

妊娠初期のマウス子宮内膜におけるmacrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α)の発現分布様式の検討

呉 利嘉¹⁾, 藤宮 峯子²⁾, 秋山 稔¹⁾, 後藤 栄¹⁾,
竹林 浩一¹⁾, 高倉 賢二¹⁾, 野田 洋一¹⁾

1) 滋賀医科大学産婦人科教室

2) 滋賀医科大学第一解剖学教室

Distribution of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 α) in mouse uterus during early pregnancy

Wu LIJIA¹⁾, Mineko FUJIMIYA²⁾, Minoru AKIYAMA¹⁾, Sakae GOTO¹⁾,
Koichi TAKEBAYASHI¹⁾, Kenji TAKAKURA¹⁾, Yoichi NODA¹⁾

1) Department of Obstetrics and Gynecology, Shiga University of Medical Science

2) First Department of Anatomy, Shiga University of Medical Science

Abstract: Previous studies demonstrated that the presence and distribution of macrophages in the mouse uterus is dependent on cyclical production of estrogen and progesterone and that, at the time of implantation, macrophages are very clearly increased in number especially at subepithelial area. Accumulation of macrophages in pregnant uterus appears to be caused in part by ovarian hormone-stimulated CSF-1 production and in part by others as yet unidentified uterine chemotactic factors. Recently, it was reported that macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), one of β -chemokine subfamily whose target cells are T cells and macrophages, was expressed in mouse uterus throughout pregnancy. However, no morphological assessment has been performed yet.

In this immunohistochemical study, we examined the spatio-temporal distribution of MIP-1 α positive cells in the mouse endometrium and decidua between days 0 and 8 of pregnancy, and obtained the following results. Firstly, the concentration of MIP-1 α positive cells in the periluminal area of endometrium (called "primary decidua" after implantation period) was low on days 0 and 3, and high on days 4 and 5, but not thereafter. Secondly, the concentration of MIP-1 α positive cells in the perimyometrial area of endometrium (called "secondary decidua" after implantation period) was high on days 3 to 8 thereafter. Lastly, most of MIP-1 α positive cells in the mouse endometrium during early pregnancy were macrophages.

These changes of distribution of MIP-1 α positive macrophages may be involved in the successful conception in mice.

Key words: MIP-1 α , mouse endometrium, implantation, early pregnancy, immunohistochemistry

Received September 29, 2000: Accepted after revision December 4, 2000

Correspondence: 滋賀医科大学産科学婦人科学講座 呉 利嘉 〒520 2192 大津市瀬田月輪町

はじめに

妊娠の成立に際し子宮内膜ではマクロファージや白血球，T細胞などの特異的な浸潤が観察され，これらの免疫担当細胞の誘導が哺乳類の妊孕現象に深く関わっていることが推測されている^{3,4,9,10,18}．多核白血球やマクロファージの遊走活性を調節する炎症性サイトカインの一群には，よく似たアミノ酸配列をもつためにケモカインと呼ばれるものがある．ケモカインは，一番N末側の2つのシステインの連鎖配列の違いによって， α ケモカイン（別名CX₂Cケモカイン：システインとシステインとの間に1つの異なるアミノ酸が存在する）と β ケモカイン（別名CCケモカイン）との2つのサブファミリーに大別される．一般に前者は好中球に対して，後者は単球，マクロファージに対して遊走活性をもつことで知られる²⁰．

近年， β ケモカインに属するmonocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)や， α ケモカインに属するinterleukin-8 (IL-8)がヒト子宮内膜においても合成され⁶，しかも他のいくつかのサイトカインと同様に，分泌期にこれらの合成が亢進していることが報告された^{6,16}．

最近，秋山らは， β ケモカインの1つであるmacrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α)が，増殖期および分泌期のヒト子宮内膜上皮細胞に発現していることを報告し¹，ケモカインの子宮内膜における役割が注目されるようになってきたが，これらの役割をより深く解明するためには動物モデルが必要である．また，妊娠マウス子宮においてMIP-1 α が発現していることが最近報告されたが¹⁹，妊娠初期におけるマウス子宮内膜でのMIP-1 α の局在，分布を調べた報告はこれまでにない．そこで今回われわれは妊孕現象におけるMIP-1 α の役割をよりよく理解する第一歩として，着床前後におけるマウス子宮内膜のMIP-1 α の発現分布を免疫組織化学的方法を用いて解析したのでここに報告する．

