

## 【研究紹介】

## ウマの着床期の子宮内膜における interleukin 1 receptor antagonist (IL 1 RN) の発現とその機能の検討

羽田 真悟

帯広畜産大学 臨床獣医学研究部門 (〒080-8555 帯広市稲田町西2線11)

## 背景と目的

着床において様々なサイトカインが胚と子宮のコミュニケーションに必要であることが報告されており、interleukin 1 (IL 1) もその1つとして知られている。IL 1にはアゴニストであるIL 1 alpha (IL 1 A) とIL 1 beta (IL 1 B)、そしてレセプターに結合することでアゴニストの作用を阻害するIL 1 receptor antagonist (IL 1 RN) が存在する。IL 1 Aは着床直前の子宮においてマウスで<sup>[1]</sup>、IL 1 Bは着床直前の胚において発現が上昇することがマウス<sup>[2]</sup>とブタ<sup>[3]</sup>で知られている。したがって、IL 1は、着床過程における胚と子宮内膜の相互作用や栄養膜細胞の伸長に重要であると考えられている。一方、*IL 1RN* mRNAの発現は、マウスにおいては発情期に上昇し<sup>[4]</sup>、ブタにおいては発情期に上昇するが着床時期には上昇しないことが報告されている<sup>[3]</sup>。マウスにおいては、着床時期の前からIL 1 RNを複数回連続投与すると着床が阻害されることから<sup>[5]</sup>、IL 1 RNは着床過程において抑制作用を示すものと考えられる。

母体の妊娠認識(MRP; maternal recognition of pregnancy)は各種動物によって大きく違い、ブタでは胚由来のエストラジオール-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>)がMRPにおいて重要なシグナルであることが知られている<sup>[6]</sup>。ウマにおいてもE<sub>2</sub>がMRPに関係する可能性がある。しかし、ウマ胚の卵黄嚢内の総E<sub>2</sub>量は妊娠10日頃から上昇し始め、18日頃に最大レベルに達した後、26日またはそれ以降高値を保ち続ける<sup>[7]</sup>ことから、ウマ胚におけるE<sub>2</sub>の発現はブタと違ってMRPの時期特異的な現象ではないと考えられる。また、胚の存在にかかわらず、子宮内膜中のE<sub>2</sub>濃度やE<sub>2</sub>による遺伝子発現の情報はなく、胚のE<sub>2</sub>による黄体退行の抑制を含めたMRPへの関与は明らかにされていない。

本研究では、ウマの着床過程においてIL 1 RNが着床成立に果たす役割を理解するために、子宮内膜中IL 1

システム関連の遺伝子 (*IL 1A*、*IL 1B*、*IL 1RN*、*IL 1 receptor type 1 (IL 1R1)*、*type 2 (IL 1R2)*)と、IL 1に誘導される因子の1つとしてIL 6の経時的变化および子宮内膜組織における局在を調べた。さらに、胚と子宮内膜中のステロイドホルモンの測定および*IL 1RN*遺伝子の発現におけるステロイドホルモンの影響を明らかにすることで、胚のステロイドホルモンによる子宮内膜への影響を検討した。

