

牛の着床・受胎機構：基礎研究からの投射

橋爪一善[†]

Mechanisms of Receptivity and Implantation in Cows : Projection from Basic Research

Kazuyoshi HASHIZUME[†]

着床・受胎には多様な分子が複雑に関与しておりその機構は明快でなく、子は授かりものの思想は現在も続いている（神のみぞ知るか？）。しかしながら、今世紀の科学技術の発展は、この分野においても多くの新規知見をもたらした。牛の受胎に関する研究もその恩恵を受け、新しい展開があった。第一は、分子生物学及び遺伝子工学の発展による遺伝子解析と遺伝子組換え技術がもたらした恩恵である。他の面は、体細胞クローン動物の作成がもたらした遺伝子発現の制御メカニズム解明の貢献である。ここでは、まず牛の受胎に関する（多くの哺乳動物と共通する点は多数ある）既知の情報を確認し、問題点の抽出と解決への展望について考える。

- ①妊娠（受胎）は受精に始まる。
- ②受精胚には精子と卵子の役割を持つ遺伝情報の融合が必須である。
- ③母体子宮内膜と受精胚の協調が必要である（免疫系を含む）。
- ④胎盤（母体と胚のインターフェイス）が必須で、その機能はオス由来遺伝子の支配下にある。
- ⑤受精胚の約70%は胎子まで発育しない（早期胚死滅）。
- ⑥不受胎の母体側要因は、子宮及び生殖器への環境要因（栄養疾患、細菌感染など）と遺伝的な欠陥である。
- ⑦胚側の不受胎要因は、遺伝的な欠陥以外、不明である（絶対に妊娠する胚の選別方法は未確立）。

と挙げると数多くの項が思い浮かぶ。解決への道は、必ず受胎する受精胚の選別方法と受胎を保証する子宮内膜因子同定法の開発である。では現実はどうであろうか。

生殖現象は人為操作により人が侵してはいけない領域と言われながら、不思議にも人為操作技術が古くから発

達している領域である。科学の暗黒時代と呼ばれた中世から、人はその実態を捉えていないにもかかわらず生殖細胞は特別な細胞と認識していた。妊娠の成立や受胎率向上への強い興味は、生命を継ぐことから、種を問わず永遠のものである。牛の受胎率、産子生産率の低下はわが国だけでなく世界的な現象で、この20年来低下の一途である（図1、2）。乳用牛では約30%まで低下しており、その原因を乳量生産の増加と逆相関の関係から個体あたりの過剰な乳生産によるとされている[1]。確かに、卵巣機能を調節する性腺系と乳腺に関わるプロラクチン／成長ホルモン系の内分泌調節機序の関係からも裏付けられる。受胎や妊娠成立の成否は、畜産業経営を左右する主要因であり、その改善、向上を図ることは産業動物獣医療の重要な使命である。

1 着床成立前後における受精胚と子宮内膜の生理機能

妊娠成立時の子宮内膜機能と受精胚の関係は複雑で、いまだその調節機構を明快に説明できない。牛におけるこの時期の重要な要因は、分娩後60日頃までの細菌による子宮内膜障害を除き、特異的な2分子、プロゲステロン（Progesterone：P4）とインターフェロン・タウ（Interferon-tau：IFNT）にあると言っても過言ではない（図3）。中でも卵巣由来のステロイドホルモン、特にP4は子宮内膜や卵巣機能を調節する主要な因子であると同時に受精胚の機能調節に関わる。牛胚の生存性や伸張など初期発生過程でのP4の重要性は言うまでもない。P4は卵巣の黄体由来であり、その調節対象である子宮内膜におけるプロスタグランジン（Prostaglandins：PGs）—オキシトシン（Oxytocin：OXT）の作用を通して卵巣機能を制御している。これらの相互調節やP4の分泌及び維持調節の不備は早期胚死滅の一因で

[†] 連絡責任者：橋爪一善

〒124-0006 葛飾区堀切1-41-9-403 ☎・FAX 03-5698-3417 E-mail : kazuha@iwate-u.ac.jp

[†] Correspondence to : Kazuyoshi HASHIZUME

1-41-9-403 Horikiri, Katsushika-ku, 124-0006, Japan

TEL・FAX 03-5698-3417 E-mail : kazuha@iwate-u.ac.jp

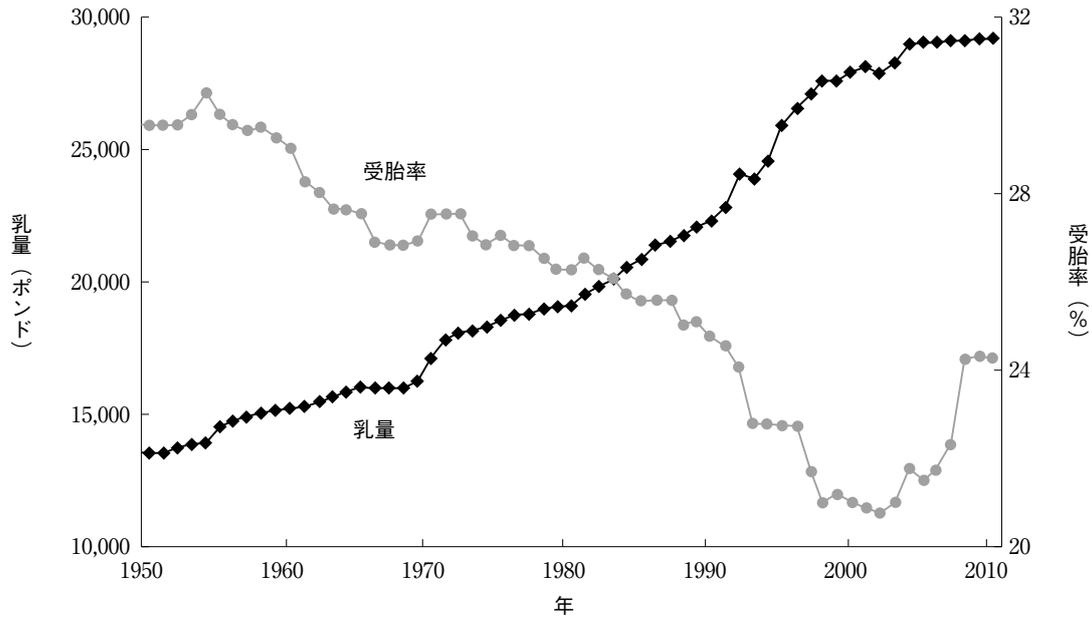


図1 北米における受胎率の変遷 [1]

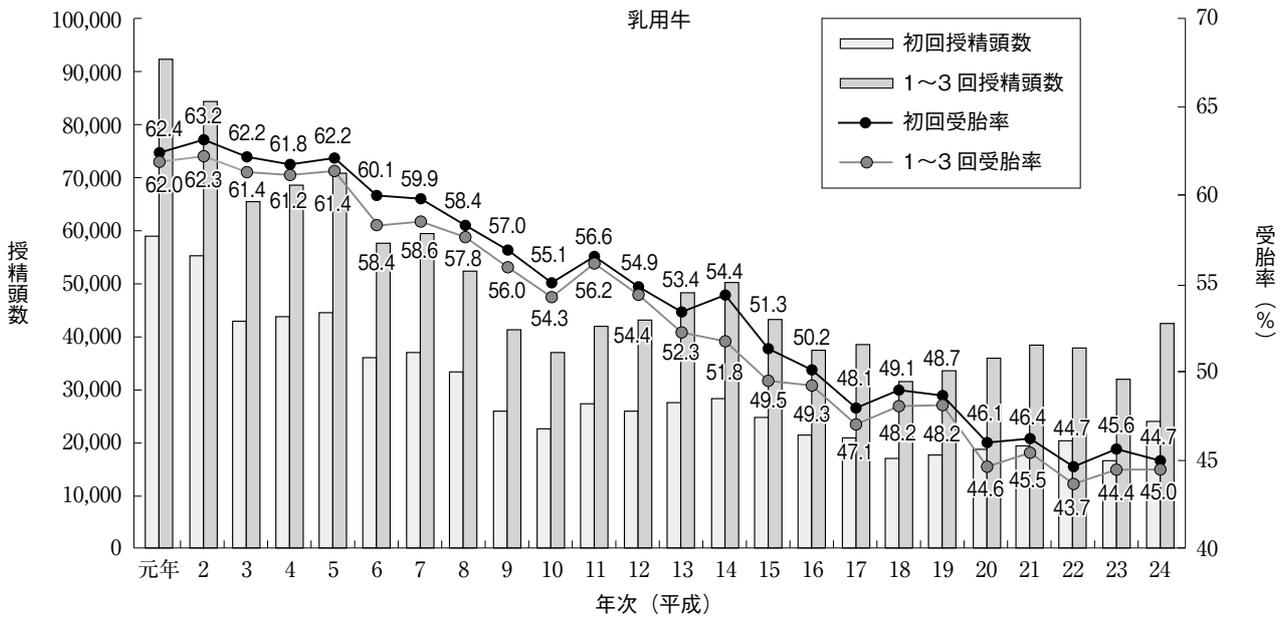


図2 わが国における受胎率の現状

(受胎成績調査, 家畜改良事業団, <http://liaj.or.jp/giken/gijutsubu/seieki/jyutai.htm>, 2015. 1. 16)