材料と方法

1．実験動物と組織調製

4週齢のICRマウス（日本Charles River Inc.）を温度 23 ± 2 ，湿度 $50 \pm 10\%$ ，明暗各12時間で水，食事制限なしの条件で飼育した．過排卵処理は5～6週齢の雌マウスにPMSG (pregnant mare serum gonadotropin；帝国臓器) 5単位を腹腔内投与し，48時間後にhCG (human chorionic gonadotropin；帝国臓器) 5単位を腹腔内投与し，雄マウスと一晩同居させ，翌朝膣栓を確認した．その日を妊娠第1日目とした．21匹の雌マウスを3匹ずつ7グループ，すなわち非妊娠群と妊娠3,4,5,6,7,8日目のグループに分けた．麻酔はペントバルビタール (50mg/kg) の腹腔内投与で行い，左心室から5 ml/minの速度で4% paraformaldehyde (PFA) 0.5% glutaraldehyde (Glu)，0.2% picric acid (PA) in 0.1 M phosphate-buffer (PB, pH 7.4) を4で10分間灌流した後子宮を摘出した．妊娠3～5日目の動物ではO'Neillらの洗浄法に準じて¹⁷子宮の中にblastocystsの存在を確認し，妊娠6～8日目では肉眼的に妊娠を確認した．取り出した子宮は4% PFA 0.2% PA in 0.1 M PB (pH 7.4) 溶液中で4で24時間後固定した後，15% sucrose in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) 溶液中で4で4日間洗浄した．10% gelatin溶液に37で6時間包埋し，氷冷により固めた後，cryostatで10 μ mの厚さの切片を作製した．切片はPBST (0.1M PBS containing 0.3% Triton X-100) 溶液中に4日間浸漬し，免疫組織化学染色を行なった．胚を含む子宮の中央部の切片を染色に用いた．

2．免疫組織化学

上記作製の子宮切片を0.1% trypsin (Sigma Chemical Co.) 0.068 mM calcium chloride in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) 溶液中で20で10分間前処理を行なった．PBSTで切片を10分間3回洗浄後，抗マウスmacrophage inflammatory protein-1 α 抗体 (MIP-1 α ウサギポリクローナル抗体，HyCult biotechnology b.v)^{5,7,13}，PBST1000倍希釈溶液中で4で5日間反応させ

た¹²⁾。次に内因性のペルオキシダーゼを除去するために0.1% H₂O₂ in PBS及び0.1% phenylhydrazine in PBSをそれぞれ室温で30分間反応させた。さらにbiotinylated anti-rabbit IgG 2次抗体 (Vector Laboratories Inc.) PBST1000倍希釈溶液中で室温で2時間反応させ、さらにavidin-biotin-peroxidase complex (ABC Kit, Vector Laboratories Inc.) PBST1000倍希釈溶液中で室温で1.5時間反応させた。免疫反応は0.01% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (日本同仁化学研究所), 0.1% 硫酸アンモニウムニッケル, 0.0003% H₂O₂ in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH7.6) 溶液中で10分間発色を行なった。切片はスライドガラスに載せ0.1% Neutral-Redで対位染色後、アルコール脱水、エンテランに封入し光学顕微鏡下で観察した。マウスの肺と脾臓を陽性コントロールとし、陰性コントロールは一次抗体を抜いて免疫染色を行った。

3. 二重標識免疫組織化学

上記の免疫組織化学染色方法と同様に、最初に抗マウスMacrophage抗体 (F4/80 IgG 2 α ラブ

トモノクローナル抗体BMA Co. ¹⁴⁾, PBST1000倍希釈溶液中で4日間で5日間反応させ、2次抗体, ABCを経て、免疫反応は0.01% 3,3'-diaminobenzidine (DAB), 0.0003% H₂O₂ in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH7.6) 溶液中で行い、陽性構造を茶色で染色した。さらにMIP-1 α 抗体PBST1000倍希釈溶液中で4日間で5日間反応させて、2次抗体, ABC反応を経て、免疫反応は0.01% 3,3'-diaminobenzidine (DAB), 0.1% 硫酸アンモニウムニッケル, 0.0003% H₂O₂ in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH7.6) 溶液中で行い、陽性構造を紫色で染色した。

4. MIP-1 α 陽性細胞密度の画像解析

非妊娠と妊娠3~5日目：子宮中央部を含んで縦の切片の子宮腔側内膜 (periluminal area) と子宮筋側内膜 (perimyometrial area) 各々237.60 μm^2 (光顕対物 $\times 20$) の領域に含まれる全間質細胞数に占めるMIP-1 α 陽性細胞数の比率 (陽性細胞数/間質細胞数 $\times 100\%$) をPA160D/EM/NR画像解析装置とMacintoshのPhotoshop4.0を組み合

