

妊娠の制御と成立機構のリモデリング

Remodeling on molecular mechanisms of pregnancy establishment and Regulation

今川 和彦 (Imakawa Kazuhiko)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授



研究の概要

トロホブラスト細胞から時期（着床期）特異的な発現をする IFNT 遺伝子の発現制御機構と、この遺伝子の発現によって誘導される母体側や胚仔側の遺伝子群を明らかにすることによって、受胎の認識、胚の接着、浸潤から初期胎盤の形成までの理解を深め、着床・妊娠の制御機構の新たなモデルを提唱する。

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：動物、遺伝子、発現制御、妊娠、リモデリング、インターフェロン、トロホブラスト細胞、着床

1. 研究開始当初の背景

これまで、生命は「受精」によって始まると言われていた。しかし、実際には多くの受精卵は初期胎盤の形成以前に死に至り、妊娠は成立しない。この生命が始まる一連の過程で、個々の現象で発現している遺伝子群はかなり同定・解析されてきた。しかしながら、着床過程を再現する実験系がないばかりではなく、胎盤形成に至るメカニズムは未だに解明されていない。

2. 研究の目的

具体的な目標として、以下の5項目を掲げた。

- ①トロホブラスト細胞株 IFNT 遺伝子発現制御モデル
- ②人為的制御可能な IFNT 遺伝子を持つトロホブラスト細胞株と子宮細胞での接着や浸潤過程の解析
- ③遺伝子改変トロホブラスト細胞株による接着から胎盤形成過程の解析
- ④IFNT 遺伝子改変 ES 細胞を用いてトランスジェニックや遺伝子ノックアウト・シバヤギの作出
- ⑤早期妊娠診断法の開発や上記知見のクローン動物への応用のための基礎実験

3. 研究の方法

本研究の目標は、トロホブラスト細胞から時期（着床期）特異的な発現をする IFNT 遺伝子の発現制御機構と、この遺伝子の発現によって誘導される母体側と胚側の遺伝子群を明

らかにすることによって、受胎の認識、胚の接着、浸潤から初期胎盤の形成までの理解を深めることにある。そのために、IFNT 遺伝子の発現を人為的に制御して得られるデータ、in vivo のサブトラクション法などから得られる情報と、固定・包埋させた全子宮の in situ ハイブリダイゼーションや免疫染色から得られるデータを比較しながら、in vivo により近い in vitro 系解析法の確立を図る。

購入機器のルミノメーターは遺伝子発現度合いの検証に用いられている。分光光度計は、子宮組織や胚仔から抽出した RNA の解析に使用され、また、デスカッション顕微鏡は、免疫染色や in situ hybridization のデータ解析に用いられている。なお、上記の機器の使用頻度は週平均 4-5 日間である。

4. これまでの成果

子宮内における胚仔 IFNT 遺伝子発現時には、IFNT 遺伝子を含むクロマチン構造が緩んだ状態 (euchromatin state) でなければならぬ。実際、ヒストン 3 (H3) のアセチル化度が高く、また H3 メチル化度が低いことは論文発表した (Sakurai et al., 2009)。妊娠子宮から回収した胚仔のクロマチン構造の解析では、胚仔が子宮内膜に接着を開始すると IFNT 遺伝子の H3 メチル化度が一気に上昇した。このことは、接着という現象が IFNT 遺伝子の発現を制御していることを示唆している (論文作成中)。また、この接着シグナルが何であるのかも検討している (図 参照)。

細胞塊 (スフェロイド) の子宮内移植は、ヤ

ギやヒツジでの TS 細胞作出の失敗を踏まえ、マウス TS、ES や iPS 細胞を用いて行っている。ES 細胞に細胞塊を形成させ、周りからトロホプラスト機能発揮のための CDX2 遺伝子の導入を今までの導入法やレンチウイルス・ベクターを用いて行った。様々な遺伝子発現の解析から、ES 細胞でも胚盤胞様の構造を作らせることができ、また、それらは通常の初期胚・胚盤胞の遺伝子発現を呈することを確認した。さらに、マウス ES 細胞塊の子宮内移植では、着床、子宮の脱落膜反応の誘起や初期胎盤の形成までは確認した。今後、この「細胞塊-胚移植」系で妊娠中期胎盤や内部細胞塊 (ICM) の形成まで持っていきたい。

