

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 31 年度

受付番号 201960025

氏名 藍川 志津

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

### 記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：シンシナティ小児病院医療センター（米 国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。  
Planar Cell Polarity を介した受精卵着床制御機構の解析
3. 派遣期間：令和 元 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 22 日
4. 受入機関名及び部局名  
シンシナティ小児病院医療センター・生殖科学部門
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**  
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)  
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

本派遣において、上記研究課題遂行のため、Planar Cell Polarityの重要分子の一つである Scribble (Scrib)に着目し、主に遺伝子改変マウスを用いた解析を行った。その結果、(1)Pgr-Cre driverを用いた Scribの子宮における欠損は脱落膜形成に異常をきたし妊孕能の低下を引き起こすこと、及び(2)Pgr-Creによる乳腺での Scrib欠損は妊娠時の乳腺発達が不良となり新生児致死に繋がることを見出した。Scribの解析に加えて、当研究員は核内因子 High Mobility Group Box-1 (HMGB1)についての解析も行い、(3)HMGB1は着床期子宮における Progesterone signaling 活性化に寄与することで正常な着床・妊娠維持に重要であることも明らかにした。以下詳細を記載する。

### **Scaffold protein Scribble (Scrib) による受精卵着床環境形成機構**

げっ歯類において、子宮内で着床部位を決定した受精卵は上皮細胞に接着し、その周囲の間質細胞は脱落膜化 (decidualization)と呼ばれる劇的な細胞増殖・分化を起こす。脱落膜化は段階的に生じ、初めに上皮周辺の間質細胞がその形態を線維芽細胞様から上皮細胞様に変え、Primary decidual zone (PDZ)と呼ばれる複層を成す。その後 PDZの消失を伴いながら、更にその周囲の間質細胞が多核化細胞へと分化する (Secondary decidual zone)。脱落膜の発見 (Physiological Zoology 1937) から 80年以上の時が経ち、SDZは胎盤形成・妊娠維持への寄与が示されてきた一方、PDZは着床後わずか 2-3日しかその存在が確認されず、PDZの形成機構及び妊娠過程への寄与はほとんど明らかとなっていなかった。

当研究者は本研究において、Scaffold proteinである ScribがPDZ形成及びその後の妊娠維持に寄与することを明らかにし、この成果は Nat commに掲載された。

#### 1. ScribはPDZで高発現し、子宮特異的欠損により顕著な妊孕能の低下を引き起こす

Scribはこれまでに、細胞極性分子と結合し上皮細胞の極性維持に寄与することが知られていた(J Cell Biol 2019)。派遣先では以前、子宮上皮の細胞極性が適切な受精卵着床に重要であること、着床前の上皮において Scribが高発現していることを見出しており (PNAS 2016)、Scribは子宮上皮細胞極性を制御していると仮説を立てた。しかしながら、予想外にも子宮上皮特異的 Scrib KO (*Scrib<sup>fl/m</sup> Ltf<sup>Cre/+</sup>*; Scrib eKO)は野生型と同等の妊孕能を示した。一方、子宮全体で Scribを欠損させたマウス (*Scrib<sup>fl/m</sup> Pgr<sup>Cre/+</sup>*; Scrib uKO)は妊娠成功率及び産仔数の著しい低下を認め、Scribは上皮以外の細胞で重要な機能を持つと想定された。

そこで詳細な発現解析を行ったところ、ScribはPDZにおいて高発現していることがわかった。この発現と合致するように、Scrib uKOは受精卵着床までの過程に異常がない一方で、脱落膜化の減弱、その後妊娠中期において胎児死亡・胎盤吸収が生じていることがわかった。

#### 2. Scrib欠損によるPDZ形成不全は着床巣の形態異常を引き起こす

PDZはその上皮細胞様の形態から、異物から受精卵を保護する働きがあると考えられており、実際にPDZでは血管内皮の浸潤がほとんどない。この無血管状態は低酸素環境を作り出し、受精卵の発達に寄与していると認識されている。この点に着目し、Scrib欠損時のPDZは機能的にも異常であるかを調べたところ、Scrib欠損時には血管内皮が受精卵近傍まで侵入していた。また、これと相関するように、マクロファージ及びリンパ球の強い浸潤も認められた。