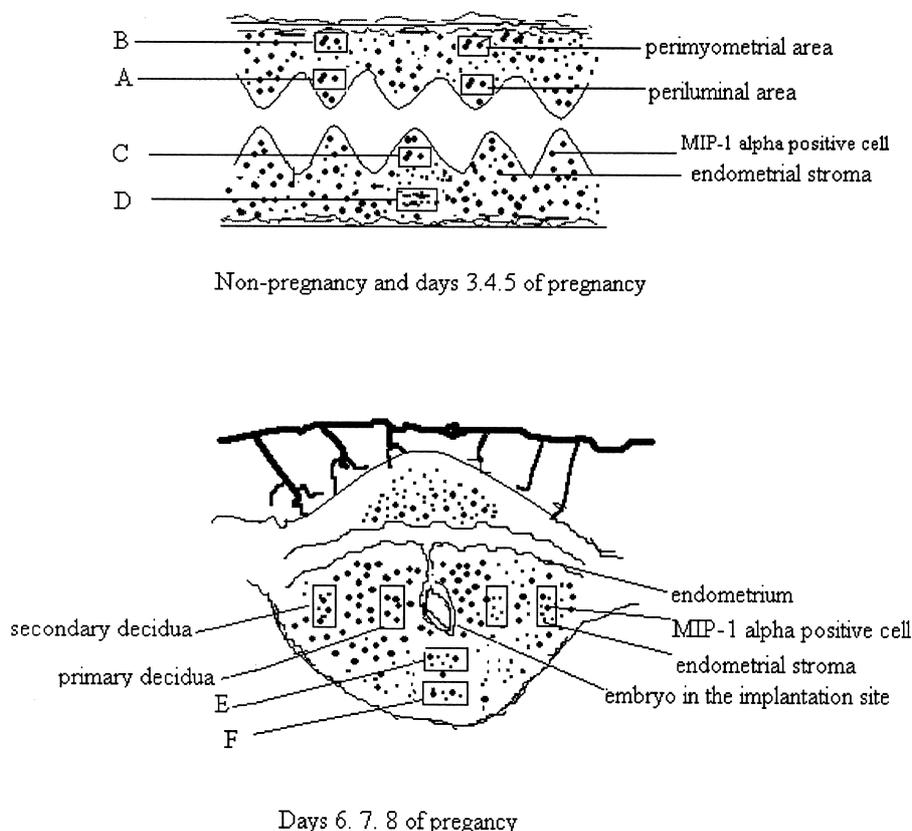


Fig. 1. 交配直後の非妊娠, 妊娠3, 4, 5日目及び妊娠6, 7, 8日目におけるMIP-1 α 陽性細胞と子宮内膜間質細胞の分布のモデル図. A-Fの四角の領域はFig. 2のA-Fに対応する.

わせて測定した (Fig. 1). 妊娠 6 ~ 8 日目: 同様に胚の着床点の近傍 (primary decidua) 及び胚の着床周辺部 (secondary decidua) 各々 237.60 μm^2 の領域に含まれる全間質細胞数に占める MIP-1 α 陽性細胞数の比率を画像解析装置で測定した (Fig. 1)¹⁵⁾.

非妊娠及び妊娠 3 ~ 5 日目の子宮切片 1 枚当たり periluminal area 3 箇所と perimyometrial area 3 箇所もしくは, 妊娠 6 ~ 8 日目の子宮切片 1 枚当たり primary decidua 3 箇所と secondary decidua 3 箇所の平均値を求めた. 動物 1 匹につき子宮切片 3 枚の解析を行い, 3 匹の動物の平均, 標準誤差を求めた.

5. 統計学処理

妊娠 3 ~ 8 日目マウスの子宮 periluminal area 及び primary decidua における MIP-1 α 陽性細胞密度と perimyometrial area 及び secondary decidua における MIP-1 α 陽性細胞密度の妊娠経過における変化を one way ANOVA を用いて非妊娠群と比較した.

