

論文の内容の要旨

リゾホスファチジン酸受容体 (LPA₃) の受精卵着床における役割

濱 弘太郎

【序】

リゾホスファチジン酸 (LPA) は、細胞遊走亢進、細胞増殖亢進、抗アポトーシス効果を持つほか、アクチン骨格の再編成や、細胞内カルシウム濃度上昇などの様々な活性を持つ生理活性脂質として知られている。これらの作用は、主に G タンパク質共役型受容体(LPA₁, LPA₂, LPA₃, LPA₄) によって担われており、LPA が各受容体を介してどのような生理的・病的機能を持つのか注目されている。これらの LPA 受容体の中でも特に LPA₃ は、精巣、子宮などの生殖系臓器に高発現しており、生殖において何らかの機能を持つことが予想されている。私は、博士課程において LPA₃ 欠損マウスの作成・解析を行い、雌ホモ欠損マウスの子宮において受精卵の着床異常を見出し LPA の全く新しい生理的機能を明らかにした。さらに、雌ホモ欠損マウスの子宮内で、正常な着床に必須と考えられているプロスタグランジン (PG) 類の産生系に異常が生じていることを示し、子宮における LPA シグナルと PG シグナルのクロストークを提唱した。

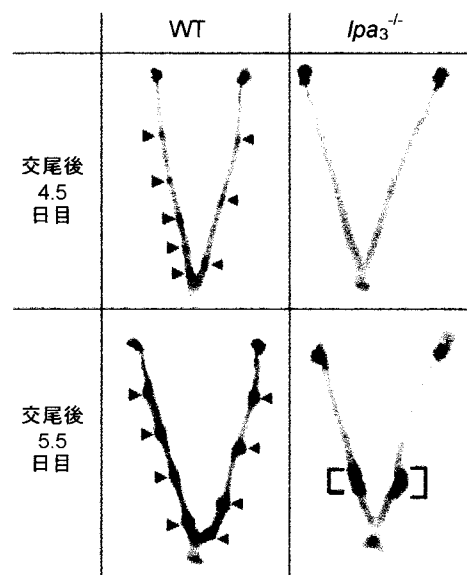
【方法と結果】

LPA₃ ホモ欠損雌マウスに見られる産仔数の減少と着床異常

Table. 1

♀	x	♂	産仔数	n
+/+		+/+	8.1 ± 2.2	29
+/-		+/-	8.1 ± 1.1	9
+/-		-/-	8.2 ± 2.3	20
-/-		+/+	3.8 ± 0.9 *	17
-/-		+/-	3.5 ± 2.1 *	16
-/-		-/-	3.1 ± 1.7 *	22

*. P<0.001, compared to +/+ x +/+



マウス LPA_3 は 3 番染色体上に 3 つのエキソンから構成されている。開始コドンが含まれる領域をネオマイシン耐性遺伝子で置換したターゲティングベクターを作成し、常法に従ってノックアウトマウスを作成した。生まれてきたホモ欠損マウスは外見上正常であり、また発育過程にも異常は見出されなかった。しかしながら繁殖の過程で、雌ホモ欠損マウスの産仔数が通常の半分以下に減少していることを見出した (Table.1)。そこで、各妊娠過程を調べたところ、 LPA_3 ホモ欠損雌マウスの排卵能、受精能、卵管輸送能については特に異常は見出されなかった。ところが、通常交尾後 4.5 日目に観察されるはずの受精卵の着床部位が、ホモ欠損マウスでは全く観察されないことを見出した (Fig.1)。また、ホモ欠損マウスでは交尾後 5.5 日目に着床部位は見られるものの、着床部位は非常に近接していた (Fig.1)。さらに、着床部位の異常が生じる過程を明らかにするため、交尾後 3.5 日目、3.8 日目、4.5 日目の子宮の連続切片を作成し、子宮内に存在する受精卵の位置を観察した。その結果、野生型では、

交尾後 3.5 日目から 3.8 日目にかけて、受精卵が子宮内で均等に配置されるのに対して、 LPA_3 ホモ欠損雌マウスでは、交尾後 3.8 日目および 4.5 日目でも受精卵どうしが非常に近接して存在していることがわかった (data not shown)。このことから、 LPA_3 を介したシグナルは、受精卵の適切な着床時期と、子宮内における均等な着床配置の両方を制御することが明らかになった。

