

環境要因などによる着床障害の原因追求とその治療の基礎

Basic research and analysis of the cause of implantation disorders due to environmental factors.

金井正美

要約 女性の社会進出が望まれる一方、社会的ストレスや環境要因（環境ホルモンや添加物など食生活）から、健康体であるにも関わらず適齢期に望む妊娠がなされない女性が増えている。既婚カップルの10-25%が不妊に悩み、その60%は母体が要因であると考えられている。体外受精しても移植後に着床する胚は約20%、移植された胚のうち80%は妊娠に至らない。その原因の多くは不明であるが、着床受容期が非常に短いことが第一の問題と考えられる。本研究では、体外受精正常胚を、母体によって着床不全となる遺伝子ヘテロ不全のマウスへ移植し、様々な要因と考えられる因子を同時添加することで、着床率への影響をスクリーニングする系を確立した。本システムを用いることで、胚移植時の薬剤効果を*in vivo*で観察することが可能となり、着床障害に対して受精胚や母体をより自然に近い環境で治療する手がかりとなる。

Summary It is longed the participation of woman in contemporary society. On the other hand, though they have healthy bodies, from social stress and environmental factors (the eating habits including environmental endocrine disrupter and the additive), the women that the pregnancy to expect at marriageable age is not accomplished increase. 10-25% of the married couple are troubled with sterility, and, it is thought that 60 % in it depends on a mother's factor. As for approximately 20% of fertilized eggs which are implanted after transplant *in vitro* fertilization, however, remaining 80% are failed for the pregnancy. Most of reasons are unknown, however it is presumed that a time window of the receptivity is very narrow with the first problem. In this study, we have transplanted an *in vitro* fertilization eggs from wild mouse to heterozygous one which became the implantation imperfection, and established a system to screen the influence on implantation rate by adding various factors at the same time. By use of this, we can observe a drug effect in the embryo transfer *in vivo*.

Key words; Implantation, IVF, mouse, haploinsufficiency

Masami Kanai-Azuma

東京医科歯科大学 実験動物センター

Center for Experimental Animals, Tokyo Medical and Dental University

1. はじめに

Sox (Sry related HMG box) 17 遺伝子は Sox7 と Sox18 と共に SoxF サブグループに属し、内胚葉初期発生や血液血管系の発生に重要な役割を担い、ヒト生殖細胞の決定に必須であることが知られている。我々は、Sox17 ヘテロ不全個体が、肝不全、胆道閉鎖症のモデルとなることを以前報告したが¹⁾、Sox17 遺伝子は子宮内膜上皮や、子宮腺、卵管上皮にも発現しており²⁾、またヒトの体外受精 (IVF) の成功率と同調することも報告されている³⁾。

胚の着床は複雑なイベントであり、母親の子宮内膜が受精胚を受け入れるために厳密に制御され、様々な要因が関与していることが知られている⁴⁾。Sox 17 ヘテロ個体において、顕著な着床不全を呈するが⁵⁾、このような着床不全個体に、正常な IVF 卵を移植し、胚移植時に加える因子や薬剤効果を *in vivo* でスクリーニングすることが出来れば、生殖医療への基礎研究として有用であると考えた。今回の実験系の確立によって、Sox17 ヘテロ個体などの着床不全マウスに IVF 胚を移植し、同時に添加する薬剤や因子の効果を適切に判断出来れば環境要因など同定することが可能となる。

2. 方法

本実験に用いたマウスは東京医科歯科大学実験動物センターにて飼育管理され、実験動物委員会承認のもと実験計画を施行した。使用したマウス系統はミシガン大学の Sean J. Morrison から分与された Sox17 GFP ノックインマウス (Sox17^{tm1Sjm})⁵⁾ と、Sox17 ノックアウトマウス (Sox17^{tm1Ysk})⁶⁾ で、いずれも ICR と C57BL/6J のミックスバックグラ