結 果

妊娠マウスにおける子宮内膜中の MIP-1 α 陽性細胞の分布は妊娠日数に応じて変化した. Fig. 1 で四角で囲んだ領域の顕微鏡写真を Fig. 2 に示した. 非妊娠マウスでは periluminal area, perimyometrial area とともに MIP-1 α 陽性細胞が疎にびまん性に分布した (Fig. 2, AA'BB'). 妊娠 4 日目では periluminal area, perimyometrial area とともに子宮内膜間質細胞の増加が見られ, MIP-1 α 陽性細胞も増加する傾向にあった (Fig. 2 CC', DD'). 妊娠 4 ~ 5 日目では内膜上皮直下の periluminal area で陽性細胞が増加する傾向があった (Fig. 2 CC'). 妊娠 6 ~ 8 日目では胚周辺の primary decidua (着床前の periluminal area に相当する部分で胚に比較的近い部分の脱落膜領域) では MIP-1 α 陽性細胞は低密度となったが, 子宮筋層に近い secondary decidua (着床前の perimyometrial area に相当する部分で胚から比較的遠い部分の脱落膜領域) では妊娠 4 日目より高密度に観察され, 少なくとも妊娠 8 日目までは MIP-1 α 陽

性細胞は高密度に観察された (Fig. 2 EE', FF'). すなわち着床後は primary decidua の着床点の近くでは陽性細胞の密度が少なく, 周辺にむかうにつれて多くなる所見が得られた (Fig. 2 Day 7, E). さらに栄養膜外胚葉 (trophectoderm) においても一部に MIP-1 α 陽性細胞が見られた (Fig. 2 Day 7).

次に抗 MIP-1 α 抗体と F4/80 IgG 2 α ラットモノクローナル抗体 (抗 Macrophage 抗体) で二重染色をおこなったところ MIP-1 α 陽性細胞のほとんどはマクロファージであることがわかった (Fig. 2 E"). すなわち脱落膜に存在する MIP-1 α 陽性細胞の大部分がマクロファージであることが示唆された.

交配直後から妊娠 8 日目までのマウス子宮内膜における MIP-1 α 陽性細胞密度の推移を画像解析によって数値化して表した (Fig. 3, 4). 交配直後における periluminal area における陽性細胞密度は 5.8% であった (Fig. 3). 妊娠 3 日目の periluminal area における陽性細胞密度は 6.7% で非妊娠群と差がなかったが, 妊娠 4 日目で 12.9% になり, 5 日目で 13.2% と最大になり, 着床期には有意に増加した. しかし着床後の妊娠 6 日目以降になると primary decidua (着床前の periluminal area に相当する部分で胚に比較的近い部分の脱落膜領域) では妊娠 3 日目のレベルに低下した (Fig. 3).

また, 交配直後における perimyometrial area の MIP-1 α 陽性細胞密度は 4.5% であり, 妊娠 3 日目では 11%, 4 日目で 12.1%, 5 日目で 11.6%, 6 日目で 14.1%, 7 日目で 14.7%, 8 日目で 12.6% であった (Fig. 4). 着床前の妊娠 3 目を過ぎると perimyometrial area では, MIP-1 α 陽性細胞は有意に増加し, 少なくとも妊娠 8 日目まで secondary decidua では MIP-1 α 陽性細胞密度は高値を持続した (Fig. 4).

考 察

近年, ヒト子宮内膜の脱落膜細胞においても種々のサイトカインによって in vitro 下に MIP-1 α の産生が誘導されることが報告された¹¹⁾. さらに 1999 年, われわれのグループによって MIP-1 α が正常ヒト子宮内膜腺上皮において発現していることが明らかとなった¹⁾, 今回の研究によって, 妊娠初期マウス

