Japan Society of Obstetrics and Gynecology

日本産科婦人科学会雑誌　ACTA OBST GYNAEC JPN Vol. 63, No. 1, pp. 105—114, 2011（平成 23, 1 月）

第 62 回日本産科婦人科学会・学術講演会

シンポジウム 2「子宮内膜の機能調節とその病態」

(4) トロフィニンに着目した子宮内膜の機能調節とトランスレーショナルリサーチ

浜松医科大学医学部産婦人科学講座

准教授　杉原　一廣

Function of Trophinin and Translational Research

Associate Professor, Kazuhiro SUGIHARA

Department of Obstetrics and Gynecology, Hamamatsu University School of Medicine, Shizuoka

はじめに

精子と卵が受精して融合した接合子は卵分割を繰り返し初期胚となる．卵管から子宮腔に達した胚は受精後 6〜7 日目に子宮内膜上皮に対立した後，接着し着床が開始される．接着を契機として胚と子宮内膜それぞれで特異的な変化が起きる．栄養外胚葉（トロフェクトダーム）は栄養膜細胞（トロホブラスト）に細胞形態を変え，細胞増殖し子宮内膜上皮を超えて間質内へ浸潤する．一方，子宮内膜はトロホブラストの浸潤を受け入れ，やがて胚が子宮内へ埋没し妊娠が成立する．

我々は着床における接着分子「トロフィニン」[1)〜6)8)〜11)]に着目し分子レベルで着床現象のメカニズムを明らかにしてきた．本稿ではトロフィニンによって時間的・空間的に調節された初期着床過程を子宮内膜と胚の接着・相互作用・細胞内伝達系の観点から概説する．さらに得られた知見を基に進めているトランスレーショナルリサーチについても紹介する．

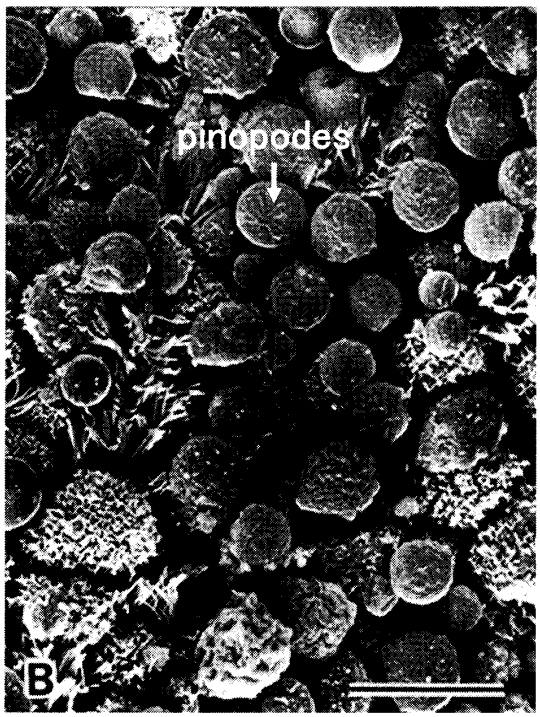
子宮内膜上皮細胞の特徴

一般に上皮細胞の apical cell surface は多糖外被（glycocalyx）を形成する糖タンパク質ムチンで覆われており，ムチンは細胞を保護する役割を担っている．子宮内膜上皮を覆うムチンのコアタンパク質は MUC1 で無数の糖鎖によって修飾された巨大分子である．ブラストシストが子宮腔へ達して最初に遭遇する分子は MUC1 である．この際，MUC1 の糖鎖はブラストシストが子宮内膜上皮細胞へ接着することを阻害する．マウス・ラット・ブタでは，胚が着床する前に子宮内膜上皮全体の MUC1 が低下することが知られている．この知見はムチンが接着を阻害していること，MUC1 の低下により着床に必要な接着分子が子宮内膜上皮に露呈し受容性を促進するという考えと一致する[4)]．しかしながらヒトの子宮内膜では implantation window の時期 MUC1 は著明に上昇してくる[7)]．この一見相反する事実は，ヒトの子宮内膜上皮表面は広範囲にブラストシストの接着を阻止す

Key Words: Implantation, Cell adhesion, Trophinin

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology



分泌期中期

【図1】pinopodes
分泌期中期，implantation window と呼ばれる時期の子宮内膜 apical cell surface では小胞状の突出構造 pinopodes が電顕で観察される．
(文献12)より)

ることを示唆している．それではどのようにしてヒトのブラストシストは着床場所をみつけるのであろうか？ *in vitro* でヒトのブラストシストを子宮内膜上皮に接着させると，ブラストシスト直下と周囲の子宮内膜上皮細胞に発現していたMUC1は消失することが解った．一方，接着部位からすこし離れた子宮内膜上皮細胞ではMUC1が発現し続ける．この結果は，ヒトのブラストシストが母方の上皮細胞に働きかけてMUC1発現を抑制する機序が働いていることを強く示唆している[4]．