また、留学先機関で開発された手法により着床部位周辺の様子を三次元構築した。野生型では受精卵を包み込むように上皮層が深い谷底状の形態を取っているのに対し、Scrib uKOではこの形態変化が極めて弱く、受精卵の発育が停滞している様子が観察された。以上から、ScribはPDZ形成を介し適切な受精卵生育環境を構築していることが明らかとなった。

#### 3. Scribは Hippo signalingの活性化を介し間質細胞の上皮細胞様分化を促す

Scribは Scaffold proteinの一種であり、多彩な細胞内分子と結合しその機能を増強する。Scribの結合分子としてキナーゼ分子である Mst1/2及び Lats1/2が知られており、これらは Hippo signalingと呼ばれるリン酸化カスケードを形成する。Hippo signalingは最終的に転写因子である Yap/Tazをリン酸化し、その核内移行を妨げることで細胞増殖を抑制する。Hippo signalingの上皮細胞における不活化、つまり Yap/Tazによる転写活性化の亢進は、細胞増殖や遊走を起こすことが広く知られる。

興味深いことに、PDZを形成する上皮様細胞は増殖能が極めて弱く、b-cateninやZO-1を介した強い細胞間接着を有する。一方、Scrib uKO子宮の着床部位周辺間質細胞ではこれらの形態学的特徴が失われていた。この異常は Hippo signalingの破綻によるものと考え、各キナーゼ分子及び Yapの発現解析を行った。その結果、通常 Mst1/2や Lats1/2はPDZで高く発現しているのに対し、Scrib欠損時には顕著な発現低下を認めた。加えて、着床部位周辺における高い細胞増殖と相関する様に、Scrib uKOでは Yapの強い核内局在が観察された。以上から、Scribは Hippo signalingの活性化を介してPDZ形成に寄与していることが示された。

#### <総括>

1937年にその存在が既に報告されていた一方で、PDZは着床後のわずか 2-3日間しか存在せず、その解析の難しさからPDZの形成機構及び生理的意義は現在に至るまで謎に包まれていた。本研究成果は Scribを起因とした Hippo signalingの活性化がPDZ形成を誘導することを世界で初めて明らかにした。加えて、PDZの形成不全は受精卵の正常な生育を妨げ、ひいては妊娠中期における胎児死亡に繋がることが示された。よって、今後 Scrib-Hippo signalingを含め、PDZにおける分子シグナルを制御することは新規の着床・妊娠改善薬の同定に繋がると期待できる。

## **Scrib**による乳腺発達制御機構

乳腺が正常に発達し機能することは、産仔に母乳供給を介して栄養やイムノグロブリンを与える上で重要である。乳腺は管 (duct) 及びその先端に存在する小葉 (lobule) 構造から形成される。未成熟な乳腺では、duct の先端は terminal end buds (TEBs) と呼ばれるスプーン状の形態を示し、主に TEB 中に存在する細胞群が増殖・分化を行うことで乳腺は伸長と分岐を続けて発達していく。Lobule は妊娠時に更に微細な胞構造 (alveoli) を形成し、母乳を生産する。乳腺上皮は管腔側及び基底側の二層から成り、その周囲は脂肪細胞等に囲われているが、それぞれの細胞層では女性ホルモン受容体をはじめ、乳腺発達に重要な分子の発現が全く異なっており、様々な分子が異なる細胞群で複雑に機能することで乳腺発達が生じているものと理解されている (Wiley Interdiscip Rev Dev Biol 2015)。これまで乳腺の発達に寄与すると報告されてきた分子の中でも、Progesterone ( $P_4$ ) は特にその重要性が知られている。 $P_4$  受容体である PGR は管腔上皮にのみ、不均一に発現している。また、マウスにおいては、血中  $P_4$  レベルは交尾後 3 日目以降から分娩直前まで高く保たれている。加えて、PGR KO マウスでは alveoli の形成不全が生じる (Genes Dev 1995)。

