

子宮内膜上皮から分泌される細胞外分泌顆粒の役割

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室 講師 浜谷敏生

はじめに

エクソソームを含む細胞外分泌顆粒(Extra membrane vesicle: EMV)は、がん細胞や免疫細胞などから放出され、テトラスパニン (CD9, CD81 など)をはじめとするタンパク質や miRNA など細胞機能を制御する分子を内包し、細胞間情報伝達に重要な役割を果たしていることが知られている。生殖細胞の分野でも、受精の過程で、卵細胞から CD9 を含む EMV が放出され、囲卵腔でそれを受け取った精子のみが卵に接着・侵入できることが報告されている¹⁾。ここでは、国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部の宮戸健二先生との共同研究の成果をもとに、子宮内膜からも CD9 を含む EMV が分泌されていることやその機能について紹介させていただきたい。

Keywords: EMV、エクソソーム、CD9、反復着床不全、内膜菲薄化、VEGF

マウス子宮内膜細胞における CD9 の発現と子宮内腔への EMV 分泌
マウス子宮内膜上皮細胞における CD9 の発現を検討したところ、性周期に伴う局在変化が認められた。発情期と発情間期では基底膜側に CD9 が局在するのに対し、着床期では基底膜と対側の子宮内腔側に局在しており、性周期に応じた CD9 の再配置が起こることが明らかとなった(図 1)²⁾。

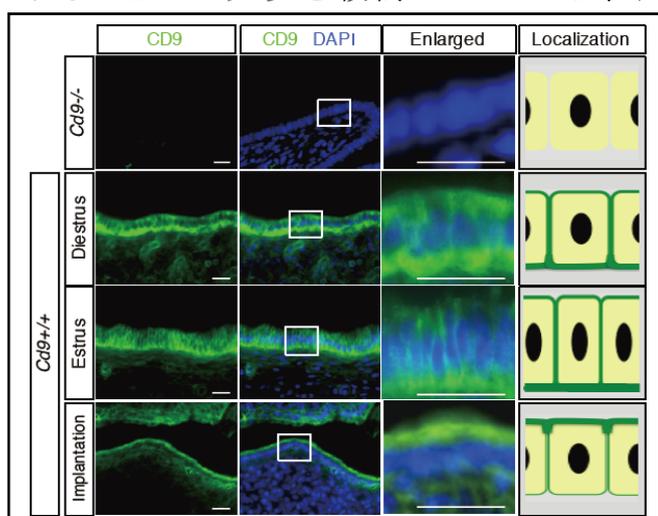


図 1 マウス子宮内膜上皮細胞における CD9 蛋白の性周期による局在変化(文献 2)

さらに、着床期の CD9 の局在と胚の着床部位は一致していた²⁾。またマウス子宮内腔液中での CD9 の分泌量を、性周期別にイムノブロット法により解析したところ、全性周期を通じ CD9 の分泌を認めるものの、発情期のマウス子宮内腔液中で最も多くの CD9 が検出された (図 2 a)³⁾。

また、子宮内膜上皮細胞における CD9 含有量を性周期別に検証したところ、発情期で最も低下していた²⁾。一方、コントロールとして用いたマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) や月経血由来ヒト iPS 細胞の培養上清では CD9 は検出感度以下であった。

次に、発情期の子宮内腔液から遠心分離により EMV 分画を抽出し、免疫電子顕微鏡像を取得したところ、金コロイドで標識した抗 CD9 抗体が前述した卵子由来の EMV に類似した構造体 (マイクロエクソソーム)⁴⁾ が観察された (図 2 b-d)³⁾。以上の結果から、全性周期を通じて子宮内腔液中に含まれ、特に発情期に子宮内膜上皮細胞から CD9 が多く分泌されると考えられた。