着床が可能な時期は，月経周期では19～22日頃の分泌期中期で implantation window と呼ばれる時期に相当する．この時期の子宮内膜上皮 apical cell surface は pinopodes と呼ばれる小胞状の突出構造を呈す(図1)．pinopodes はさまざまな哺乳動物に観察される．ヒトの pinopodes は子宮内膜が胚を受容可能なわずか2日以内に出現し，ブラストシストの attachment は pinopodes の頂上で起こる[4)12)]．

胚と上皮細胞の相互作用

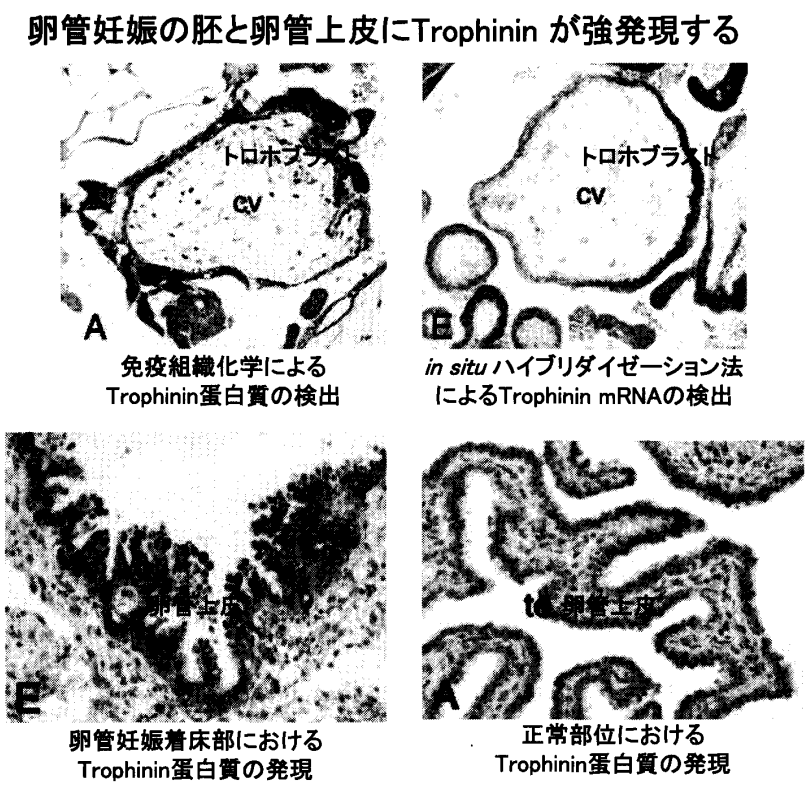
ブラストシストと受容する上皮細胞間のクロストークは子宮外妊娠の研究から明らかになった．ヒトの卵管妊娠は相対的に高い頻度で発生するが，同じ哺乳動物でも齧歯類では子宮外妊娠は起こらないばかりかヒト以外の霊長類における子宮外妊娠の発生率は非常に稀である．これらの事実はヒトブラストシストの着床過程にはヒトに特異的な機序が存在し，子宮外妊娠にそれらが端的に表現されていると示唆される．卵管妊娠の着床部位では，胚・上皮細胞ともに初期接着分子トロフィニンの発現が認められるが，興味深いことに着床部位から少し離れた卵管上皮ではトロフィニンは発現していない[11)](図2)．この結果は，胚近傍の卵管上皮細胞にトロフィニンの発現を誘導する胚由来の因子の存在を示唆している．卵管組織に絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)を加えて培養するとトロフィニン mRNA が増加するので，着床時にヒトのブラストシストから分泌される hCG がトロフィニンを誘導する因子であることが明らかとなった．つまり胚から分泌される hCG が近傍の上皮細胞に作用しトロフィニンを局所的に誘導する．ヒト以外の霊長類との差については，ヒトへの進化で hCG を獲得したことより説明ができる[4)11)]．さらに，子宮外妊娠と炎症との関連よりサイトカインの関与が示唆される．また，着床時の子宮腔において IL-1β が上昇することが報告されているため hCG と IL-1β を培地に加えて卵管上皮を培養したところ，IL-1β 添加により hCG 単独よりトロフィニンが強誘導されることが示された(unpublished data)．

ブラストシスト・子宮内膜上皮の接着

着床は，胞胚の子宮内膜上皮への対立・初期接着により開始される．トロフェクトダームと子宮内膜上皮への接着は，遺伝的にも異なる2種類の上皮細胞が apical cell surface でそれぞれ接着するという移植免疫学や細胞生物学の常識では説明できない例外的現象である．本来，上皮細胞は api-

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology



【図2】卵管妊娠におけるトロフィニンの発現
免疫組織と *in situ* ハイブリダイゼーションの結果，卵管に着床した胚のトロホブラストはタンパク質・RNA レベルともにトロフィニンを強く発現していた．また，卵管でのトロフィニンの発現は絨毛が接している近傍の卵管上皮にのみ強発現し，着床部位よりわずかに離れた（5mm）卵管上皮ではトロフィニンの発現は認められない．
（文献11）より）