前述の子宮における Scrib の解析を行う中で、*Scrib<sup>fl/fl</sup> Pgr<sup>Cre/+</sup>* メスマウスからの出生仔は高確率で生後 48 時間以内に致死となることが判明した。死亡したものも含め、*Scrib<sup>fl/fl</sup> Pgr<sup>Cre/+</sup>* を母とする新生仔では腹部で通常見られる milk spot がほとんど観察されず、母乳の供給に異常があることが想定された。上記の PGR の乳腺における重要性を踏まえ、Pgr-Cre により Scrib が PGR 陽性細胞で KO されることで、乳腺の発達に以上が生じていると想定し解析を行った。その結果、Scrib は乳腺細胞が乳汁産生細胞へと成熟分化する上で重要であることが明らかとなった。この成果は派遣終了後の 3/25 付で生殖系学術誌の Reproduction に Accept された。

### 1. PGR 陽性細胞における Scrib 欠損では alveoli 形成異常により乳汁産生能がする

*Scrib<sup>fl/fl</sup> Pgr<sup>Cre/+</sup>* メスマウス産仔における milk spot の減弱を受け、この母体では乳汁産生に異常が生じているのではないかと想定した。そこで乳汁産生のマーカーである b-casein の免疫染色を行ったところ、通常産後 2 日目で見られるはずの管腔上皮における染色が Scrib 欠損時にはほとんど見られなかった。同様に、Oil-red-O staining により脂肪滴を可視化し乳汁を観察した場合でも同様の結果が得られた。

乳腺発達のどの段階で異常が生じているのかを明らかにするため、乳腺上皮を Carmine Alum 染色で可視化し、duct の分岐や lobule・alveoli の形態を観察した。その結果、非妊娠時には野生型と比べて明らかな差異が見られなかった一方で、交尾後 4 日目の時点で TEBs とよく似た肥大した lobule が生じており、その後妊娠中期や分娩後においても alveoli が形成されていないことがわかった。

### 2. PGR 陽性細胞における Scrib 欠損は成熟細胞への分化異常を引き起こす

通常、妊娠し血中  $P_4$  などの女性ホルモンレベルが上昇すると、それに応答したホルモン受容体は下流シグナルを流すことで細胞の分化を誘導する。この成熟分化において、特に  $P_4$ -PGR 及び Prolactin (Prl) - Prl receptor (Prlr) の寄与が知られる。Prlr が活性化するとその下流で Jak2 や Pak1 といったキナーゼが Stat5 のリン酸化を引き起こす。核内移行した Stat5 は PGR と協調的に機能し、Rankl といった分泌型因子の発現を誘導し、分泌された Rankl 等は周囲の細胞に作用し増殖・分化を誘導する。こうした一連のシグナル伝達の結果として、乳汁産生能を持つよう成熟分化した細胞は Elf5 という転写因子を発現し、これと相反するように PGR 陽性細胞数は妊娠の進行とともに減少していくことが報告されている (Wiley Interdiscip Rev Dev Biol 2015; Development 2013)。

そこで、リン酸化 Jak2、Pak1、Stat5 について免疫染色を行ったところ、いずれの発現も *Scrib<sup>fl/fl</sup> Pgr<sup>Cre/+</sup>* 乳腺で減弱していた。なお、Prlr の発現は野生型及び Scrib KO 間で同等であった。Scrib は Pak1 などのキナーゼに対し Scaffold protein として結合しその機能を補助することが報告されており (J Cell Biol 2019)、本知見においても同様であると想定される。また、これらシグナルの下流で発現する Rankl についても発現が低下していた。加えて、PGR 及び Elf5 を成熟分化マーカーとし、妊娠中期の乳腺において免疫染色を行ったところ、*Scrib<sup>fl/fl</sup> Pgr<sup>Cre/+</sup>* 乳腺では PGR 陽性細胞が多く保たれている上に Elf5 陽性細胞が極めて少ないことがわかった。