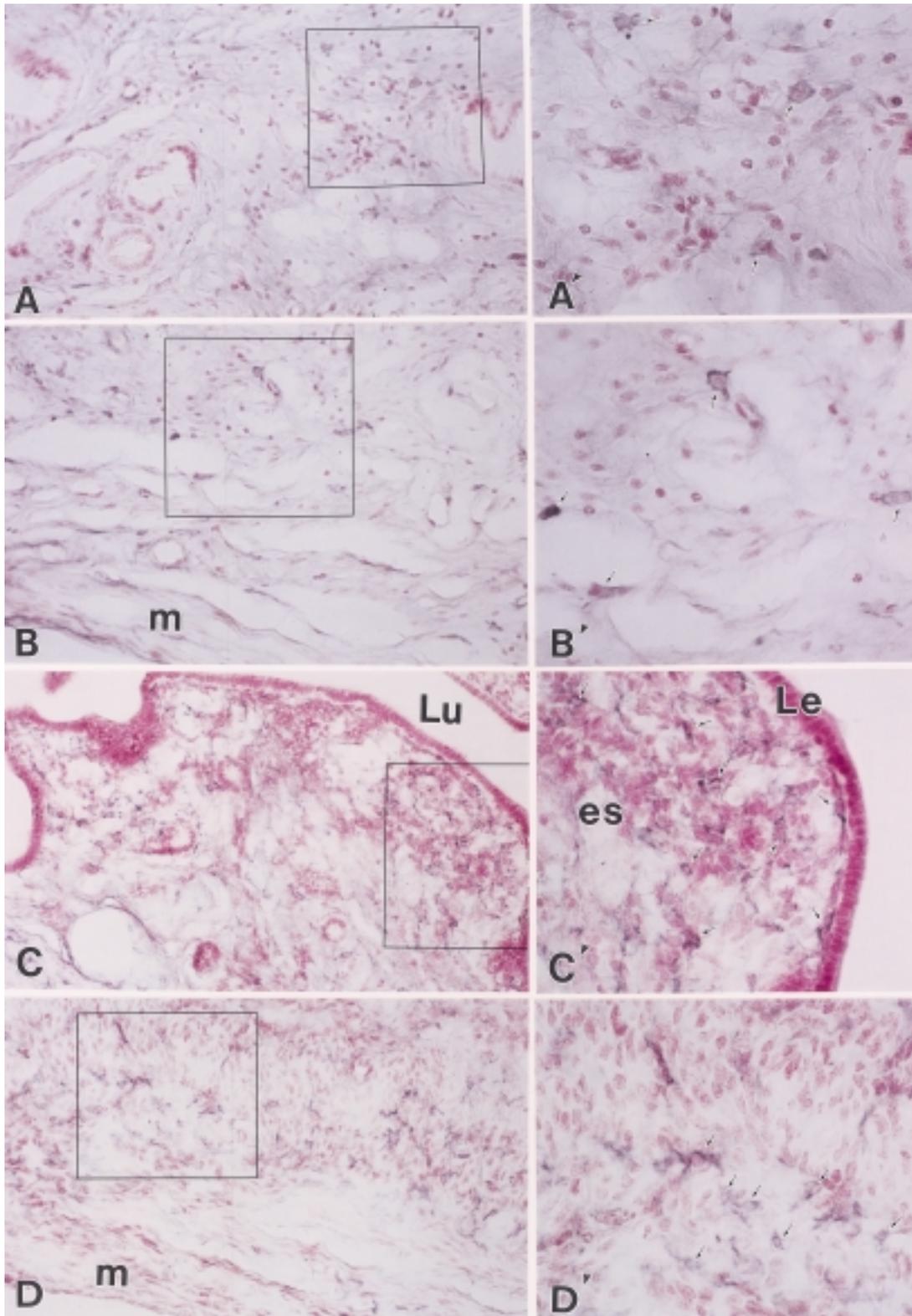


Fig. 2. 非妊娠 (A A', B B'), 妊娠 4 日目 (C C', D D') 及び妊娠 7 日目 (Day 7, E E', E'' F F') における子宮内膜の MIP-1 α 陽性細胞の分布.

