

討 論

森座長：ただ今から総合討論に入りますが、これを前半の卵管内の胚の発育と後半の子宮内の胚の発育の二つの部分に分けて討論を進めたいと思います。前半を廣井教授にお願いします。

廣井座長：まず前半お二人の先生に講演内容について簡単にまとめて頂きましょう。

野田洋一：本日私は三つの点について述べました。

まず第1はマウス等の動物モデルで *in vitro* で胚培養を行ったときに胚は酸化的ストレスを受けるということであります。

第2はその結果もたらされる胚の傷害というのはMPF 活性の調節機構の中の *cdc25* フォスファターズ活性が失活する結果、MPF 活性が誘導されない、つまり細胞周期をレギュレートするシステムに欠陥が起こるということであります。

第3はそれをヒトの体外受精に応用した結果 Day 6 に判定した胚盤胞率は、それ以前の培養系では13% ありましたが、5% 酸素下で α -MEM を用いた培養法では60% に達し、動物モデルで得た結果がヒトでも再現できたということであります。

廣井座長：30年来不明でありました2-cell block の謎を見事に解いたという点で大変興味があります。それでは末岡先生お願いします。

末岡 浩：私は受精から着床までの間に出現致します物質の一つとして early pregnancy factor という糖蛋白の分離精製を致しまして、少なくとも N 末端からの一部ではありますが一次構造を決定致しました。ただそれ以外の報告者の中にこれと違つた相同物質について報告がございましたので、それと私の精製致しましたヒトの EPF とのホモロジーを検索致しました。さらにリンパ球への作用およびどういう時期に出現してくるのかという出現機構についても申し上げました。

廣井座長：ありがとうございます。このように着床以前に母体に胚からなにかメッセージを送っている、そしてその母体になんらかの形で反応を示しているという大変興味あることを詳しくご説明願いました。

卵管内における胚の発育というお二人の先生にご質問がありますでしょうか。

北井啓勝（埼玉中央病院）：野田先生へお伺いします。臨床応用も可能な新しい知見を教えてくださいありがとうございます。

私は以前マウスの細胞周期を測定したことがありまして、2細胞周期で先生のおつしやつた G2期が非常に長いというのを聞きまして、MPF のいろいろな作用機序が長い G2期の保持に働いているのではないかと、ということで非常に理解が深まつたのではないかと思っております。お聞きしたいことは、先生の胚発育停止現象というのはマウスの ICR の系を使われていたが、例えばマウスでも F1ならそういう現象は起こらなかつたり、あるいは2細胞周期を越えてしまえば4細胞周期ではそういった現象は起こらない、またヒトの場合は2細胞期ではなくて4細胞期に起こる。細胞周期や種によつて胚発育停止現象が逆に起こらないことについてその機序についてどのようにお考えでしょうか。

野田洋一：大変興味のある点です。どうしてブロックのかからないストレインがあるのか考えておりますが、我々の行つた実験結果に基づいて考えますと、たとえば非常に酸化的ストレスによる傷害を受けやすい時期にそういったストレインでは相対的に外界の刺激あるいはストレスに対する防御機転が強く働く、いわば抵抗力の強いストレインであると考えていいのではないかと思います。そうすると我々の使っている ICR や TUCK では *cdc25* の活性が落ちましたが、それがうまく保たれるような機序がそういうストレインでは実際に働いているのかという疑問が残ります。その点については今後の検討課題でありましょう。そもそも1回目2回目の細胞周期でマウス胚が外界のストレスに弱い理由を考えてみる必要があります。この時期は maternal-embryonal genomic transition が起こる時期であり、卵にそもそも存在していた m-RNA のある種のもは時間経過の中でだんだんと量が減つていくことが既に知られております。受精後27時間以降、胚の遺伝子は活性化され、それによつてまたどんどん各種の m-RNA が産生されますが、m-RNA の量からみますと最も少なくてもいわば谷底にあたり、広い意味で外界の環境条件に弱い時期ではないかと考えております。私が確かめた訳ではないですがヒトの場合は4細胞期から8細胞期にかけて胚培養効率が低下することはこれまでの報告からみて事実だと思います。またヒトの場合は4細胞から8細胞の間に genomic transition が起こるのではないかという議論もあります。またブタにおいてもヒツジにおいてもブロックの時期と genomic transition の時期とは一致しております。

