

## 着床前期胚の発育とその調節因子\*

河村 和弘

秋田大学医学部生殖発達医学講座産婦人科分野

(平成 20 年 5 月 8 日掲載決定)

### Preimplantation embryo development and its regulatory factors

Kazuhiro Kawamura

*Division of Obstetrics and Gynecology, Department of Reproductive and Developmental Medicine,  
Akita University School of Medicine, Akita 010-8543, Japan*

#### はじめに

生殖の重要な過程である卵成熟および受精後の胚発育は、近年の生殖補助技術の発達により生体外でも行われるようになったが、その成績は生体内のものとは比べ劣る。さらに動物実験において、体外培養によって得られた胚を移植した時の妊娠率は、生体内で発育した胚を移植した場合に比べ低下する。生体内での卵成熟および受精後の胚発育は、それぞれ卵巣および卵管・子宮由来のパラクライン因子により制御されていると考えられ、生体外では、これらの母体由来パラクライン因子が欠如することで、卵成熟不全や胚発育不全が生じていると推測される。

ヒト体外受精胚移植の臨床成績を最も左右するのは、体外培養によって得られる胚の質である。胚の質を改善するためには、体外培養による胚発育不全の分子機構を解明し、胚発育を調節する因子を明らかにすることが必要である。また、質の高い胚を得るためには、良質な成熟未受精卵を採取することも重要であるが、母体由来パラクライン因子による卵成熟機構の詳細は

明らかではない。

我々は、ヒト体外受精胚移植の臨床成績向上にむけて、母体由来パラクライン因子に着目し、その卵成熟および胚発育制御について研究を継続してきた。本稿では、秋田医学会学術賞受賞講演での講演内容を中心に、これまで我々が同定した新規因子について概説する。

#### 胚 発 育

卵巣内の卵胞中で、卵母細胞は主に下垂体由来の FSH と LH の作用により発育する。最大に発育した排卵前卵胞は、排卵刺激である LH サージに反応する能力を持ち、下垂体からの LH サージにより排卵が惹起される。排卵された卵は、その周囲を卵丘細胞と呼ばれる母体の細胞に取り囲まれており、卵管膨大部において精子と受精すると、卵丘細胞が脱落する。受精した卵は、卵割を続けながら卵管内を子宮の方向に移動し、胚盤胞と呼ばれる発育段階に到達すると子宮内に入る。子宮内で胚盤胞は透明帯という胚の殻から脱出し(hatching)、子宮内膜に接着する。接着した胚盤胞の外側の栄養膜外胚葉層はトロホプラストに分化し、子宮内膜に浸潤して着床がおこる。卵管・子宮内膜では種々の成長因子・サイトカインが産生されている。その中には、受容体が着床前期胚に存在するものがあり、胚発育に関与する可能性が考えられる (図 1)。

---

Correspondence: Kazuhiro Kawamura  
Division of Obstetrics and Gynecology, Department of Reproductive and Developmental Medicine, Akita University School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan  
Tel: 81-18-884-6163  
Fax: 81-18-884-6447  
E-mail: kawamura@yf7.so-net.ne.jp  
\*第 18 回秋田医学会学術賞

(8)

着床前期胚の発育とその調節因子

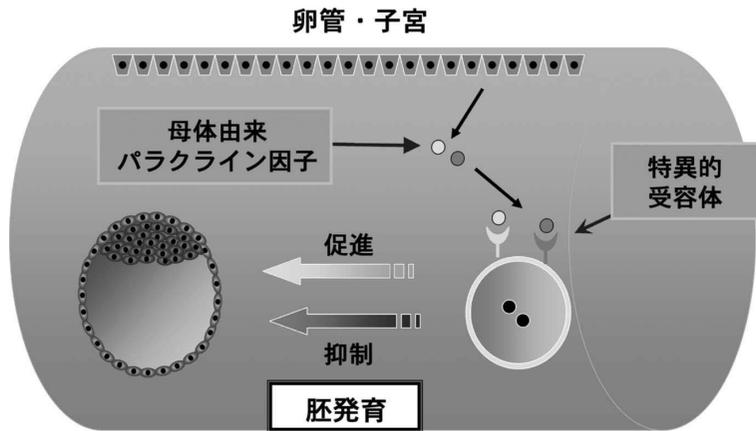


図1. 胚発育と母体由来パラクライン因子に関する仮説  
卵管・子宮で産生されたパラクライン因子が、その特異的受容体を発現している胚に作用し、胚の発育を調節する。

### 新規胚発育調節因子の同定

胚発育を調節する新規母体由来パラクライン因子を同定するため、母体卵管・子宮内膜でのリガンドの産生、着床前期胚での受容体の発現を調べ、候補因子の胚への生物学的作用について、胚発育・アポトーシスへの関与を検討した。その結果、新規胚発育調節因子として、GnRH-I、レプチン、transforming growth factor alpha (TGFA), brain derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF)を同定した<sup>1-5)</sup>。これらの因子は卵管・子宮内膜で産生され、その受容体を発現している着床前期胚に直接作用し、胚発育を促進、アポトーシスの発生を抑制した。また、グレリン、tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) が逆に胚発育を抑制することを見いだした<sup>6,7)</sup>。