ドである。雌マウスに、7.5 IU の妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG)、その 46 ~ 48 時間後に 7.5 IU のヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) 投与し過排卵誘発を行った。その後、雄マウスと交配し、翌朝膣栓が付着している雌マウスの卵管膨大部から受精卵を採卵し、KSOM ドロップ中で 37°C、5% CO₂ 条件で培養を実施した。着床数は、過排卵処理した雌マウスと精管結紮オスと交配し、偽妊娠状態の雌マウスの左右の卵管に野生型の 2 細胞期凍結胚を各々 10 個ずつ移植し、妊娠 5 ~ 7 日目に 1% シカゴスカイブルーを尾静脈から注入し着床部位を観察した。

統計解析は全て Prism 6 (グラフパッド社) を使用し、2 群間の有意差検定には Student の t 検定を用いた。多群間の統計解析は一元配置分散分析 (one-way ANOVA) による検定後、各群間についてダネットの多重比較 (Dunnett's multiple comparisons test) を使用した。全ての統計解析において $p < 0.05$ で帰無仮説を棄却した。また、着床数解析では、排卵、受精、胚発生の異常が見られた個体は統計解析から除外した。

3. 結果

ヘテロ個体の妊性の確認；野生型オス (+/+) マウスと、野生型メス (+/+), 我々が保有している Sox17 ヘテロマウス (GFP/+, +/- 2 系統) を用いて交配実験を実施したところ、メスがヘテロのいずれの場合も著しい妊性低下が観察された。即ち、野生型メス (+/+) は妊娠率 80% で、平均の着床数 10.8 個であり、GFP/+ メスマウスの場合は 10 個体うち 1 個体妊娠 (10%)、平均の着床数 0.3 個、5 世代バッククロスした Sox17 ヘテロマウス (+/-, N5) は 0% を示した (表 1)。

表 1

Table 1. Sox17 heterozygous females exhibit implantation failure (after super ovulation and mating with wild-type males).

Genotype of female	No of mice	No. of mice with IS (% of total)	Mean no. of IS ($\pm$ SEM)	p value
WT	10	8 (80)	10.8 $\pm$ 2.7	
GFP/+	10	1 (10)	0.3 $\pm$ 0.3	0.0012
+/-	3	0 (0)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0189

先行研究において、自然交配野生型 (+/+) マウス同士の場合の着床数は平均 8.3 個、Sox17 ヘテロマウス (GFP/+) 1.5 個であることをすでに報告しているが²⁾、以上の結果は、過排卵処理後の交配は自然交配と比較して、上記 2 群間の差がより顕著であることを示す。

排卵、受精、胚発生、着床の 4 段階の検証；ヒトを含む哺乳類の着床のステップは排卵、受精、胚発生、着床の 4 段階で検証可能である。過排卵処理を行い採取した未受精卵数の比較を野生型メス (+/+) と Sox17 ヘテロ変異メス (GFP/+) との間で排卵数を観察したところ、野生型では、平均 16.5 個 (n=2)、ヘテロ個体からは平均 21 個 (n=4) の排卵数が確認され、有意差は認められなかった (図 1 A)。卵管から採取された 2 細胞期胚数の比較は、野生型メス (+/+) は 29.5 個と Sox17 ヘテロ変異メス (GFP/+) は 26 個であり、同様に 2 群間での有意差は観察されなかった (n=11) (図 1 B)。以上より、野生胚とヘテロ個体から得た胚について、受精卵そのものの発生には問題はないことが示された。次に、野生型 20 個の 2 細胞期凍結胚を野生型メス (+/+) と Sox17 ヘテロ変異メス (GFP/+) 卵管へ移植後、妊娠 5~7 日目の着床数を比較したところ、野生型メス平均 10.8 個と比べ、Sox17 ヘテロ変異メス (+/GFP, +/-) で有意に着床数が低下し、母体要因による着床数の低下が示唆された (*, p = 0.0189; **, p = 0.0012) (表 1)。

