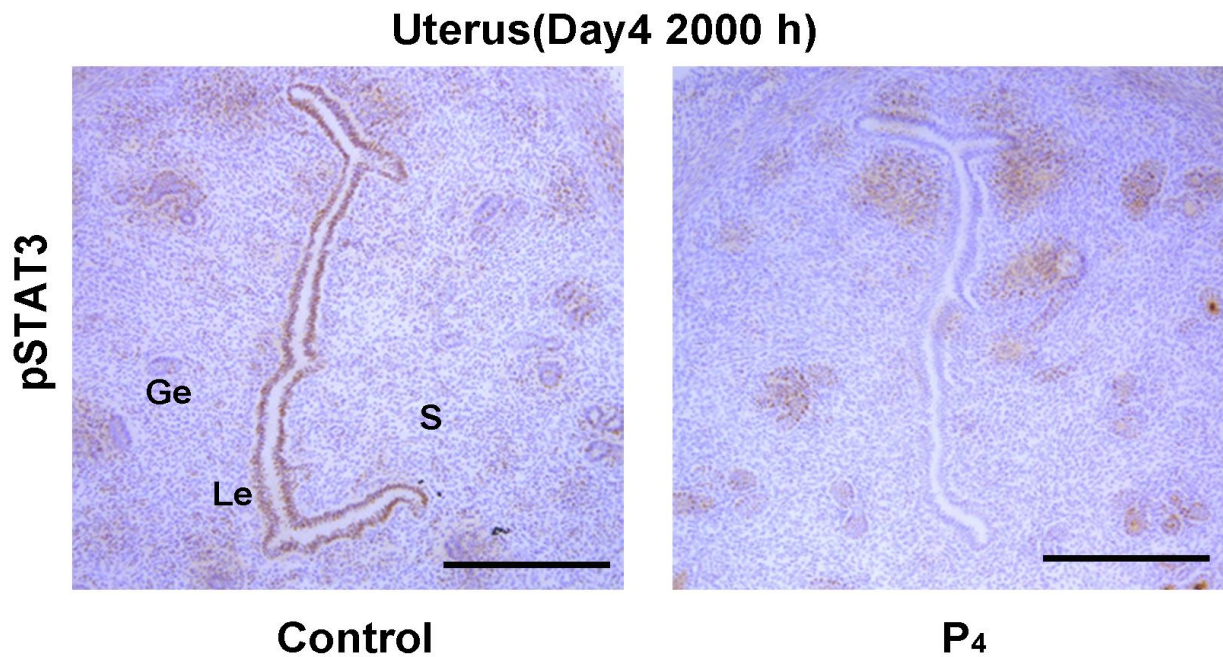


図23. P₄投与によりLIFの下流シグナルSTAT3活性化が減弱する

P₄ (10mg) を連日皮下注射し、Day4 20時に子宮を回収し、LIFシグナルの下流のリン酸化STAT3の発現を免疫染色で確認した。Leは管腔上皮、Geは腺上皮、Sは間質を示す。図のスケールバーは200μmを示す。

LIF低下がP₄投与での着床阻害の原因になっているかどうかを評価するために、P₄をday1からday4まで連続投与した後にリコンビナントLIF（12μg/匹）をday4朝・夕の2回投与し、day5朝に着床の有無を評価したところ、3/4匹（75%）で着床部位を確認できた（図24）。リコンビナントLIF投与で有意に着床率は上昇し、P₄投与による着床阻害の原因はLIFの分泌低下であることが示唆された。