もある。一方、胚由来の分子 IFNT は、牛などの反芻動物の妊娠認識物質として、母体へ妊娠情報を伝える種特異物質である。この分子は受精胚が細胞分裂を始め、胎子となる細胞集団 (内部細胞塊, Inner cell mass : ICM) から最初に分化した細胞である栄養膜細胞の単核の細胞 (Mononucleate : MNC) から分泌される。その分泌消長は、あっけないもので、受精後2週目から産生が著しく活発となり、3週日以降には分泌はほとんど消失する。その作用は、着床前後に出現する卵巣機能を制御するだけでなく胚の発育、伸張や子宮内膜の機能調節の役割も担っている [2]。では、これら2分子が

主導権を持つ着床前後の受精胚と子宮内膜の関係はどのようなものであろうか。まず、精子と卵子の融合に始まる受精胚は、牛では2分割、4分割と分割が進み、桑実胚期 (Morula) に子宮内へ移動する。その後、胚盤胞 (Blastocyst)、脱出胚盤胞 (Hatching blastocyst) となり、反芻動物特有の現象である胚の伸張 (Elongation) が生じる (図4)。牛ではこの受胎産物の膜 (胎膜) の伸張は、着床直前には約25cm以上にもなり、左右の子宮内膜表面全体を覆う。そして排卵側 (ここでは一般的な呼称として妊角と称する) の比較的子宮体部寄りの子宮内膜小丘に対応して絨毛叢の形成が始まる。すなわ

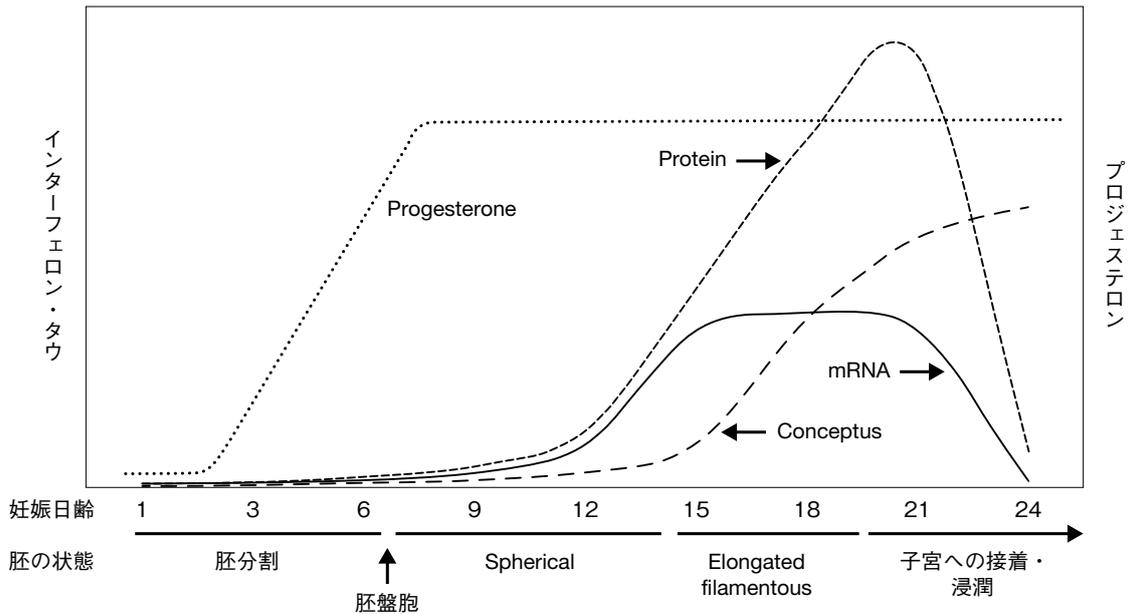


図3 受胎早期における妊娠認識分子の動態 [2, 3]

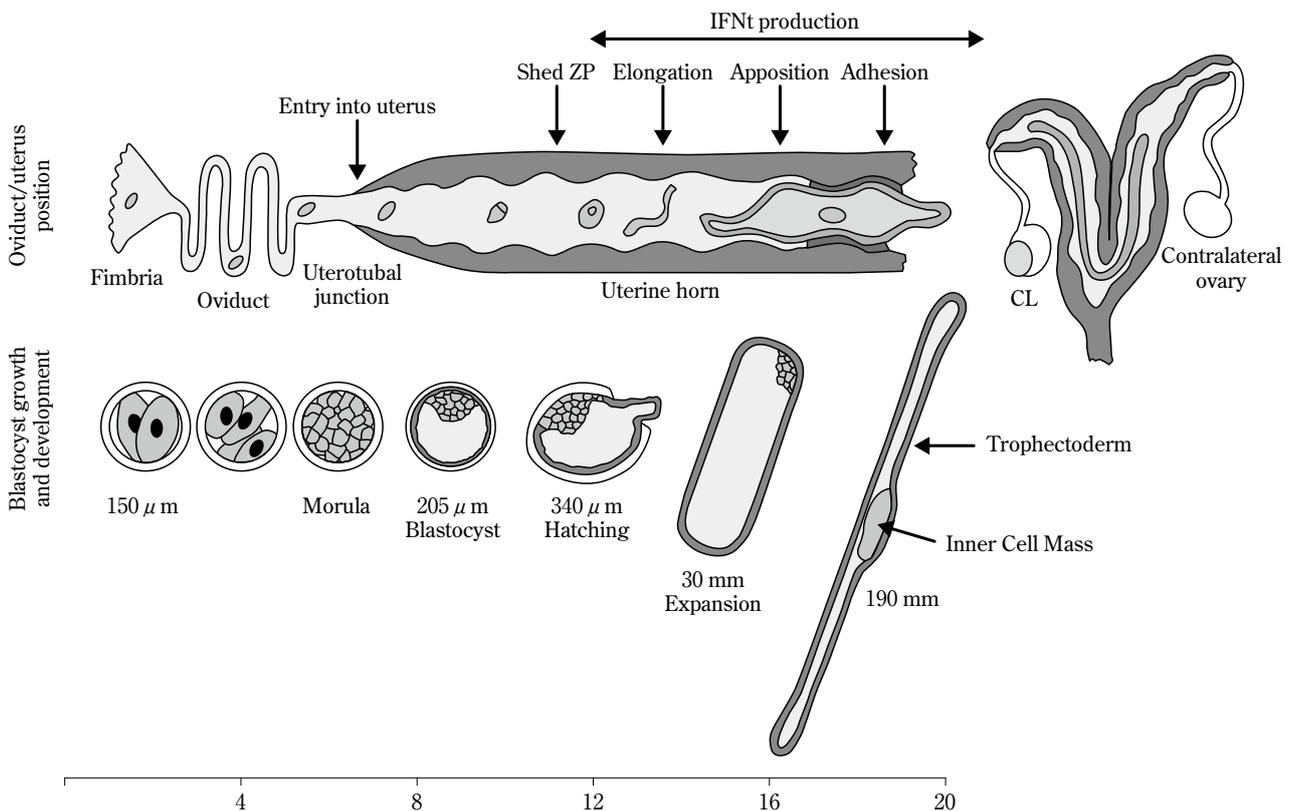


図4 妊娠早期における受精胚の発達 [3]