廣井座長：ほかにご質問はございませんか。

百枝幹雄(東京大学)：末岡先生へお伺いします。興味深く拝聴致しました。ほかの報告者と先生の精製なさったEPFとはcharacterが随分違っていて、着床前後に二つの活性のピークがあるというのを考えてもEPFというのは単一物質とは限らないと私は思います。その点からいうと先生の精製なさったEPFはoriginが妊婦の尿であるということですので、尿を採取した時期が着床前か後かということをお聞きしたいと思います。またEPFのm-RNAの発現のレベルで産生部位を同定しておられる仕事があれば教えて頂きたい。

末岡 浩：ご指摘のとおりと私も思っています。EPFといわれるmoleculeが本当に単一かどうかについては議論が残ります。発現してくる時期についても最初のピークがあつて次に一旦少し活性を落とした後次のピークが出て参ります。それから灌流系のような非常にプリミティブなモデルでも最初局所循環から出てきた後で全身循環が出てくるという過程の中に、必ずしもこれが全身をsaturateしたというだけでは解決のできない問題が含まれていると思います。私が精製のために用いた出発材料についてはご指摘のとおりですが、これは広い意味で妊娠中の尿を使っているという解釈をしております。具体的にはEPFは極めて少ない物質でありますので、大量の精製出発物質としてhCG標品を用いました。ほかの報告者の精製出発材料はウシ胎盤から酸性沈澱をして得られたもので、我々の得たものと相同物質であるかどうかについては今後の残された問題であると考えております。まだNorthernに関しましては今後これを行う予定であります。

斉藤英和(山形大)：野田先生へお伺いします。今回の先生の研究における培養液とくに光の実験での培養液にはフェノールレッドは含まれているのでしょうか。また今回の実験ではO₂濃度は5%と20%を用いておりますが、至適O₂濃度は何%と考えられますか。

野田洋一：フェノールレッドは動物実験にもヒト胚培養にも加えておりません。また至適O₂濃度は不明です。恐らく5%前後と考えますが、微妙な酸素濃度の違いを培養条件下で作出すのは極めて難しく、また費用もかかりますので実際にこれを行うのは困難だと考えます。

竹内一浩(鹿児島大)：野田先生へお伺いします。最近グルコースを含まないCZB培養液を使つて2-cell blockを解除したという報告があります。2細胞期胚

には6-phospho-fructokinaseを欠如するために4細胞期以降になつてグルコースをエネルギー源として利用できるとの報告もあります。2-cell blockに対するグルコースの影響をどのように考えておられますか。

野田洋一：グルコースが胚発生に対して阻害的效果を示すのは、胚が酸化的ストレスを受けている場合だけであると考えております。たとえば、酸化的ストレスを受けていない卵管内では卵管液中にグルコースが存在するにもかかわらず胚発生はまったく阻害されません。培養液中のリン酸の存在に関しても全く同様で、卵管液中には大量のリン酸が存在しますが胚発生は阻害されず、培養液中に存在する場合にのみラット、ハムスター等で厳しい阻害が成立します。

森座長：それでは後半のお二人のお話に関するdiscussionに移りたいと思います。多賀先生、根上先生お二人に講演の内容を簡単にまとめて頂きましょう。

多賀理吉：今回検討しました成長因子としてEGF、EGF前駆体、TGF- α 、それからテネインなどこの物質の共通点がなにかといいますと、EGFドメインを、あるいはEGFモチーフといつてもいいのですが、を有している点であるといつていいと思います。このEGFモチーフを有する物質が最近cell to cell interactionにおいて非常に重要であることが判つてきていますので、胚の発生とか着床とかまさにこのような生理的作用の要求されるような場で、今度私の検討した物質がやはり重要であるということが明らかになつたということだと思います。

根上 晃：用いた系は単純なものではありますが、基底膜成分というものを、ECMの一つですが、用いることによつて飛躍的に培養成績あるいは培養のいろんな条件が改善されることを示しました。そういった系ではカルシウムとラミニンが大事であつたということ、それから、こういった系を使えば今後研究モデルとしての発展性があるということをお示したつもりです。ECMは刻々と変化しており、着床後のearly pregnancy lossを克服して行くようなそういう時期のトロホプラストもまた同時に分化しています。両方考えないとこの初期の着床の現象は理解できないということです。