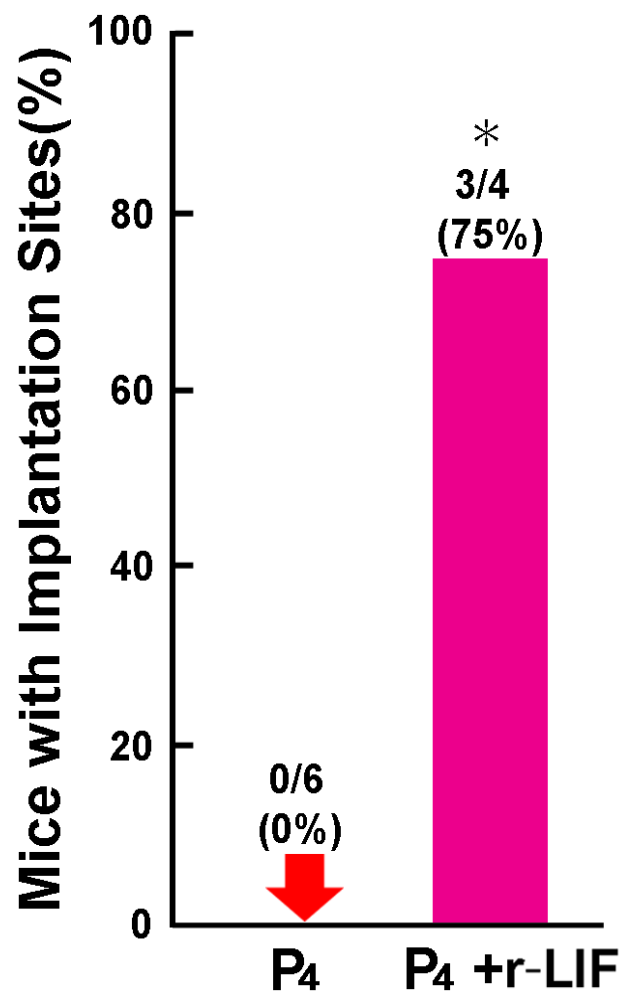


図24. P₄による着床障害は、LIF投与により救済される。

P₄を day1 から day4 まで連続投与した後にリコンビナント LIF (r-LIF ,12μg/匹) を day4 朝・夕の 2 回投与し、day5 朝に着床の有無を評価したところ、r-LIF 投与で着床率が上昇した。＊は、群間に有意差があることを示す (P < 0.05) 。

考察

本研究では、黄体ホルモンによる着床阻害効果についてマウスモデルで検討した。黄体ホルモン投与による避妊効果は、視床下部へのネガティブフィードバック作用による黄体化ホルモン (LH) 分泌抑制が排卵抑制に繋がるために起きるものであるというのが定説であった。それに対し、着床阻害に関しては避妊効果への関与が推測されていたものの、その効果を明示した研究は今までになされていなかった。妊娠マウスでは、交配タイミングを決めることで排卵・受精・着床が起きるタイミングを統一した状況を作り出すことができるため、薬剤投与のタイミングを排卵後と定めて着床の有無の評価を行えば、薬剤の着床に対する影響を明らかにすることができると考えた。排卵が終了した妊娠 1 日目から、着床直前の妊娠 4 日目までに黄体ホルモン製剤を投与して着床を検討した。黄体ホルモンとして LNG・P₄ を使用したところ、いずれも着床を妨げる効果が示された。またその効果は投与量により変化することもわかった。特に P₄ は、妊娠マウスを使用した実験モデルにおいて黄体補充目的に使用される量である 5mg/day では着床阻害はみられなかったものの、投与量を 10mg/day に増加すると着床阻害が認められた。これらの結果により、今まで明らかにされていなかった黄体ホルモン投与の着床阻害効果が、本研究によってはじめて示せたといえる。ただし、本研究での黄体ホルモン投与法は通常の緊急避妊を目的とした投与方法と異なっている。通常臨床において緊急避妊目的に黄体ホルモンを投与する際には、無防備な性交渉をもったタイミングより 72 時間以内に LNG 1.5mg を 1 回内服する。実際に予

備実験として Day1 のみ・Day2 のみ・Day3 のみでの LNG 投与実験も行ったが、着床阻害はみられなかった。マウスとヒトとでは黄体ホルモンに対する反応性が異なるため、単純に体重あたりの投与量や投与期間に関してヒトとマウスとで比較することは困難であるが、臨床において定められている使用量でヒトにおいて同様の現象が起きているかは今後更なる検討が必要である。

