

マウス血清を用いた初期の妊娠維持に必須な *Dedd* 遺伝子の発現解析の一例安齋政幸^{1,2}, 藤野奈央³, 堀光一郎³, 尾崎美樹⁴, 野田義博⁵, 松本和也^{1,2,3}

要 旨

着床から胎盤形成までに形成される脱落膜は、着床胚に対する栄養分の輸送や胎児と母体間での免疫拒絶を防ぐ役割も担っている。その脱落膜形成において重要な働きをもつ DEDD (Death effector-domain containing protein) は、子宮内における脱落膜細胞の分化に関係する。本実験では、初期の妊娠維持に重要とされる *Dedd* の発現の検出をマウス微小採血により検出を試みた。自然交配により得られた妊娠個体は、非妊娠個体と比較し交配成立後 5.5 日目に発現の上昇が認められた。さらに脱落膜形成後の妊娠期間(9.5,15.5 日)では発現の減少が確認され妊娠の成立および出産を確認した。これらのことから、微小採血を用いた *Dedd* 発現を指標にした妊娠判定の可能性が示唆された。

キーワード : マウス、*Dedd* 遺伝子、脱落膜

1. 緒 論

母体と胎児を認識するための最初の過程で形成される脱落膜には、NK 活性や LAK 活性を持つ多くの細胞やサイトカインが妊娠の維持のみならず胎児の拒絶に関与している可能性が示されている⁽¹⁾。脱落膜は、胎盤形成時までの着床胚に栄養分や成長因子を供給し、加えて胎子と母体の免疫拒絶を防ぐ役割を持つ。マウスでは、4.5 日齢で着床時より増殖していた胚の周囲組織が脱落膜へ分化し、8.5 日齢で胎盤が形成されるまでの期間で重要な働きを持ち、特に 4.5 日齢から 6.5 日齢の間、胚の中心部から子宮外部に向けて脱落膜化が急速に進行する。また、脱落膜組織の形成には、プロゲステロンやエストロゲンなどのステロイドホルモンが重要な働きを持つ⁽²⁾。マウスでは、交配成立後 1 日目でエストロゲンが急増し、2 日目から卵巣でプロゲステロンレセプターの産生が増加することで黄体が形成される。その後、プロゲステロンが生成され、子宮内膜間質細胞を増殖させる前脱落膜化が起こる。4 日目には卵巣からのエストロゲン分泌が急増し、子宮内膜で発現誘導された白血病抑制因子 (LIF) が子宮内腔へ分泌され、子宮上皮細胞表面にある LIF 受容体に結合することで子宮内での胚盤胞の受容体制が整い、妊娠 4.5~5.5 日目までに行われる着床と着床刺激により、子宮内膜間質細胞が脱落膜細胞に分化する⁽³⁾。この脱落膜形成時に発現上昇するタンパク質として DED タンパク質ファミリーの一つである、Death effector domain-containing protein (DEDD) が同定された⁽⁴⁾。

この機能を欠失させた *Dedd* ノックアウトマウスでは、着床後に脱落膜形成がされず 5.5~9.5 日齢

原稿受付 2020 年 12 月 25 日

1. 近畿大学先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1
2. 近畿大学大学院生物理工学研究科 生物工学専攻 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
3. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
4. アドベンチャーワールド 〒649-2201 和歌山県西牟婁郡白浜町堅田 2399
5. (地独) 東京都健康長寿医療センター研究所 〒173-0015 東京都板橋区栄町 35-2

までの間に胚が死亡することが報告されており⁽⁵⁾、*Dedd* 遺伝子の発現量を指標として妊娠初期における脱落膜形成の正常化やその後の胎児形成を予測できることが示されている⁽⁶⁾。さらに、着床後の細胞数の急激な増殖に伴う *Esr1* 遺伝子の発現がその後の正常な妊娠の維持に必須とされている⁽⁷⁾。これは、*Esr1* 遺伝子における脱落膜化の調整を行うエストロゲンやプロゲステロンなどのステロイドホルモンが子宮への標的器官へ結合することが示されており、*Esr1* 遺伝子を欠損したマウスでは、脱落膜形成に異常が起こり、妊娠継続が正常に起こらないことが示されている^(8, 9, 10)。本実験では、交配成立後の妊娠初期に重要とされる *Dedd* の発現をマウス微小滴採血により検出し、妊娠判定に応用できる可能性を検討した。