LPA_3 ホモ欠損マウス子宮内での胎子の発生異常と胎盤共有

次に、 LPA_3 ホモ欠損マウスに見られる産仔数減少の過程を明らかにするため、着床期以降経時的に子宮内の胎仔数を計測した。着床期の子宮内に存在する受精卵数には、野生型とホモ欠損マウスの間に顕著な差は見られなかった。しかし、ホモ欠損マウスにおける生存胎仔数は妊娠の進行とともに徐々に減少した。特に、妊娠過程の進行に伴ってホモ欠損

マウスの子宮では着床部位の形態異常が顕著となり (Fig.2)、複数の胎仔間での胎盤共有 (Fig.3)、胎子の発生遅延・停止が高頻度に観察された。このことから、ホモ欠損マウスの子宮内では、着床配置の異常に起因する発生環境の悪化のために、産仔数が野生型の半分程度まで減少するものと考えられた。

子宮における LPA_3 の発現とその制御

ホモ欠損マウスでは着床過程に異常が見られたので、着床前後の時期の子宮内の LPA_3 発現量を定量 PCR 法を用いて解析した。その結果、着床開始期である交尾後 3.5 日目に LPA_3 の発現は最大になることを見出した (data not shown)。さらに、同時期の子宮内に対して *in situ* hybridization を行ったところ、子宮内膜上皮細胞に限

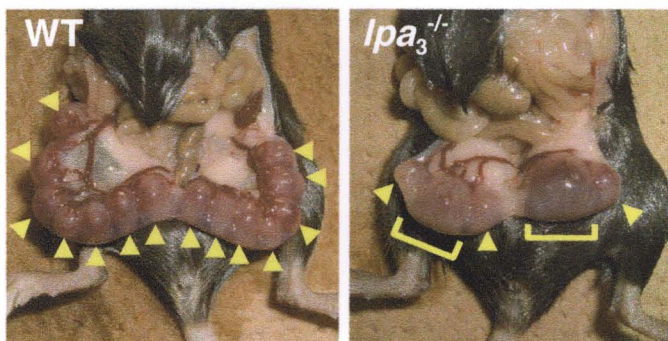


Fig.2 交尾後10.5 日目の子宮の形態
Fig.1 LPA_3 ホモ欠損雌マウスにみられる着床異常

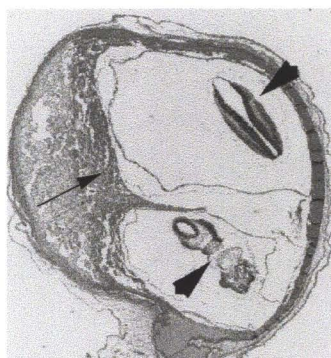


Fig.3 交尾後 10.5 日目の複数の胎子による胎盤の共有 (矢印は胎盤、矢頭は胎子を示す)



Fig.4 交尾後 3.5 日目の子宮における LPA_3 発現分布

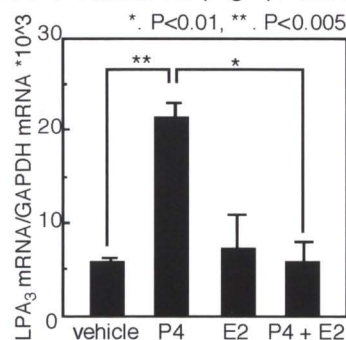


Fig.5 卵巣摘出マウスへの女性ホルモン投与による LPA_3 の発現変化

局して LPA₃ が発現していることがわかった (Fig.4)。このように LPA₃ は妊娠初期過程において大きく発現量が変動することから、LPA₃ の発現変化における女性ホルモンの関与を予想した。そこで、卵巣を摘出したマウスに対してプロゲステロン(P4)、エストロゲン(E2)を投与し、子宮における LPA₃ の発現量を解析したところ、P4 による発現量の増大が観察された。また、この発現量変化は P4 と E2 の同時投与により見られなくなったことから、LPA₃ の発現は P4 と E2 によって拮抗的に制御されているものと考えられた(Fig.5)。