4. 考察

哺乳類間の着床・胎盤形成様式は動物種によって大きく異なる。ヒトの妊娠期は 266 日で着床時期は 6~8 日であり、一方、マウスの妊娠期間は 20 日、交尾後 4 日から 5 日の間が受容期である。着床前、着床期間が比較的近く、また、ヒトの受精胚・着床についての研究は倫理問題も含め非常に困難であるため、マウスの系はヒトの有効なモデルと考えられている。我々は以前、Sox17 遺伝子が子宮内膜上皮、子宮腺、卵管上皮に発現していること、Sox 17 ヘテロ個体の母体要因による着床不全を呈することを報告した²⁾。Sox 遺伝子は転写因子であるために、母体治療への臨床応用は困難であるため、その下位の分泌型もしくは細胞外基質など、IVF 後の受精胚移植時に同時投与が可能な因子の同定が必須である。着床不全を *in vivo* スクリーニングする系が確立できれば、今後、母体原因である着床不全の改善に繋がるものと考えられる。本研究では、自然交配と比較して、体外受精胚の移植を用いることでより明確な着床率の差が観察され、生殖補助医療 (ART) を対象としたモデルとして有効であることが示唆するものである。今後、母体原因の着床不全個体へ野生胚移植し、着床率をあげる薬剤などを同時投与することで、着床率改善のスクリーニングに本系を用いることで、治療に向けた技術の向上を目指す。

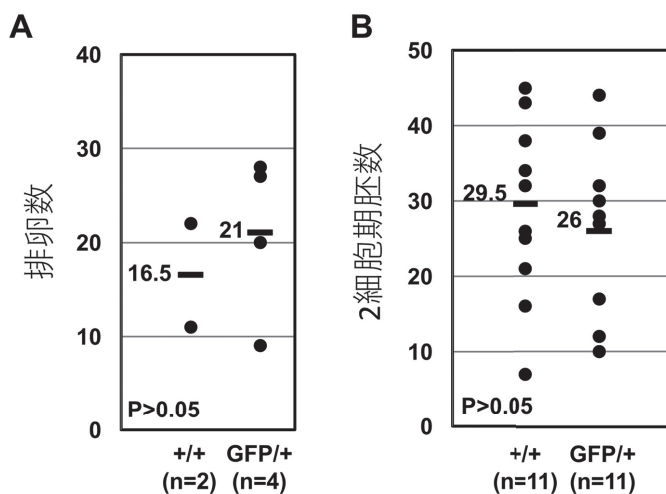


図 1. Sox17ヘテロ変異メスにおける着床不全。PMSG と hCG 投与による過排卵処理を行い採取された未受精卵数。野生型メス (+/+) と Sox17 ヘテロ変異メス (GFP/+) との間で排卵数に有意差は認められなかった。(B) 過排卵処理後、卵管から採取された 2 細胞期胚数。野生型メス (+/+) と Sox17 ヘテロ変異メス (GFP/+) との間で 2 細胞期胚数に有意差は認められない。

[文献]

- 1) Higashiyama H, Ozawa A, Sumitomo H, Uemura M, Fujino K, Igarashi H, Imaimatsu K, Tsunekawa N, Hirate Y, Kurohmaru M, Saijoh Y, Kanai-Azuma M, Kanai Y. Embryonic Cholecystitis and Defective Gallbladder Contraction in the Sox17-haploinsufficient Model of Biliary Atresia. *Development* 144: 1906-1917, 2017.
- 2) Hirate Y, Suzuki H, Kawasumi M, Takase HM, Igarashi H, Naquet P, Kanai Y, Kanai-Azuma M. Mouse Sox17 haploinsufficiency leads to female subfertility due to impaired implantation. *Sci. Rep.* 6: 24171, 2016.
- 3) Uhlen M et al., Toward a knowledge-based Human Protein Atlas 2010. *Nat. Biotechnol.* 28: 1248-1250, 2010.
- 4) Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation strategies for successful pregnancy. *Nat. Med.* 18: 1754-1767, 2012.
- 5) Kim I, Saunders TL, Morrison SJ. Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells. *Cell* 130: 470-483, 2007.
- 6) Kanai-Azuma M, Kanai Y, Gad JM, Tajima Y, Taya C, Kurohmaru M, Sanai Y, Yonekawa H, Yazaki K, Tam PP, Hayashi Y. Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development* 129: 2367-2379, 2002.