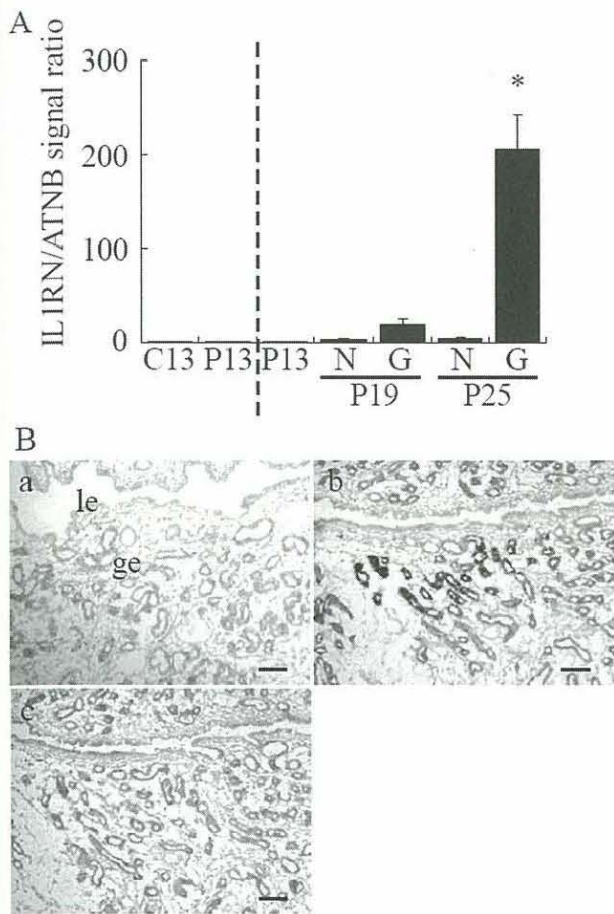
## 材 料

実験にはサラブレッド種の雌ウマ8頭を用いた。排卵日をDay 0とし非妊娠13日 (cyclic 13; C13)、妊娠13日 (pregnant 13; P13; 胚の遊走期)、19日 (pregnant 19; P19; 胚の固着後)、25日 (pregnant 25; P25; カプセル融解後)にそれぞれ2頭ずつから子宮を回収した。子宮は左角、右角、体部それぞれを長軸方向に3等分し、それぞれ頭側、中部、尾側とした。P19、P25の子宮では胚の存在するほうを妊娠角 (gravid horn; G)、反対側を非妊娠角 (non-gravid horn; N)とした。子宮内膜の一部は組織学的検索のために4% paraformaldehyde (PFA)-PBS中で固定し、パラフィン包埋した。また、RNAとタンパク質の抽出、凍結切片作製のために、子宮内膜を剥離し液体窒素中で速やかに凍結後-70℃で保存した。以降、説明のない限りサンプルには子宮角尾側を使用した。さらに、ステロイドホルモン測定のために妊娠25日の胚から卵黄嚢液を、母体から血液を採取し、子宮内膜から抽出液を得た。

## 結 果

1. 妊娠早期の子宮内膜における *IL 1RN* mRNA およびタンパク質発現の変化

C13とP13において、子宮内膜中のmRNAの発現は左(L)子宮角と右(R)子宮角で有意差が見られなかったため結果を合わせたものとして表示した。*IL 1RN*

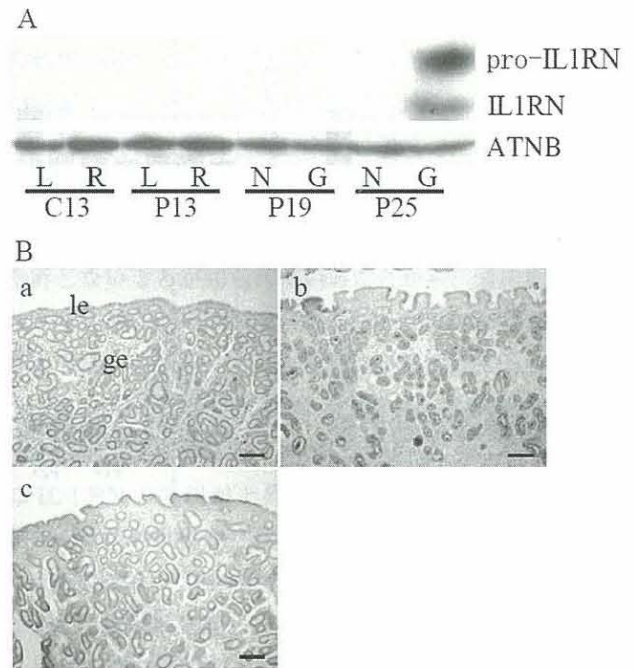


**図1 子宮内膜における *IL1RN* mRNA の発現と局在**  
 以下図表において P19 と P25 における非妊娠角は (N)、妊娠角は (G) とする。

**A Real-time PCR を使用した *IL1RN* mRNA 発現の解析。**  
 以下子宮内膜中の各因子の発現は、C13 と P13 の左角と右角では発現に差がなかったため両角の値を平均して一つとし、P19 と P25 は妊角と不妊角を別々に表示した。また、C13 と P13 および妊娠群を別々に比較した。発現量は P13 を 1 として比較した。ATNB;  $\beta$ -actin \*\* $p < 0.01$  Bar = 平均  $\pm$  SEM