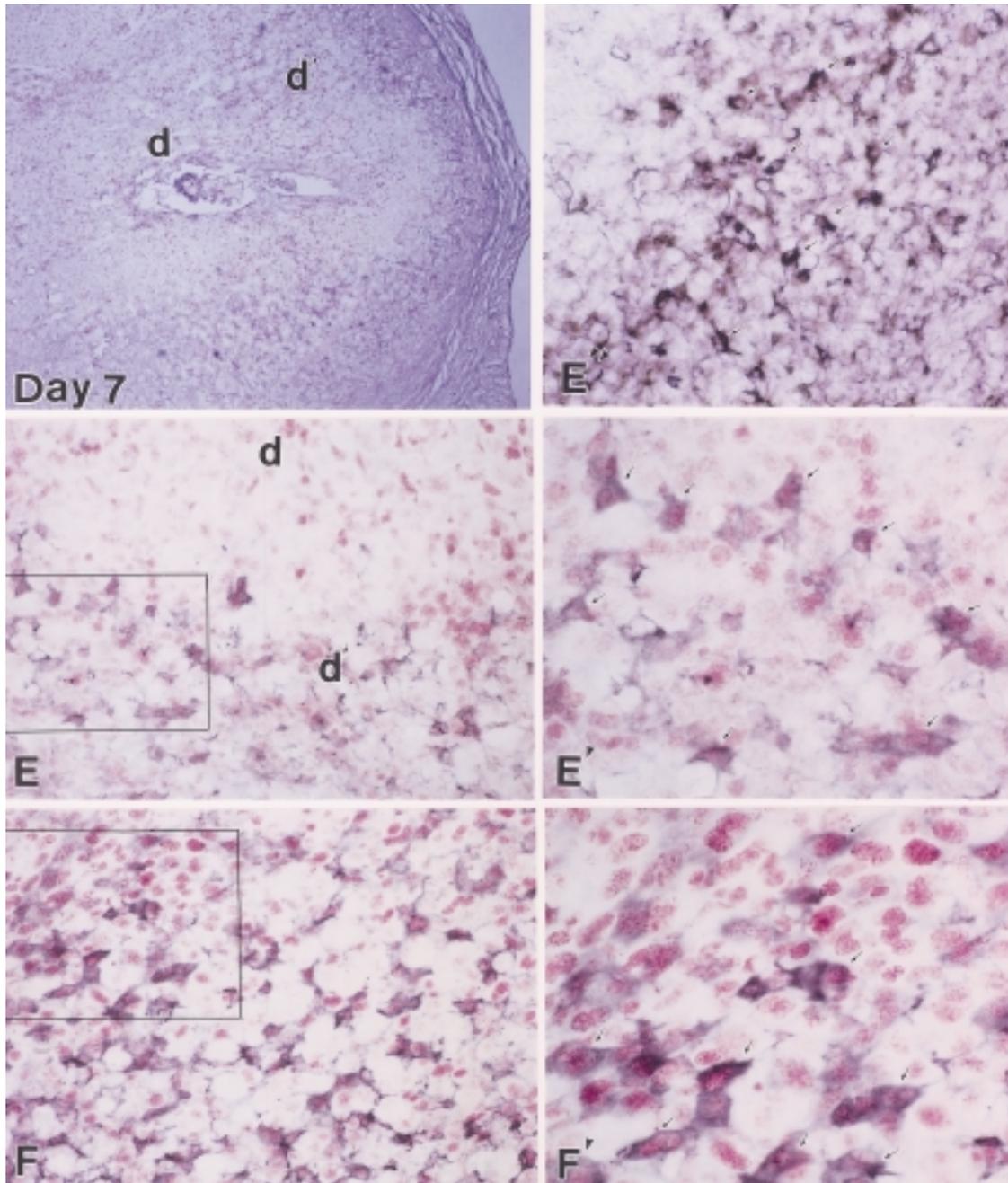
A, C は periluminal area, B, D は perimyometrial area, E は primary decidua, F は secondary decidua を示し, Day 7 は妊娠 7 日目の胚の着床の全貌を示す. $\times 45$

A' F' はそれぞれ A-F の四角の領域の拡大写真である.

E'' は MIP-1 α と macrophage 抗体の二重免疫染色所見を示す.

A-F 及び E'' $\times 220$

A' F' $\times 420$



では子宮内膜上皮細胞にはその発現が認められず，その産生細胞のほとんどが子宮内膜間質に存在するマクロファージであったことは興味深い．すなわちMIP-1 α は，ヒト子宮内膜では月経周期全般を通じて間質でほとんど認められず，上皮細胞にのみ強くその発現が認められたのに対し，マウスにおいては，少なくとも交配直後では子宮内膜間質に弱くびまん性に認められたのみであり，上皮細胞には認められなかった．この相違の原因としては(1)ヒトとマウスではそもそも着床機構にかなり異なる点があるため，あるいは(2)ヒトでの発現分布は非妊娠子宮に

ついて調べたものであるのに対し，マウスでは妊娠子宮について調べたものであるためと考えられるが，詳細は不明である．さらにマウスでは管腔に近い間質(periluminal area)において胚の着床直前時期にのみ高密度にMIP-1 α 産生細胞が観察され，妊娠6～8日目になると，子宮内膜間質細胞の脱落膜化がみられ，着床点近傍のprimary deciduaにはMIP-1 α 陽性細胞は疎らになり，MIP-1 α 陽性細胞は着床点から離れるにしたがってその数が増加する傾向が認められた．これらの所見から，子宮内膜への胚の着床という現象はマクロファージ数や