### GnRH-Iのマウス着床前期胚発育促進、アポトーシス抑制作用

本稿では、我々が同定した新規胚発育調節因子の中から代表例として、GnRH-Iの成績を示した。Real-time RT-PCRによる測定の結果、GnRH-Iは子宮で発現しており、交配の前後で発現量の有意な増加は認められなかった(図2a)。一方、着床前期胚におけるGnRH-I受容体(GnRHR-I)の発現量をReal-time RT-PCRで定量したところ、初期胚盤胞期以降に発現

が急増した(図2b)。さらに、GnRH-Iの発現は胚自身でも認められ、2細胞期に高発現しており、その後発現が低下し、初期胚盤胞期以降に再度発現が増加した(図2b)。また、胚盤胞ではGnRH-I、GnRHR-Iともに、内細胞塊、栄養膜外胚葉層の双方で発現が認められた<sup>1)</sup>。これらのリガンド、受容体の発現パターンから、GnRH-Iはパラクラインおよびオートクライン双方の作用により、その受容体を発現している胚の発育を調節することが想定された。

GnRH-Iのパラクライン作用を検討するため、胚から産生されるGnRH-Iの効果を減弱させるべく2細胞期胚を多量の培養液中で個別に培養し(単独胚培養)、GnRH-Iアゴニストを添加した。2細胞期胚を144時間培養し、培養後の2細胞期胚のhatched胚盤胞への到達率を観察し、caspase-3 assayにより胚のアポトーシス発生を測定したところ、GnRH-Iアゴニストは胚の発育を促進し、アポトーシスの発生を抑制することが明らかとなった(図2c)。次に、GnRH-Iのオートクライン作用を検討するため、2細胞期胚を少量の培養液中で多数同時に培養し(集合胚培養)、培養液中のGnRH-I濃度を増加させた状態でGnRH-Iアンタゴニストを添加した。パラクライン作用の検討と同様の方法で、hatched胚盤胞到達率、胚のアポトーシス発生を調べたところ、GnRH-Iアンタゴニストにより胚の発育は抑制され、アポトーシスの発生が増加した(図2d)。さらに、GnRH-Iアンタゴニストによるアポトーシスの発生は、アポトーシスの内因経路に関与