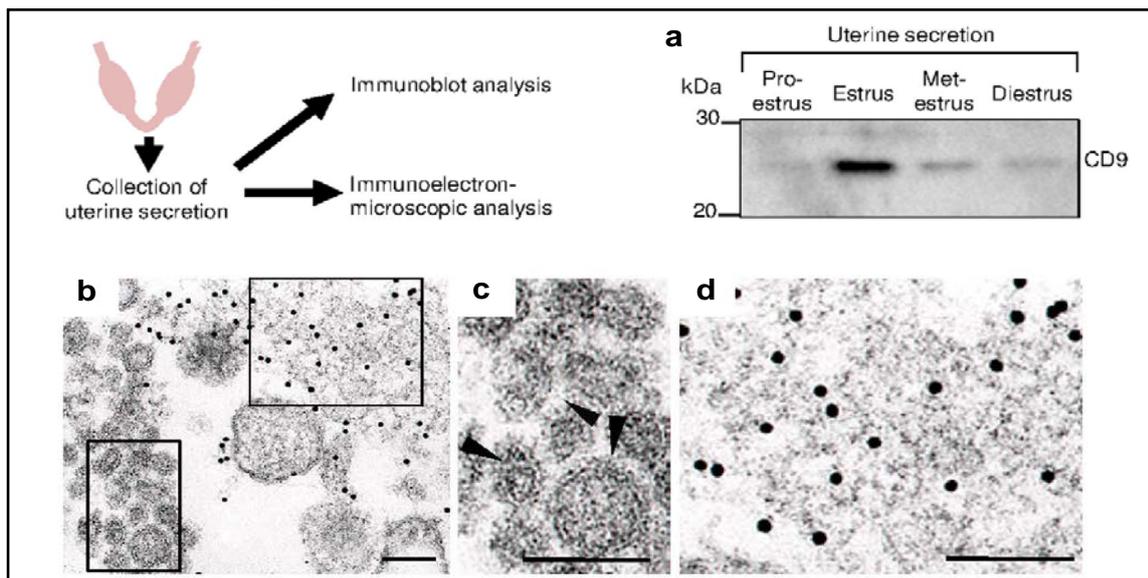


図 2 マウス子宮内腔液中の CD9 とマイクロエクソソーム (文献 3)

- a マウス子宮内腔液のイムノブロッティング、
- b マウス子宮内腔液中マイクロエクソソームの免疫電顕

マウス子宮内膜における CD9 の役割 (CD9 欠失マウスの解析)

CD9 欠損マウスは卵細胞により EMV の分泌不全による受精障害を呈する¹⁾。そこで、CD9 欠損マウスに卵細胞特異的に CD9 の発現を回復させたトランスジェニックマウス (CD9-*l*-TG) を作成したところ、1 回目の出産時の産仔数は回復したが、2 回目以降の出産では産

仔数が激減することが明らかとなった(図3a)³⁾。CD9^{-/-}TGの初回出産後の子宮内膜上皮の再生過程について組織学的に検討したところ、出産後のCD9^{-/-}TGの子宮内膜では野生型マウスに比べて、上皮および間質の再生が遅延し、一部では癒着も生じ子宮内腔の狭小化も認められた(図3b, c)。

