

会長指定シンポジウム2 子宮内膜機能の調節機構—着床機構の視点から—

ペプチド分解酵素が繰り広げる分泌期子宮内膜のダイナミズム

名古屋大学講師 安藤 寿夫

目 的

着床とは、胚と子宮内膜の複雑で調和のとれた相互作用によって成立する一連の過程である。排卵後の子宮内膜は、黄体ホルモンの分泌開始とその持続により14日間に及ぶプログラムされた経日的変化を示す。内膜の経日的変化は組織学的に最も明瞭で、子宮内膜日付診として古くから日常臨床に取り入れられてきた。その中心をなすのは腺上皮細胞のアポクリン分泌と間質の脱落膜化であり、分泌期の日付診はこの2つのプロセスを中心に確立されたものである。ヒトでは2つのプロセスが胚着床の有無にかかわらず進行し、その進行の差異が着床・妊娠成立に微妙な影響を及ぼすと考えられる。さらに、ヒトでは、着床・妊娠成立に向けた子宮内膜の変化プロセスが、同時に月経発来に向けた変化プロセスを内包していることが特徴である。生殖補助医療(高度生殖医療; assisted reproductive technology, ART)の臨床成績は、着床前初期胚の長期体外培養や凍結・融解技術の進歩により向上したが、なお未解決の問題が多い。中でも胚発育と分泌期子宮内膜変化の非調和が生じる可能性はARTにおいてより大きな問題であり、子宮内膜の経日的変化の詳細を明らかにすることの臨床的意義は深い。約2週間にわたる分泌期子宮内膜のダイナミックな経日的変化は、黄体ホルモンやその他の因子の誘導連鎖だけでは説明困難で、時間的空間的解釈を加える必要がある。近年、生殖におけるオキシトシンやアンジオテンシンなどの生理活性ペプチドに、従来のホルモンという概念だけでなく、組織で産生されるパラクライン・オートクライン因子としての解釈が加えられるようになった。本研究では局所において機動性の高い役割を担う生理活性ペプチドを活性化あるいは不活化してその局所濃度調節に威力を発揮する膜結合型ペプチド分解酵素の時間

的空間的局在変化に着目した。演者の所属教室で胎盤プロテアーゼとして展開してきたオキシトシナーゼ(placental leucine aminopeptidase, P-LAP)とアンジオテンシナーゼ(aminopeptidase A, APA)などのペプチド分解酵素が、着床に向けた分泌期子宮内膜の変化プログラムをどのように繰り広げているかを実証することを研究の目的とした。

方 法

本学倫理委員会で研究への使用が承認済みの子宮内膜日付診パラフィン包埋ブロックと、患者同意の下に子宮筋腫などの子宮摘出手術により得られた子宮内膜組織を用いて以下の実験を行った。

1. 子宮内膜におけるP-LAPとAPAの発現及び局在様式

あらかじめ作製した抗P-LAP及び抗APAポリクローナル抗体を用いて、Western blotting(以下WB)により月経周期各時期の子宮内膜組織における蛋白発現を検討した。また、酵素活性についても同様に検討した。次に、月経周期各時期の子宮内膜組織切片を用いてimmunohistochemistry(以下IH)を行い、局在を検討した。さらに、P-LAP及びAPAのmRNAを認識するビオチン化RNAプローブを作製し、*in situ* hybridization(以下*in situ*)を行って各時期の内膜組織におけるmRNAの局在を検討した。

2. 培養子宮内膜間質細胞脱落膜化におけるAPAの発現様式の変化

確立された方法により子宮内膜間質細胞を分離・培養し、 10^{-8} M 17β -estradiol, 10^{-6} M progesterone, 1 mM dibutyryl cAMPを添加して脱落膜化を誘導した。脱落膜化の有無によるAPA活性の違いを検討した。また、脱落膜化処理後の各時期の培養細胞に 35 S] methionineを取り込ませて合成された蛋白を抗APA抗体を用いて免疫沈降し、

SDS-PAGE, オートラジオグラフィーを行って APA 蛋白合成の変化を検討した。

成 績

1. P-LAP の発現と局在

WB による検討では, 増殖期と分泌期前期の子宮内膜組織及びエストロゲン製剤長期投与を受けた患者の子宮内膜組織検体では, P-LAP に相当する 160 kDa のバンドを明瞭に認めたが, 分泌期中期・後期の検体及びエストロゲン・プロゲステロン合剤の長期投与例では発現レベルは著しく減弱していた。組織ホモジネートの酵素活性においても, 同様の結果が認められた。

P-LAP は, 内膜上皮に局在し, 間質には存在しないことが IH 及び *in situ* で示された。IH において, 膜結合型ペプチド分解酵素である P-LAP は, 腺上皮細胞において核下空胞の形成と移動に一致した特徴的な局在変化を呈した。すなわち, 増殖期には細胞内にびまん性小顆粒状に点在, 分泌期前期には核下空胞に集積した。その後分泌期中期にかけて核下空胞が腺腔に向かって移動してアポクリン分泌された。

2. APA の発現と局在

WB による検討では, 各時期の子宮内膜組織検体から APA に相当する 160 kDa のバンドを明瞭に認めた。組織レベルの発現強度においては, 分泌期中期が顕著であった。一方, エストロゲン製剤の長期投与例では発現レベルは増殖期と同様であったが, エストロゲン・プロゲステロン合剤の長期投与例ではやや低レベルの発現にとどまった。子宮外妊娠(6~8 週)の内膜検体では発現レベルは著しく減弱していた。

APA の局在については, IH 及び *in situ* で一致して増殖期には上皮優位, 分泌期では間質優位の傾向であり, 分泌期後期には上皮における局在は

ほとんど認めなかった。分泌期後期では APA は間質細胞に強い局在を認める一方で, ラセン動脈は急激に伸張しながら蛇行が著しくなり, その周囲の間質細胞は脱落膜化が進展して, そこでは APA はほぼ消失した。

3. 培養間質細胞脱落膜化モデルにおける APA の発現変化

間質細胞を分離培養し, 前述の方法で脱落膜化させた結果, APA 活性は約 50% に低下した。APA の蛋白合成においても, 脱落膜化の進行に従い処理後約 10 日で著しい低下をみた。IL-1 α や TNF α などで脱落膜化を阻止した群では, APA 合成は非脱落膜化群と変わらなかった。

結 論

本研究により, 以下の 2 点が明らかとなった。すなわち, 1) P-LAP の局在変化を解析したことにより, P-LAP が子宮内膜腺上皮細胞からアポクリン分泌されることを示した。アポクリン分泌の結果としての P-LAP による子宮内腔のコーティングにより, 着床期において P-LAP がオキシトシンの局所濃度を調節する膜表面ペプチド分解酵素として機能していることが示唆された。2) APA は分泌期子宮内膜間質組織に強い局在を示し, アンジオテンシン II (Ang II) を III に分解(不活化)していると考えられる。分泌期後半の間質細胞脱落膜化により APA がほとんど消失するので, 脱落膜化内膜において Ang II の局所濃度は上昇する。増加した Ang II は, 脱落膜化に伴って進行するラセン動脈の急激な血管新生 (Ang II が VEGF を誘導する) を通じて, 着床から妊娠成立にかけての内膜環境を整えつつ, 他方, 増加する Ang II は黄体ホルモンレベルの急激な低下に連動したラセン血管構築後の血管収縮 (vasospasm) を惹起し, 月経発来へのプロセスを進行させていると推察された。