今回の研究モデルと同様のタイミング、つまり排卵後より黄体ホルモン製剤を使用する臨床的局面が不妊治療の黄体ホルモン補充である。卵巣で形成された黄体からの黄体ホルモンの分泌不全である黄体機能不全や、生殖補助医療での医原性の下垂体機能抑制による二次的な黄体機能不全といったケースで用いられている。黄体ホルモン補充によって着床率を高め流産率を減少させることができる。ヒトにおける黄体ホルモンの投与量は、経験的にその投与量が設定されており、明確なエビデンスに基づいて設定されていない。着床という観点でのホルモン応答能の明確な指標がないため、とにかく黄体ホルモンを十分に投与し血中濃度が上昇すれば妊娠成立・維持に有効だ、といった誤解を持っている臨床家も多い。本研究では、マウスへの P_4 投与により正常マウスの 4 倍の P_4 血中濃度となっただけで着床が阻害された。本研究の結果からいえることは、着床率を高めるために投与されている黄体ホルモンが投与方法や反応性の個人差によっては負の作用である「着床阻害作用」を及ぼし得るということである。今後、ヒトにおける黄体ホルモン投与の至適値を明らかにする研究の必要性が考えられた。

LNG および P₄ の投与によって、子宮内膜腺上皮での P₄ 応答が増強され、着床の必須因子とされる LIF の分泌低下が認められた。また P₄ 投与によって、LIF の刺激により活性化される Jak-Stat 経路である STAT3 リン酸化の減弱が確認された。LNG および P₄ 投与で起きた着床障害は LIF 蛋白の補充によって回復した。LNG による着床障害は、着床直前の E₂ 投与により子宮内膜腺および管腔上皮からの LIF 分泌が誘導され回復した。これらの結果から、黄体ホルモンの投与は、子宮内膜腺上皮での P₄ 応答増強・E₂ 応答減弱を誘導し LIF 分泌を減少させ、さらには胚接着の場である子宮内膜管腔上皮の STAT3 を抑制し胚接着を阻害していると考えられた (図 25)。LIF はマウスにおいては胚の接着に関わると考えられ、ヒトでも着床期の子宮内膜で分泌がされていることもわかっており、今後ヒト検体を用いた黄体ホルモンの LIF 抑制効果の検討が必要と考えられる。

マウスのホルモン状態は、排卵直後には E₂ 優位であり、卵巢黄体形成により子宮着床直前には P₄ 優位の状態に移行する[17, 18]。一方 LIF 発現は、排卵直後には子宮内膜管腔上皮に局在しており、着床直前には子宮内膜腺上皮に局在している。また LIF は E₂ 刺激により子宮に誘導され、E₂ 刺激による LIF 分泌が胚接着の成立に重要である[28]。E₂ 刺激は Pgr を誘導し P₄ の反応性を高めること、P₄ の主な作用は E₂ 作用を抑制することが知られており、E₂・P₄ の刺激のバランスが子宮の機能調節に重要である。本研究では、黄体ホルモン投与が子宮内膜腺上皮の LIF の分泌低下を誘導し着床を阻害し、着床直前の E₂ の追加投与により子宮内膜腺上皮および管腔上皮から LIF

が分泌され着床障害が回復した。これらの知見から、着床に関わる LIF の分泌調節には E_2 が中心的に関与し、 P_4 が E_2 作用の抑制を介して LIF 分泌を抑制していると考えられた。

