

# 機械刺激による着床受容能制御機構の解明

## Regulatory mechanism of implantation receptivity by mechanical stimulation

熊本大学大学院生命科学研究部 薬学生化学分野 助教 稲住 知明

### 要 約

近年の晩婚化や不妊治療技術の進歩を背景として、体外受精の実施件数および体外受精による出生は年々増加しているが、その一方で、出生までに至る成功率は20%前後と未だに低く、これは移植した胚の着床率の低さに起因する。それゆえ着床を制御する分子機構を明らかにすることは不妊治療の観点からも急務である。プロスタグランジン (PG) はアラキドン酸をもとに産生される脂質メディエーターの一群であり、9種のGタンパク質共役型受容体に作用して多彩な生理、病態作用を示す。PGはその合成酵素の欠損マウスが着床に異常を来すことから、正常な着床に必須と考えられてきたが、各受容体の単独欠損マウスはいずれも正常に着床するため、その着床制御機構は不明であった。そこで我々は、複数の受容体が着床に寄与すると考え、各受容体欠損マウスの交配を進めた結果、特定の組み合わせで欠損させた (PGR KO) マウスで着床異常が生じることを見出した。これらの受容体は子宮収縮作用を担っていたことから、PGR KOマウスにムスカリン受容体作動薬を投与して子宮収縮を惹起させたところ、着床の改善が確認された。子宮収縮が着床を制御するメカニズムとして、我々は機械シグナルの伝達を担う転写共役因子YAPに着目した。子宮におけるYAPの細胞内局在や下流マーカー遺伝子発現を調べた結果、野生型マウスにおいては着床の直前期においてYAP経路の一過的な活性化が認められ、これはPGR KOマウスでは消失していた。以上より、PGによる子宮の筋収縮がYAP経路の活性化を誘導し、正常な着床に寄与する可能性が示唆された。

### 緒 言

近年の晩婚化に伴い、体外受精の実施件数や体外受精による出生は年々増加しており、2019年には全出生数の約14人に1人を占めている。しかしながら、実際に出生に至る成功率は依然として20%前後と低い水準である。この原因として、体外受精の成功率は高い一方で、胚移植時の着床率が低いことが挙げられる。それゆえ着床を制御する分子機構を明らかにすることは、不妊治療の観点からも急務である。

プロスタグランジン (PG) は生体膜リン脂質からホスホリパーゼA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) によって切り出されたアラキドン酸をもとに、シクロオキシゲナーゼ (COX) を律速酵素として産生される生理活性脂質の一群であり、9種のGタンパク質共役型受容体を介して、多彩な生理、病態作用を発揮する<sup>1</sup>。PGは排卵、受精、分娩など多くの女性生殖プロセスに必須であり<sup>2</sup>、着床においても重要な役割が示唆されている。例えば、代表的なPLA<sub>2</sub>であるcPLA<sub>2</sub>  $\alpha$  の欠損マウスにおい

ては、通常10箇所程度見られる着床部位が半数程度に減少し、これはPGの投与により回復することが報告されている<sup>3</sup>。しかしながら、PGがいかんして着床を制御するのか、その分子機構については全く不明である。我々はこれまでに、各種PG受容体欠損マウスを用いて、着床に重要なPG受容体の同定を試みたが、いずれの欠損マウスにおいても着床は正常に行われ、cPLA<sub>2</sub>  $\alpha$  欠損マウスの表現型は再現されなかった。そこで我々は、複数の受容体が機能的に補償しながら着床に寄与すると考え、本研究では複数のPG受容体を同時に欠損させたマウスを用いて、PGによる着床制御機構を明らかにすることを目的とした。

### 方 法

#### 1. マウスの交配および着床評価

マウスは23℃で12時間おきの明暗周期の下で飼育した。妊娠マウスは雄と終夜同居させて作成し、翌朝の膣栓が認められた日を妊娠0.5日とした。着床期

の妊娠4.5日に1% Evans Blue Dye を200 $\mu$ l尾静脈投与し、着床部位を可視化した。胚移植実験においては、雌マウスを精管結紮雄マウスと交配して偽妊娠を誘起し、妊娠0.5日の卵管に野生型の2細胞期胚を片側子宮あたり6個移植し、妊娠4.5日に着床を評価した。全ての動物実験は熊本大学動物実験委員会における倫理審査を受けて承認された。