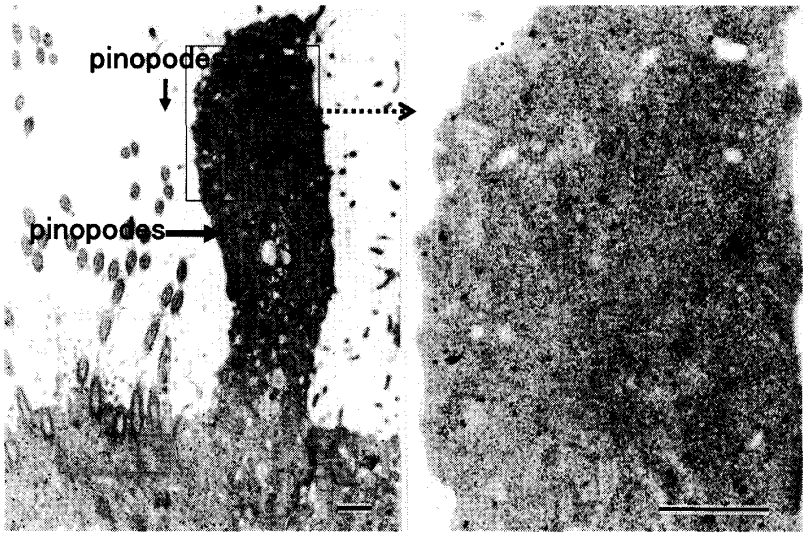
cal cell surface での接着性はなく細胞の側面や基底面でのみ細胞間接着が可能なため，着床時の初期接着は「細胞生物学的パラドックス」と呼ばれている．我々は，この時期に着床に特有な接着分子が発現しているという仮説をたてトロフィニンを同定した．トロフィニンは分子の90%以上が10アミノ酸の繰り返し構造で，N端が細胞質に存在し細胞膜貫通領域あるいは疎水性ドメインを複数もつ．そのため，まるでチャックのようなジッパー構造を上皮細胞の apical cell surface で構成しトロフィニン-トロフィニンが相同的に結合できる．トロフィニンは胞胚の胚側局（embryonic pole）に強く発現する[1)~6)8)~11)]．この事実は，ヒトの胚側局が子宮内膜上皮に対立し接着するという観察結果と一致する．一方，子宮内膜上皮のトロフィニンの発現は着床部位に限局して発現誘導される．ヒト子宮内膜上皮細胞を初代培養しhCGやIL-1βを培養液に添加するとトロフィニンが強誘導されることが判明した[2)]．胞胚が子宮内膜に対立すると胞胚近傍のMUC1の発現が抑えられ子宮内膜上皮細胞を覆うムチンが薄くなり子宮内膜上皮細胞に形成されたpinopodが露出する．胞胚より分泌されるhCGにより対立部位近傍の子宮内膜，とくにpinopodへトロフィニンが強誘導される[2)]（図3）．pinopodesは子宮内膜上皮細胞から突出する構造のため，胞胚と子宮内膜はpinopodesの頂上でふれあう．よってpinopodesに発現したトロフィニンはトロフェクトダームのトロフィニンと容易に結合することが可能である．これらの結果，トロフェクトダームと子宮内膜上皮細胞それぞれのトロフィニンが相同的に結合し胚と子宮内膜にとって最初の強い接着が起こる（図4）．