森座長：ではただいまのお二人の先生に対するご質問がございませうでしょうか。

矢追良正(獨協医大)：根上先生にお伺いします。implantation windowの成熟が着床のタイミングにとつて重要であります。その成熟状態は持続している

ものなのでしょうか、あるいは一瞬のものなのでしょうか。また分割卵が上皮に接着する際の相互作用はどのようなものかとお教え願いたい。

根上 晃：細胞外成分の検討のところでお話しましたように、細胞外成分が減少する時期は非妊娠症例の検討を行いますと、分泌期初期から観察されます。この時期は受精卵が子宮腔にまだ達していない時期です。したがって胚側の絨毛細胞のコラゲナーゼ活性が働きやすい（基質が少ない）期間は実際の着床時期より3～4日も前から始まっていることになります。ヒトの implantation window はかなり早くから open しているように思えるのはこの理由によるからです。野田先生のご講演の中にありましたように、体外受精胚移植時に胚移植する時期を検討すると、4日目に移植すると最もよい妊娠率が得られたという結果とも一致するように思われます。5日目以降は培養上の問題か、もしくは内膜そのものが胚と相互作用する必要性があるため妊娠率が逆に低下するのではないのでしょうか。まとめますと、排卵後3～4日目に内膜の implantation window は open する、この時より胚と母体の内膜は相互作用を開始する。この時の相互作用は胚の分化に不可欠で胚の分化を促進するか、もしくは implantation window の open している時期を延長させている可能性があり、結果的に内膜の胚胎受胎期間を決定しているのではないのでしょうか。

矢追良正：根上先生にお伺いします。腺管の状態が胚移植にとって重要であると思えますが、着床率を高めるために、移植に最適な時期を決定しなければなりません。子宮内膜のタイミングを調整するために良好な腺管状態を発見する指標として何が重要であるかご所見をお伺いしたい。

根上 晃：発表の中でお示しましたように、今回の平行培養の仕事では観察項目はわずか5項目でした。しかもその中で腺管に関するものは、腺管の形態、分布、開口部の面積、腺管の面積から決定される被覆上皮の占有面積の四つであります。胚は内膜被覆上皮に接着し、着床を開始します。したがって着床のごく初期はこの被覆上皮との相互作用から始まり、その後内膜内に侵入した胚は内膜上皮下に存在する限られた空間（脱落膜空間）でその後の母体との相互作用を介して分化、増殖を遂行していくこととなります。そうしますと、この脱落膜空間の体積を決定するのは、腺管に囲まれている空間ですから、結果的には腺管の体積が決定していることとなります。腺管開口部の面

積は被覆上皮の実際の着床有効面積を決定しますから、今回観察した4項目はすべて着床率を決定する大事な指標になると思います。また腺管からの分泌顆粒を含む分泌液の流量を考えてみますと、腺管の均等分布は着床部位に異常な乱流を形成せず、着床初期の胚の静止状態を形成すると思われまふ。まとめますと、均等なかつ過形成のない、開口部の大きくない腺管の発育が着床の初期接着とその後の侵入を保証すると考えています。

寺川直樹(鳥取大)：多賀先生へお伺いします。卵巢ホルモンであるエストロゲンの作用発現は子宮内膜においても成長因子を介するオートクリン又はパラクリンコントロールの可能性を見事に示されましたが、その作用発現は脱落膜化内膜においてのみおこるのででしょうか。またエストロゲンの作用が成長因子を介して発現する証明方法としては、抗成長因子受容体抗体によるエストロゲン作用の阻害実験も行うことが望ましいと思われるが、この点をどのようにお考えになりますか。

多賀理吉：成長因子の介在による卵巢ホルモンの子宮内膜増殖作用は脱落膜化内膜においてのみ起こるのではなく、エストロゲン単独の子宮内膜上皮細胞増殖作用も一部成長因子を介する作用であると考えます。また卵巢ステロイドホルモンによつて EGF や TGF- α の成長因子が発現されるといつても、その発現される細胞が異なり、エストロゲンの場合は上皮細胞主体であり、プロゲステロンでの脱落膜化過程では間質細胞がそれぞれ主体となります。ご指摘のとおりだと思いますが、今回は成長因子の受容体からの分析は行っておりません。

左合治彦(慈恵医大)：多賀先生へお伺いします。先生はテネインが着床期に子宮内膜上皮下に、着床後は内輪筋層下に発現することをお示しになりました。腸絨毛では上皮細胞が剝離する部位に発現されることが知られていて、テネインは接着ではなく剝離に働くといわれています。着床に関連してテネインが発現される現象はどのように理解したらよいのでしょうか。

多賀理吉：ご指摘のように、腸上皮も含めて、テネインは remodeling の盛んな細胞の部位に発現することが知られております。子宮におけるテネインの発現についても、上皮細胞の剝離による一種の wound に対する wound repair, wound healing 的な作用と考えております。着床との関連についてはテネインの