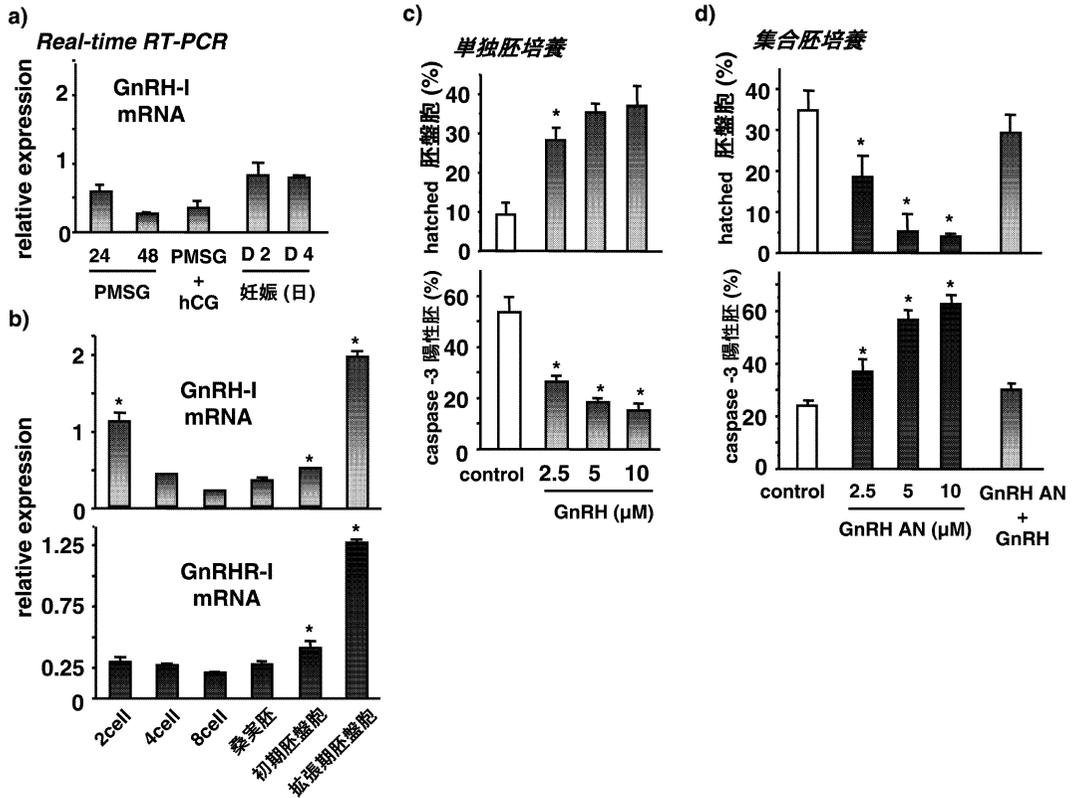


図2. GnRH-Iの着床前期胚発育促進, アポトーシス抑制作用

(a) 子宮におけるGnRH-I mRNAの発現変化. ゴナドトロピン投与, 妊娠によってGnRH-I mRNAの発現量は変化しない. PMSG: pregnant mare serum gonadotropin, hCG: human chorionic gonadotropin, (b) 着床前期胚におけるGnRH-I, GnRHR-I mRNAの発現変化. GnRH-I, GnRHR-I mRNAの発現量は胚の発育段階で変化する. (c) GnRHアゴニスト(GnRH)の胚発育(上段), アポトーシス(下段)への作用. GnRHアゴニストは, 単独胚培養において2細胞期胚のhatched胚盤胞までの発育を促進し, アポトーシスの発生(caspase-3陽性胚)を抑制する. (d) GnRHアンタゴニスト(GnRH AN)の胚発育(上段), アポトーシス(下段)への作用. GnRHアンタゴニストは, 集合胚培養において2細胞期胚のhatched胚盤胞までの発育を抑制し, アポトーシスの発生を増加させる. これらのGnRHアンタゴニストの作用は過剰量のアゴニストによりブロックされ, GnRHR-Iを介した作用と考えられる. \*,  $P < 0.05$  (文献1より一部改変)

するcaspase抑制剤の同時添加によりブロックされたことから, ミトコンドリアの機能破綻が重要となる内因経路が関与していることが示唆された(図3a). 実際, GnRH-Iアンタゴニストにより, 胚盤胞の活性化ミトコンドリアの減少(図3b), ミトコンドリア内のシトクロムCの細胞質への放出が認められた(図3c). 以上から, GnRH-Iはパラクラインおよびオートクライン作用により胚の発育を促進し, アポトーシスを抑制することが明らかとなった.

### マウス着床前期胚のアポトーシス制御に重要なアポトーシス抑制因子の同定

着床前期胚に発現しているアポトーシス抑制因子のうち, ノックアウトマウス表現型の文献的考察から, inhibitor of apoptosis (IAP)ファミリーであるsurvivin (baculoviral IAP-repeat-containing 5; BIRC5)以外のノックアウトマウスのホモ着床前期胚は正常に発育することから, survivinが着床前期胚のアポトーシス抑制に重要であると考え, 着床前期胚においてアンチセンスによるsurvivinの発現抑制を

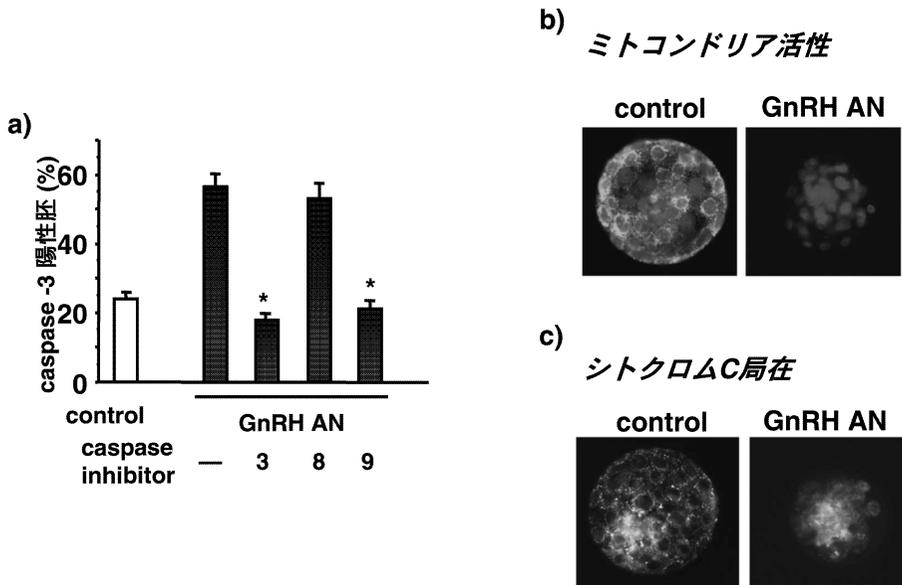


図3. GnRH-Iの胚のアポトーシス抑制機構

(a) GnRH アンタゴニスト (GnRH AN) による胚のアポトーシス誘導に対する各 caspase 抑制剤の作用。アポトーシスの内因経路に関与する caspase-3, -9 の抑制剤により, GnRH アンタゴニストのアポトーシス誘導作用がブロックされる。(b, c) GnRH アンタゴニストによってアポトーシスを誘導した胚のミトコンドリア活性 (b) とシトクロム C の細胞内局在 (c)。活性化ミトコンドリアに取り込まれ, 蛍光を発する dye は, GnRH アンタゴニスト処理した胚ではほとんど認められない。免疫染色により, コントロールではミトコンドリアの局在に一致して認められたシトクロム C は, GnRH アンタゴニスト処理した胚では, 細胞質内にびまん性に広がり, ミトコンドリアからの放出が示唆される。\*,  $P < 0.05$  (文献 1 より一部改変)