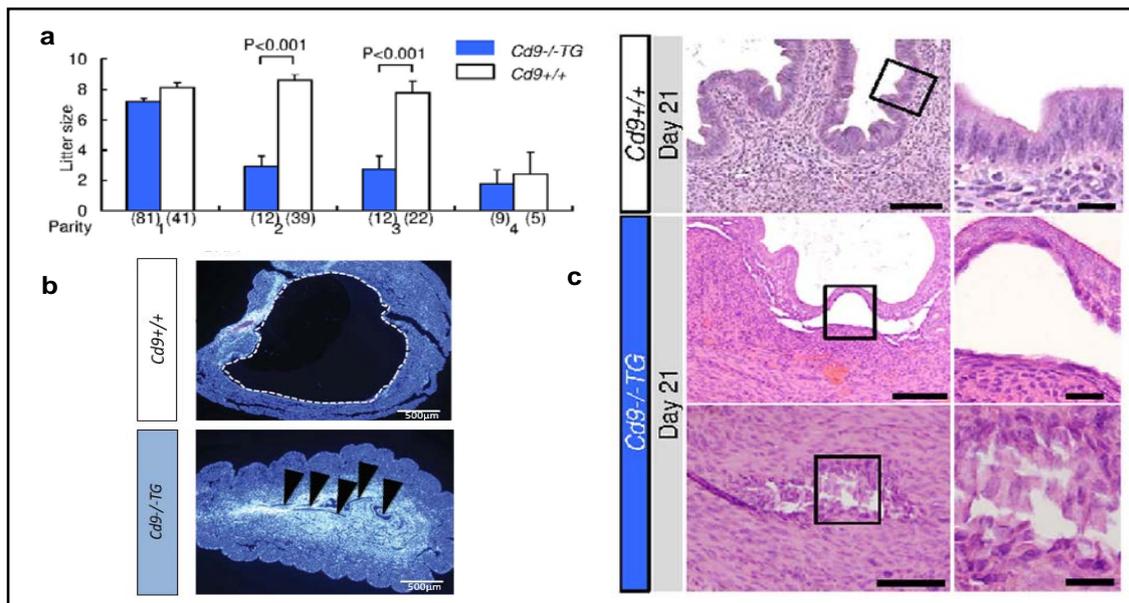


図3 CD9^{-/-}TGの分娩当たりの産仔数(a)と出産後の子宮内膜再生(b, c) (文献3)

その原因を検索するため、初回妊娠前の発情期のCD9^{-/-}TGと野生型マウスの子宮を摘除し、透過型電子顕微鏡にて解析したところ、CD9^{-/-}TGの子宮内膜上皮細胞では野生型と比較して、特に発情期における微絨毛が粗かつ短小化しており、また、子宮内膜上皮細胞内のミトコンドリア数が優位に減少していることが明らかとなった²⁾(図4)。また、子宮内腔液を回収し各種液性因子を定量したところ、CD9^{-/-}TGの子宮内腔液ではG-CSFとVEGF-Aの有意な減少が認められた³⁾。免疫沈降による解析により、VEGF-Aは子宮内腔ではCD9と複合体を作っていることも明らかとなった(図5)³⁾。そこで、CD9^{-/-}TG出産後の子宮内腔内に、VEGF-Aを含んだセファロースビーズを投与したところ、野生型マウスと同様な子宮内膜の再生が観察された³⁾。これらのことから、分娩後の子宮内膜上皮におけるCD9はEMVの分泌を介してVEGF-Aを子宮内腔に分泌し、子宮内膜再生に寄与していると考えられた。