トロフィニンの分子結合を模倣するペプチドの同定

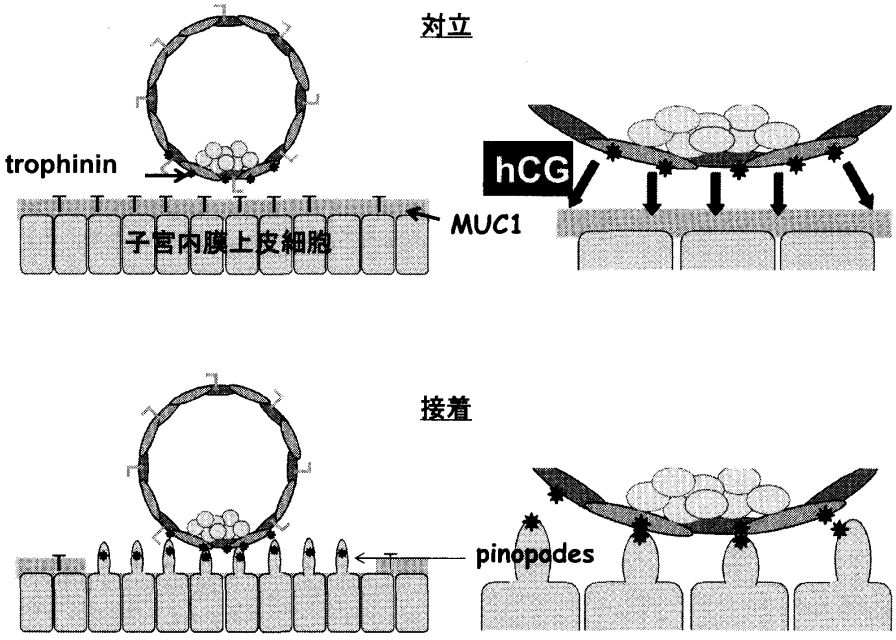
胚の着床は最初の接着が引き金になって胚と子

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology



【図3】免疫金標識されたpinopodesの透過型電子顕微鏡写真
*in vitro*で培養液にhCGを含有するビーズを加えて分泌期中期の子宮内膜上皮細胞を培養し，抗トロフィニン抗体を用いた免疫組織電顕．pinopodesにトロフィニンが誘導され発現する．
（文献2）より）
Scale bars：0.5um

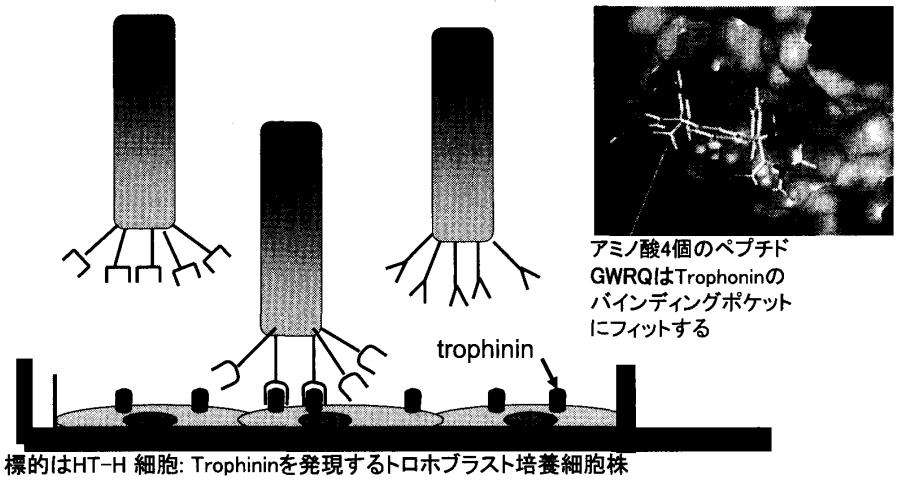


【図4】ブラストシストと子宮内膜上皮のクロストークと接着
胞胚が子宮内膜に対立すると胞胚近傍のMUC1の発現が抑えられ子宮内膜上皮細胞を覆うムチンが薄くなり子宮内膜上皮細胞に形成されたpinopodが露出する．胞胚より分泌されるhCGにより近傍の子宮内膜上皮細胞，とくにpinopodへトロフィニンが強誘導される．その結果，トロフェクトダームと子宮内膜それぞれのトロフィニンが相同的に結合し胚と子宮内膜上皮間の初期接着が成立する．
（文献2），4）より）

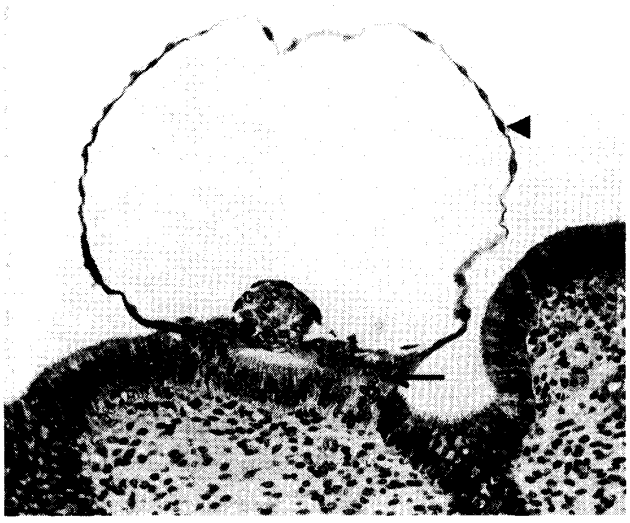
（脚注1）
GWRQペプチド（G＝Glycine；W＝Tryptophane；R＝Arginine；Q＝Glutamine）．

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology



【図5】トロフィニンを模倣するペプチドの同定
個別のペプチドを発現するファージライブラリーを$10^{11\sim13}$という膨大なスケールでスクリーニングしトロフィニンを模倣するペプチドを同定.
(文献1)より)



【図6】着床初期の電顕写真
サルブラストシストの子宮内膜への着床．接着した側のトロフェクトダームはトロホブラストへ細胞形態を変化させ，増殖し子宮内膜へ浸潤を開始する(arrows)．一方，子宮内膜と接着していない側の細胞は一層のままで増殖しない(arrow heads)．
Elsevier Biomedical from H. A. Padykula, Histology, 5th edition 一部改変