LPA₃ シグナリングにおける PG の関与

これまで、シクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害剤で処理したマウスあるいはラット、および PG 産生の初発酵素である cPLA₂α ホモ欠損マウスは着床異常を示すことが報告されている。LPA₃ ホモ欠損マウスの表現型は、これらの着床不全モデル動物と類似点が多い。そこで、LPA₃ ホモ欠損マウス子宮内の PG になんらかの異常が生じている可能性を考え、ホモ欠損マウス子宮内の PG 量を定量した。その結果、PGE₂、PGI₂ はホモ欠損マウスの子宮で有意に減少しており、PGF_{2α} についても減少傾向が見られた(Fig.6)。さらに、PG 産生に重要な酵素である cPLA₂α、COX-1、COX-2 の子宮内における発現量を検討したところ、COX-2 のみホモ欠損マウスで発現量が減少していた (Fig.7)。LPA₃ シグナルが直接的に COX-2 の発現を亢進しうるかを確認するため、LPA₃ 発現細胞株に対して、有機合成化学教室との共同研究により開発した LPA₃ 選択的アゴニスト T13 を添加したところ、有意に COX-2 の発現上昇が観察された (data not shown)。これらの結果より、LPA₃ ホモ欠損雌マウスに見られる着床異常は、子宮での COX-2 発現低下、それに伴う PG の不足が原因と考えられた。そこでホモ欠損マウスへの PG 投与による、着床異常の表現型の回復を試みた。

LPA₃ ホモ欠損マウスに PGE₂ と PGI₂ の安定アナログである cPGI を同時投与したところ、投与したすべてのマウスで交尾後 4.5 日目に着床部位が観察された。しかし受精卵どうしが非常に接近して着床しており、着床の配置の異常は回復されなかった (Fig.8)。

【まとめ、考察】

本研究において私は、LPA₃ ホモ欠損雌マウスでは受精卵の着床時期と配置に異常が生じることを見出し、LPA が LPA₃ を介して時間的、空間的に受精卵の着床を制御していることを初めて明らかにした。さらに、LPA₃ を介したシグナルは、着床期の子宮において COX-2 の発現量を上昇させ、着床に重要な PG 類の産生を促進していることを示した。LPA₃ の発現はプロゲステロン (P4) によって増大した。P4 は女性ホルモンの一種であり、着床を含めた妊娠初期過程に重要な役割を持つことは以前から知られていたが、今回の結果は、着床における P4 の作用の一部が LPA₃-PG シグナル系を介していることを示唆している。PG 類の投与により、ホモ欠損雌マウスの着床の遅延は回復された。しかし、着床の配置異常については回復されなかった。従って、着床の配置を制御する LPA₃ を介したシグナルが PG シグナルとは全く別のシグナルを介している可能性がある。LPA₃ を介したシグナルが着床の

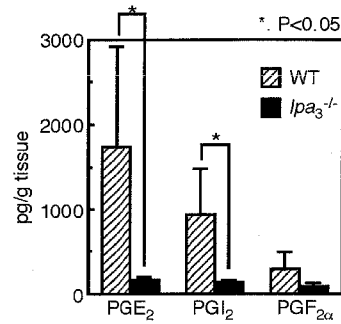


Fig.6 交尾後3.5日目の子宮内プロスタグランジン量

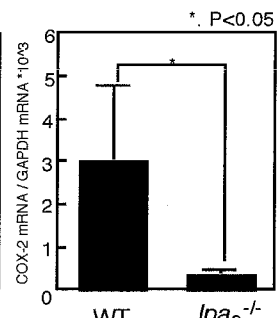


Fig.7 交尾後3.5日目の子宮内のCOX-2 発現量

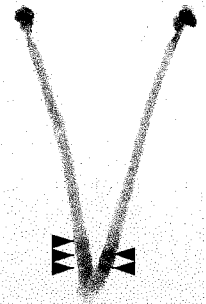


Fig.8 PG投与による着床の部分的回復

配置を制御する機構、さらには子宮における LPA の供給機構はともに今後の重要な課題である。近年、不妊症患者の増加に伴って、体外受精等の不妊治療が盛んに行われているが、体外受精の成功率は、未だ 20~30 % と低水準である。その主な要因に着床不全があげられている。しかし、着床の分子機構に関する知見は極めて乏しく、着床不全に対する有効な治療法や創薬開発は行われていないのが現状である。今回、着床に重要な G タンパク質共役型受容体が初めて明らかになったことから、LPA₃ に対するアゴニストが着床不全に対して効果的であるかという点についても、創薬開発の観点から非常に重要な今後の課題である。

【参考文献】

1. **Hama K.**, Bandoh K., Kakehi Y., Aoki J. and Arai H. : *FEBS Lett* 523:187-192, 2002
2. **Hama K.**, Aoki J., Fukaya M., Kishi Y., Sakai T., Suzuki R., Ohta H., Yamori T., Watanabe M., Chun J. and Arai H. : *J Biol Chem* 279:17634-17639, 2004
3. Ye X*, **Hama K***, Contos JA., Anlinker B., Inoue A., Skinner MK., Suzuki H., Amano T., Kennedy G., Arai H., Aoki J. and Chun J. : *Nature* 435:104-108, 2005 (* co-first author)