2. 材料と方法

(1) 供試動物

供試動物として、成熟齢に達した MCH(ICR)マウス (日本クレア(株))を用いた。マウスの搬入後、12 時間照明下 (明期:7:00-19:00、暗期:19:00-7:00) において 1 週間以上馴化した後に実験へ供試した。飼育環境は、室温 23±2°C、湿度 50%とし、飼料 (CRF1R: オリエンタル酵母工業(株))を不断給餌し、飲料水は自由摂取させた。なお、本実験における実験動物の飼養と管理および動物実験の立案や苦痛度の管理は、近畿大学動物実験規程に準じて行った。

(2) マウスの交配および血液試料の調整

マウスの採血は、未経産成熟個体を用いて眼窩静脈叢より採血を実施した。その後、発情周期の確認を行い、発情前期を示す個体を同系統の雄マウスと同居させ自然交配を行った。交配翌日に膣栓を確認できたものを 0.5 日とし、5.5、9.5、15.5 日齢に経時的な採血を行った。採血後の血液は、1.5mL チューブ内で 2 時間静置し、4,000rpm、20 分間遠心処理後に上清を回収した。血清は実験に供するまで -80°C 下で保存した。また、自然交配により得られた妊娠マウスは、妊娠満了となる 19.5 日齢で自然分娩の有無により正常個体と判断し、それ以降に分娩を認める個体を着床遅延個体とし、それぞれの産子数を記録した。

(3) 血清試料からの RNA 抽出および cDNA 合成操作

各血清試料 50μL からの RNA 抽出は、NucleoSpin[®] RNA Plus (740984.50, Takara Bio)を用いて行った。プロトコールに従い抽出した試料から、カラム内へ溶出された RNA は、RNase-free Water を 60μL 加え回収した。抽出した RNA 試料の一部 (8μL)を滅菌 PCR チューブに移した後、プロトコールに従い、各試料へ PrimeScript[™] RT Master Mix (RR036A, Takara Bio)を 2μL 添加し混合し、サーマルサイクラーを用いて逆転写反応を行った。反応温度条件は、37.0°C で 15 分逆転写反応後、85.0°C で酵素の失活を起こし cDNA を合成した。なお、合成した cDNA は 4°C 下で qPCR に供試するまで保存した。

(4) 脱落膜組織の採取

qPCR の検量線の作成のために、採血時と同様の方法で交配成立後、5.5 日齢の雌マウスから脱落膜組織を採取した。安楽死処分後、開腹し子宮角を切断後、子宮間膜と子宮壁を切開し脱落膜を摘出した(図 1)。採取した脱落膜は、30mg 毎に 1.5mL チューブに入れ、-80°C 下で使用時まで保存した。NucleoSpin[®] RNA Plus (740984.50, Takara Bio)のサンプル溶解液 Buffer LBP 100μL を脱落膜と共にバイオマッシャー-III (320302,

Nippi)のフィルターチューブ上加え、パワーマッシャーII (891300, Nippi)を用いて破碎し、遠心処理後ペレットと溶解液から RNA 抽出を施し cDNA 合成を行った。