宮にさまざまな反応が起こり胎盤形成に向かう．我々はもしトロフィニンが胚の接着に関与するならば接着に続いて起こる反応にもトロフィニンが重要な役割を果たしているに違いないとの仮説をたてた．具体的に実験をするにあたりトロフィニンの分子結合を模倣するためにトロフィニンのbinding pocketにすっぽりとはまってトロフィニンを模倣するペプチドを同定することから始めた．すなわちファージ表面に単一のペプチドを発現するファージライブラリーを用い，トロフィニンを介する接着活性を持つ細胞をターゲットとして$1\times10^{11\sim13}$という膨大なスケールでライブラリーをスクリーニングし，接着と機能を模倣するGWRQペプチド(脚注1，図5)を同定し分子機構を解析した[1]．

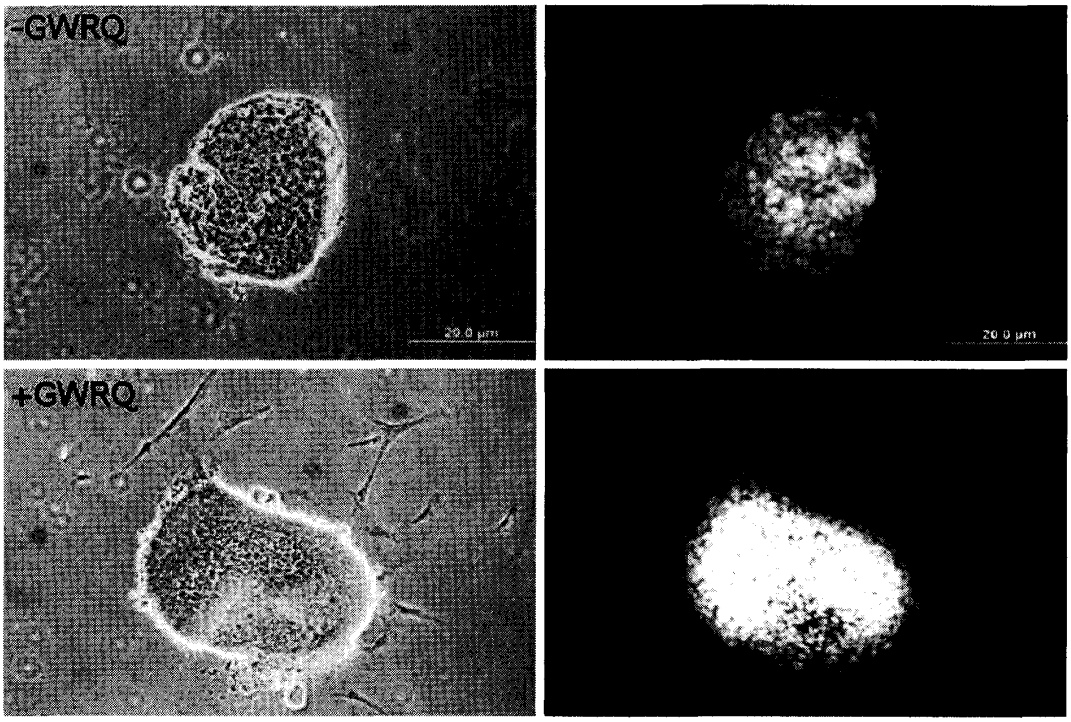
ブラストシストの浸潤と細胞内情報伝達系

ブラストシストと子宮内膜が接着すると，接着した部分のトロフェクトダームは急速に増殖と浸潤を開始する．細胞形態を変化させたトロホブラストは細胞分裂を開始し細胞運動しながら子宮内膜に浸潤する．一方，接着しなかった部分のトロフェクトダームは細胞増殖をしない(図6)．これらの事実より，トロフィニン-トロフィニンの相同的な接着が引き金となって細胞内情報伝達系を活性化する機構の存在が考えられる．

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

GWRQペプチドはサルのブラストシストを活性化する



Sugihara K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007.

【図7】GWRQペプチド添加(トロフィニンとトロフィニンとの相同的結合)によるトロホブラストの変化
サルのブラストシストにGWRQペプチドを加えるとトロホブラストが盛んに分裂・増殖し細胞運動が惹起される.
(文献1)より)

着床時の栄養外胚葉では上皮成長因子受容体(EGFR)ファミリーのErbB4が発現し,ErbB4の細胞質ドメインはトロフィニン・ビスチン(トロフィニンの細胞内調節分子)と結合して複合体を形成しているため,ヘパリン結合性上皮成長因子様成長因子(HB-EGF)が細胞表面でErbB4に結合してもErbB4はリン酸化されずチロシンキナーゼは不活性である.次いでトロフィニンによる細胞接着が起こるとトロフィニンはビスチンから解離しErbB4は活性化される.つまり,トロフィニンは細胞接着分子として機能すると同時に,「ErbB4の分子スイッチ」として機能することが判明した.サルのブラストシストにトロフィニンの機能を模倣しうるGWRQペプチドを加えるとトロホブラストが盛んに分裂・増殖し細胞運動が惹起される[1)4)5)](図7).トロフィニンに着目した研究よりトロホブラストが子宮内膜への浸潤能を獲得する情報伝達過程が分子レベルで明らかになった(図8).