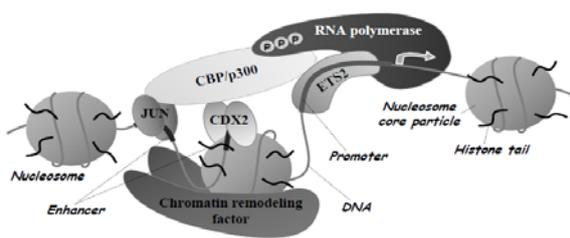


Figure 2
[IFNT 遺伝子発現制御機構の新モデル]

マウスの実験で得られた知見は、即ウシの培養細胞実験系に活かされる。ウシの子宮内膜や CT-1 細胞にこだわらない実験・評価系を確立するために、現在、子宮内膜細胞の不死化やウシ iPS 細胞の作出を行っている。なお、細胞の不死化は国立がんセンターの清野透部長、iPS 細胞作出は東大・医科研・中内啓光教授のサポートで行われている。

5. 今後の計画

ウシ・トロホプラスト細胞株と子宮内膜細胞の共培養実験系に、ヒツジ妊娠 15 日や 17 日の子宮灌流液を添加すると、トロホプラスト内遺伝子発現が、in vivo で見られるものと同じようになった。今後は、この解析系をもっと in vivo に近づけるとともに、子宮灌流液のプロテオーム解析を行い、どのタンパク因子群がトロホプラスト細胞の遺伝子発現を制御しているのかを明らかにする。この解析から、着床過程の遺伝子発現を絞り込み、その因子の制御機構を見つけ出していく。

細胞塊移植実験は、塊そのものを胚盤胞に近づけていくことで、胚盤胞の形成や胚盤胞の外側と内側の遺伝子群発現とその制御から、着床過程のメカニズムを明らかにしていきたい。この解析法は、今のところ、日本にも世界にも存在しない。そこで今後は、これをさらに発展させ、胚仔の接着や浸潤 (着床) だけではなく、胎盤形成そのものをコントロールするようにし、それらの過程での遺伝子

発現とそれらの制御法を開発していく。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)
(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

- ① Imakawa K, Kim M-S, Matsuda-Minahata F, Ishida S, Iizuka M, Suzuki M, Chang K-T, Echternkamp SE, Christenson RK. Regulation of the ovine interferon-tau gene by a blastocyst-specific transcription factor, Cdx2. *Mol. Reprod. Develop.*, 73: 559-567 (2006).
- ② Imakawa K, Imai M, Sakai A, Suzuki M, Nagaoka K, Sakai S, Lee A-R, Chang K-T, Echternkamp SE, Christenson RK. Regulation of conceptus adhesion by endometrial CXC chemokines during the implantation period in sheep. *Mol. Reprod. Develop.*, 73: 850-858 (2006).
- ③ Rider V, Isuzugawa K, Twarog M, Jones S, Cameron B, Imakawa K, Fang J. Progesterone initiates Wnt-beta-catenin signaling but estradiol is required for nuclear activation and synchronous proliferation of rat uterine stromal cells. *J. Endocrinol.*, 191: 537-548 (2006).
- ④ Nagaoka K, Tanaka T, Imakawa K, Sakai S. Involvement of RNA binding proteins AUF1 in mammary gland differentiation. *Exr. Cell Res.*, 313: 2937-2945 (2007).
- ⑤ Haneda S, Nagaoka K, Nambo Y, Kikuchi M, Nakano Y, Matsui M, Miyake Y, Macleod JN, Imakawa K. Interleukin-1 receptor antagonist expression in the equine endometrium during the peri-implantation period. *Domest. Anim. Endocrinol.*, Jan. 7 (2009).
- ⑥ Nagaoka K, Aoki F, Hayashi M, Muroi Y, Sakurai T, Itoh K, Ikawa M, Okabe M, Imakawa K, Sakai S. L-amino acid oxidase plays crucial role in host defense in the mammary glands. *FASEB J.*, Mar. 10 (2009).
- ⑦ Sakurai T, Sakamoto A, Muroi Y, Bai H, Nagaoka K, Tamura K, Takahashi T, Hashizume K, Sakatani M, Takahashi M, Godkin JD, Imakawa K. Induction of endogenous tau interferon gene transcription by CDX2 and high acetylation in bovine non-trophoblast cells. *Biol. Reprod.*, Feb. 11 (2009).

ホームページ等

<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/ikushu/>