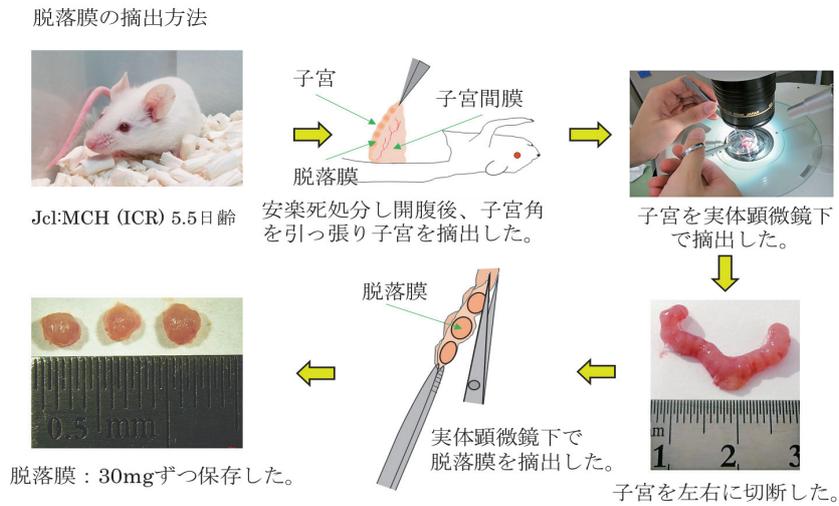


図 1. 妊娠マウスからの脱落膜の摘出

(5) qPCR 反応

qPCR 反応は、作製した検量線用サンプルと血清由来 cDNA を用いて TB Green[®] Fast qPCR Mix (RR430S, Takara Bio)を用いて実施した。Mixture は、TB Green (2×) 5.0μL に各 Primer の Forward と Reverse を 0.5μL ずつ添加し、超純水(DW)を 2.0μL 添加後ボルテックスにより攪拌した溶液を 8μL ずつ MyGo Pro & Mini Single Tube individual bag (7688, Funakoshi)および MyGo Pro 8 Well Tube Strips individual BAG (7023, Funakoshi)、MyGo Pro 8 Well Cap Strips individual BAG (040, Funakoshi)にそれぞれ分注した。その後、各 cDNA または DW を 2μL ずつ添加した後、Realtime PCR, MyGoPro 1337 を用いて測定した。得られたデータは $\Delta\Delta C_t$ 法により、*Gapdh* の C_t 値をもとに標準化した。なお、反応条件および各プライマー配列は図 2 に示した。

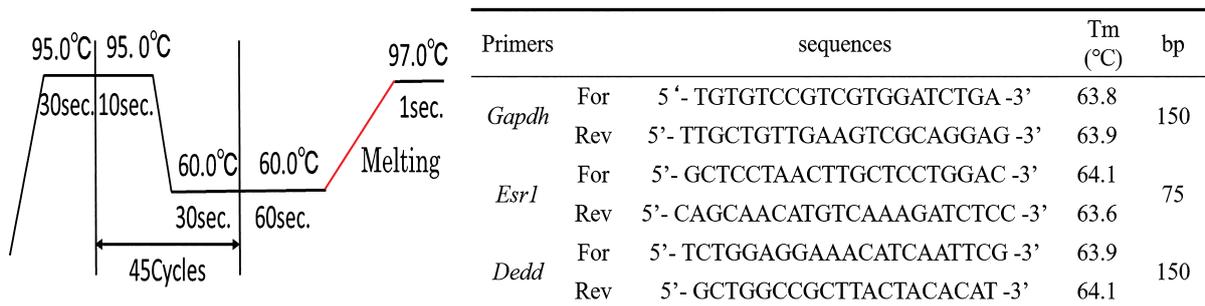


図 2. *Esr1* および *Dedd* 遺伝子の qPCR 反応条件およびプライマー配列

3. 結果

自然交配による妊娠が成立したマウスでは、4.5 日齢から子宮組織への着床が成立し、脱落膜組織への分化が開始された後 7.5~9.5 日齢で胎盤の形成が開始される。また、交配成立後 4.5 日齢前後に誘起される血中エストロゲン濃度の一過性な上昇によって子宮内での初期胚受容能力を獲得するこ

とで、上皮細胞へのエストロゲン依存的な接着性を有すると考えられており、この刺激に対して作用促進的に働くレセプターは *Esr1* 遺伝子でコードされる $ER\alpha$ があることが確認されている⁽¹¹⁾。しかしながら、卵巣切除あるいは卵巣切除と黄体ホルモン投与の併用によって妊娠を継続したマウスにおいては、遅延着床が誘起され子宮内での胚盤胞発生と産子の低下が認められる^(12, 13)。