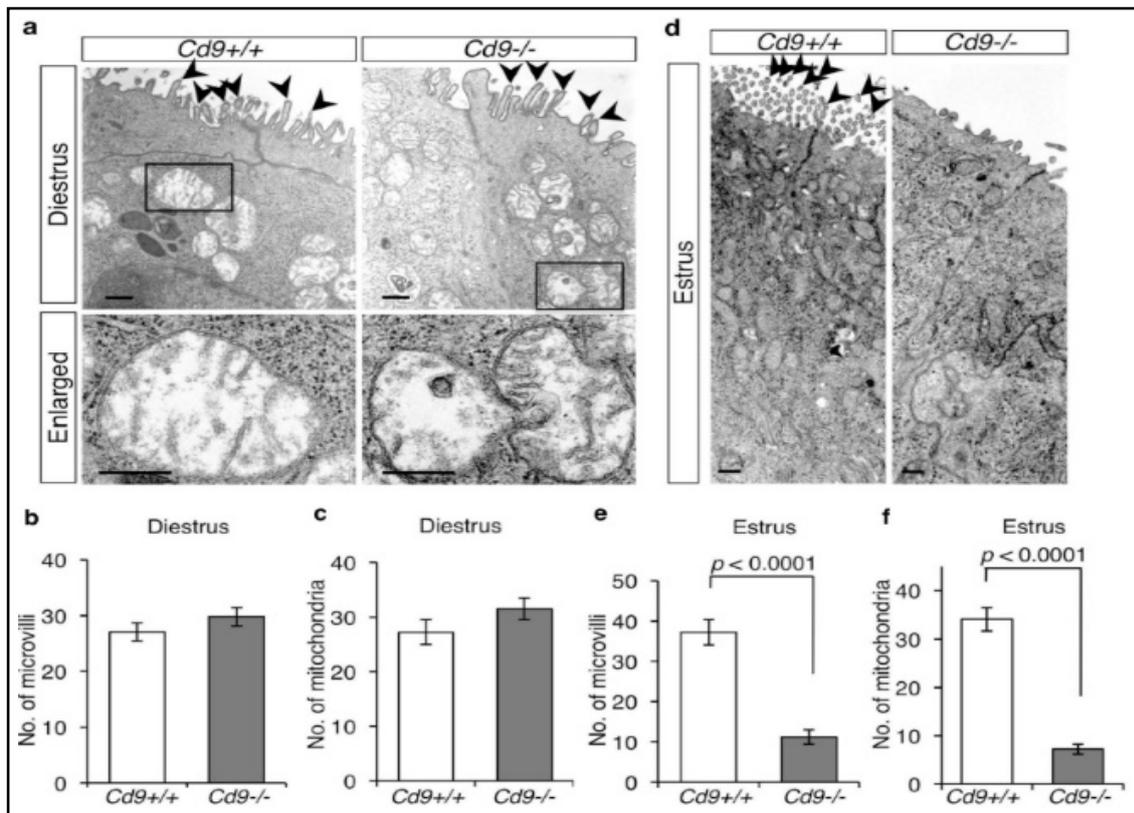


図4 マウス子宮内膜上皮細胞の微絨毛に関する電顕的観察（文献2）
 （CD9欠損型と野生型の比較）発情間期（a-c）と発情期（d-f）における微絨毛とミトコンドリアの電顕写真（a, d）、微絨毛数（b, e）、ミトコンドリア数（c, f）

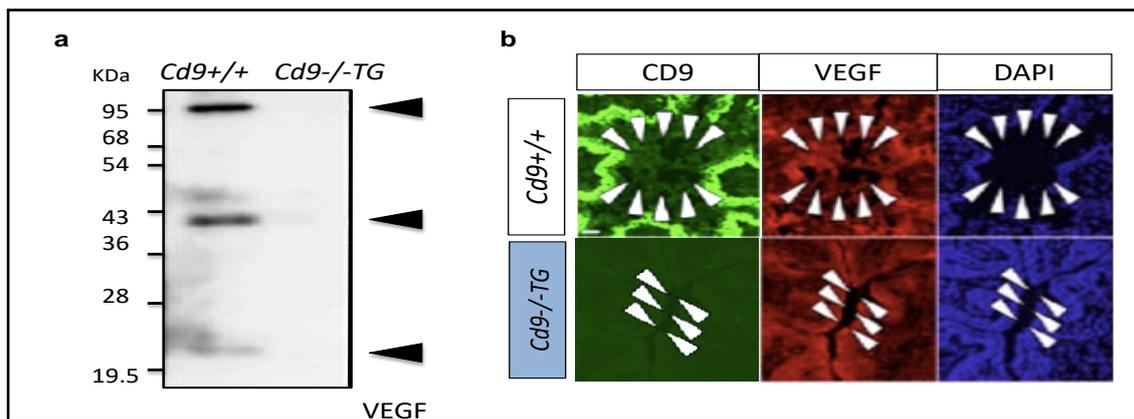


図5 マウス子宮内腔液のイムノブロッティングと子宮内膜および子宮内腔内容の免疫染色（文献3）
 a 野生型では VEGF の 1 量体、2 量体、4 量体が検出されているが、CD9-/-TG では VEGF が検出されていない。
 b 野生型では子宮内膜上皮および子宮内腔に VEGF の発現が認められたが、CD9-/-TG では上皮に発現を認めるものの、内腔には認められなかった。

ヒト子宮内腔への CD9 分泌量の解析

ヒトでは分娩後のみならず月経の度に子宮内膜の大規模な再生が必要となるため、ヒト CD9 は子宮内膜における着床環境の整備に寄与している可能性が示唆される。

そこで、反復着床不全患者に十分な説明を行い同意を得た後、着床期子宮腔洗浄液についてイムノブロッティングを行い、子宮内腔洗浄液中の CD9 の有無と患者背景の関連について検討した³⁾。子宮内腔洗浄液より CD9 が確認されたが、CD9 が確認できない症例もみられた(図 6a)。D&C 既往、内膜菲薄化(排卵期内膜厚<8.5mm)、反復着床不全のある(少なくとも 2 回の良好胚移植で妊娠が認められなかった)症例で、子宮内腔液中の CD9 の陰性化率が有意に高かった(図 6b)