ち、胎盤節の形成である [3]。その位置は何により決定されるのかは現在のところ不明であるが、胚（胎子）から局所性に分泌、拡散する物質がその誘導要因と推測される。その後、妊角側での絨毛叢形成が広がっていくとともに、個々の絨毛叢は発達し、大豆粒大の胎盤節となる。非妊角側での絨毛叢形成は受精後30日を過ぎて始まるようであるが、50～60日くらいから肉眼で確認が

可能となる。胎盤節はその大きさと血流網を拡大しながら妊娠末期の（分娩前1週間）こぶし大まで発達する。牛の子葉状胎盤は、発生学的には散在性胎盤から進化したものであるから絨毛が漿膜である絨毛膜上に現れ、集合して絨毛叢を形成すると言えるが、肉眼的にはそのような徴候を認めず、限局的な発達にみえる。いずれにしても胎子側絨毛膜と母体側子宮内膜上皮の関係は、まず

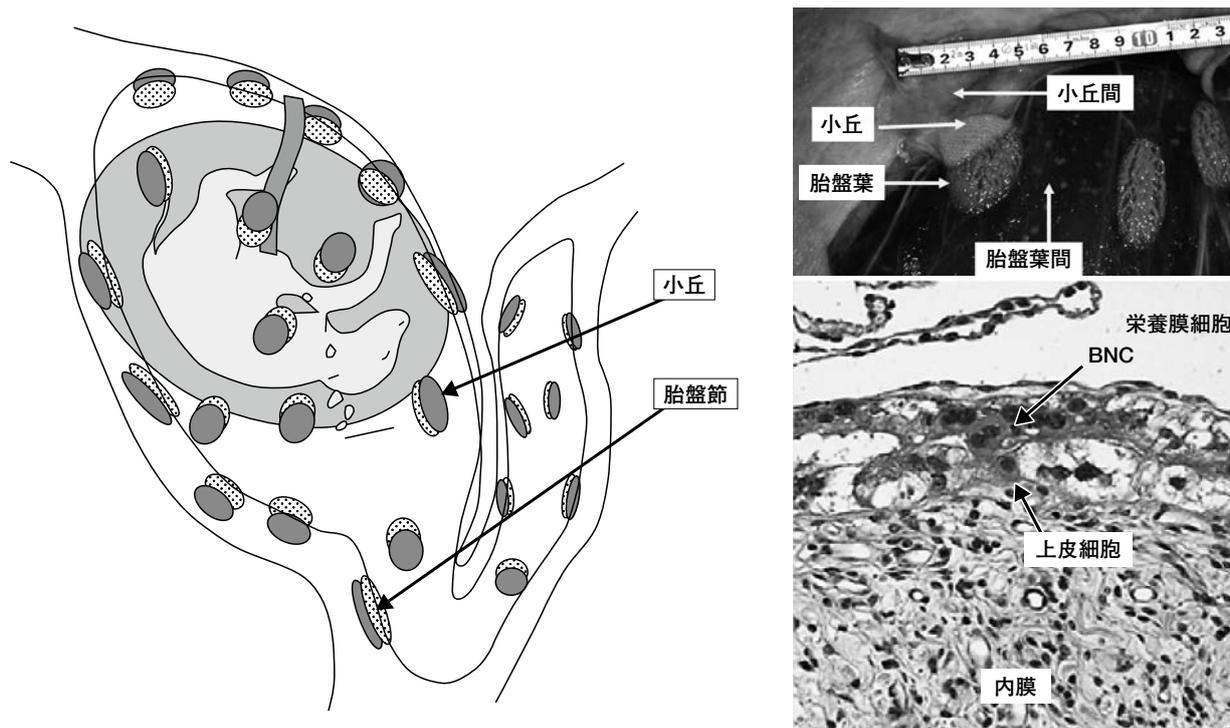


図5 胎盤節形成とその分布 [4]

接触，対峙，遊走，融合の経過をとり，胎盤節形成が進行する．これらの過程が牛における着床である．この時期に生じる受精胚での最も重要な出来事は，まず，将来主として胎子となる細胞群である ICM と栄養膜外胚葉の分化であり，後者は分裂，伸張しながらさらに MNC と二核細胞 (Binucleate : BNC) へ分化する (図5)．この2種の栄養膜細胞は，妊娠期間を通し胎盤節の機能を担う主細胞である．大雑把に言って MNC は IFNT，BNC は栄養膜細胞 (Trophoblast : Tr) の分化の指標であり，牛胎盤の内分泌面を担う細胞群である．BNC は主として胎盤性ラクトゲン (Placenta lactogen : PL あるいは CSH1) 並びに各種のステロイドホルモンを産生分泌する．また，子宮内膜上皮細胞と BNC の融合 (三核から多核細胞) を主導する．この部位が絨毛叢の形成，胎盤節の発達部位である [4]．

2 分子生物学的解析技術の着床・受胎機構解明への貢献

哺乳動物における受胎の生理は，受精胚由来の胎子側と母体側の全く異なる組織の融合，再構成による胎盤形成が鍵であり，両組織で産生，分泌される分子は多様である．そのため，20世紀後半までに発展した解剖学や生理・生化学を基盤とした手法では，根本的な課題へのアプローチは困難であった．分子生物学的手法がその解明の新しい局面をもたらした．受胎率，妊娠率の向上，改善は，家畜に限らず人を含めた各種哺乳動物の種族維持における最大の課題であることは言うまでもないが，

いまだ決定的な解決策はない．このような情勢の中，前世紀末から今世紀にかけ飛躍的に発展した分子生物学に立脚する研究技術やその取り組みにより，この分野にも大きな端緒が開かれたと言ってもよい．人類が手にした遺伝子組換え，解析技術の発展がその基本にある．1989年に人ゲノムプロジェクトがスタートしたことに端を発し，その後，家畜，牛においてもそれらの技術や情報が波及した [5]．分子生物学の情報や技術は，動物，植物といった生物の分類や種を超えた共通の基盤に関連するものであったおかげである．根本的には同床である遺伝学を基盤とした染色体やゲノム地図の研究とは少し趣を変えた塩基配列解析を基にしたゲノム及び遺伝子研究がそれである．原核生物の細菌に始まり，真核生物の酵母，線虫などのゲノム配列が次々と明らかとなる中，遺伝子を網羅的に解析する技術の開発があり，その適用は受胎と不受胎動物間の遺伝子発現やその差異を明らかにすることとなった．生殖に関わる細胞の体外培養，体外受精，胚の移植技術 (Embryo transfer : ET) の発展は，当時すでに実験動物から家畜まで確立されていた [6]．しかし，それらの技術を用いても受胎率，妊娠率及び分娩率の改善に繋がらず，家畜の生産性は向上しなかった．その要因は，受胎牛と不受胎牛の受精胚や子宮組織の何が異なるかが明らかでなく，その解析方法もなかった．そのため，分子生物学的手法の応用は理にかなっており，わずかな遺伝子情報の差異を明らかにする手法を開発することが期待された [7]．組織や細胞に発現する遺伝子全体を解析するマイクロアレイ (DNA チップと

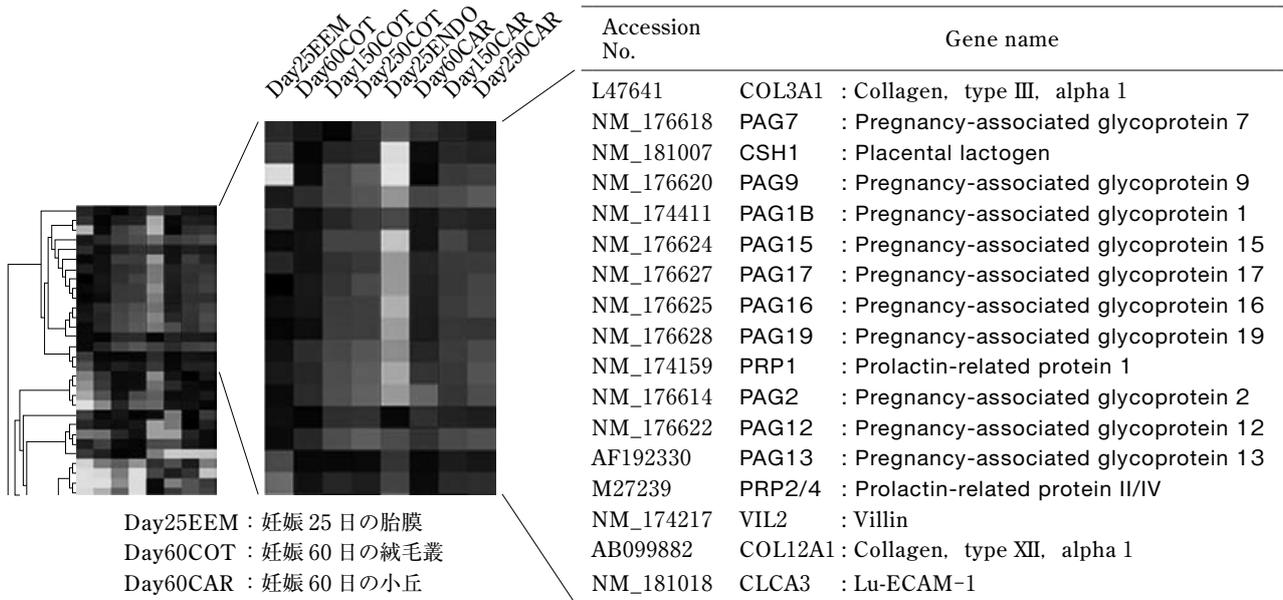


図6 マイクロアレイによる組織特異的遺伝子の網羅的発現解析 [8]