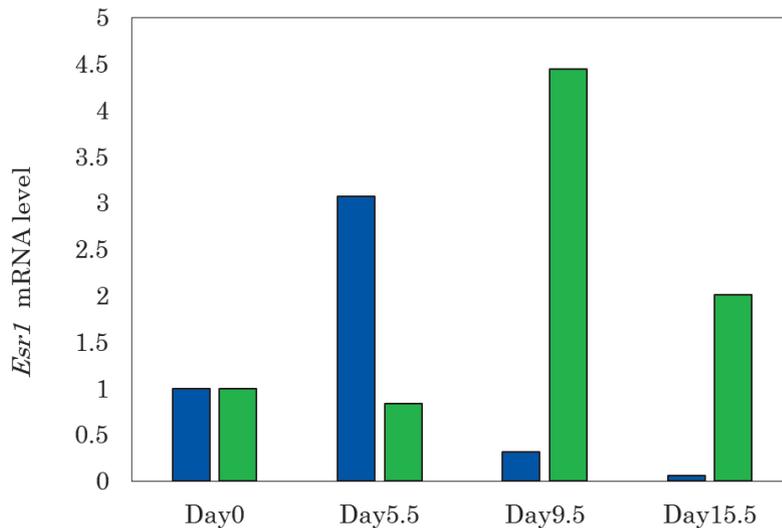


図 3. 非妊娠時から妊娠 15.5 日齢までのマウス血清を用いた *Esr1* 発現変化の一例
青：個体 A 緑：個体 B

図 3 では、遺伝子発現の比較の結果、個体 B で着床遅延が疑われた妊娠 5.5 日齢、9.5 日齢、15.5 日齢での血清試料を用いた *Esr1* 遺伝子の定量化について qPCR を用いて比較した。その結果、正常個体 A では妊娠 5.5 日齢での発現上昇を認め、その後 9.5 および 15.5 日齢では発現の減少が確認された。一方、着床遅延が疑われる個体 B において 5.5 日齢では発現の上昇が認められず、その後の *Esr1* の発現は 9.5 日齢において上昇を示し、15.5 日齢まで発現が認められた。

表 1 では、自然交配下で得られた着床遅延を疑う個体 B への産子への発生成績を示す。後藤らは、4 元交配により遺伝的背景を均一化し生産されている出産率は、平均 13 匹であり着床遅延や著しい産子率の低下は認められないことを報告した⁽¹⁴⁾。本結果においても妊娠成立後、通常 19.5 日目で出産を迎えた正常個体では平均 14.2 匹の産子の発生が認められる。しかしながら、本試験において着床遅延を疑われた個体 B では、交配成立後出産までに 22.5 日を要し産子への発生は 3 匹と著しい低出産数であった。

表 1. 自然交配により得られた着床遅延マウスの産子発生数

個体	出産数(匹)	妊娠期間(日)*
A	19	19.5
B	3	22.5

*交配成立日を 0.5 日齢とする

交配成立後、着床に向けて発生した初期胚が胚受容能力を備えた子宮内膜と接着するために、プロゲステロン産生によって着床開始前に子宮内膜間質細胞の脱落膜化が起こる。マウスにおいては、このプロゲステロン産生と接着反応を誘起する指標としてエストロゲンの上昇が認められ、正常な着床状態を示すエストロゲン存在下では膜結合型エストロゲン受容体の活性により *Dedd* の発現が認められる⁽¹⁵⁾。成熟雌マウス微量血清を用いた、交配成立後 5.5、および 9.5、および 15.5 日齢における *Dedd* 遺伝子の発現量を qPCR で定量した結果を図 4 に示す。正常な出産日を認めた個体は、非妊娠時から妊娠 5.5 日齢において *Dedd* 発現上昇を認め、9.5 日齢および 15.5 日齢ではその発現が減少することを確認できた。