**B in situ hybridization を使用した *IL1RN* mRNA の局在の解析。** a, b はアンチセンスプローブ処理した P13 および P25G, c はセンスプローブ処理した P25G。le; 子宮内膜上皮、ge; 腺上皮、Bar = 100  $\mu$ m

mRNA の発現は、非妊娠および妊娠のいずれの子宮内膜においても認められ、P25G ( $p < 0.01$ ) において他群と比較して顕著に上昇していた (図 1A)。また、有意差は認められなかったものの P19G における発現は P13、P19N および P25N と比較して高い傾向が見られた。さらに、P19N および P25N における発現は、P13 より高い傾向が見られた。in situ hybridization の結果から、*IL1RN* mRNA は P19 と P25 の腺上皮において発現していることが認められたが、子宮内膜上皮や間質では認められなかった (図 1B)。また、C13 と P13 の腺上皮にシグナルは認められなかった。



**図2 子宮内膜における *IL1RN* タンパク質の発現と局在**  
 A Western blotting を使用した *IL1RN* タンパク質の解析。C13 および P13 の左角と右角は別々に解析した。ATNB;  $\beta$ -actin  
 B 免疫染色を使用した *IL1RN* タンパク質の局在の解析。a, b は抗 *IL1RN* 抗体で処理した P13 および P25G, c は normal goat IgG で処理した P25G。le; 子宮内膜上皮、ge; 腺上皮、Bar = 100  $\mu$ m

Western blotting の結果、*IL1RN* タンパク質は real-time PCR の結果と一致して P25G において豊富に存在していた (図 2A)。また、検出された *IL1RN* タンパク質には前駆体と考えられるバンドと活性型と考えられるバンドが存在していた。免疫組織学的検索より、*IL1RN* タンパク質は in situ hybridization の結果同様、腺上皮細胞に局在していることが認められ、さらに子宮腺の内腔にも存在が認められた (図 2B)。

**2. 妊娠早期の子宮内膜における *IL1A*、*IL1B*、*IL1R1*、*IL1R2* および *IL6* mRNA 発現の変化**

*IL1A* mRNA の発現は P25G において他群と比較して顕著に上昇していた ( $p < 0.05$ )。また、C13 および P13 において *IL1A* mRNA の発現は検出できなかった (図 3A)。*IL1B* mRNA の発現には、有意差が認められなかった (図 3B)。*IL1R1* mRNA の発現は、P25G において上昇していた (図 3C)。*IL1R1* に対して、*IL1R2* mRNA の発現は P19N、P19G および P25N において P13 と比較して有意に減少していた (図 3D)。また、P25G においても有意な差は認められなかったが、その発現は減少する傾向が見られた。*IL6* mRNA の発現は *IL1RN* mRNA の発現と同様のパターンを示し、

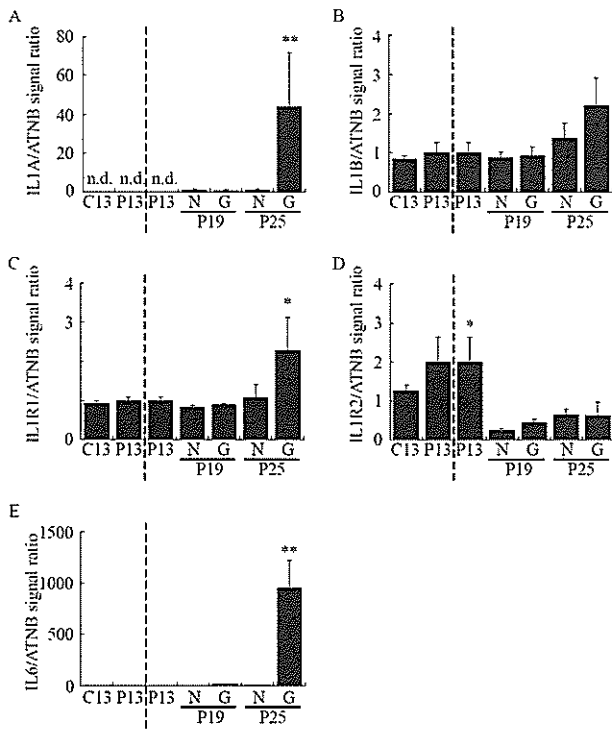


図3 子宮内膜における *IL1A*、*IL1B*、*IL1R1*、*IL1R2* および *IL6* mRNA の発現

Real-time PCR を使用して各物質の mRNA 発現を調べた。PCR で40 cycle 増幅させた後、その因子に特異的なバンドが見られなかったものは不検出 (not detected; n.d.) とした。A *IL1A*、B *IL1B*、C *IL1R1*、D *IL1R2*、E *IL6*、\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  Bar=平均±SEM