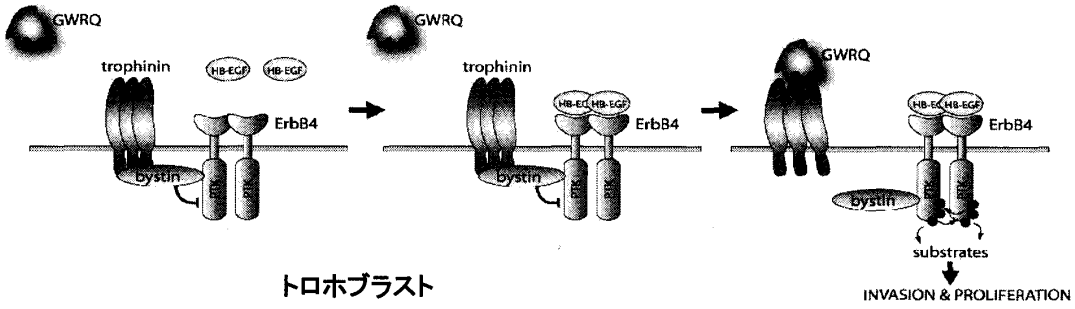
子宮内膜上皮細胞の変化

子宮内膜上皮細胞は,細菌など外界に対して防御バリアとして機能する.着床を成功させるためには,胚は上皮細胞が形成するバリアを克服して浸潤することが不可欠である.ヒト胚着床のモデル系による検討より,トロホブラストは子宮内膜上皮細胞のアポトーシスを誘導することが示唆される[13)14)].しかるにトロホブラストによる子宮内膜上皮細胞のアポトーシス誘導は胚着床の重要なステップである.しかしながらトロフェクトダームと子宮内膜上皮細胞の相互作用によるアポトーシスの分子誘導機構は依然として明快ではない.

アポトーシスは,プログラムされた細胞死(積極的に制御されている細胞死)を意味し哺乳動物において余剰細胞や異常細胞を除去する.そして抗がん剤,成長因子の欠如,デス因子を含むさまざまな刺激によって誘導される.FasとFasリガンド(FasL:Fas依存性アポトーシスシグナル伝達

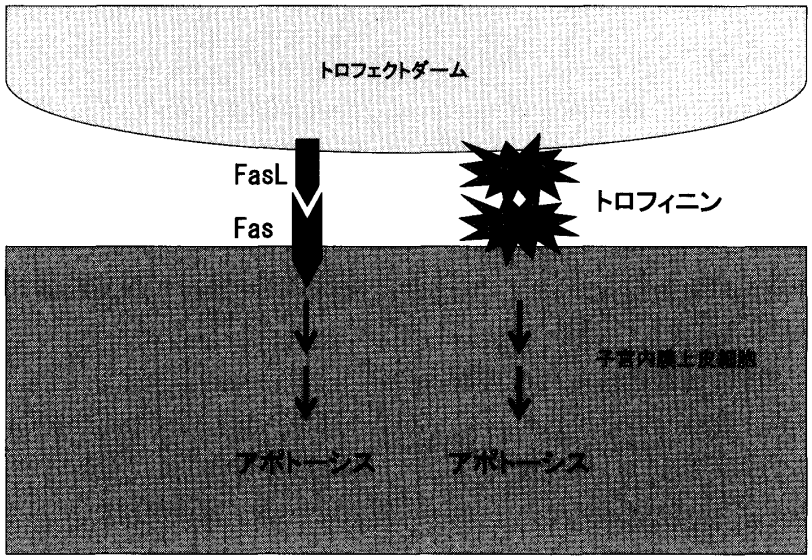
NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology



Sugihara K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007.
Editors choice: Science 2007.

【図8】トロフィニンを介する初期接着が引き金となってトロホブラストが活性化される分子機構：トロフィニンは分子スイッチを構成する
ブラストシストにおいてトロフィニンはビスチン・ErbB4と複合体を構成する．トロホブラストではErbB4にHB-EGFが結合してもErbB4はリン酸化されない．子宮内膜上皮のトロフィニンもしくはトロフィニンの機能を模倣するGWRQペプチドがトロホブラストのトロフィニンに結合すると立体構造が変化しビスチンとトロフィニンが解離する．その結果，ErbB4がリン酸化され細胞内情報伝達系を介して細胞増殖，細胞運動が起こり着床が進む．
(文献1)より)