## 2. マグヌス法による子宮筋収縮解析

摘出したマウス子宮を1 cmの長さにカットし、タイロッド液10mlを入れたマグヌス管内にセットした。セットした子宮管の一端をトランスデューサー (ADInstruments) に接続し、子宮の収縮活性をモニターした。実験はタイロッド液に混合ガス (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) を常に通気した状態で行った。

## 3. ウェスタンブロット

子宮組織をRIPA buffer中でビーズホモジナイザーを用いて破碎し、遠心後の上清タンパク質濃度をPierce BCA protein assay (Thermo) で測定した。サンプルに2× sample bufferを加え、100°Cで3分インキュベートしてタンパク質を変性させた。その後SDS-PAGE (30mA、2時間)によりタンパク質を分離し、ゲル中のタンパク質をPVDF膜 (Millipore) に転写した (75mA、1.5時間)。Blocking One-P (Nacalai tesque)によりメンブレンをブロッキング処理し、一次抗体処理 (抗YAP抗体CST、14074; 抗p-YAP抗体CST、13008、共に1:1000)を4°Cで一晩行なった。その後、二次抗体HRP標識anti-rabbit IgG (DAKO、P0399、1:3000)を室温で1時間処理し、発光基質SuperSignal West Pico (Thermo)を添加して、LAS 4000mini (GEヘルスケア)で解析を行った。バンドの定量はImageQuant software (GEヘルスケア)を用いて行った。

## 4. 定量PCR

子宮組織をSepasol-RNA I Super G (Nacalai tesque)中でビーズホモジナイザーを用いて破碎し、total RNAを精製した。その後、Prime Script RT Master Mix Perfect Real Time (Takara)を用いてcDNAを作成し、各遺伝子特異的プライマーとFast SYBR Green Master Mix (Thermo)を用いて定量PCRを行った。同一サンプルの $\beta$ -actinの発現量を定量し、内部コントロールとして用いた。

## 5. 免疫染色

子宮組織をO.C.Tコンパウンド (Sakura Finetek)で包埋し、クライスタットにより厚さ10 $\mu$ mの凍結切片を作成した。4%パラホルムアルデヒドにより、室温で20分間固定し、10%goat serum/0.2%Triton-X100/PBSにより、透過処理、ブロッキングを室温で1時間行なった。抗YAP抗体 (CST、14074、1:100)と4°Cで12時間反応させた後、二次抗体Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Thermo、A-11034、1:250)を用いて、室温で1時間反応させた。核はDAPI (Sigma)により染色した。観察は蛍光顕微鏡BZ-X700 (Keyence)にて行った。

## 結果

PG受容体単独欠損マウスが着床障害を示さないことから、これらマウスの交配を進めて複数受容体を同時に欠損したマウスを作成し、着床能を評価した。その結果、特定の組み合わせで欠損させた (PGR KO) マウスにおいて、着床数が野生型の半数程度に減少した。PGR KOマウスは排卵や、受精といった着床以前のプロセスについては正常であったため、本マウスは着床過程に異常が生じているものと考えられた。そこで、母体、受精卵のいずれのPG受容体が着床に重要であるかを調べるため、偽妊娠の野生型あるいはPGR KOマウスに野生型の受精卵を同数移植した。その結果、胚移植したPGR KOマウスにおいては自然妊娠時と同様に着床数が減少しており、母体のPG受容体が正常な着床に寄与することがわかった。興味深いことに、子宮においてこれら受容体はいずれも胚の接着が起きる内膜層ではなく外側に位置する平滑筋層に発現しており、平滑筋の収縮に関与するものと考えられた。実際、マグヌス法によりPGR KOマウスの子宮筋収縮能を評価したところ、アセチルコリンに対する収縮応答は野生型と同等であったが、PGリガンドに対する応答は完全に消失した。そこで、着床直前期のPGR KOマウスに子宮収縮剤としてムスカリン受容体作動薬を投与したところ、着床数の有意な増加が認められた。以上より、PG受容体を介した子宮収縮が着床受容能の亢進に寄与していることが明らかになった。

次に我々は、PG受容体による子宮収縮が着床を制御するメカニズムとして、Yes-associated protein (YAP) 経路に注目した。YAPは細胞外の機械刺激を感受して細胞内で生化学的シグナルに変換するメ