P25G においてその発現が顕著に上昇し、P19G においても上昇する傾向が見られた (図3 E)。各因子とも C13 と P13 の間に有意な差は認められなかった。

### 3. 卵黄嚢、子宮内膜および血中のステロイドホルモン濃度

妊娠25日の2個体における卵黄嚢中の  $E_2$  濃度は、それぞれ366.0および1875.0pg/mlで、血中の濃度はそれぞれ17.9および31.6pg/mlであった (表1)。子宮内膜中の  $E_2$  濃度は胚存在部位 (592.5および1709.3pg/g) で他の部位 (非妊娠角頭側126.5および89.2、非妊娠角尾側102.9および132.3、妊娠角頭側82.8および99.0pg/g) に比べ高値を示した。一方、卵黄嚢中  $P_4$  濃度は、13.3および22.9ng/ml、血中濃度は11.1および5.4ng/mlであり、子宮内膜においては、胚存在部位でも他の部位に比べて極端に高いといった所見は見られなかった (非妊娠角頭側16.1および8.8、非妊娠角尾側16.0および11.2、妊娠角頭側17.5および6.7、胚存在部位24.6および11.8ng/g) (表2)。

### 4. 子宮内膜での *IL1RN*、*IL1A*、*IL1B* および *IL6* mRNA 発現におけるステロイドホルモンの影響

$P_4$  添加群において、子宮内膜における *IL1RN* mRNA

表1 妊娠25日における卵黄嚢、子宮内膜および血中の  $E_2$  濃度

Sample	25-1	25-2
卵黄嚢中 (pg/ml)	366.0	1875.0
子宮内膜中 (pg/g)		
非妊娠角		
頭側	126.5	89.2
尾側	102.9	132.3
妊娠角		
頭側	82.8	99.0
尾側	592.5	1709.3
血中 (pg/ml)	17.9	31.6

表2 妊娠25日における卵黄嚢、子宮内膜および血中の  $P_4$  濃度

Sample	25-1	25-2
卵黄嚢中 (ng/ml)	13.3	22.9
子宮内膜中 (ng/g)		
非妊娠角		
頭側	16.1	8.8
尾側	16.0	11.2
妊娠角		
頭側	17.5	6.7
尾側	24.6	11.8
血中 (ng/ml)	11.1	5.4

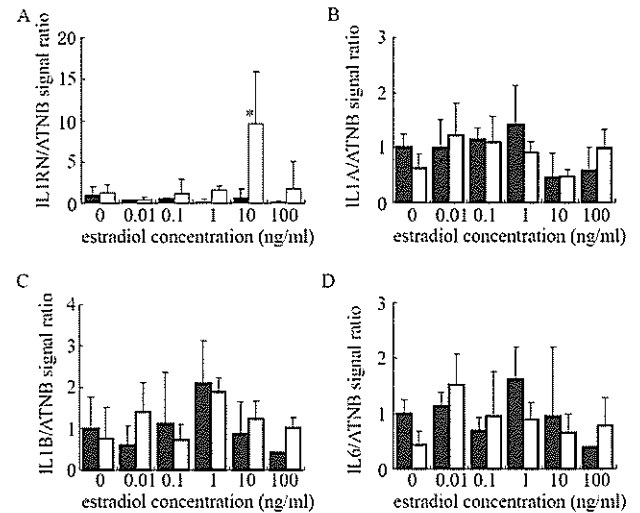


図4 子宮内膜の組織培養において  $E_2$  および  $P_4$  が *IL1RN*、*IL1A*、*IL1B* および *IL6* mRNA の発現におよぼす影響

Real-time PCR を使用して各物質の mRNA 発現を調べた。■ $P_4$  非添加群、□10ng/ml  $P_4$  添加群。発現量は  $P_4$  非添加群の 0 ng/ml  $E_2$  を 1 と比較した。\* $p < 0.05$  A *IL1RN*、B *IL1A*、C *IL1B*、D *IL6* Bar=平均±SEM

の発現は10ng/mlの  $E_2$  で処理した場合に 0 ng/ml と比較して有意に発現が上昇した ( $p < 0.05$ ) (図4 A)。それに対して、 $P_4$  非添加群ではどの濃度においても  $E_2$  処理による *IL1RN* mRNA 誘導の効果は得られなかった。*IL*