も称される) やごくわずかな遺伝子情報を多量に増やすポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction: PCR) がこれに代る技術開発であった。図6のようにマイクロアレイでは、組織や妊娠時期特異的に発現する分子の網羅的な同定が可能となった [8]。

3 体細胞クローン牛研究の着床・受胎機構解明への貢献

分子生物学的解析技術の発展に加え、着床・受胎、胎盤機能の研究を加速的に推進した他の原動力は、体細胞クローン動物の研究である。クローン羊、ドリー誕生の衝撃的な発表から、わずか1年半、わが国では相次いで体細胞クローン牛が誕生した [9, 10]。その生物学的及び細胞、遺伝学的意義は高く評価されているが、産業的な応用への道は必ずしも十分確立されているとは言い難い。では畜産業への貢献はないのか。長年、種々の研究開発が試みられているが、畜産業の立場から旧来の肉や乳などの生産技術としての適用は、未定である。ところがクローン動物の研究は、意外な研究分野に光を当てる結果となった。着床、胎盤形成の研究である。この分野は、現在でも発展が遅れている研究領域である。その訳は、時間のかかる地道な研究で、センセーショナルな成果を顕示できないことがその要因の1つである。たとえば、機能を調べるには妊娠期間を例にとってみれば明白である。牛では年単位でないと実験の展開が難しい面がある。また、生殖機能研究の人材が少なくという背景がある。では、体細胞クローン研究がこの分野に何をもちたのであろうか。

体細胞クローン牛は、除核した卵子に体細胞由来の細胞核を導入、発生させた発育胚を、子宮へ移植、妊娠

分娩により、得ることができる。この人為的生殖系は、受精胚の作成とその培養方法以外、基本的には通常用いられるETと変わらない [10]。この系がなぜ着床・受胎機構解明への鍵を提示するのであろうか。生殖研究者をいざなう契機は、通常のETに比べ著しく低い産子の誕生率にある。とりもなおさず、胚盤胞期まで一見よく発育した受精胚のその後の高率な死滅である。胚や胎子が死滅し、産子まで至らない現象は遺伝子の欠損や異常並びに母体子宮の不調によることがよく知られているが、胚子死滅現象の機構解明の難点は、なぜ、ある受精胚は胎子ひいては生存子まで発育するのか、他は死滅するのか。両者間にどのような差異があるのかなど、再現性の観点から詳細に検証はできなかった。しかしながら体細胞クローン胚では、少なくとも約90%の一見正常と思える胚が妊娠中に死亡するのである。つまり、受胎、分娩率がおもわしくなく、胚や胎子の死亡率がきわめて高頻度に起こる (図7)。現在でも分娩に至る個体は10%前後が現状である。胎盤節の数、形態や機能異常がその原因に深く関わる。事実、牛では妊娠60日目頃と比較するとクローン胚移植牛での胎盤節は約半数である (人工授精: 85.4 ± 5.9 vs. 体細胞クローン: 30.7 ± 7.1)。ただ、分娩に至る個体では、胎盤節数が少ない個体もあるが、有意差が生じる数ではない [11]。もっとも、牛の胎盤節数の変動は、胎盤機能と直接関連するものではない。事実、二十数個の胎盤節で妊娠全期間を全うし、分娩に至った体細胞クローン牛の報告がある [12]。通常の妊娠群においても少ない個体は存在し、片側子宮での妊娠の場合は約半数しか胎盤節はないが、妊娠期間や胎子はおおむね正常である。また、形態的には歪で肉眼的に大きな変化を認める胎盤であっても、妊娠

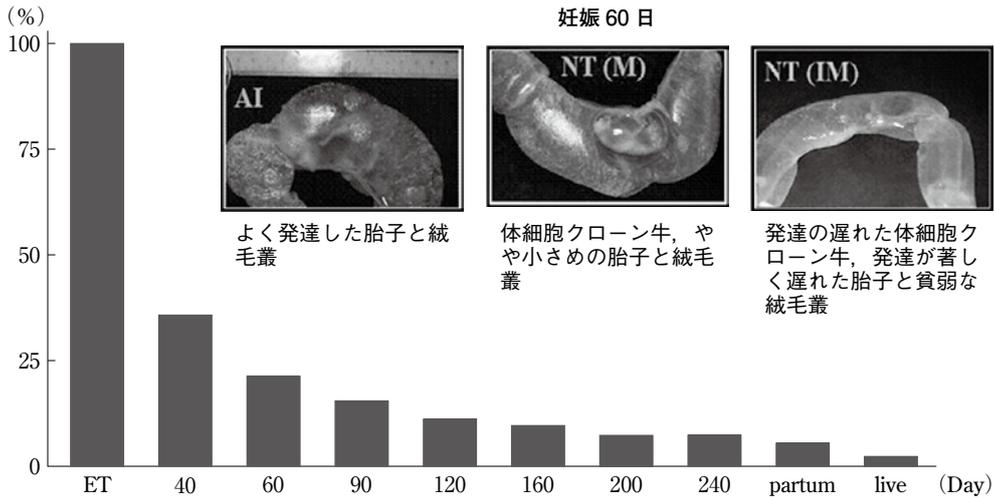


図7 体細胞クローン牛の受胎率例

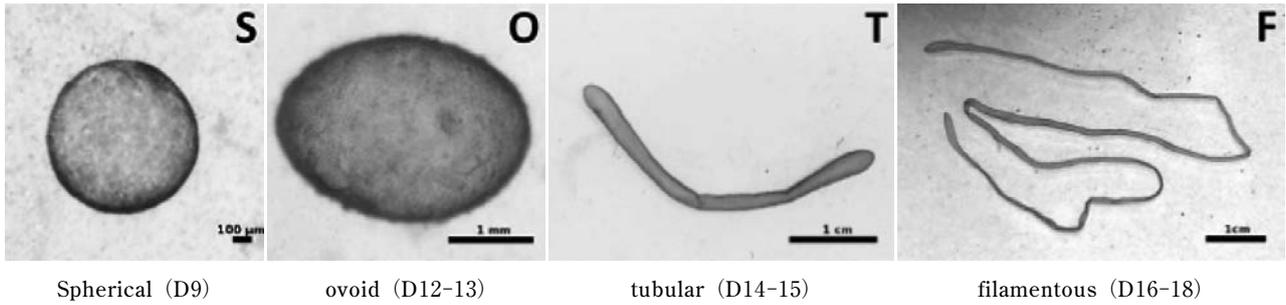
の継続と直接的な関係はない。つまり、形態的に異常でも胎子は無事分娩する。このような変異とクローン動物を結び付けがちであるが、実は機能面に関わる遺伝子や分子発現の変動が大きいことが最も重要な問題である。着床率はETに比べむしろ高率であるが着床及び胎盤形成の始まり前後に胚並びに胎子死滅が著しく生じること、着床—初期胎盤形成時期における胎盤節数が少ないが妊娠終盤では通常の妊娠牛と変わらないこと、歪な形態の胎盤節を持つ個体を認めることなどから、質的な変化が疑われる。中でも胎盤形成に関わるTrに発現する遺伝子群の変異が報告されている [11, 13-15]。それ故、着床や胎盤形成並びにその維持機構に何らかの異常が生じると推測できる。このことは、後年マウスでの巨大胎盤及び単偽生殖マウスKAGUYAの研究からも裏付けられた [16, 17]。また、胎盤すなわちTrに発現する遺伝子の変化、変動が着床の成否や胎盤形成と密接に関連していることが分子生物学的な解析からも明らかとなった [11, 13]。つまり、体細胞クローン胚では、細胞のリプログラミングが通常の受精胚のように生じないことがあるためである。受精胚は発生過程において、細胞の増殖と分化を繰り返し、動物の各種組織、器官や胎盤を形成する。すべての細胞が同じゲノムを持つのに、異なる組織が形成される。どのようにしてその過程は調節されるのか。その原動力が後生的遺伝子修飾（エピジェネティクス）である。その実態は、DNAのメチル化、ヒストンのアセチル化、クロマチン構造のリモデリングなどである。エピジェネティクスは、発生上の細胞の分化を後生的に調節する重要な役割を有している。よく知られた修飾の1つDNAのメチル化は、ゲノムDNAのシトシン塩基をメチル化する現象である [18]。たとえば、体細胞クローン牛あるいは通常の妊娠牛の脳組織と胎膜組織を解析するとDNAのメチル化状態が異なっていることが明らかである。この異なりは、ゲノム