行い, そのアポトーシス抑制作用について調べた。RT-PCR による検討では, survivin は全ての発育段階の胚に発現が認められた(図 4a)。また, エクソン 2 が消失したスプライズバリエーション (238 bp) は 4 細胞期胚, 胚盤胞, 拡張期胚盤胞のみに認められた(図 4a)。免疫染色によるタンパク質 Supica-Syobou, ベルの検討では, RT-PCR と同様の発現を認め, 胚盤胞においては, 内細胞塊, 栄養膜外胚葉層の双方で発現が認められた<sup>9)</sup>。アンチセンスにより survivin の発現を抑制した胚は, ほとんどが桑実胚から初期胚盤胞で発育が停止し, caspase 3 assay および核の形態学的変化からアポトーシスを生じていることが明らかとなった(図 4b)。survivin アンチセンスによる胚のアポトーシス発生は, アポトーシス誘導剤である staurosporine を正常胚ではアポトーシスを誘導しない濃度 (0.1  $\mu\text{M}$ ) で作用させ<sup>9)</sup>、胚にストレスを付加するとより顕著に認められた(図 4c)。これらの結果から, survivin が着床前期胚のアポトーシス制御に重要であることが示さ

れた。

#### 母体由来パラクライン因子による胚のアポトーシス抑制因子の発現調節

本稿では, 代表例として, TGFA による survivin の発現調節のメカニズムを示した。Caspase3 assay による検討では, 単独胚培養において TGFA はマウス胚盤胞のアポトーシス発生を抑制し(図 5a), その効果は TGFA の中和抗体によりブロックされた<sup>9)</sup>。同じ系において, real-time RT-PCR により survivin の発現量を測定したところ, TGFA は survivin の発現量を増加させた(図 5b)。さらに, アンチセンスにより survivin の発現抑制を行った胚は, コントロール, ミセンス群で認められた TGFA によるアポトーシス抑制効果が消失した(図 5c)。これらの結果から, TGFA は survivin の発現増加により胚のアポトーシス抑制作用を示すことが明らかとなった。さらに, TGFA による

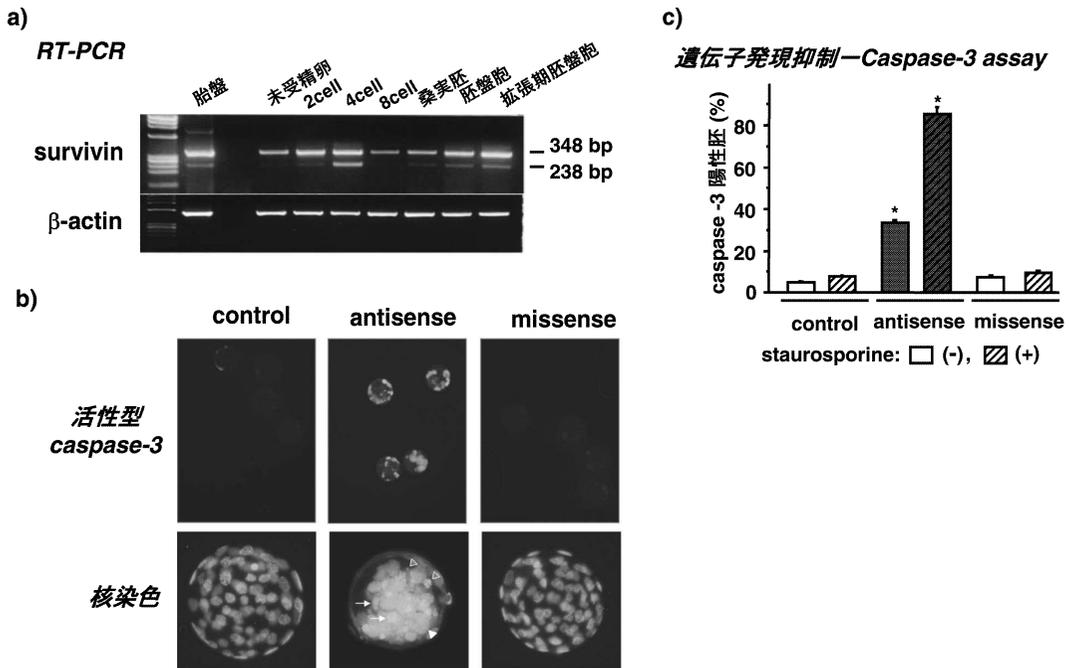


図4. 着床前期胚における survivin のアポトーシス抑制因子としての役割

(a) 着床前期胚の survivin mRNA の発現。Full length の survivin (348 bp) は全ての発育段階の胚に発現している。エクソン2が消失したスプライスバリエーション (238 bp) は4細胞期胚、胚盤胞、拡張期胚盤胞のみに発現している。(b, c) アンチセンスによる survivin 発現抑制の胚の変化 (b)、アポトーシスの誘導 (c)。アンチセンスにより胚の survivin 発現を抑制すると、アポトーシスが誘導される。その作用は staurosporine による胚ストレスにより増強される。\*,  $P < 0.05$  (文献8より一部改変)

胚のアポトーシス抑制の分子機構を明らかにするため、TGFA のアポトーシス抑制のシグナル経路として知られている phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) の着床前期胚における発現を RT-PCR にて調べたところ、全ての発育段階の胚に発現が認められた<sup>3)</sup>。PI3K の抑制剤である LY294002 (LY) および wortmannin (WO) を胚に作用させ、胚盤胞における survivin の発現量を real-time RT-PCR で測定したところ、TGFA による survivin の発現増加作用が認められず、TGFA は PI3K 経路を介して survivin の発現量を増加させることが示された (図5d)。