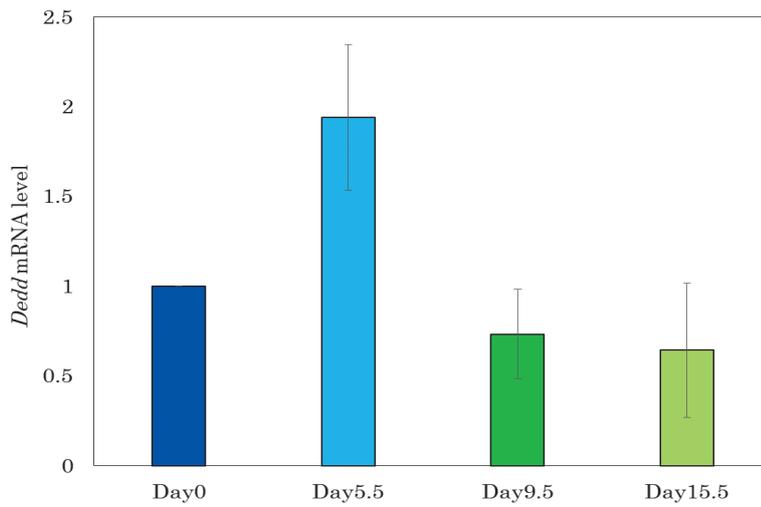


図 4. 非妊娠時から妊娠 15.5 日齢までの雌マウス血清を用いた *Dedd* 発現変化 (n=4)

4. 考察

エストロゲンは、マウスにおいて妊娠 4 日齢の血液内で胚盤胞を受容するために分泌量の上昇がみられ、その後減少することが知られている⁽¹⁶⁾。本実験に用いた血清からの *Esr1* 遺伝子の発現は、正常妊娠個体 A では、5.5 日齢で発現量がピークになりその後に減少することを確認できることから、エストロゲンホルモンとその受容体の発現量には相関性があると考えられる。また着床遅延が疑われ、産子数が著しく少なかった個体 B では、*Esr1* 遺伝子の発現上昇のピークが 9.5 日齢であり、その後に発現の減少が見られた。脱落膜化が起こる子宮間質細胞内で *Esr1* 遺伝子を欠損したマウスでは胚の着床が妨げられ産子数が減少することが報告されている⁽¹⁷⁾。また、産子数と妊娠期間には負の相関があり、産子数が少ないと妊娠期間が延びることから⁽¹⁸⁾、*Esr1* 遺伝子の発現の増加の遅れが子宮への着床の遅延、さらには産子数の減少と妊娠期間の延長を生じさせたと考えられる。

胚と子宮とのクロストークは、段階的に子宮内膜への対峙と接着そして破壊と再構築を繰り返す。Tamura らは、子宮間膜間質細胞を用いた脱落膜誘導の結果、mRNA の発現を認める 223 の遺伝子を同定し、子宮間膜間質細胞が脱落膜化を受けるために必要なグルコース取り込みに関与している可能性のあるインスリンシグナル伝達に影響する⁽¹⁹⁾。また、細胞周期と細胞質増加に寄与することで子宮間膜間質細胞への脱落膜化誘導を担う *Dedd* 遺伝子は、子宮組織では 5.5 日齢で発現上昇が見られ、その後減少が起こる⁽²⁰⁾。今回、マウス血清を用いた結果においても子宮組織と類似する結果が得られ

た。マウスでは、交配成立後 4.5 日齢に胚盤胞の子宮内膜組織への付着により子宮内膜血管透過性が増加し胚盤胞と栄養膜が母体の血液と直接接触する⁽²¹⁾。また、妊娠母体は血管新生をもとに細胞増殖が得られ分化のために着床および脱落膜化の際の子宮血管透過性を制御することが示されており⁽²²⁾、げっ歯類で示されている物理的な刺激以外の脱落膜化形成のみならず^(23, 24)、DEDD が持つ Akt とサイクリン D3 シグナルを介する共結合により子宮組織内の環境要因として、*Dedd* 遺伝子の発現量が増加する可能性が示唆された。