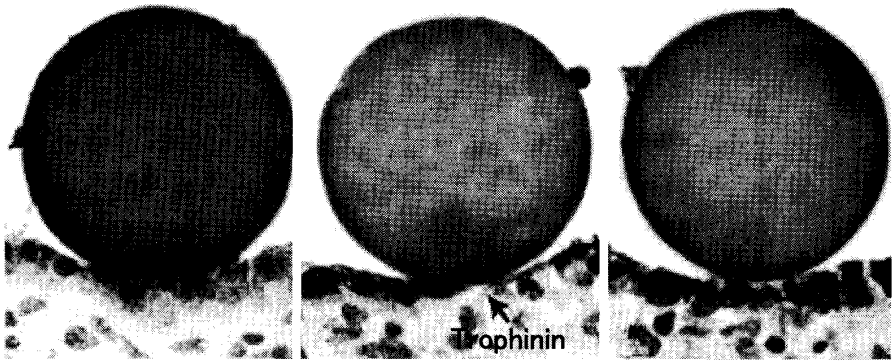


【図9】子宮内膜上皮細胞のアポトーシス誘導
胚のトロフェクトダームに発現したFasLと子宮内膜上皮のFasが結合すると子宮内膜上皮細胞はアポトーシスを起こす．さらにトロフィニンを介するアポトーシスの系が存在する．

因子)が結合すると，続いてカスパーゼカスケードが活性化しアポトーシスが開始される[15]．FasLがアカゲザルのブラストシストのトロフェクトダーム表面に発現し，Fasが胚着床部位近傍の子宮内膜上皮細胞に位置することが報告されている．そこで，attachmentにより胚のFasLが子宮内膜上皮のFasに結合するとアポトーシスを誘導し子宮内膜上皮細胞のバリアが破壊されると考えられる[16]．この結果，トロフェクトダームは基底膜と接触し間質への浸潤が可能となる．さらに，我々はFas, FasLを介する系と独立してトロフィニンを介する接着が子宮内膜上皮細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにしている(unpublished data)．

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology



【図10】子宮内膜のトロフィニンはエッグメイトにより発現誘導される
エッグメイトを分泌期中期の子宮内膜へ添加すると子宮内膜(apical cell surface)にトロフィニンが強誘導される.
(文献2)より)

トランスレーショナルリサーチ

ブラストシストが子宮内膜上皮に接着し着床が成立する頻度は健常な女性でも比較的稀である.不妊症患者に対する治療法として体外受精が行われているが妊娠率は頭打ちである.その主たる原因のひとつが着床不全と考えられる.そこでトロフィニンに着目してトランスレーショナルリサーチを進めている.

我々は,着床時のヒト胚の物理的・生理学的特性を模倣できるアガロースビーズ(エッグメイト)を開発した.着床にはブラストシストが分泌するhCGが子宮内膜に作用することが必要である.開発したビーズはわずか1個でブラストシストが分泌するhCG量を保有し子宮内膜(apical cell surface)で放出する.IL-1βの存在下にエッグメイトを分泌期中期子宮内膜に添加するとビーズから解離したhCGが子宮内膜上皮細胞へのトロフィニンの発現を強誘導する(図10)[2].さらに,アカゲザルの受精卵とエッグメイトを混ぜて胚移植すると着床率,妊娠率ともに上昇傾向を示した.

胚と子宮内膜のトロフィニンを介する接着はブラストシストが分泌するhCGのパラクライン作用により時間的・空間的に調節されている[2].トロフィニンを子宮内膜に強発現させることで胚と子宮内膜上皮細胞のトロフィニンを介する接着が亢進し,トロホブラストの増殖・浸潤能がトロフィニンの結合により誘導されることと相俟って胚受容能の改善が期待でき,着床不全を改善し妊娠率を上げる有効な方法と成りうる可能性がある.今後,トロフィニンの上流や下流で胚と子宮内膜のクロストークに関与する分子の機能解析を進め,着床不全に対する治療法の開発を目指す.

謝　辞

発表の機会を頂きました第62回日本産科婦人科学会学術集会長 稲葉　憲之先生,座長の久保田俊郎先生・神崎秀陽先生に深謝いたします.

本研究遂行に協力いただいた浜松医科大学産婦人科学講座のみなさんと,ご指導いただいた金山尚裕先生,慶應義塾大学 吉村泰典先生,杏林大学 岩下光利先生,共同研究者であるSanford-Burnham Medical Research Institute Dr. Michiko Fukuda, Dr. Naoaki Tamura,一緒に仕事を進めている多くの国内外の研究者に心より感謝いたします.

文　献

1) Sugihara K, Sugiyama D, Byrne J, Wolf DP, Lowitz KP, Kobayashi Y, Salmani MK, Nadano D, Aoki D, Nozawa S, Nakayama J, Mustelin T, Ruoslahti E, Yamaguchi N, Fukuda MN. Tropho-

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

blast cell activation by trophinin ligation is implicated in human embryo implantation. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 3799—3804

2) Sugihara K, Kabir-Salmani M, Byrne J, Wolf DP, Lessey B, Iwashita M, Aoki D, Nakayama J, Fukuda MN. Induction of trophinin in human endometrial surface epithelia by CGβ and IL-1β. FEBS Lett 2008; 23: 582: 197—202

3) Fukuda MN, Sugihara K, Nakayama J. Trophinin: what embryo implantation teaches us about human cancer. Cancer Biol Ther 2008; 7: 1165—1170