### 卵成熟

卵巣内に存在する第一減数分裂前期の卵母細胞は、完全に成長したものでも、受精・発生能をもたない未成熟な卵である。卵成熟には核成熟と呼ばれる、第1減

数分裂前期で停止していた卵が減数分裂を再開し、第2減数分裂中期に達する核の形態学的な変化と、細胞質成熟と呼ばれる、核成熟とは区別される、卵の受精能および初期胚へと発生する能力がある。卵の核成熟および細胞質成熟は、LH サージによって誘導されることが知られている。しかし、卵巣における LH 受容体は、卵巣顆粒膜細胞、莢膜細胞に局在しており、卵には殆ど発現していないため、卵の核成熟および細胞質成熟には、顆粒膜細胞、莢膜細胞由来のパラクライン因子が関与していると考えられるが、その詳細は明らかではない (図6)。

### 新規卵成熟パラクライン因子の同定

卵成熟を誘導する母体由来パラクライン因子を網羅的に同定するため、DNA マイクロアレイ (Affymetrix mouse MGU74v2 array; 遺伝子数 > 45,000 genes) を

(12)

着床前期胚の発育とその調節因子

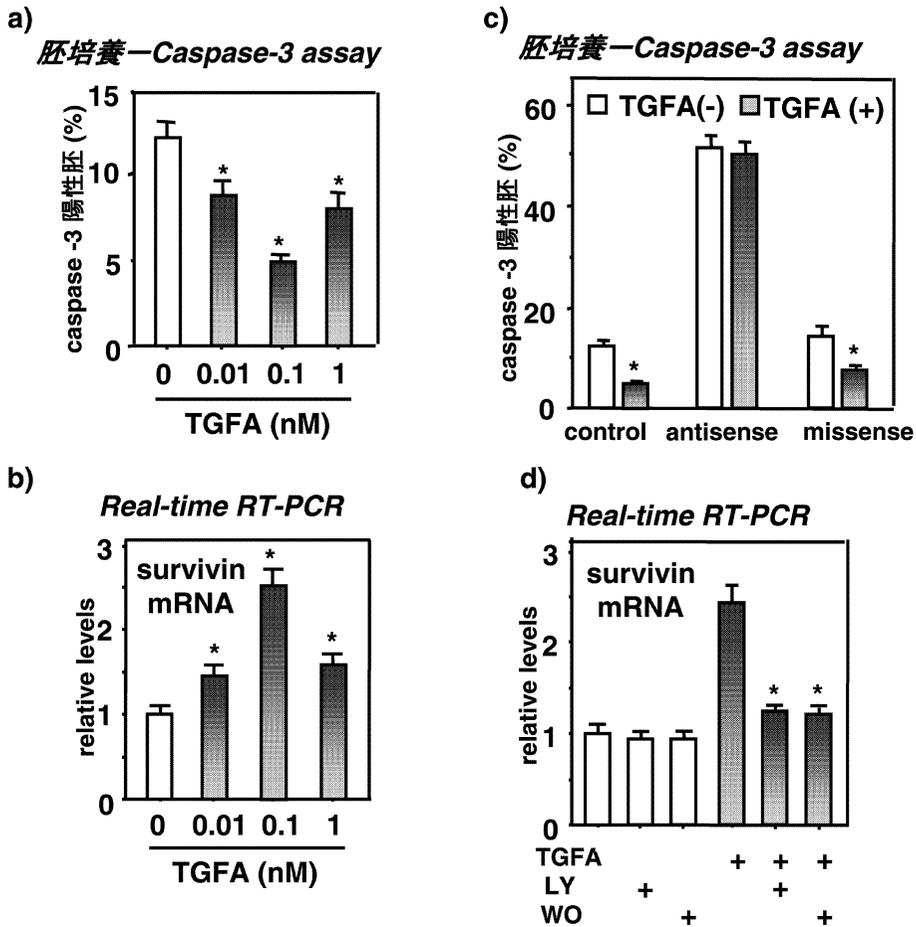


図5. TGFAによる着床前期胚のアポトーシス抑制機構

(a) TGFAによる着床前期胚のアポトーシス抑制作用. TGFAは、胚のアポトーシスの発生(caspase-3陽性胚)を抑制する。(b) TGFAによる着床前期胚のsurvivin発現増加作用. TGFAは胚のアポトーシスを抑制するとともに、survivinの発現を増加とさせる。(c) アンチセンスによってsurvivinの発現を抑制した胚へのTGFAのアポトーシス抑制作用. コントロール、ミスセンス群で認められたTGFAによる胚のアポトーシス抑制作用は、アンチセンス群では認められないことから、TGFAはsurvivinの発現増加により抗アポトーシス作用を示す。(d) PI3K抑制剤のTGFAによる胚のsurvivin発現増加作用のブロック. TGFAによる胚のsurvivin発現増加効果はPI3K抑制剤(LY: LY294002, WO: wortmannin)によって打ち消される.\*、 $P < 0.05$  (文献3より一部改変)