5. 結論

本実験では、初期の妊娠維持に重要とされる *Dedd* の発現の検出をマウス微小滴採血により試みた。自然交配により膣栓を確認した雌個体の眼窩静脈叢より経時的に採血後、遠沈処理にて血清区画を精製しリアルタイム PCR にて定量解析をおこなった。自然交配により得られた妊娠個体は、非妊娠個体と比較し交配成立後 5.5 日目に発現の上昇が認められた。さらに、脱落膜形成後の妊娠期間(9.5,15.5 日)では発現の減少が確認された。また、*Dedd* 遺伝子の発現が検出された個体は、いずれも妊娠の成立および出産を確認した。これらのことから、微量血液からも妊娠判定が有効である可能性が示された。

6. 謝辞

Jcl: MCH(ICR)マウスコロニーの生産方法について情報を提供いただいた、日本クレア (株) 土居良信先生へ感謝申し上げます。

本研究の一部は、近畿大学学内研究助成「展示動物からの細胞・配偶子を用いた新規生物多様性保全技術の開発と動物園・水族館との統合研究連携モデルの構築」の支援を受けた。

7. 参考文献

- (1) Sumit, R., Eeic, O. L. (2019) Cell atlas reveals the landscape of early pregnancy. *Nature* 563, 337-338.
- (2) 杉野法広 (2004) 活性酸素を介した生殖戦略:子宮と卵巣における活性酸素とその消去酵素の役割、*山口医学* 53, 9-19.
- (3) Egashira, M., Hirota, Y. (2013) Uterine receptivity and embryo-uterine interactions in embryo implantation: lessons from mice. *Reprod Med Biol.* 12, 127-132.
- (4) Stegh, A. H., Schickling, O., Ehret, A., Scaffidi, C., Peterhänsel, C., Hofmann, T. G., Grummt, I., Krammer, P. H., Peter, M. E. (1998) DEDD, a novel death effector domain-containing protein, targeted to the nucleolus. *EMBO J.* 17, 5974-5986.
- (5) Mori, M., Kitazume, M., Ose, R., Kurokawa, J., Koga, K., Osuga, Y., Arai, S., Miyazaki, T. (2011) Death effector domain-containing protein (DEDD) is required for uterine decidualization during early pregnancy in mice. *J Clin Invest.* 121, 318-327.
- (6) Kong, S., Han, X., Cui, T., Zhou, C., Jiang, Y., Zhang, H., Wang, B., Wang, H., Zhang, S. (2016) MCM2 mediates progesterone-induced endometrial stromal cell proliferation and differentiation in mice. *Endocrine* 53, 595-606.
- (7) 池田和博、井上聡 (2014) エストロゲン受容体と関連因子による代謝調節の解明とがん増殖における役割、*埼玉医科大学雑誌* 42, 7-10.