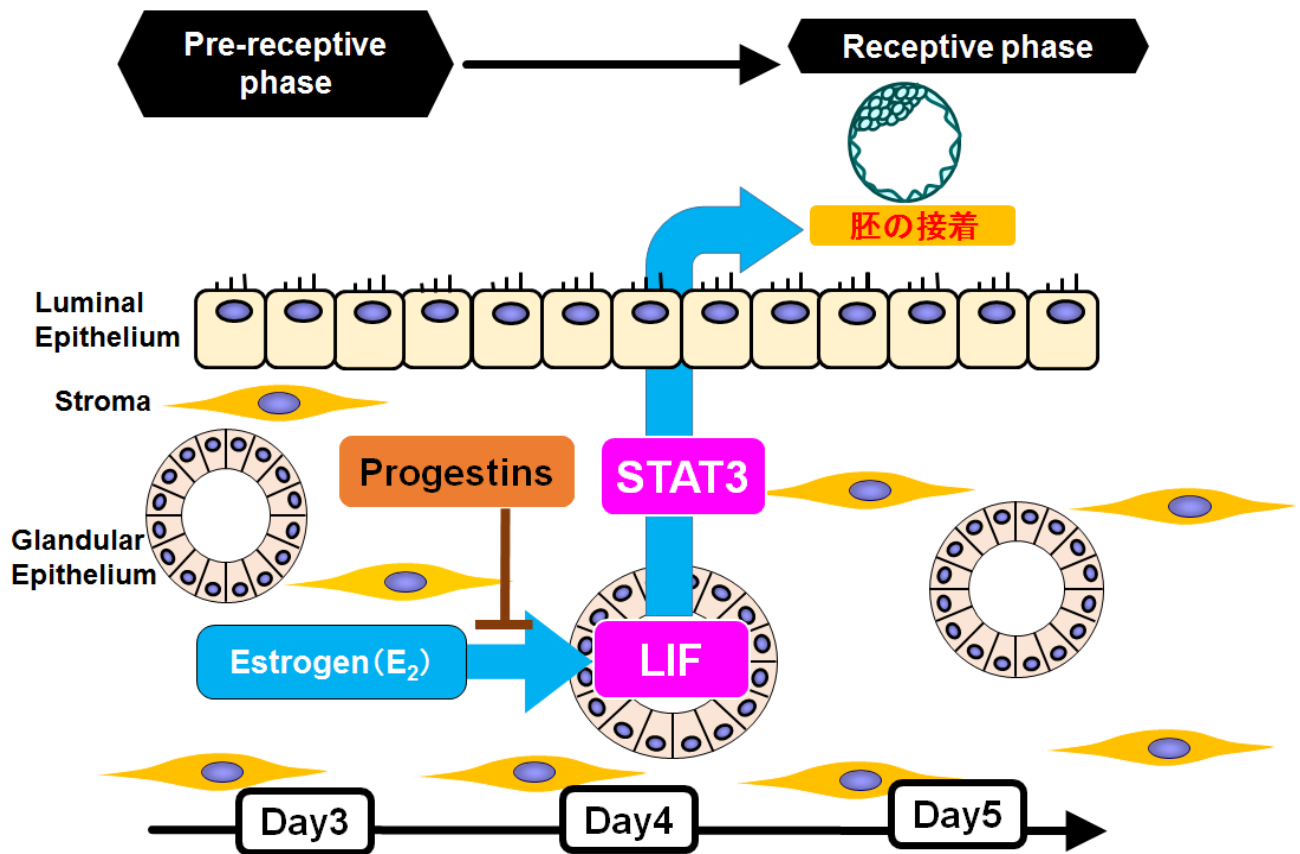


図 25. 黄体ホルモン投与は LIF 分泌を抑えることで着床を阻害する

マウスの妊娠では前胚受容期から胚受容期にかけ子宮内膜腺上皮から LIF の分泌がおき着床が成立する。LNG 投与はその LIF 分泌を抑制することで胚受容能を低下させている。

結論

本研究により、黄体ホルモンが着床阻害効果を持つことが明らかになり、またその阻害機構は子宮腺上皮における LIF 分泌の抑制が原因であることが示唆された。黄体ホルモン製剤の避妊作用は排卵阻害作用だけでなく、LIF 分泌抑制による着床阻害作用も介している可能性が示唆された。また、LIF 分泌はエストロゲンにより主に調節を受けるとされてきたが、黄体ホルモンも LIF 分泌調節に関わっていることが明らかとなった。今後不妊治療における着床率改善のための黄体ホルモン製剤の投与至適値を明らかにする研究の必要性が考えられるが、LIF はその指標となる可能性がある。