用いて、LHサージ後にマウス卵巣で発現が上昇する、リガンドとしての分泌タンパクまたはその受容体の遺伝子を候補因子として抽出した。その結果、100以下の遺伝子数に絞り込むことができた。これらの候補因子の卵巣内局在を、単離した卵、顆粒膜細胞、卵丘細胞におけるreal-time RT-PCR、卵および卵巣における免疫染色またはELISAにより検討し、LHによるリガンドおよび受容体の発現調節についてRNA・タンパ

クレベルで検証した。受容体が卵または卵丘細胞に存在し、体細胞にてリガンドが産生されている因子で、リガンドまたは受容体の発現がLHにて誘導されるものを最終的な候補因子としたところ、最終候補遺伝子数は24となった。これらの候補因子に対して、*in vitro* および *in vivo* アッセイにより、卵成熟への作用を検討した結果、母体由来新規卵成熟因子として、BDNF<sup>9)</sup>、insulin-like 3 (INSL3)<sup>10)</sup>、GDNF<sup>5)</sup>、を同定

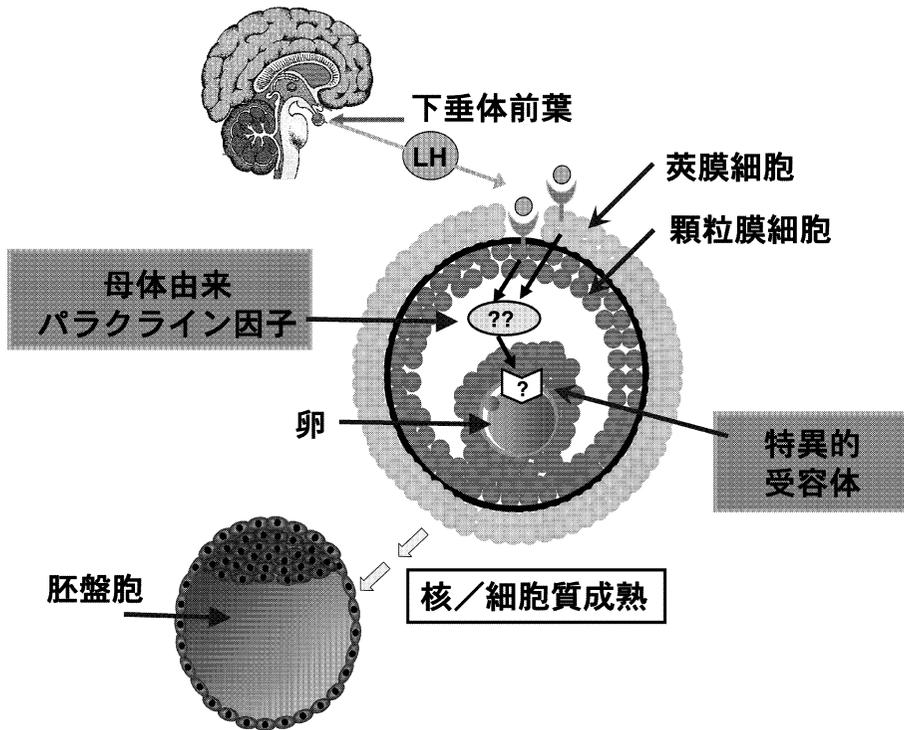


図6. 卵成熟と母体由来パラクライン因子に関する仮説

下垂体前葉より LH サージとして産生された LH は、その受容体を発現している卵巣莢膜・顆粒膜細胞に作用し、それらの細胞から産生される局所のパラクライン因子が、その特異的受容体を発現している卵に作用して卵成熟が誘導される。

した。

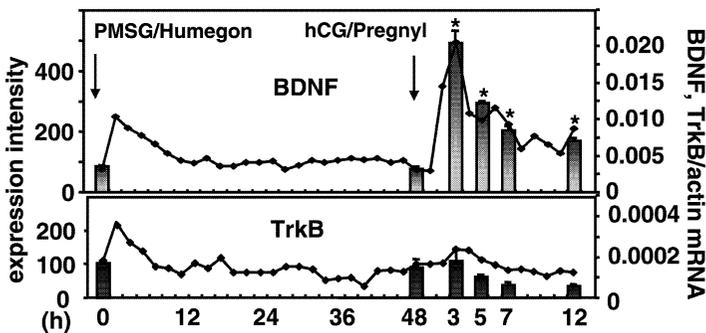
### BDNF の卵成熟促進作用

本稿では、我々が同定した新規卵成熟因子の中から代表例として、BDNF の成績を示した。DNA マイクロアレイと real-time RT-PCR による検証の結果、マウス卵巣における BDNF mRNA の発現は、hCG 投与後に発現が増加し、3 時間でピークに達し、その後漸減した。一方、受容体の TrkB mRNA の発現は hCG にて変化しなかった (図 7a)。ELISA によるタンパクレベルの検討では、BDNF の発現は hCG 投与後 7 時間でピークに達することから<sup>9)</sup>、BDNF の核成熟への作用は、生体内で LH サージ後数時間で惹起される卵核胞崩壊の促進ではなく、その後の第 1 極体放出を誘導する可能性が示唆された。免疫染色および RT-PCR の結果から、BDNF は卵巣顆粒膜細胞にて産生され、