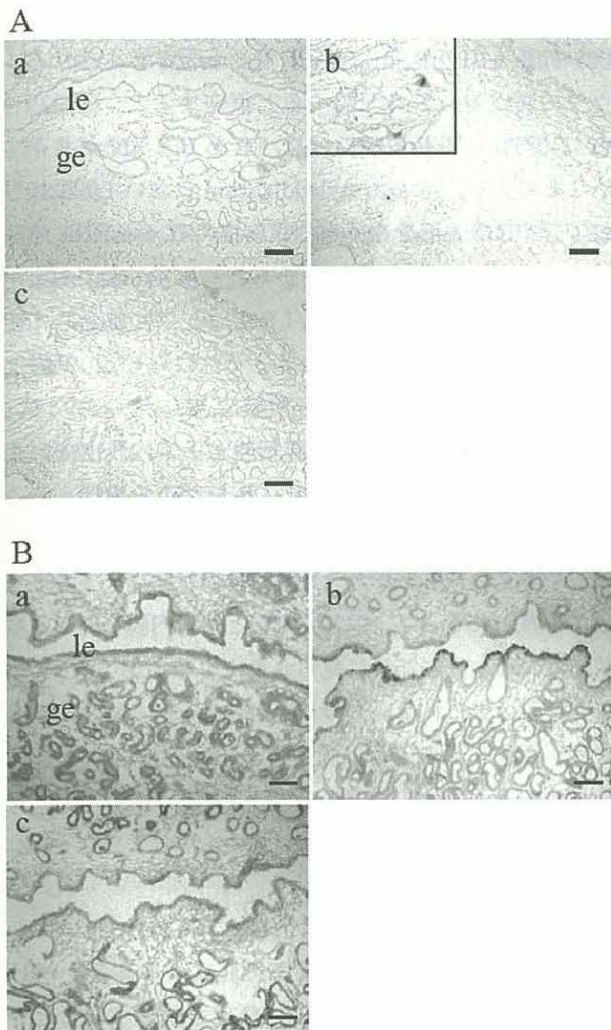


図5 子宮内膜における *IL1A* および *IL6* mRNA の局在 in situ hybridization を使用して *IL1A* および *IL6* の mRNA の局在を解析した。

A *IL1A* mRNA の局在。a, b はアンチセンスプローブで処理した P13 および P25G, c はセンスプローブで処理した P25G。b の枠内は間質部の拡大像。

B *IL6* mRNA の a, b はアンチセンスプローブで処理した P13 および P25G, (c) はセンスプローブで処理した P25G。le; 子宮内膜上皮, ge; 腺上皮, Bar=100μm

*IL1A*, *IL1B* および *IL6* mRNA の発現は P<sub>4</sub> 添加群、非添加群どちらにおいても E<sub>2</sub> 処理による影響はなかった (図 4 B-D)。

##### 5. *IL1A* および *IL6* mRNA の局在

*IL1A* mRNA は、P25G の子宮内膜の間質領域において散在性のシグナルとして検出された (図 5 A)。これらのシグナルは、センスプローブで処理したものではありません。 *IL6* mRNA は、P25G の子宮内膜上皮の一部においてのみに限局して認められた (図 5 B)。

## 考 察

マウス [8] およびブタ [3] の着床前の胚が、それぞれ *IL1*

*B* と *IL1RN* および *IL1B* mRNA を発現することが知られている。さらに、マウス [2]、ウシ [9] およびブタ [10] の妊娠子宮において *IL1A* もしくは *IL1B* が発現することが報告されている。着床期の子宮では、マウスにおいて *IL1A* の発現の上昇が見られるが [1]、マウス [2]、ウシ [11] およびブタ [3] において *IL1B* mRNA の発現は上昇しないことが知られていることから、着床期には、胚からの *IL1B* により着床反応の一部が誘導されるものと考えられる。ブタの着床期の子宮内膜において、*IL1RN* mRNA の発現が上昇しないこと [3] も *IL1B* 刺激の必要性を支持するが、本研究において、ウマの着床期に *IL1RN* の発現が上昇していたことから、ウマに特異的な着床の制御が存在するものと考えられる。