		コントロール				卵丘細胞	クローン			
		ICFM		脳			ICFM		脳	
		#1	#2	#1	#2		#1	#2	#1	#2
A	14	●	●	●	●	○	●	●	○	●
	20	●	●	●	●	○	○	○	○	○
	26	●	●	●	●	○	○	○	○	○
	28	●	●	●	●	○	○	○	○	○
B	2	○	○	○	○	●	○	○	○	○
	12	○	○	○	○	●	○	○	○	○
	13	○	○	○	○	●	○	○	○	○
	16	○	○	○	○	●	●	●	●	●
	17	○	○	○	○	●	●	●	●	●
	19	○	○	○	○	●	●	●	●	●
	21	○	○	○	○	●	●	●	●	●
	22	○	○	○	○	●	●	●	○	○
	23	○	○	○	○	●	●	●	●	●
	25	○	○	○	○	●	●	●	●	○
27	○	○	○	○	●	●	●	○	○	

図8 体細胞クローン牛におけるDNAメチル化の変化 [19]

の変化でなく後生的な修飾に基づいている (図8)。一般的にシトシン塩基がメチル化されるとその部位にゲノム情報を読み取るタンパク質が結合できなくなり、下流の遺伝子情報が読み取れなくなるため、機能遺伝子の塩基配列に対応したタンパク質が産生できない [19]。この変更は細胞のおかれた環境要因の栄養状態やストレスなどにより後生的に生じる。今日では、ある種の腫瘍ではこの機序による発生が知られている。体細胞クローン牛では、不完全なリプログラミングにより遺伝子発現の調節の変動、変異がもたらされ、着床、胎盤はもとより、胎子の組織形成に変化が生じる。

また、Trと発生初期の胎子形成領域である胚盤 (embryonic disc : ED) との発達のずれが体細胞クロー



発育ステージ	代表的な発現遺伝子
Spherical-Tubular	IFNT, TKDP4, PAGs Calreticulin, FGF4, EGF, TGF α <i>NANOG, GATA6, CDX2, EOMES, ETS2, ASCL2, HAND1, c-FOS, JUN, HRAS</i>
Tubular-Filamentous	Tetraspanin, Prosaposin, Superoxide dismutase, PAGs, IFN-induced 35k protein, CSH1, VEGF, Brachyury, <i>AP-2</i>
Filamentous-Attached	ERV, CSH1, PAGs, BCL2A1, SOLD1, Cathepsins, DLX3, <i>AP-2</i>
Placentation	ERV, PAGs, CSH1, PRPs, TKDPs, IGF, Allograft inflammatory factor 1, Cathepsins, SOLD1, PPARG, <i>Sp1</i>

図9 胚発育ステージに伴う遺伝子の発現 [21, 22, 24]. 斜字は転写因子の遺伝子

ン胚の着床や胎盤形成の不備をもたらす要因の1つである [20, 21]. この現象も ICM 側でのエピジェネティックな制御と関連し、原腸形成時期に発現する Brachyury 遺伝子の妊娠 18 日での発現パターンが変化すると指摘されている (図 9). また, Tr の分化は IFNT, PRP1, CSH1, ACVR2A, KLF4 などの発現が指標となる. これら ICM 及び Tr 組織の適正な増殖分化過程を調節する遺伝子群の発現制御に変動, 変化が生じることが, 着床不全を含む着床前後の胚死滅の主因であり, その調節はエピジェネティックな制御下にあると考えられる. 多少の揺らぎはあるが, リプログラミングが完全なものだけが着床, 胎盤形成, 胎子発育をへて生存子を得ることができるということになる. これらの研究から着床, 受胎を左右する要因の1つはエピジェネティックな遺伝子修飾系であると推測できる.

4 胚側の発達, 着床に伴う機能分子の発現

着床前後に生じる胚の発達はいくつかの特徴的な段階に分けられる. その現象と遺伝子発現動態を対比することから着床現象の主導的分子を抽出することができる. 牛胚は受精後 7 日目頃に伸張が始まる. その 1 週後の胚は所謂 tubular と呼ぶ管状の約 10cm \times 1cm 以下の大きさとなる. この間は脱出胚盤胞から管状の胚として子宮内膜と対面, 接触する時期であり, 主として IFNT, TKDP4, EOMES, ETS2, FGF4, GATA6, CDX2 などの発現が認められている. また, 特に spherical 期には FOS, JUN, EGF などの特異的な発現がある. その後, 胚はさらに発達, filamentous と呼ぶ約 17~25cm \times 1~2cm の大きさとなり, PAGs, IFN-induced 35k

protein, CSH1, VEGF などを発現する. この時期以降は母子間の細胞接着現象を認め, 組織学的にも着床の始まりと言える時期に入る (図 9). 胚の Tr は子宮内膜表面の大部分を覆い, 接着の始まった子宮内膜細胞との境界などに BNC 細胞が現れ, PRPs, CSH1, PAGs, ERVs, SOLD1 などの細胞特異的な遺伝子や分子を認める. これ以降 (妊娠約 25 日) は胎盤節の形成を胎膜のあちらこちらで明確に認めるようになり, 胎膜上には BNC 特有の上記遺伝子及び分子が検出される. このような受精胚のダイナミックな発達をみると, 牛 Tr では妊娠 18 日までは MNC, それ以降では BNC に関連する分子が主導権を握っていると総括できる. つまり着床前に将来胎子となる ICM と Tr は分化基点を採り, MNC の機能により胚を伸張, 着床開始までに Tr は一部の細胞が BNC へ分化することになる. 胚は IFNT, TDKPI, P4 の主導により伸張し, 拡張した Tr の子宮内膜への浸潤や細胞の接着に関わる機能分子 SOLD1, PRP1, CSH1 などが特異的に検出できる [22-26]. また, 子宮内膜との接着, 融合分子である内在性レトロウイルス分子 (endogenous retrovirus: ERVs) の発現が BNC に認められる [27, 28]. これらの遺伝子は転写因子による特異的な制御を受け, 時期及び細胞特異的に発現する. たとえば, 転写因子 AP-2 ファミリーは, BNC に発現する SULT1E1, PAG1, PAG17, TMSB10, PRP1 及び CSH1 遺伝子の上流域に共通した配列の結合領域を持っていることから, これらの遺伝子発現を同時に調節することがうかがえる [29]. しかしタンパク質分子の発現時期が必ずしもすべて同時とは言えず, その転写の詳細な制御機構は今後の課題である.