接着作用によるものではなく、むしろ細胞の離脱の激しい部位に着床しやすく、そのために発現しているのか、あるいは受精卵の invasion に対して反応的に発現しているのか、二つの可能性を考えております。

古谷健一(防衛医大)：多賀先生へお伺いします。テネイン遺伝子発現において妊卵着床後子宮内膜側の子宮筋層に alternative transcription が認められるとのことですが、正常月経周期においても観察されるのでしょうか。alternative transcription は Relaxin などいくつかの peptide 遺伝子発現で観察されており、またその生理学的意義に関心がよせられております。先生が観察された結果がなにか生理学的意義が考察できるのであればご教示頂きたい。

多賀理吉：我々は以前にヒト子宮内膜や子宮筋層でテネインの発現、およびその月経周期における変化を報告しましたが、それは蛋白質レベルにとどまっております。遺伝子レベルの報告はありません。したがって alternative splicing による調節があるかどうかは不明であります。

今回検討したマウス妊娠子宮でのテネイン mRNA の動きは、small variant はマトリックスとして細胞接着能をもたず repulsive な接着阻害作用を有するという報告とも一致しております。恐らく、妊娠初期子宮でのテネイン mRNA の alternative splicing の存在の意義は、発現部位と発現時期とが極めて重要な意味をもつ着床現象において、テネインを異なる部位、時期に、そしてその異なる機能を発現させることによつて、複雑な一連の着床過程を調節している可能性がある点であると考えております。

佐久本哲郎(琉球大)：根上先生へお伺いします。不妊症患者の内膜培養でその後の妊娠例と非妊娠例では腺管、被覆上皮細胞密度に差がでるのはどのような因子、又は機構によつて引き起こされていると思われませんか。

根上 晃：大変難しい問題ですが、腺管や被覆上皮はステロイドホルモンによつてその増殖、分化が制御されています。しかし、月経時に大部分の機能層の子宮内膜は剝離離脱を行います。そのとき残存した基底層の腺管から被覆上皮が分化する仕組みはこれまで不明でした。我々は、腺管上皮の最先端の細胞に多分化能があり、この細胞が基底膜存在下で血小板由来の成長因子によつて調節を受け被覆上皮化を行うことを既に明らかにしています。したがってこの因子とステロイドホルモンが働いて腺管や被覆上皮の増殖分化に

作用し、結果的に細胞密度を決定しているものと考えられますが、現時点まででは具体的な実験データをもっておりませんので speculation にとどまることをお許しください。

森座長：活発なご討議ありがとうございました。時間が参りましたので、4人の演者のお話と一部文献の考察を加えてまとめをさせていただきます。

卵管内胚発育をまとめてみますと次のようになります。哺乳動物における卵管内の胚発育は、系統発生的に卵生の名残りと解釈することもできますから、基本的には非依存性あるいは自律性発育の時期と理解することができます。この場合支配しているゲノムの由来によつて二つの時期を区別することができます。すなわち、最初の母性ゲノムの支配する時期から途中で胚性ゲノムの支配する時期に変わり、この移行期を genomic transition といいます。この genomic transition はマウスでは2細胞期、ヒトでは4～8細胞期に相当しますが、この時期の胚は環境ストレスに脆い存在で、そのために in vitro では発育停止 developmental block が起こります。

母性ゲノムの支配する時期には、酸素、光、遷移金属などの酸化的ストレスから胚を保護してやる必要があります。その本態は M-phase promoting factor、すなわち MPF 活性を維持してやるということであり、そして MPF 活性が失活する分子機構をつきつめると cdc25 の phosphatase 活性の維持の成否が決め手になっていることが判りました。胚性ゲノムの支配する時期になりますと、成長因子が登場してきます。ここで機能する成長因子としては、ライガンド、レセプターともに胚にその存在が立証されているもので、現在までに知られているのは IGF-II、PDGF、TGF- α /EGF-R などです。そして胚自身で作られた成長因子が胚自身に働いてその発育を促進するというオートクリン調節を行っております。他方 EPF に関しては、着床前に母体が妊卵の存在を感知する機構、すなわち妊娠認識 pregnancy recognition の一つとして、ヒトでも作動していることが明らかとなり、分子構造上 human thioredoxin や human EGF とは異なるものであることが示されました。この EPF は胚由来の PAF によつて誘導されますが、月経黄体から妊娠黄体への機能化、局所的な免疫寛容の誘導ならびに胚の成長促進などを通して着床準備態勢を整えているらしいという可能性が示唆されましたが、その詳細は今後引き続き検討を要する課題でありましょう。