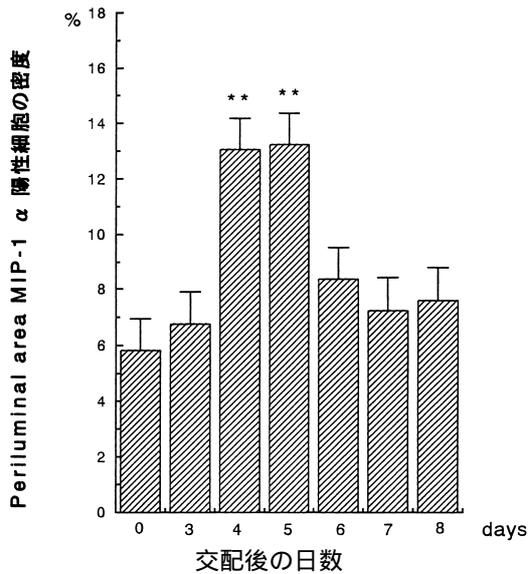


Fig. 3. MIP-1α 陽性細胞の子宮内膜periluminal area における密度の推移.

横軸は非妊娠(交配直後day 0)及び妊娠日数(days 3-8)を示す.縦軸は子宮内膜間質細胞に占めるMIP-1α陽性細胞の密度(%)を示す.

数値はすべて平均値±標準誤差(n=3). * P<0.05; ** P<0.001(one way ANOVA)

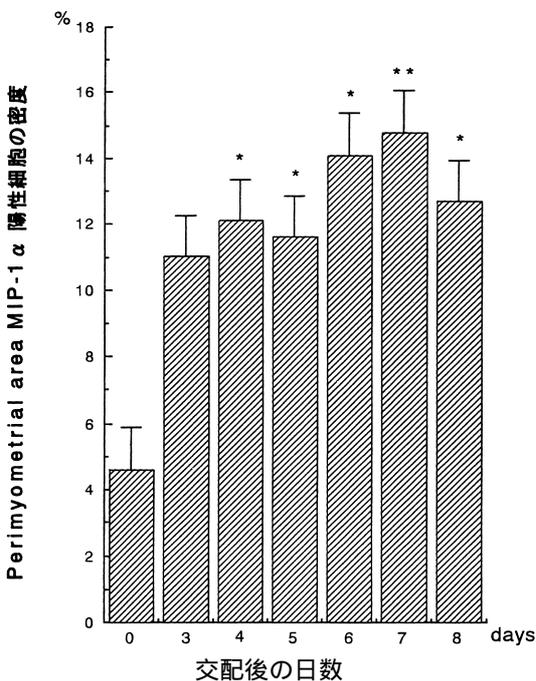


Fig. 4. MIP-1α 陽性細胞の子宮内膜perimyometrial area における密度の推移

MIP-1α 陽性細胞数の減少など局所免疫的に抑制された状態で開始されると推測される.これらの免疫抑制因子として,リンパ球,とくにhelper T-1細胞, CD 8-T細胞を介した抑制作用や抗体を介した抑制

作用があり,同時にMIP-1αをはじめとするケモカインの作用や分布を考慮する必要があると考えられる⁹⁾. 子宮筋層に近い部分の間質(perimyometrial area,着床後ではsecondary decidua)ではMIP-1α陽性細胞が着床前から着床後も持続して集積しているという観察結果は,着床と妊娠の維持という2つの現象にMIP-1αがそれぞれ異なった役割を演じている可能性が考えられよう.また,ヒトではプロゲステロンが妊娠に必須であるのに対して,マウスにおいては着床直前にエストロゲンサージがおこることが着床に必須であり,管腔に近い間質でのMIP-1α陽性細胞の集積が,ステロイドホルモン影響下に誘導されている可能性が考えられるが⁸⁾,ごく最近の研究によれば,MIP-1αの発現誘導にはエストロゲンおよびプロゲステロンは無関係らしい¹⁹⁾.受精卵が卵管から子宮腔内に移動する妊娠3日目よりMIP-1αの発現が高まることから,MIP-1αの発現を促す因子として胚由来因子が可能性の一つにあげられる.すなわちこの微量な胚由来因子によってMIP-1αがまず発現誘導され,次にマクロファージにautocrine, paracrine的な作用を及ぼし,そのシグナルを増幅してマクロファージの集積を増強させているのかもしれない.

妊娠初期のヒト脱落膜でのMIP-1αの発現分布の報告は現在まだないが,着床現象には種間による相違があり,ケモカインの産生様式という観点から,ヒトとマウスの着床現象を比較解析してみるのも興味深い.