### <総括>

今回、Pgr-Cre を用いることにより、予期せず Scrib の乳腺 PGR 陽性細胞における重要性を見出した。実のところ、ホルモン受容体を全く発現していないヒト由来乳腺基底細胞株におけるノックダウン (Cell 2008)、乳腺全体における欠損 (Plos Genet 2014)、全身性ノックダウン (J Cell Sci 2015) など、これまでも Scrib の乳腺における機能は報告されてきた。しかしながら、いずれの報告も Scrib 欠損による乳腺への影響が異なっており、Scrib は発現している細胞や時期、生理的・病的背景により異なる機能を持っていることが示唆される。実際に、今回 PGR 陽性細胞のみで欠損した場合、これまでの報告とは異なり妊娠期に限局した異常が観察されている。今後異なる Cre を用い特定の細胞種に着目して遺伝子改変を行うことで、Scrib をはじめとした様々な分子がどこで・いつ・どう働くかが明確になると期待される。こうした解析は今後乳がん治療などを行う上で、より特異性の高く副作用の少ない分子標的薬の開発等で重要であると考えられる。

## **High Mobility Group Box-1 (HMGB1) による受精卵着床制御機構**

着床は妊娠過程において受精卵と母体（子宮）とが接する最初のステップであり、着床の異常はその後の妊娠維持、胎児発育に多大な悪影響を与える。着床を含めた妊娠過程において、Progesterone (P<sub>4</sub>) は生物種を超えて不可欠な分子である。マウスにおいて、交尾後新しく形成された黄体から P<sub>4</sub> が放出され、その血中レベルは交尾後 3 日目から上昇し分娩直前まで高い濃度で保たれる。P<sub>4</sub> はその受容体である PGR を活性化し、これにตอบสนองして子宮間質細胞の増殖が交尾後 3・4 日目に生じることで子宮内膜は受精卵に対する受容能を獲得する。交尾後 5 日目に受精卵が着床すると、やはり P<sub>4</sub> の作用を受けて着床部位周辺の間質細胞では脱落膜化と呼ばれる増殖・分化が生じる。これらの一連の流れの一つでも不備が生じた場合その後の妊娠維持に異常を来すことから、P<sub>4</sub>-PGR シグナルは極めて厳密に制御される必要がある (Nat Med 2014)。

当研究員は着床期子宮の P<sub>4</sub>-PGR シグナルの制御因子として、クロマチンタンパク質 High-mobility group box-1 (HMGB1) を新たに同定した。この研究成果は Cell Death Differ に掲載された。

### 1. HMGB1 は着床期子宮で高発現し、その欠損は着床異常を引き起こす

派遣先で行われた着床期子宮における網羅的遺伝子発現解析により、HMGB1 が着床期子宮で極めて高い発現を示すことを見出した。実際に、免疫染色や in situ hybridization 法などを用いて検証したところ、この分子は核内に局在し、着床期子宮の、特に間質細胞で高く発現することがわかった。次に、HMGB1 の着床期子宮における機能を解析するため、Pgr-Cre を用い子宮特異的 KO マウスを複製し、妊娠能の解析を行った。その結果、妊娠成功率及び産仔数は野生型マウスのほぼ半数まで減少し、妊娠中期で既に顕著な胎盤吸収を認めた。更に妊娠時期を遡り解析を行ったところ、交尾後 5 日目において着床反応が極めて弱い様子が見られ、着床過程に何らかの異常が生じていると想定された。