つぎに子宮内発育についてまとめてみます。着床に至る子宮内の胚発育は、卵管内の発育とは異なつて、基本的には依存性発育の時期と考えられます。つまり母性シグナルと胚性シグナルが相互に相手をコントロールするという相互依存性のパラクリン調節が成立しているのでありまして、この場合、初めは母性シグナルが優位であります。次第に胚性シグナルの占めるウェイトが大きくなります。

着床は真胎生生殖様式の根幹をなす現象であります。その全プロセスを anatomical/functional barrier という観点から四つのステップに分けることができるようでありまして、それは接着、置換あるいは融合、侵入それに定着であります。着床が成立するには、このうち少なくとも三つのバリアーを突破しなければならないわけでありまして、最初のバリアーは初覆上皮であります。子宮外妊娠でもみられるように、本来胚は接着力の強い細胞塊であります。被覆上皮に一旦細胞極性が成立すると、なかなか胚を受けつけません。しかし一定のホルモン条件が整いますと胚受容性が出現し、いわゆる implantation window がオープンして接着が起こります。ヒトではこの window は19~23日の5日間であるといっている人がおります。この接着のプロセスに Ca-カドヘリン系が作動していることはかなり確実といえそうです。次が基床膜バリアーですが、ラミニンをはじめとするいくつかの細胞外成分から構成されています。いわゆる着床酵素の一つであるプラスミノゲン・アクチベーターが活性化されてプラスミンができ、これが MMP #9 を活性化してコラーゲンを溶かすというカスケードによつて基底膜が融解します。第3のバリアーは間質でありまして、タイプ I, III のコラーゲンを主とする細胞外成分と脱落膜細胞から構成されています。ここでも似たようなカスケード現象が起こつて MMP #1 によつてコラーゲンが溶かされますが、内膜内胚移植は少なくとも二つのバリアーを一気に機械的に突破しようとするもので、今後の臨床展開が注目されます。第4のバリアーらしきものが筋層前に存在しており、テネシンとかタイプ V コラーゲンなどの細胞外成分から成つており、子宮の伸展や胚の侵入に対する補強作用が考えられますが詳しくはなお不明であります。

一方成長因子についてみますと、着床過程そのもの

についての意義はまだ不明のところが多いのですが、着床前後の現象から類推しますと、少なくとも三つの局面で成長因子が子宮内の胚発育や着床に積極的に関与していることが明らかにされてきました。その一つは脱落膜形成前の段階で胚発育を促進する作用であります。この時期には胚側にまずレセプターのみが出現するような成長因子が重要な役割を担つておりまして、母体側から供給されるライガンドとして現時点で判つておりますのは PDGF, IGF-I, インスリンであります。2番目は脱落膜形成後の段階で胚発育を促進する作用であります。脱落膜細胞の中には EGF, TGF- α , TGF- β が著明に出現してきますから、これらが胚発育にパラクリン・コントロールを及ぼしている可能性は大きいのですが、レセプターの存在証明はまだなされておられません。しかし内膜側のレセプターは存在しますのでオートクリン的に脱落膜形成や血管形成に関与しているようであります。3番目は性ステロイドによる脱落膜形成や内膜増殖において、EGF が mediator として働いていることでもあります。しかし全体として、これら細胞外成分や成長因子の作用や調節の機序に関しては今後の解明に委ねざるを得ないといえましょう。

このように〈まとめ〉をしてみますと、胚の卵管内発育については一定の解析が進みましたが、着床に関してはほんの一端が解明されただけで、光明はみえてきたものの依然として black box に残る部分が多いことを改めて痛感させられた次第であります。今後分子生物学などの方法の進歩によつて、ヒトの生殖発生生物学に関する科学的知見が集積され、臨床にフィードバックされることを期待するものであります。

本日はそれぞれ素晴らしいご講演を賜つた4人の演者と、活発なご討議を頂いたフロアの先生方に座長団として厚くお礼申し上げます。そしてこのテーマをお取り上げ頂いた高見澤会長、学術企画委員会ならびに理事会に敬意を表したいと思います。4人の演者の方の今後の研究のご発展をお祈りするとともに、本シンポジウムが本学会のこの方面のサイエンスの進展のための一里塚になることを、皆様と共に期待しながらこのシンポジウムを閉じたいと思います。

ご静聴ありがとうございました。