5 子宮内膜に発現する分子の機能と調節

牛を含む反芻動物では、通常、子宮内膜小丘領域にだけ着床に伴い胎盤節が形成される。そのため小丘領域に特異的な分子が発現、着床を誘導すると考えられるが、その実態はほとんど不明である。受胎に際しては、子宮内膜の受容性（妊孕性）の可否が受胎率を左右する。大雑把には、P4とIFNTが妊孕性を調節すると言って過言でない。P4は多様な分子の調節を担っており、たとえば、細胞外マトリックス（extra-cellular matrix：ECM）酵素群（MMPやカテプシンとその関連分子）の発現制御を通し、内膜の構造を改変する。また、ガレクチンやムチン分子の機能調節を介して細胞接着を促す。OXT受容体やIFNTの調節は黄体機能の制御をつかさどるし、子宮腺の分泌機能調節を促すことから初期発生胚の発育及び拡張を担っている [30-32]。では子宮内膜での小丘領域とそれ以外の部分（小丘間領域）の間では何が異なるのであろうか。小丘領域には間葉性幹細胞が存在する可能性がある。小丘とそれ以外の部分から採取した間質細胞を継代培養すると小丘由来細胞の増殖性は増殖速度並びに継代可能回数も数倍高いことが明らかである。両者の細胞では細胞周期調節因子であるサイクリンEの発現が異なることから、小丘では増殖性の高い細胞群（間葉性幹細胞）の存在がうかがえる。

一方、分子生物学的検証から、上記したMMP、ガレクチンなどに加え、両領域間では、多種の遺伝子及び分子の発現差異が明らかである。ある報告では、妊娠20日における小丘領域では約450遺伝子が小丘間領域に比べ高発現であり、その内、約190遺伝子が妊娠現象により高発現した遺伝子であった。それらには、IFIT5、MX1、MX2、PLAC8など細胞の接着、増殖、細胞死、細胞の形態及び細胞内情報伝達に関わる遺伝子群が含まれる。また、胎盤節が形成され始める頃の妊娠角と非妊娠角子宮内膜上皮での遺伝子発現を比較した報告では、EGF、INHBA、BMP15などが妊娠角側で高発現することを認めている（図10） [32-35]。

これらを統合すると受胎時期の子宮では、P4やIFNTの統御下にECM改変分子、子宮内膜細胞接着因子、黄体機能刺激因子が発現することから、細胞の増殖及び接着、子宮液分泌、血管新生、免疫などの機構を調節して妊孕性を担保すると言える。

6 子宮内膜と受精胚の相互作用からみた着床現象

適正で確実な着床及び受胎のためには、受精胚の発育と子宮内膜受容性の同調が必須である。では子宮内膜は発情開始及び交配後、いつまで受精胚を受け入れることができるのであろうか。ET研究の結果では、子宮内膜の日齢換算に比べ受精胚齢が1～2日遅い胚を7日目頃

分類	遺伝子名
減少	・ Interferon・tau (IFNT)
	・ Pregnancy-associated glycoprotein 2 (PAG2)
	・ PAG6
	・ PAG8
	・ PAG15
	・ Cathepsin B (CTSB)
	・ Trophoblast Kunitz Domain protein 4 (TKDP4)
	・ Mucin 1 (MUC1)
上昇	・ Allograft inflammatory factor 1 (AIF1)
	・ CSH1 (Placental lactogen)
	・ Prolactin-related protein 1 (PRP1)
	・ PRP5
	・ PRP6
	・ PAG7
	・ PAG10
	・ PAG17
	・ CTSK
	・ Insulin growth factor binding protein 3 (IGFBP3)

図10 着床開始時点を境にして発現が減少あるいは上昇する遺伝子例

に移植しても着床・受胎には大きな影響を与えない。また、発情周期換算の16日の子宮に適正な胚を移植すると着床、受胎する。これらの結果は、牛子宮内膜は少なくとも発情後6～16日の間、受精胚の受け入れが可能である（妊孕性あり）ことを示している [36]。この子宮内膜の受け入れ態勢は受精胚由来の各種分子により調節される。その主体はTr由来である。牛のTrは特異的な細胞MNCとBNCからなり、MNCはIFNT、TKDP、BNCはPL、PRP、PAG、SOLD1などの特異分子を産生分泌する [22, 25]。着床・受胎の第1段階は卵巣由来のP4の影響下にあり、P4は子宮内膜細胞を直接刺激する。第2段階では、IFNTとP4は胚の伸張を刺激、調節すると同時に子宮内膜のUTMP産生、MMPやEMMPRINの活性化を通してECMを改変、子宮内膜の妊孕性を賦活化する。また、IFNTは子宮内膜におけるOXTRの発現抑制を介してPGF2 α 産生ひいては黄体の退行を防止する。第3段階には胚細胞と子宮内膜細胞の接着、浸潤が生じる。子宮側にはレクチン、ケモカイン、カテプシンなどの関連分子が発現する。一方、胚側にはPRP1、PL、SOLD1などBNC特異分子とともにケモカイン受容体が発現する。これらの分子はいずれも両組織細胞の接着、浸潤を促進する分子である。受精胚が子宮内膜に接着する時期の内膜ECMの動態は、特徴的で妊娠24日ではコラーゲンのI型はほとんど消失、加えて本来上皮細胞の基底膜直下に存在するIV型も消失している。しかしながら妊娠30日になると再構築は顕著で、絨毛叢や着床点の組織改変が生じている（図11） [36-38]。着床の最終段階は、胚のBNCと子宮内膜上皮細胞の融合である。BNCに発現する

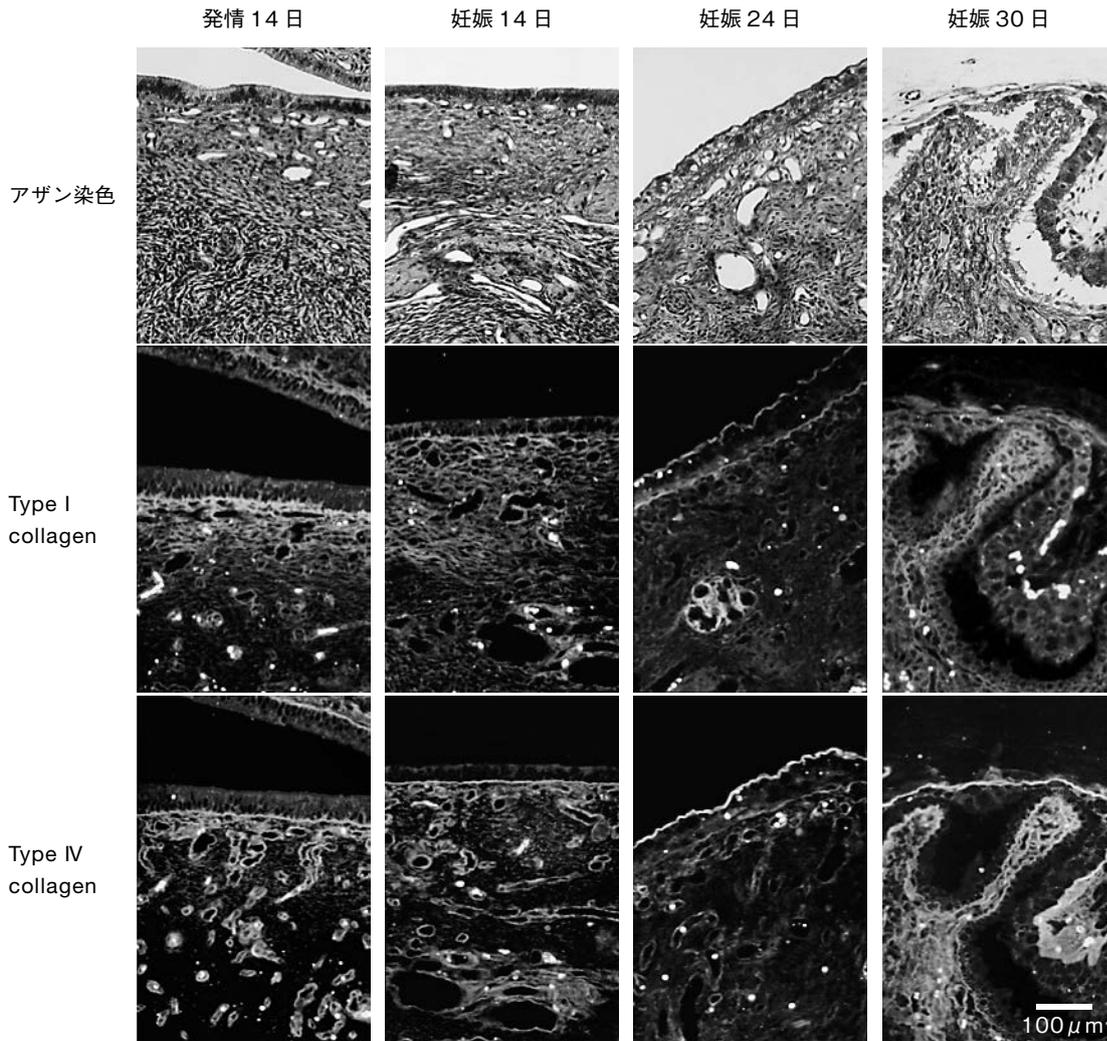


図 11 子宮内膜の細胞外マトリックスの動態 [37]