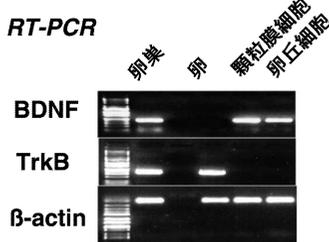
受容体の TrkB は卵に特異的に発現していることが明らかとなった (図 7b, c)。BDNF の卵核胞崩壊への影響を検討するため、排卵前卵胞培養を行ったところ、BDNF は卵核胞崩壊を誘導しなかったが<sup>9)</sup>、卵-卵丘細胞複合体培養を用いて、第 1 極体の放出への作用を検討したところ、BDNF は第 1 極体の放出を促進した (図 8a)。この作用は TrkB の細胞外ドメインまたは Trk 抑制剤でブロックされたことから、TrkB を介した特異的な作用であることが示された<sup>9)</sup>。さらに、細胞質成熟への作用を調べるため、未成熟卵の体外成熟-体外受精-胚培養を行い、受精率、胚盤胞到達率を測定した。また、卵の受精能を反映し、細胞質成熟の指標の一つとして考えられている卵細胞内グルタチオン濃度を測定した。BDNF は卵の体外成熟-体外受精-胚発育試験で、受精率・胚盤胞到達率を向上させる作用を有し、成熟卵のグルタチオンレベルを増加させ、卵の細胞質成熟を促進することが明らかとなった (図 8b)。

(14)

着床前期胚の発育とその調節因子

a) *line graph: DNA マイクロアレイ; bar graph: real-time RT-PCR*

b)



c)

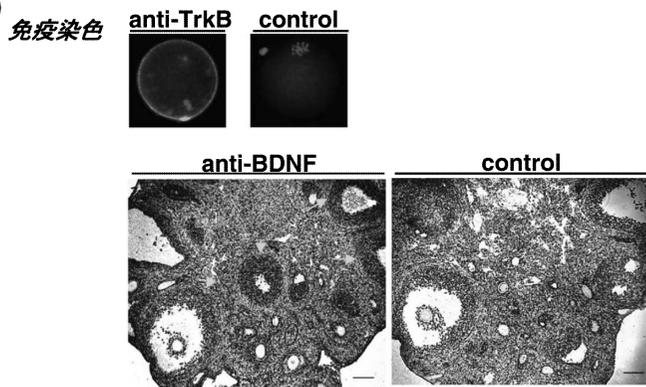


図7. マウス卵巣における, BDNF, TrkB のゴナドトロピン投与による発現変化 (a) と BDNF, TrkB の局在 (b, c)

BDNF の発現は hCG により急増し, hCG 後 3 時間でピークに達しその後漸減する. 一方, BDNF の受容体である TrkB の発現はゴナドトロピン投与では変化しない. BDNF は卵巣顆粒膜細胞および卵丘細胞で産生され, TrkB は卵に特異的に発現している. (文献 9 より一部改変)

FSH 刺激後に雌マウスに Trk 抑制剤を投与し, hCG 投与により排卵させて第 1 極体放出率を測定したところ, 第 1 極体放出の抑制が認められた. さらに, Trk 抑制剤を投与したマウスを交配させ, 動物あたりの得られた胚盤胞数, 胚盤胞あたりの細胞数を調べたところ, 胚盤胞数・胚盤胞細胞数の減少が認められ (図 8c), BDNF が生体内で卵成熟因子として重要な働きを持つことが示された.

### おわりに

我々は, 一連の研究により胚発育不全の分子機構を解明し, 胚の発育を調節する因子を明らかにしてきた. さらに, 母体由来パラクライン因子が卵成熟に重要で

あることも示してきた. これらの研究成果により, 新たな卵・胚培養液の開発に関する特許を取得した. 今後は, 動物実験からヒトへの応用を進め, ヒト体外受精胚移植のさらなる治療成績向上を目指していきたい.

### 謝 辞

研究をご指導頂きました田中俊誠教授, 並びに, 研究活動を支援してくださいました秋田大学医学部感覚器学講座皮膚形成外科学分野の河村七美先生, 秋田大学医学部生殖発達医学講座産婦人科分野の皆様に感謝申し上げます.