文 献

- 1) Akiyama M, Okabe H, Takakura K, Fujiyama Y, Noda Y: Expression of macrophage inflammatory protein-1α (MIP-1α) in human endometrium throughout the menstrual cycle. Br J Obs Gyn 106: 725-730, 1999.
- 2) Austyn JM, Gordon S: F 4/80, a monoclonal antibody directed specifically against mouse macrophages. Eur J Imm 11: 805-815, 1981.
- 3) Brandon JM: Distribution of macrophages in the mouse uterus from one day to three months after parturition, as defined by the im-

- munohistochemical localization of the macrophage-restricted antigens F 4/80 and macrosialin. *Anat Rec* 240 : 233 242, 1994.
- 4) Brandon JM : Macrophage distribution in decidual tissue from early implantation to the periparturient period in mice as defined by the macrophage differentiation antigens F 4/80, macrosialin and type 3 complement receptor. *J Reprod Fert* 103 : 9 16, 1995.
 - 5) Broxmeyer H, Sherry B, Lu L, Cooper S, Carow C, Wolpe SD, Cerami A : Myelopoietic enhancing effects of murine macrophage inflammatory protein-1 and 2 on colony formation in vitro by murine and human bone marrow granulocyte /macrophage progenitor cells. *J Exp Med* 170 : 1583 1594, 1989.
 - 6) Critchley HO, Kelly RW, Kooy J : Perivascular location of a chemokine interleukin-8 in human endometrium : a preliminary report. *Hum Reprod* 9 : 1406 1409, 1994.
 - 7) Davatelis G, Wolpe SD, Sherry B, Dayer JM, Chicheportiche R, Cerami A : Macrophage inflammatory protein-1 : a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. *Science* 243 : 1066 1068, 1989.
 - 8) De M, Wood GW : Influence of oestrogen and progesterone on macrophage distribution in the mouse uterus. *J Endocrinol* 126 : 417 424, 1990.
 - 9) De M, Choudhuri R, Wood GW : Determination of the number and distribution of macrophages granulocytes in the mouse uterus from mating through implantation. *J Leuk Biol* 50 : 252 262, 1991.
 - 10) De M, Wood GW : Analysis of the number and distribution of macrophages and granulocytes in the mouse uterus from implantation through parturition. *J Leuk Biol* 50 : 381 392, 1991.
 - 11) Dudley DJ, Spencer S, Edwin S, Mitchell MD : Regulation of human decidual cell macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) production by inflammatory cytokines. *Am J Reprod Immun* 34 : 231 235, 1995.
 - 12) Fujimiya M, Maeda T, Kimura H : Serotonin-containing epithelial cells in rat duodenum . I. Quantitative morphometric study of the distribution density. *Histochemistry* 95 : 217 224, 1991.
 - 13) Graham G, Wright EG, Hewick R, Wolpe SD, Wilkie NM, Donaldson D, Lorimore S, Pragnell IB : Identification and characterization of an inhibitor of haemopoietic stem cell proliferation. *Nature* 344 : 442 444, 1990.
 - 14) Hume DA, Robinson AP, Mac Pherson GG, Gordon S : The mononuclear phagocytic system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F 4/80. *J Exp Med* 158 : 1522 1536, 1983.
 - 15) Pollard JW, Lin EY, Zhu L : Complexity in uterine macrophage responses to cytokines in mice. *Biol Reprod* 58 : 1469 1475, 1998.
 - 16) Matsumoto M, Sakao Y, Akira S : Inducible expression of nuclear factor IL-6 increases endogenous gene expression of macrophage inflammatory protein-1 α , osteopontin and CD 14 in a monocytic leukemia cell line. *Int Immunol* 10 : 1825 1835, 1998 .
 - 17) O' Neill C, Quinn P : Interaction of uterine flushings with mouse blastocysts in vitro as assessed by the incorporation of [3 H]-uridine. *J Reprod Fert* 62 : 257 262, 1981.
 - 18) Wood GW, Hausmann E, Choudhuri R : Relative role of CSF-1, MCP-1/JE, and RANTES in macrophage recruitment during successful pregnancy. *Mol Reprod Dev* 46 : 62 70, 1997.
 - 19) Wood GW, Hausmann E.H.S, Kanakaraj K : Expression and regulation of chemokines genes in the mouse uterus during pregnancy. *Cytokine* 11 : 1038 1045, 1999.
 - 20) Wolpe SD, Davatelis G, Sherry B, Beutler B, Hesse DG, Nguyen HT, Moldawer LL, Nathan CF, Lowry SF, Cerami A : Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties . *J Exp Med* 167 : 570 581, 1988.