胚が固着した後の子宮内膜の胚存在部において、*IL1RN* の発現が上昇していたことは、*IL1RN* は胚もしくは胚の分泌物によって誘導されていることを示している。卵黄囊中に E<sub>2</sub> が高濃度で存在していたことと、子宮内膜の培養において P<sub>4</sub> 存在下で E<sub>2</sub> が *IL1RN* を誘導したことから、子宮内膜における *IL1RN* は胚からの E<sub>2</sub> によって誘導されることを示唆している。このことは、血中の E<sub>2</sub> 濃度が低いにもかかわらず胚存在部の子宮内膜において E<sub>2</sub> の含有量が高かったことによって支持される。E<sub>2</sub> と違い、卵黄囊、子宮内膜および血中の P<sub>4</sub> 濃度は、黄体期レベルにとどまった。しかし、子宮内膜の培養における *IL1RN* mRNA の発現には、E<sub>2</sub> および P<sub>4</sub> 両方が必要であったことから、胚存在部の子宮内膜における、*IL1RN* を含む着床に関わる遺伝子の発現には母体の P<sub>4</sub>、胚の E<sub>2</sub>、その他胚による因子が必要であると考えられる。上記の結果により、ウマの着床期の子宮内膜において、胚から分泌される E<sub>2</sub> が特定の遺伝子発現を誘導するということが示された。

過去の報告 [7] に見られるように、妊娠 25 日の胚の卵黄囊中の E<sub>2</sub> は、高濃度で検出された。ウマの胚は妊娠 10 日頃から、ブタの胚同様に E<sub>2</sub> を産生し始める。ブタの胚による E<sub>2</sub> の産生は、MRP の時期である妊娠 12 日を中心に作用するように制御されている [12] が、ウマの胚による E<sub>2</sub> の産生は、そのような制御下にはなく、卵黄囊中の E<sub>2</sub> の総量は、妊娠 10 日頃から上昇し始め、妊娠 18 日頃にピークに達し、妊娠 26 日まで高濃度で維持されている [7]。ウマの子宮内膜におけるエストロゲンレセプター (ER) およびプロゲステロンレセプター (PR) の発現は、排卵日に高く、黄体期が進行するにつれ減少する。しかし、減少はするものの、E<sub>2</sub> は ER 量が低い妊娠 11-13 日に子宮内膜のオキシトシンに対する

反応性を上昇させていること<sup>[13]</sup>から、黄体期後期および妊娠早期の子宮内膜におけるERを介したE<sub>2</sub>に対する反応性は維持されているものと考えられる。データは示していないが、本研究に使用した子宮内膜中のER mRNAは非妊娠13日および妊娠13-25日を通して変化はしなかったものの、一定に発現していたことから子宮内膜がE<sub>2</sub>に対する反応性を維持していることが考えられる。しかし、胚によるE<sub>2</sub>の分泌はウマのMRPの時期(妊娠15日以前)に認められるものの、MRPに関わるかどうかは定かでない<sup>[14]</sup>。

in situ hybridizationと免疫染色の結果から、IL1RN mRNAおよびタンパク質はそれぞれ腺上皮および腺上皮と子宮腺の内腔に認められた。つまり、IL1RNは子宮の管腔内に分泌されているものと考えられる。IL1システムは2つのアゴニストであるIL1AおよびIL1B、2つのレセプターであるIL1R1およびIL1R2、そしてレセプターアンタゴニストであるIL1RNからなる。IL1R1は妊娠25日の妊角において発現が上昇していたが、残りの部位では一定して発現していたのに対し、IL1R2は妊娠19日および25日において非妊娠13日および妊娠13日と比較して減少していた。IL1R1はIL1と結合して細胞内にシグナルを伝達するのに対し、IL1R2はIL1と結合するもののシグナル伝達は起こらない<sup>[15]</sup>。その性質ゆえにIL1R2は“decoy receptor”と呼ばれる。胚の固着以降“decoy receptor”の発現が減少していることから妊娠19日および25日の子宮内膜はIL1シグナルに対して感受性が上昇しているものと考えられる。

