

論文の内容の要旨

論文題目 黄体ホルモン投与による胚着床阻害とその分子機構

氏名 松尾 光徳

【背景・目的】

着床とは受精卵が子宮内膜に触れ結合する現象である。黄体ホルモンは妊娠ホルモンとも呼ばれ、卵巣から分泌され着床の成立に重要な役割を持っている。黄体ホルモンは多種の製剤が臨床で用いられている。適応症として無月経・月経困難症・子宮内膜症・子宮体癌や切迫早産など多岐に渡るが、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。不妊治療では、黄体ホルモンの分泌不全、すなわち黄体機能不全に対して、着床率を高め流産率を減少させることを目的として使用される。また一方で妊娠成立を阻害する目的でも黄体ホルモンは用いられる。緊急避妊法は無防備な性交渉後に黄体ホルモン製剤を内服することで避妊効果が得られるとされる。これらの治療において、黄体ホルモンの作用機序については未だ不明な点が多い。不妊治療における黄体補充では、黄体ホルモンを投与することが実際にどのような機序で作用し着床を促進しているのか明らかになっておらず、着床を促進する至適投与量の範囲はわかっていない。緊急避妊法は着床阻害作用を介しているか否か、確かな根拠に乏しい。本研究では着床における黄体ホルモンの役割を明らかにすることを目的として、黄体ホルモンによる着床阻害作用に焦点をあてマウスモデルを用いて研究を行った。

【方法】

生体内での現象である着床に関する研究としてマウスモデルを用いた。雌雄マウスを交配させ、膣栓を確認した日を妊娠 1 日目 (day1) とすると、day4 の深夜から day5 の朝にかけて胚は子宮内膜上皮に接着する (着床を開始する) こと、胚が接着した部位の子宮内膜間質においては血管透過性が亢進することが知られている。本研究では、野生型マウスを用いて雌雄を交配させ、雌マウスに対し黄体ホルモン製剤を day1 から day4 まで連日投与した。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) を使用した。着床の可否に関する評価は、day5 の午前 9 時にシカゴブルー色素の尾静脈注射を行い、胚接着刺激による子宮内膜間質の血管透過性亢進を可視化して着床を確認した。LNG 投与が着床前の胚発育や卵管から子宮への胚の移送に影響を及ぼすか否かを確認するため、着床直前の day4 午前に生理食塩水を用いて子宮を灌流し、子宮内の胚を回収し数・形状を調べた。着床に関する機能解析のために、免疫染色 (IHC)、in situ hybridization

(ISH)、定量的 PCR (qPCR) を行った。マウスの着床では、day2 から卵巣からの P₄ 産生が始まり、その持続的な影響下に、day4 において子宮内膜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起き、子宮が受容能を獲得する。この子宮内膜の上皮と間質との増殖能の変化は、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指標であり、proliferation-differentiation switching (PDS) と呼ばれ、細胞増殖の指標である Ki67 免疫染色で評価され、着床前子宮の胚受容能の指標である。着床前の子宮における E₂ 応答遺伝子および P₄ 応答遺伝子として、Ltf・Muc1・C3 および Areg・Ihh・Hdc・Hoxa10 を調べた。また、胚接着に必須因子である leukemia inhibitory factor (LIF) の発現を調べた。LIF 受容体のシグナル伝達経路である STAT3 の活性化を、リン酸化 STAT3 の IHC で調べた。黄体ホルモンによる着床阻害の表現型を救済するために、leukemia inhibitory factor (LIF) および卵胞ホルモン (17β-estradiol, E₂) の投与を行った。

【結果】

LNGをday1~4に投与し着床を評価した。コントロール (vehicle) 群および30μg/kg/dayの低用量投与では着床部位が確認されたのに対して、300μg/kg/dayの高用量投与では着床部位を認めなかった。着床前のLNG投与は着床を阻害することが示された。以後のLNG投与の実験では300μg/kg/dayを投与した。着床直前のday4午前の子宮において、LNG投与群での胚盤胞形成率や胚の数はコントロール群と差が認められず、LNG投与は胚の卵管から子宮への移送着床前の胚発育には影響を及ぼさないと考えられた。着床前のPDSはLNG投与群でも正常に認められ、着床前子宮が妊娠に適した状態であることが示唆された。着床前子宮のホルモン応答性を調べるため、day4午前子宮のE₂応答遺伝子およびP₄応答遺伝子の発現をqPCRにより評価した。LNG投与により子宮上皮のP₄応答遺伝子であるAreg・Ihhの発現増加が認められ、E₂応答遺伝子には変化が認められなかった。LNG投与は子宮上皮における黄体ホルモン応答を増強していることが確認できた。day4午後の子宮を用いて胚接着の必須因子であるLIFの発現をqPCRおよびISHで検討した。LNG投与群でのLIF mRNA発現はコントロール群と比較し子宮腺上皮で低下していることが判明した。LNG投与により、子宮腺上皮からのLIF発現が減弱し着床阻害が起きている可能性が示唆された。LIF低下がLNG投与による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投与群に対して、LIFをday4午前・午後に12μgずつ投与し、day5午前に着床を評価した。5匹中4匹 (80%) に着床部位を確認でき、LNG投与による着床阻害をLIF投与で救済できることがわかった。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ことが示唆された。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、E₂をday4午前に20ng投与し、day4午後の子宮でLIFの発現を確認し、day5午前に着床を評価した。E₂投与によりLIFが腺上皮に誘導され、6匹中5匹 (83.3%) で着床部位が確認できた。LNG投与による着床阻害はE₂投与で救済でき、それはLIFの誘導による効果であることが推測された。

次に、LNG以外の黄体ホルモン製剤でも着床阻害効果がみられるかどうかを検討した。天然型プロゲステロン (progesterone, P₄; 0, 5, 10, 20mg/day) をday1~day4に投与し、day5に着床を評価したところ、着床部位が確認されたマウスはコントロール群、5mg/dayの投与群でそれぞれ100% (8/8)、100% (3/3) であったのに対し、10mg/day、20mg/dayの投与群ではそれぞれ

0% (0/6)、0% (0/4) と低下した。黄体ホルモン製剤によらず、高用量の黄体ホルモン投与により着床阻害が起こる可能性が示された。以後のP₄投与の実験では10mg/dayを投与した。day4 午後のLIF発現をqPCRで評価したところ、P₄投与により発現低下が認められた。さらにP₄投与群では子宮のリン酸化STAT3発現が低下しており、LIF発現低下を反映している結果と考えられた。LIF低下がP₄投与による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投与群に対して、LIFをday4の午前・午後に12μgずつ投与し、day5午前に着床を評価した。3匹中4匹 (75%) に着床部位を確認でき、P₄投与による着床阻害をLIF投与で救済できることがわかった。LIFの分泌低下がP₄投与による着床阻害の直接的な原因であることが示唆された。

【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、またその阻害機序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。黄体ホルモン製剤による避妊のメカニズムとしての「LIF分泌抑制による着床阻害作用」が明らかになった。LIF分泌はエストロゲンにより調節を受けることが知られていたが、黄体ホルモンによってもLIF分泌が影響を受けることが示された。本研究により、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至適投与量などを明らかにする今後の研究の必要性が考えられ、LIFの発現がその標準化の指標として使用できる可能性が推測された。