### 2. HMGB1 は P<sub>4</sub> 依存的な間質細胞の増殖に寄与する

前述の通り、着床期子宮では間質細胞の増殖が生じ、これが受精卵の受容に重要である。また、この時期に HMGB1 は間質細胞で高く発現することから、間質増殖への影響を疑った。そこで Ki67 染色により交尾後 3・4 日目の細胞増殖を観察したところ、HMGB1 KO では間質細胞層における増殖が減弱していることが明らかとなった。派遣先では以前、間質細胞増殖の制御に関わる分子として転写因子 Hoxa10 を報告している (Development 1996)。子宮において Hoxa10 発現は P<sub>4</sub> 刺激により上昇し、Hoxa10 KO の子宮では P<sub>4</sub> 依存的な間質細胞増殖が減弱し受精卵着床不全となる。間質細胞増殖の減弱と相関するように、HMGB1 KO 子宮の間質において、Hoxa10 発現の減弱が生じていた。

In vitro の実験系を用いた過去の知見において、HMGB1 は DNA 上の核内ホルモン受容体応答配列と結合し、ホルモン受容体による転写を亢進させることが報告されている (Mol Cell Biol 1994)。着床期子宮における間質細胞増殖及び着床の異常は PGR による転写活性低下に起因しているのではないかと考え、この検証を次に行った。着床期子宮から間質細胞を回収し、Hoxa10 遺伝子座上に存在する PGR 結合部位を標的に ChIP-qPCR を行ったところ、HMGB1 KO 由来の細胞では PGR が標的配列に結合しづらくなっていることがわかった。また、同様に単離した間質細胞を初代培養し、PGR 応答配列の下流でルシフェラーゼが転写される plasmid を用いることで P<sub>4</sub> 刺激時の転写活性を評価した。その結果、HMGB1 KO 細胞では PGR による転写活性が低下しており、この細胞に HMGB1 を過剰発現させた場合活性の回復が観察された。以上から、HMGB1 は PGR による転写活性を増強することで着床に寄与していることが明らかとなった。

### 3. HMGB1 はマクロファージの着床期子宮への過剰な浸潤を抑制している

マウスにおいて、交尾後の子宮内膜には大量のマクロファージが浸潤し、これは余分な精液由来成分の除去を行っていると考えられている。一方で、交尾後 3 日目からの血中 P<sub>4</sub> 上昇とともに、子宮内膜中のマクロファージは子宮管腔側から筋層側へと遊走していく様子が見られ、過剰なマクロファージが受精卵を攻撃しないよう保護する何らかの機構が存在していると想定されている。

興味深いことに、これまでに PGR KO 及び Hoxa10 KO マウス子宮において、炎症性サイトカインの発現上昇を伴うマクロファージの過剰な蓄積が報告されている。こうしたマクロファージの集積が HMGB1 KO においても着床異常に影響しているのではないかと考え、解析を行った。その結果、HMGB1 KO 子宮でも PGR KO や Hoxa10 KO と同様に炎症性サイトカインの発現が顕著に上昇していた。また、F4/80 染色によるマクロファージの局在を観察したところ、通常間質細胞、特に受精卵着床部位周囲ではマクロファージがほとんど観察されないのに対し、HMGB1 KO では劇的な集積を認め、一部のマクロファージは管腔内まで到達し受精卵を取り囲んでいることが明らかとなった。

### <総括>

これまで血中 P<sub>4</sub> レベルの制御、すなわち黄体形成に関わる因子や、P<sub>4</sub>-PGR 受容体間の結合に関わる分子が報告されてきたが、今回これらに加えて、PGR が DNA 上の応答配列に結合する上で重要な因子が in vivo レベルで初めて明らかとなった。HMGB1 は極めて単純な真核生物からヒトまで高く保存されており、今回の機構がヒトを含めた他の哺乳類でも働いていることが強く期待される。また、本成果はマクロファージの子宮内膜の浸潤という、分子機構も生理的意義も未だ謎の多い現象の一端を明らかにした。IVF において受精卵がうまく母体に受容されることが極めて重要であり、HMGB1 を含め、マクロファージの浸潤がどのように制御され着床にどう影響するのかを明らかにすることは、今後着床改善法の開発につながることを期待される。