Real-time PCRおよびin situ hybridizationの結果から、IL1A mRNAの発現は妊娠25日の胚存在部の子宮内膜間質において上昇していた。子宮内膜の組織培養において、IL1A mRNAはステロイドホルモンの影響を受けなかったことと、ウマにおいてもマクロファージがIL1Aを発現すること<sup>[16]</sup>、さらにマウスにおいて着床期の子宮内膜にマクロファージが集積することから、妊娠25日にIL1A mRNA発現が上昇したことはマクロファージのような免疫細胞の集積によるものではないかと考えられる。一方、IL6 mRNAの発現は妊娠19日から上昇が見られ、妊娠25日では子宮内膜上皮の一部分に限局して発現していた。IL6はヒトの子宮内膜上皮細胞においてIL1によって誘導されることが知られているが<sup>[17]</sup>、妊娠19日の時点で子宮内膜におけるIL1の発現の上昇は見られなかった。ウマでは胚がIL1を産生するかどうかは報告されていないが、他の動物種におい

て胚がIL1Bを産生することが知られていることから、ウマの胚もIL1B産生能を有するものと考えられる。ウマの胚がIL1Bを分泌すると仮定すると、妊娠19日および25日の胚存在部ではIL1BとIL1RNが共存することになる。In situ hybridizationにおいて妊娠19日、および25日の大部分の子宮内膜上皮にIL6 mRNAの発現は認められなかったことから、基本的には、IL1Bのレセプターへの結合はIL1RNによって競合的に阻害されているものと考えられる。それに対して、妊娠25日の胚存在部の一部の子宮内膜上皮に見られたIL6 mRNAの発現は、胚の栄養膜細胞と子宮内膜上皮が接着することにより効率良くIL1Bシグナルを伝えることができるようになった結果であることが可能性の一つとして考えられる。また、妊娠19日では胚は、まだカプセルに覆われていて、栄養膜細胞と子宮内膜上皮の距離があるため、妊娠25日に見られたようなIL6 mRNAの強い発現は見られないものと考えられる。これらのことから、胚存在部の子宮内膜のある特定の部位ではIL1シグナルを必要とし、別の部位ではIL1RNがIL1シグナルを抑制しているというシステムが考えられる。

## ま と め

本研究の結果から、P<sub>4</sub>存在下で胚による高濃度のE<sub>2</sub>が子宮内膜におけるIL1RNの発現を誘導することが示された。また、IL1RNは子宮の管腔内に分泌されていることが示された。IL1RNの作用はIL1がそのレセプターに結合することを拮抗的に阻害することであるが、子宮内膜からのIL1は管腔に存在するような傾向を示さなかったため、IL1RNは胚からのIL1を阻害しているものと考えられる。IL1は着床を促進し、IL1RNは固着後の胚存在部でその作用を阻害することから、IL1RNは着床反応を抑制しているものと考えられ、このことにより、妊娠36日頃まで子宮内膜への侵入および胎盤の形成反応を示さないウマの着床機構を説明することができる。しかし、IL1に誘導される因子として調査したIL6 mRNAの発現パターンから、ある特定の部位では着床反応が進行していることが示唆された。

## 参 考 文 献

- [1] Noda N, et al. Biol Reprod ; 63 : 1713-1720.(2000)
- [2] Takacs P, et al. J Reprod Immunol ; 32 : 27-35. (1996)
- [3] Ross JW, et al. Biol Reprod ; 69 : 1251-1259.(2003)
- [4] Lee DS, et al. J Reprod Dev ; 51 : 787-798.(2005)

- [5] Simon C, et al. *Fertil Steril* ; 70 : 896-906.(1998)
- [6] Bazer FW, et al. *Prostaglandins* ; 14 : 397-400. (1977)
- [7] Raeside JI, et al. *Biol Reprod* ; 71 : 1120-1127. (2004)
- [8] Kruessel JS, et al. *J Reprod Immunol* ; 34 : 103-120.(1997)
- [9] Leung ST, et al. *J Reprod Fertil* ; 119 : 25-33. (2000)
- [10] Ross JW, et al. *Reprod Biol Endocrinol* ; 1 : 23. (2003)
- [11] Davidson JA, et al. *Reprod Fertil Dev* ; 7 : 1037-1043.(1995)
- [12] Pusateri AE, et al. *J Anim Sci* ; 68 : 3727-3735. (1990)
- [13] Goff AK, et al. *J Reprod Fertil* ; 98 : 107-112. (1993)
- [14] Allen WR. *Reproduction* ; 121 : 513-527.(2001)
- [15] Colotta F, et al. *Science* ; 261 : 472-475.(1993)
- [16] Straubinger AF, et al. *Gene* ; 236 : 273-280.(1999)
- [17] Perrier d'Hauterive S, et al. *Hum Reprod* ; 19 : 2633-2643.(2004)