-
- (8) Hewitt, S. C., Goulding, E. H., Eddy, E. M., Korach, K. S. (2002) Studies using the estrogen receptor alpha knockout uterus demonstrate that implantation but not decidualization-associated signaling is estrogen dependent. *Biol Reprod.* 67, 1268-1277.
 - (9) Lydon, J. P., DeMayo, F. J., Funk, C. R., Mani, S. K., Hughes, A. R., Montgomery, C. A. Jr., Shyamala, G., Conneely, O. M., O'Malley, B. W. (1995) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 9, 2266-2678.
 - (10) Pawar, S., Laws, M. J., Bagchi, I. C., Bagchi, M. K. (2015) Uterine epithelial estrogen receptor- α controls decidualization via a paracrine mechanism. *Mol Endocrinol.* 29, 1362-1374.
 - (11) 加々良尚文、野口眞三郎 (2019) 内分泌療法耐性機序としての *ESR1* 遺伝子変異、日本内分泌外科学会雑誌 36, 96-100.
 - (12) 鈴木春男、石田一夫 (1985) 着床遅延マウスにおける胚盤胞の子宮内分布、家畜繁殖学雑誌 31, 225-230.
 - (13) Kamemizu, C., Fujimori, T. (2001) Distinct dormancy progression depending on embryonic regions during mouse embryonic diapause. *Biol Reprod.* 100, 1204-1214.
 - (14) Goto, T., Yasuda, M., Shimomura, C., Ito, M., Tanaka, T., Takahashi, K., Narabe, Y., Yagoto, M., Ka, Y., Osura, T., Takahashi, R., Kawai, K., Hiroki, K., Shinohara, H. (2017) Establishment of a supply system of germfree mice Jcl:MCH(ICR)[Gf] (1) Production efficiency. *Exp Anim.* 66, S120.
 - (15) Ma, W. G., Song, H., Das, S. K., Paria, B. C., Dey, S. K. (2003) Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 2963-2968.
 - (16) Egashira, M., Hirota, Y. (2013) Uterine receptivity and embryo-uterine interactions in embryo implantation: lessons from mice. *Reprod Med Biol.* 12, 127-132.
 - (17) Lee, S., Kang, D. W., Spivey, S. H., Krust, A., Lee, E. T., Koo, Y., Cheon, Y., Gye, M. C., Chambom, P., Ko, C. Y. (2009) Theca-specific estrogen receptor-alpha knockout mice lose fertility prematurely. *Endocrinology* 150, 3855-3862.
 - (18) 泉水直人、梅村建夫、水野英夫 (1975) 実験的に胎子数を調整されたラットの産子数と妊娠期間および分娩時刻について、家畜繁殖誌 20, 125-131.
 - (19) Tamura, I., Ohkawa, Y., Sato, T., Suyama, M., Jozaki, K., Okada, M., Lee, L., Maekawa, R., Asada, H., Sato, S., Yamagata, Y., Tamura, H., Sugino, N. (2014) Genome-wide analysis of histone modifications in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol.* 28, 1656-1669.
 - (20) 森真弓、新井郷子、宮崎徹 (2011) 不妊症の新しいメカニズム—初期妊娠の子宮環境における *DEDD* 分子の重要性—、日本生殖内分泌学会雑誌 16, 15-19.
 - (21) Cha, S., Sun, X., Dey, S. K. (2012) Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med.* 18, 1754-1767.
 - (22) Matsumoto, H., Sato, E. (2017) Uterine angiogenesis during implantation and decidualization in mice. *Reprod Med Biol.* 5, 81-86.
 - (23) Lim, H. J., Wang, H. (2010) Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. *J Clin Invest.* 120, 1004-1015.
 - (24) Kobayashi, A., Behringer, R. R. (2003) Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nat Rev Genet.* 4, 969-980.

英文抄録

Expression analysis of the *Dedd* gene required maintenance of early pregnancy using mouse serum

Masayuki Anzai^{1,2}, Nao Fujino³, Kouichiro Hori³, Miki Ozaki⁴, Yoshihiro Noda⁵, Kazuya Matsumoto^{1,2,3}

Abstract

Decidualization, occurring between implantation and placenta formation, is a critical process for feeding nutrients to the embryo and the establishment of immunotolerance. DEDD (Death effector-domain containing protein) is involved in the differentiation of decidual membrane in the uterus. In this study, we detected the expression of *Dedd*, which is important for maintaining early pregnancy, by infinitesimal blood and serum in mice. Continuous blood sampling and PCR analyses detected increased expression of the *Dedd* gene in pregnant females on 5.5 days post coitum. All pregnant females showed the decrease of *Dedd* expression on 9.5 and 15.5 days post coitum, and gave successful birth. These results suggest that *Dedd* is a potential marker to detect pregnancy by simple and easy PCR method.

Key Words: mouse, *Dedd* gene, decidual membrane,

-
1. Institute of Advanced Technology, Kindai University, 14-1 Minamiakasaka, Kainan, Wakayama, 642-0017, Japan.
 2. Division of Biological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, 930 Nishimitani, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan.
 3. Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, 930 Nishimitani, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan.
 4. ADVENTURE WORLD, 2399 Katada, Shirahama-cho, Nishimuro-gun, Wakayama, 649-2201, Japan.
 5. Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo, 173-0015, Japan.