³⁾。

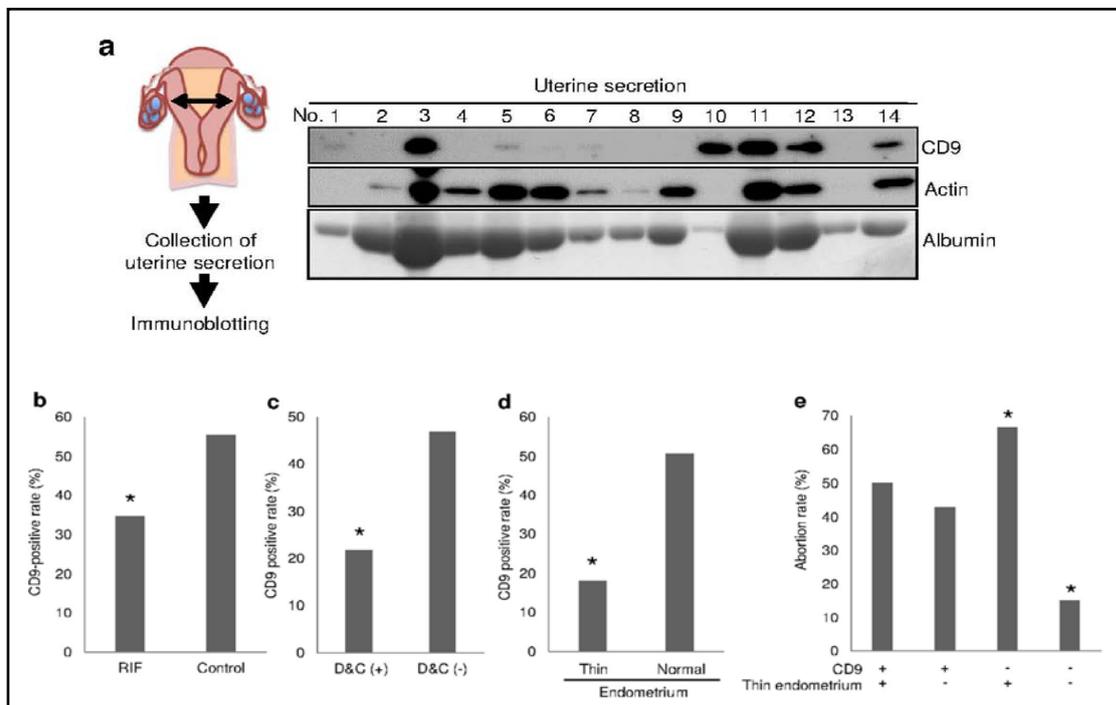


図 6 ヒト子宮内腔液のイムノブロッティング (文献 3)

- a 例として、14名から採取された子宮内腔液の14サンプルのイムノブロッティングを示した。
- b-d RIF(反復着床不全症例)、D&C既往のある症例、内膜菲薄化症例では CD9 陰性化率が有意に高かった (* P<0.001)。
- e 子宮内腔液中の CD9 陰性、Em<8.5mm の RIF 患者の流産率は 66.7%と有意に高かった。

今後は、子宮腔内における CD9 の減少がどのようなメカニズムで反復着床不全に寄与しているのかについてさらに研究を進めたいと考えている。

終わりに

最近本邦でも着床前遺伝学的検査（PGT-A）が始められているが、染色体正数性と診断された胚盤胞を移植しても、着床率は60%前後に留まると報告されている。反復着床不全の克服に向けて、培養環境の最適化による胚の質的向上に加え、子宮内膜着床環境の最適化もますます重要になっている。慢性子宮内膜炎に対する治療のみならず、今後は子宮内膜の着床環境に関する分子生物学的評価とその改善に向けた様々なアプローチが求められる。

【参考文献】

- 1) Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Sep 2;105(35):12921-6.
- 2) Iwai M, Hamatani T, Nakamura A, Kawano N, Kanai S, Kang W, Yoshii N, Odawara Y, Yamada M, Miyamoto Y, Saito T, Saito H, Miyado M, Umezawa A, Miyado K, Tanaka M. Membrane protein CD9 is repositioned and released to enhance uterine function. *Lab Invest*. 2019 Feb;99(2):200-209.
- 3) Kawano N, Miyado K, Yoshii N, Kanai S, Saito H, Miyado M, Inagaki N, Odawara Y, Hamatani T, Umezawa A. Absence of CD9 reduces endometrial VEGF secretion and impairs uterine repair after parturition. *Sci Rep*. 2014 Apr 16;4:4701.
- 4) 中村彰宏, 康宇鎮, 河野菜摘子, 齊藤英和, 宮戸健二. 卵子の加齢: 卵子を守る防御ネットワークとその破綻. *日本卵子学会誌*. 2018; 3(2): 25-31.