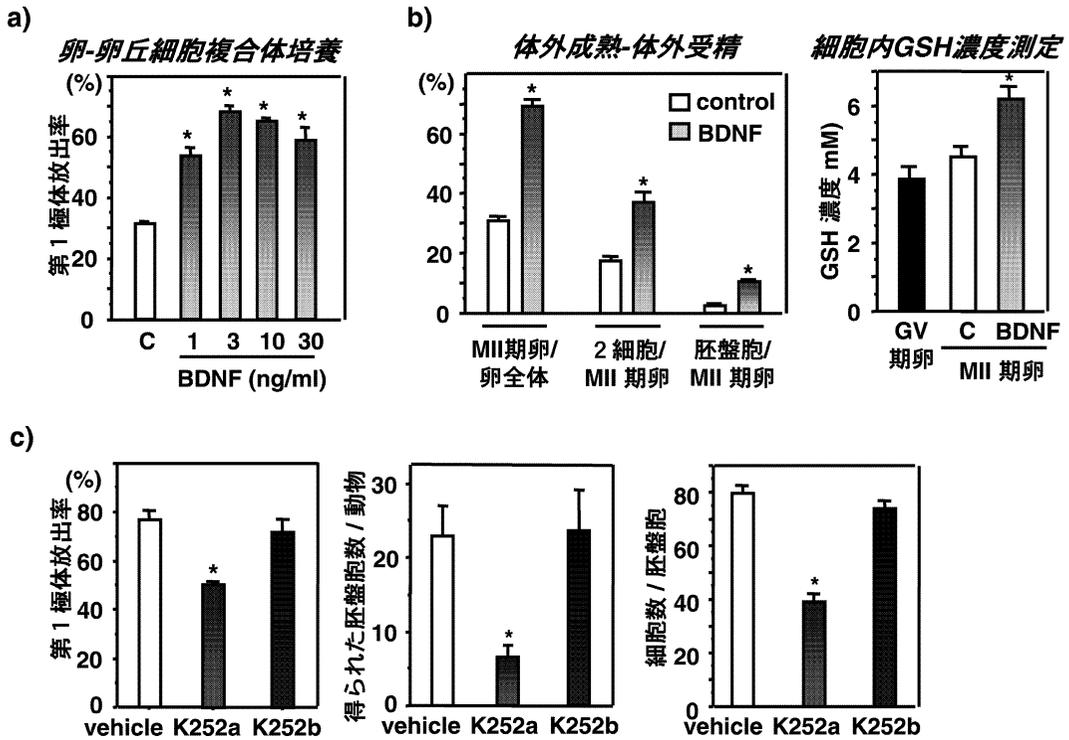


図8. BDNFの卵成熟作用

(a) *in vitro*における第1極体放出作用。BDNFは第1極体の放出を促進する。C: control (b) *in vitro*における細胞質成熟作用。BDNFは卵の受精率(2細胞/MII期卵), 胚発育率(胚盤胞/MII期卵)を促進する。体外成熟において, BDNFは核成熟卵の細胞質成熟の指標となる細胞内グルタチオン(glutathione; GSH)濃度を増加させる。GV期卵: 未熟卵。(c) *in vivo*における卵成熟作用。In vivoでTrk抑制剤を作用させ, 卵巣におけるBDNF/TrkBシグナルを抑制すると, 卵の第1極体の放出が抑制され, 動物あたりの得られる胚盤胞数が減少し, 胚盤胞あたりの細胞数が減少する。K252a: Trk抑制剤, K252b: 細胞膜非透過型。(文献9より一部改変)

## 文 献

- 1) Kawamura, K., Fukuda, J., Kumagai, J., Shimizu, Y., Kodama, H., Nakamura, A. and Tanaka, T. (2005) Gonadotropin-releasing hormone I analog acts as an antiapoptotic factor in mouse blastocysts. *Endocrinology*, **146**, 4105-4116.
- 2) Kawamura, K., Sato, N., Fukuda, J., Kodama, H., Kumagai, J., Tanikawa, H., Nakamura, A. and Tanaka, T. (2002) Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Endocrinology*, **143**, 1922-1931.
- 3) Kawamura, K., Fukuda, J., Shimizu, Y., Kodama, H. and Tanaka, T. (2005) Survivin contributes to the anti-apoptotic activities of transforming growth factor alpha in mouse blastocysts through phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Biol. Reprod.*, **73**, 1094-1101.
- 4) Kawamura, K., Kawamura, N., Fukuda, J., Kumagai, J., Hsueh, A.J. and Tanaka, T. (2007) Regulation of preimplantation embryo development by brain-derived neurotrophic factor. *Dev. Biol.*, **311**, 147-158.
- 5) Kawamura, K., Ye, Y., Kawamura, N., Jing, L., Groenen, P., Gelpke, M.S., Rauch, R., Hsueh, A.J. and Tanaka, T. (2008) Completion of Meiosis I of preovulatory oocytes and facilitation of oocyte maturation by brain-derived neurotrophic factor. *Endocrinology*, **143**, 1922-1931.

(16)

## 着床前期胚の発育とその調節因子

- tion of preimplantation embryo development by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Dev. Biol.*, **315**, 189-202.
- 6) Kawamura, K., Sato, N., Fukuda, J., Kodama, H., Kumagai, J., Tanikawa, H., Nakamura, A., Honda, Y., Sato, T. and Tanaka, T. (2003) Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Endocrinology*, **144**, 2623-2633.
- 7) Kawamura, K., Kawamura, N., Kumagai, J., Fukuda, J. and Tanaka, T. (2007) Tumor necrosis factor regulation of apoptosis in mouse preimplantation embryos and its antagonism by transforming growth factor alpha/phosphatidylinositol 3-kinase signaling system. *Biol. Reprod.*, **76**, 611-618.
- 8) Kawamura, K., Sato, N., Fukuda, J., Kodama, H., Kumagai, J., Tanikawa, H., Shimizu, Y. and Tanaka, T. (2003) Survivin acts as an antiapoptotic factor during the development of mouse preimplantation embryos. *Dev. Biol.*, **256**, 331-341.
- 9) Kawamura, K., Kawamura, N., Mulders, S.M., Sollewijn Gelpke, M.D. and Hsueh, A.J. (2005) Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 9206-9211.
- 10) Kawamura, K., Kumagai, J., Sudo, S. *et al.* (2004) Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7323-7328.