カノトランスダクションを担う主要な転写共役因子であり、脱リン酸化されることで活性型となり核内に移行して転写を調節する<sup>4,5</sup>。YAP経路は主に細胞の増殖活性や器官サイズの制御に働くが、最近では、YAP阻害剤の投与で着床障害が起こることが報告され、本経路が着床の成立に必須であることが示唆された<sup>6</sup>。そこで、着床期前後の野生型子宮をサンプリングし、YAP経路の活性化状態を調べたところ、着床直前期において、YAPの脱リン酸化および、YAP標的遺伝子の発現が一過的に誘導された。さらに、同時期の子宮切片を用いてYAPの免疫染色を行ったところ、管腔上皮細胞においてYAPの核局在が認められた。一方、PGR KOマウス子宮においては、こうしたYAPの活性化応答は認められなかった。以上より、PG受容体を介した子宮筋収縮が管腔上皮でYAP経路を活性化させ、正常な着床に寄与する可能性が考えられた。

## 考 察

本研究において、PG受容体による子宮筋収縮が着床直前期でのYAP経路活性化を誘導し、着床受容能の亢進に寄与することを見出した。着床期の子宮では、胚の接着や浸潤を助けるために、管腔上皮細胞の極性喪失やアポトーシスといったリモデリングが生じることが齧歯類やヒトで共通して知られている<sup>7</sup>。本研究で見出した管腔上皮でのYAP経路活性化が

こうしたリモデリングの制御に関与している可能性も十分考えられるため、今後詳細な解析を続けていき、PG受容体による着床制御機構の全貌を明らかにしていきたい。不妊治療においては、子宮の着床受容能を亢進させることが妊娠率を向上させる上での最重要課題であるため、本研究成果が将来的に新規着床不全治療法開発の基盤となることを期待し、今後は臨床応用に向けた検証も進めていく予定である。

## 参考文献

1. Sugimoto, Y., Narumiya, S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* 2007; 282: 11613-11617.
2. Sugimoto, Y., Inazumi, T., Tsuchiya, S. Roles of prostaglandin receptors in female reproduction. *J Biochem* 2015; 157: 73-80.
3. Song, H., Lim, H., Paria, B.C., et al. Cytosolic phospholipase A2alpha is crucial for 'on-time' embryo implantation that directs subsequent development. *Development* 2002; 129: 2879-2889.
4. Hata, S., Katada, T., Nishida, H. Regulations of YAP transcriptional co-activator. *Seikagaku* 2014; 86: 464-468.
5. Panciera, T., Azzolin, L., Cordenonsi, M., et al. Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; 18: 758-770.
6. Zhang, T., Guo, S., Zhou, H., et al. Endometrial extracellular matrix rigidity and IFN $\tau$  ensure the establishment of early pregnancy through activation of YAP. *Cell Prolif* 2021; 54: e12976.
7. Aplin, J.D., Ruane, P.T. Embryo-epithelium interactions during implantation at a glance. *J Cell Sci* 2017; 130: 15-22.

## Abstract

The number of infants born after in vitro fertilization (IVF) has constantly increased due to the recent trend toward delayed marriage and the progress of assisted reproductive technology (ART). However, the success rate of ART is only about 20% because of the low efficiency of embryo transfer. Therefore, clarifying the molecular mechanism of embryo implantation is an urgent issue to improve ART success ratio. Prostaglandins (PGs) are a group of lipid mediators synthesized from arachidonic acid. PGs exert a wide variety of actions by acting on nine kinds of G-protein coupled receptors that are specific for each PG. Previous studies suggested the essential role of PGs in embryo implantation by using knockout mice for PG synthetic enzymes. However, it remains to be elucidated how PGs contribute to the normal implantation. In this research, we found that multiple PG receptor-knockout (PGR KO) mice exhibited reduced number of implantation sites. Moreover, the implantation abnormalities of PGR KO mice were rescued by artificial uterine contraction. We then evaluated the uterine activity of Yes-associated protein (YAP), a key regulator of mechanotransduction. As the result, we observed transient activation of YAP pathway before implantation periods in wild-type mice, while this activation was defected in PGR KO mice. These results suggest that uterine contraction by PG receptors enhances the implantation receptivity via YAP activation.