ERVs 分子である *Fematin1* や *Syncytin-Rum1* 及び細胞特異的 E-カドヘリン, β -カテニンなどが主導権を持つことになる [27, 28]. この過程では BNC は子宮内膜上皮と接着, 融合するとともに, 周囲の内膜上皮細胞を破壊, 除去し, 絨毛叢の形成領域を確保する. 妊娠の進行に伴い内膜の子宮腺細胞上皮が Tr と接しながら, この領域に侵入し, 最終的には母体側子宮内膜上皮層が再構築される. 絨毛叢形成は胎子の近くから始まり, 胎子の存在しない非妊角側に広がり, 胎盤節を形成していく (図 12). これらの過程からも明らかのように, 子宮内膜細胞に発現する遺伝子や分子は, 子宮腺細胞と内膜上皮細胞では, 時期及び発現動態が異なる. また, 子宮内膜間質細胞には, 胚並びに栄養膜細胞の機能変化に対応した IFNT に関連する免疫系分子 (*ISG15*, *MX1*, *MX2*, *OAS1*) や細胞内シグナル伝達系分子 (*STAT* など) などが発現する [31, 39]. これらを総合すると着床前の胚の早期発達時には IFNT と P4 の協調, 胚の伸張へと続き, 内膜上皮と BNC が対面, 接着するようになると BNC 由来の *PRP1* や *SOLD1* により BNC は内

膜側に浸潤する. さらに栄養膜細胞の分化が進むと, BNC 由来の ERVs による細胞融合が進行し, 多核細胞を形成する. その後, PL, PRPs, PAGs, TKDPs, カテプシンや TGF β スーパーファミリーなどの各種サイトカインが共同して血管新生, 絨毛叢を形成, 最終的にはその領域に胎盤節の構築が始まる. このように多くの分子が総合的に調和し, 着床・受胎と言う複雑な異なる組織間の融合を図り, 適正に進行すれば受胎となる [27-34].

7 問題点と展望

着床・受胎を成功裏にもたらしするためには, ①母体側子宮内膜の妊孕性に作用する環境要因 (細菌汚染, 栄養条件など) を調節, 制御すること, ②適正な胚の産出あるいは選択にかかっている. 子宮内膜機能は, P4 及び IFNT が主調節要因であり, その制御下に子宮内膜上皮細胞, 腺細胞, ECM をそれぞれ調節する各種の分子が適時に発現し, 妊孕性を担保する. 胚側の要因は, 受精胚が最初に分化する 2 つの細胞系である ICM と Tr の

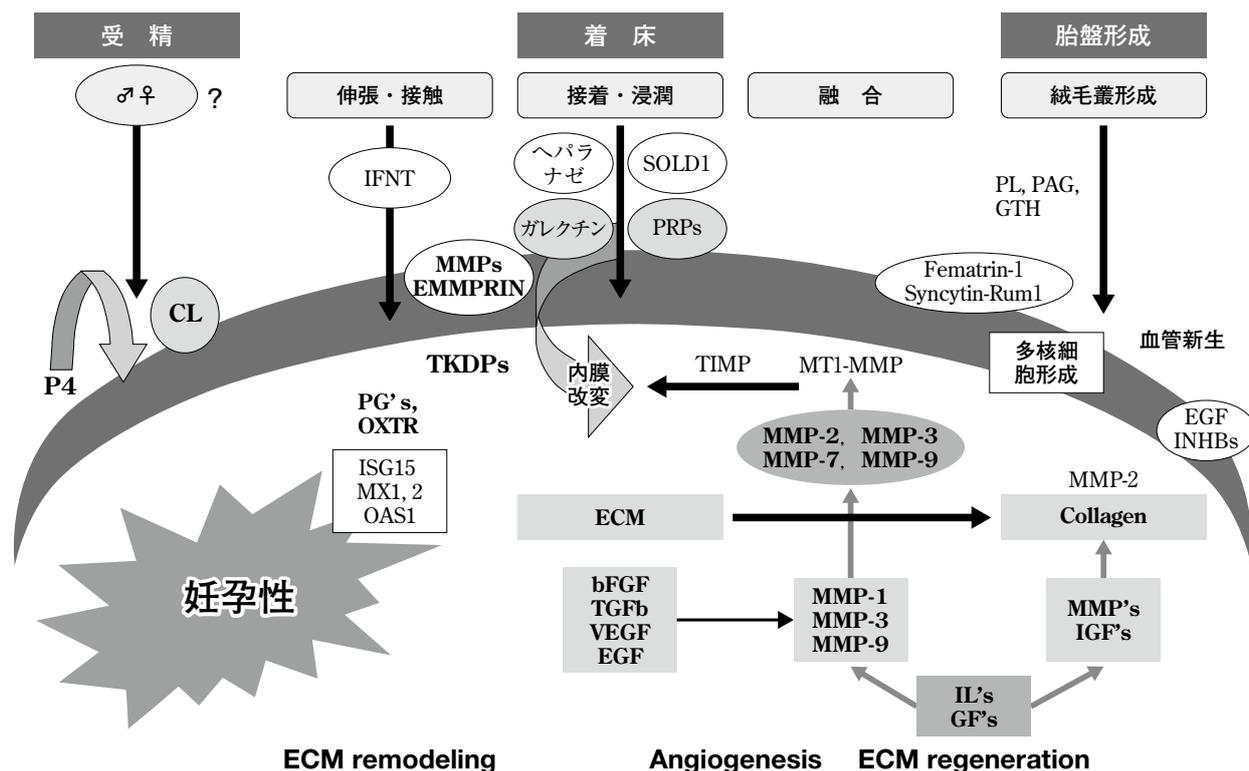


図 12 子宮内膜—受精胚の相互作用

増殖，分化の同調性が鍵と言える。そのためそれらを調節するエピジェネティックな制御系の差異を検証すれば，着床や分娩に至る産子へ発育する胚の選別は可能と推定できる。

着床，受胎率を改善するための技術開発は可能か？そのシンプルな答えはまだ明らかでないが，その端緒はみえてきたと言える。着床前後の子宮内膜の妊孕性は，いくつかの遺伝子及び分子の発現をモニターしつつ，ETによりその成否を検証することで，機能マーカー分子の絞り込みが可能であろう。また，胚の選別は，上記で述べた遺伝子群のエピジェネティックな調節系を検証することから，妊娠期を通して発育し，生存子として誕生する受精胚を選択することが可能と考えられる。

分子生物学的手法を用いたこのような基礎的な検証は，一見，臨床現場に適用できない研究と捉えられがちであるが，受精胚の品質，子宮内膜機能の評価並びに早期妊娠診断法などの実用的技術開発をもたらすもので，産業動物臨床現場での獣医療の改善だけでなく，人を含む動物の受胎，妊娠成立の謎の解明に貢献するものである。

引用文献

[1] Spencer TE : Early pregnancy: Concepts, challenges, and potential solutions, *Animal Frontiers*, 3, 48-55 (2013)
 [2] Ealy AD, Yang QE : Control of interferon-tau expres-

sion during early pregnancy in ruminants, *Am J Reprod Immunol*, 61, 95-106 (2009)

[3] Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC : Fetal-maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants, *Soc Reprod Fertil Suppl*, 64, 379-396 (2007)
 [4] Hashizume K : Analysis of uteroplacental-specific molecules and their functions during implantation and placentation in the bovine, *J Reprod Dev*, 53, 1-11 (2007)
 [5] Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium : The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution, *Science*, 324, 522-528 (2009)
 [6] Hasler JF : Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences, *Theriogenology*, 81, 152-169 (2014)
 [7] Ishiwata H, Katsuma S, Kizaki K, Patel OV, Nakano H, Takahashi T, Imai K, Hirasawa A, Shiojima S, Ikawa H, Suzuki Y, Tsujimoto G, Izaiki Y, Todoroki J, Hashizume K : Characterization of gene expression profiles in early bovine pregnancy using a custom cDNA microarray, *Mol Reprod Dev*, 65, 9-18 (2003)
 [8] Hashizume K, Ushizawa K, Patel OV, Kizaki K, Imai K, Yamada O, Nakano H, Takahashi T : Gene expression and maintenance of pregnancy in bovine: roles of trophoblastic binucleate cell-specific molecules, *Reprod Fertil Dev*, 19, 79-90 (2007)
 [9] Campbell KHS, Mcwhir J, Ritchie WA, Wilmut I : Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell