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. Shah, D. and N. Nagarajan, *Luteal insufficiency in first trimester*. Indian J Endocrinol Metab, 2013. **17**(1): p. 44-9.
2. Nardo, L.G. and H.N. Sallam, *Progesterone supplementation to prevent recurrent miscarriage and to reduce implantation failure in assisted reproduction cycles*. Reprod Biomed Online, 2006. **13**(1): p. 47-57.
3. van der Linden, M., et al., *Luteal phase support for assisted reproduction cycles*. Cochrane Database Syst Rev, 2015(7): p. Cd009154.
4. Kunjappu, M.J., *Pioneering studies of the "morning-after" pill*. Yale J Biol Med, 2011. **84**(2): p. 109-11.
5. 日本産科婦人科学会, *産婦人科診療ガイドライン婦人科外来編 2017*. 日本産科婦人科学会／日本産婦人科医会.
6. Sitruk-Ware, R., *New progestagens for contraceptive use*. Hum Reprod Update, 2006. **12**(2): p. 169-78.
7. Sitruk-Ware, R., *Pharmacological profile of progestins*. Maturitas, 2004. **47**(4): p. 277-83.
8. Bashour, N.M. and S. Wray, *Progesterone directly and rapidly inhibits GnRH neuronal activity via progesterone receptor membrane component 1*. Endocrinology, 2012. **153**(9): p. 4457-69.
9. Peck, R., et al., *Does levonorgestrel emergency contraceptive have a post-fertilization effect? A review of its mechanism of action*. Linacre Q, 2016. **83**(1): p. 35-51.
10. Durand, M., et al., *On the mechanisms of action of short-term levonorgestrel administration in emergency contraception*. Contraception, 2001. **64**(4): p. 227-34.
11. Vargas, M.F., et al., *Effect of single post-ovulatory administration of levonorgestrel on gene expression profile during the receptive period of the human endometrium*. J Mol Endocrinol, 2012. **48**(1): p. 25-36.
12. Taketani, Y., Kozuma, S., Fujii, T. & Osuga, Y. Principles of Obstetrics and Gynecology, 2014: p. 3, 40 - 93
13. Dey, S.K., et al., *Molecular cues to implantation*. Endocr Rev, 2004. **25**(3): p. 341-73.
14. Tranguch, S., et al., *Cochaperone immunophilin FKBP52 is critical to uterine receptivity for embryo implantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(40): p. 14326-31.
15. Tranguch, S., et al., *FKBP52 deficiency-conferred uterine progesterone resistance is genetic background and pregnancy stage specific*. J Clin Invest, 2007. **117**(7): p. 1824-34.
16. Hirota, Y., et al., *Uterine FK506-binding protein 52 (FKBP52)-peroxiredoxin-6 (PRDX6) signaling protects pregnancy from overt oxidative stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(35): p. 15577-82.
17. Egashira M, a.H.Y., *Uterine receptivity and embryo-uterine interactions in embryo implantation: lessons from mice*. Reproductive Medicine and Biology. , 2013. **12**(4):127-32.

18. Hiraoka T, S.-F.T., and Hirota Y., *How does Progesterone Support Embryo Implantation*. Journal of Mammalian Ova Research., 2015. **32(3):87-94**.
19. Stewart, C.L., et al., *Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor*. Nature, 1992. **359(6390):** p. 76-9.
20. Song, H., et al., *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):** p. 1147-61.
21. Mariee, N., T.C. Li, and S.M. Laird, *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):** p. 1946-54.
22. Mikolajczyk, M., P. Wirstlein, and J. Skrzypczak, *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):** p. 65-74.
23. Haraguchi, H., et al., *MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation*. Mol Endocrinol, 2014. **28(7):** p. 1108-17.
24. Lim, H., et al., *Hoxa-10 regulates uterine stromal cell responsiveness to progesterone during implantation and decidualization in the mouse*. Mol Endocrinol, 1999. **13(6):** p. 1005-17.
25. Das, S.K., et al., *Amphiregulin is an implantation-specific and progesterone-regulated gene in the mouse uterus*. Mol Endocrinol, 1995. **9(6):** p. 691-705.
26. Matsumoto, H., et al., *Indian hedgehog as a progesterone-responsive factor mediating epithelial-mesenchymal interactions in the mouse uterus*. Dev Biol, 2002. **245(2):** p. 280-90.
27. Daikoku, T., et al., *Conditional deletion of Msx homeobox genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity*. Dev Cell, 2011. **21(6):** p. 1014-25.
28. Chen, J.R., et al., *Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis*. Endocrinology, 2000. **141(12):** p. 4365-72.