4) Fukuda MN, Sugihara K. An integrated view for L-selectin and trophinin functionin human embryo implantation. J Obstet Gynaecol Res 2008; 34: 129—136

5) Sugihara K, Fukuda MN. Signal transduction in human embryo implantation. Cell Cycle 2007; 6: 10: 1153—1156

6) Fukuda MN, Akama TO, Sugihara K. Role of cell surface carbohydrates in development and disease. In: Hari G. Garg, ed. Carbohydrate Chemistry, Biology and Medical Applications. Elsevier; 2007

7) Hey NA, Graham RA, Seif MW, Aplin JD. The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. J Clin Endocrinol Metab 1994; 78: 337—342

8) Aoki R, Suzuki N, Paria BC, Sugihara K, Akama TO, Raab G, Miyoshi M, Nadano D, Fukuda MN. The Bysl gene product, bystin, is essential for survival of mouse embryos. FEBS Lett 2006; 580: 6062—6068

9) Nadano D, Sugihara K, Paria BC, Saburi S, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Nakayama J, Fukuda MN. Significant differences between mouse and human trophinins are revealed by their expression patterns and targeted disruption of mouse trophinin gene. Biol of Reprod 2002; 66: 313—321

10) Suzuki N, Nadano D, Paria BC, Kupriyanov S, Sugihara K, Fukuda MN. Trophinin expression in the mouse uterus coincides with implantation and is hormonally regulated but not induced by implanting blastocysts. Endocrinology 2000; 141: 4247—4254

11) Nakayama J, Aoki D, Suga T, Akama TO, Ishizone S, Yamaguchi H, Imakawa K, Nadano D, Fazleabas AT, Katsuyama T, Nozawa S, Fukuda MN. Implantatiuon-dependent expression of trophinin by maternal Fallopian tube epithelia during tubal pregnancies. Am J Pathol 2003; 163: 2211—2219

12) Shimuzu Y, Kabir-Salmani M, Sugihara K, Sakai K, Iwashita M. Expression and Localization of Galectin-9 in the Human Uterodome. Endocr J 2008; 55: 879—887

13) Galan A, O'Connor JE, Valbuena D, Herrer R, Remohí J, Pampfer S, Pellicer A, Simón C. The human blastocyst regulates endometrial epithelial apoptosis in embryonic adhesion. Biol Reprod 2000; 63: 430—439

14) Hsu WL, Chen YH, Chao KC, Chang S, Tsui K, Li H, Sung Y. Anti-fas activating antibody enhances trophoblast outgrowth on endometrial epithelial cells by induction of P38 MAPK/JNK-mediated apoptosis. Placenta 2008; 29: 338—346

15) Nagata S. Fas-mediated apoptosis. Adv Exp Med Biol 1996; 406: 119—124

16) Fei G, Peng W, Xin-Lei C, Zhao-Yuan H, Yi-Xun L. Apoptosis occurs in implantation site of the rhesus monkey during early stage of pregnancy. Contraception 2001; 64: 193—200

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

Synopsis

The process of human embryo implantation is initiated by an apical adhesion between two epithelia, trophectoderm and endometrial epithelial cells. Trophinin is a membrane protein mediating apical cell adhesion between trophoblastic cells and endometrial epithelial cells through homophilic trophinin-trophinin binding. Our previous study showed that trophectoderm cells of the blastocyst of primates, likely including humans, express trophinin on their cell surface. When primary cultured human endometrial epithelial cells were treated with hCG and IL-1β, these cells expressed trophinin and adhered to trophoblastic HT-H cells. In order to analyze signal transduction triggered by trophinin-mediated cell adhesion, we screened a peptide display phage library and identified GWRQ (glycine-tryptophan-arginine-glutamine) peptide. GWRQ binds to the extracellular domain of trophinin and mimics trophinin mediated cell adhesion. GWRQ activated cultured human trophoblastic HT-H cells *in vitro*, promoting invasion and proliferation. By contrast, GWRQ peptide did not activate but rather induced apoptosis of human endometrial epithelial SNG-M cells cultured *in vitro*. Results obtained in SNG-M cells are consistent with findings that human endometrial epithelial cells adhering to the blastocyst undergo apoptosis, allowing trophoblast invasion of maternal tissue. The use of SNG-M cells will enable us to define mechanisms underlying adhesion-dependent apoptosis of human endometrial epithelial cells occurring in the process of human embryo implantation.

We developed hCG-coated agarose beads, mimicking physical and physiological features of an implantation stage human blastocyst. When hCG-coated beads were applied to primary cultured human endometrial epithelial cells in the presence of IL-1β, these beads induced strong trophinin expression and morphology relevant to implantation in endometrial cells. Furthermore, hCG and IL-1β treated endometrial epithelial cells acquired the activity for apical cell adhesion with trophinin-expressing trophoblastic HT-H cells. Within a limited experiments with monkeys, we could detect a tendency to increase in pregnancy rate.

NII-Electronic Library Service