- line, *Nature*, 380, 64-66 (1996)
- [10] Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y : Eight calves cloned from somatic cells of a single adult, *Science*, 282, 2095-2098 (1998)
- [11] Hashizume K, Ishiwata H, Kizaki K, Yamada O, Takahashi T, Imai K, Patel OV, Akagi S, Shimizu M, Takahashi S, Katsuma S, Shiojima S, Hirasawa A, Tsujimoto G, Todoroki J, Izaike Y : Implantation and placental development in somatic cell clone recipient cows, *Cloning Stem Cells*, 4, 197-209 (2002)
- [12] Hill JR, Edwards JF, Sawyer N, Blackwell C, Cibelli JB : Placental anomalies in a viable cloned calf, *Cloning*, 3, 83-88 (2001)
- [13] Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME : Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses, *Biol Reprod*, 63, 1787-1794 (2000)
- [14] Kato Y, Li X, Amarnath D, Ushizawa K, Hashizume K, Tokunaga T, Taniguchi M, Tsunoda Y : Comparative gene expression analysis of bovine nuclear-transferred embryos with different developmental potential by cDNA microarray and real-time PCR to determine genes that might reflect calf normality, *Cloning Stem Cells*, 9, 495-511 (2007)
- [15] Sawai K : Studies on gene expression in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer, *J Reprod Dev*, 55, 11-16 (2009)
- [16] Tanaka S, Oda M, Toyoshima Y, Wakayama T, Tanaka M, Yoshida N, Hattori N, Ohgane J, Yanagimachi R, Shiota K : Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer, *Biol Reprod*, 65, 1813-1821 (2001)
- [17] Kono T, Obata Y, Wu Q, Niwa K, Ono Y, Yamamoto Y, Park ES, Seo JS, Ogawa H : Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood, *Nature*, 428, 860-864 (2004)
- [18] 佐々木裕之 : エピジェネティクスとは何か, 佐々木裕之編, エピジェネティクス, 3-6, シュプリンガー・フェアラーク, 東京 (2004)
- [19] Kremenskoy M, Kremenska Y, Suzuki M, Imai K, Takahashi S, Hashizume K, Yagi S, Shiota K : DNA methylation profiles of donor nuclei cells and tissues of cloned bovine fetuses, *J Reprod Dev*, 52, 259-266 (2006)
- [20] Alexopoulos NI, Maddox-Hyttel P, Tveden-Nyborg P, D'Cruz NT, Tecirlioglu TR, Cooney MA, Schauser K, Holland MK, French AJ : Developmental disparity between in vitro-produced and somatic cell nuclear transfer bovine days 14 and 21 embryos: implications for embryonic loss, *Reproduction*, 136, 433-445 (2008)
- [21] Degrelle SA, Jaffrezic F, Champion E, Lê Cao KA, Le Bourhis D, Richard C, Rodde N, Fleurot R, Everts RE, Lecardonnel J, Heyman Y, Vignon X, Yang X, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Hue I : Uncoupled embryonic and extra-embryonic tissues compromise blastocyst development after somatic cell nuclear transfer, *PLoS One*, 7, e38309 (2012)
- [22] Blomberg L, Hashizume K, Viebahn C : Blastocyst elongation, trophoblastic differentiation, and embryonic pattern formation, *Reproduction*, 135, 181-195 (2008)
- [23] Degrelle SA, Lê Cao K-A, Heyman Y, Everts RE, Champion E, Richard C, Ducroix-Crépy C, Tian XC, Lewin HA, Renard J-P, Robert-Granié C, Hue I : A small set of extra-embryonic genes defines a new landmark for bovine embryo staging, *Reproduction*, 141, 79-89 (2011)
- [24] Turenne N, Tiys E, Ivanisenko V, Yudin N, Ignatieva E, Valour D, Degrelle SA, Hue I : Finding biomarkers in non-model species: literature mining of transcription factors involved in bovine embryo development, *BioData Min*, 5, 12 (2012)
- [25] Madeja ZE, Sosnowski J, Hryniewicz K, Warzych E, Pawlak P, Rozwadowska N, Plusa B, Lechniak D : Changes in sub-cellular localisation of trophoblast and inner cell mass specific transcription factors during bovine preimplantation development, *BMC Dev Biol*, 13, 32 (2013)
- [26] Awad M, Koshi K, Kizaki K, Takahashi T, Hashizume K : SOLD1 is expressed in bovine trophoblast cell lines and regulates cell invasiveness, *Reprod Biol Endocrinol*, 12, 55 (2014)
- [27] Nakaya Y, Koshi K, Nakagawa S, Hashizume K, Miyazawa T : Fematrin-1 is involved in fetomaternal cell-to-cell fusion in Bovinae placenta and has contributed to diversity of ruminant placentation, *J Virol*, 87, 10563-10572 (2013)
- [28] Cornelis G, Heidmann O, Degrelle SA, Vernochet C, Lavielle C, Letzelter C, Bernard-Stoecklin S, Hassanin A, Mulot B, Guillomot M, Hue I, Heidmann T, Dupressoir A : Captured retroviral envelope syncytin gene associated with the unique placental structure of higher ruminants, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, E828-E837 (2013)
- [29] Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Ishiwata H, Kaneyama K, Kizaki K, Hashizume K : Global gene expression analysis and regulation of the principal genes expressed in bovine placenta in relation to the transcription factor AP-2 family, *Reprod Biol Endocrinol*, 5, 17 (2007)
- [30] Bauersachs S, Ulbrich SE, Gross K, Schmidt SEM, Meyer HHD, Wenigerkind H, Vermehren M, Sinowatz F, Blum H, Wolf E : Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity, *Reproduction*, 132, 319-331 (2006)
- [31] Spencer TE, Sandra O, Wolf E : Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches, *Reproduction*, 135, 165-179 (2008)
- [32] Forde N, Carter F, Spencer TE, Bazer FW, Sandra O,

- Mansouri-Attia N, Okumu LA, McGettigan PA, Mehta JP, McBride R, O'Gaora P, Roche JF, Lonergan P : Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant?, *Biol Reprod*, 85, 144-156 (2011)
- [33] Mansouri-Attia N, Aubert J, Reinaud P, Giraud-Delville C, Taghouti G, Galio L, Everts RE, Degrelle S, Richard C, Hue I, Yang X, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Sandra O : Gene expression profiles of bovine caruncular and intercaruncular endometrium at implantation, *Physiol Genomics*, 39, 14-27 (2009)
- [34] Sugawara K, Kizaki K, Herath CB, Hasegawa Y, Hashizume K : Transforming growth factor beta family expression at the bovine feto-maternal interface, *Reprod Biol Endocrinol*, 8, 120 (2010)
- [35] Minten MA, Bilby TR, Bruno RG, Allen CC, Madsen CA, Wang Z, Sawyer JE, Tibary A, Neiberghs HL, Geary TW, Bauersachs S, Spencer TE : Effects of fertility on gene expression and function of the bovine endometrium, *PLoS One*, 8, e69444 (2013)
- [36] Betteridge KJ, Eaglesome MD, Randall GC, Mitchell D : Collection, description and transfer of embryos from cattle 10-16 days after oestrus, *J Reprod Fertil*, 59, 205-216 (1980)
- [37] 橋爪一善, 木崎景一郎, 山田 治 : 子宮内膜細胞外マトリックス, *妊娠の生物学*, 監修: 中山徹也, 牧野恒久, 高橋迪雄, 201-209, 永井書店, 大阪 (2001)
- [38] Mishra B, Kizaki K, Koshi K, Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Sato T, Ito A, Hashizume K : Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and its expected roles in the bovine endometrium during gestation, *Domest Anim Endocrinol*, 42, 63-73 (2012)
- [39] Kizaki K, Shichijo-Kizaki A, Furusawa T, Takahashi T, Hosoe M, Hashizume K : Differential neutrophil gene expression in early bovine pregnancy, *Reprod Biol Endocrinol*, 11, 6 (2013)