

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07697

研究課題名(和文) 妊娠率向上を目指したウシ内在性レトロウイルスの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of bovine endogenous retrovirus to improve pregnancy rate

研究代表者

櫻井 敏博 (Sakurai, Toshihiro)

東京理科大学・薬学部薬学科・助教

研究者番号：70568253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本申請は、ウシ着床期周辺胚に発現する内在性レトロウイルスを探索し、胎盤形成に有用な内在性レトロウイルス遺伝子の機能解析をすることを目的とした。その結果、ウシ胎盤に高発現する BERV-K3を見出した。BERV-K3は胎盤形成に必要な古典的WNTシグナルにより、その発現が誘導されることが明らかとなった。また、X染色体やY染色体に存在する内在性レトロウイルスも見出し、これらは着床前のウシ胚に特異的に発現していることを明らかにした。これらの研究成果は、ウシの妊娠過程において内在性レトロウイルスの関与を示す重要な発見となり、新たな高受胎胚の選別のための候補因子となりうる可能性があることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to search for endogenous retroviruses expressed in bovine conceptus during peri-implantation (peri-attachment) and to analyze the function of their endogenous retrovirus genes useful for pregnancy process and placenta formation. As a result, BERV-K3 which is highly expressed in bovine placenta was found. It was revealed that expression of the BERV-K3 is induced by the canonical WNT signal required for placenta formation. We also found bovine endogenous retroviruses present on the X chromosome or the Y chromosome, and revealed that they are expressed specifically in pre-attachment conceptus. These findings have been found to be important discoveries indicating the involvement of endogenous retroviruses in bovine pregnancy process and to be possible candidate factors for the newly selection of high conception embryo/conceptus.

研究分野：育種繁殖学

キーワード：内在性レトロウイルス ウシ 胎盤形成

### 1. 研究開始当初の背景

この30年、家畜の生殖医療領域の技術開発には目覚ましい発展があっただけでなく、様々な薬剤も開発された。しかしながら、妊娠率を向上させる薬剤の開発には至っていない。実際、本邦の経産牛の妊娠率は低下し続けており、1988年の乳牛の妊娠率は63%であるのに対し、2008年の妊娠率は44%であり、現在も依然低く、回復の兆しは見られていない。地域によっては40%を下回り、本邦の畜産業界は多大な損失を被る状況になっている。妊娠率の低下に温暖化などの環境要因が関与すると考えられているが、近交交配による polymorphism を持つ遺伝子の一元化も低下に起因すると考えられる。つまり、今まで研究開発されてきた因子群(ホルモン、サイトカインやケモカイン)だけでは生産性の向上が望めないことを示唆する。

哺乳類は数千万年の歴史の中で数多くのレトロウイルスに感染し、そのプロウイルスの一部は「寄生ゲノム」としてゲノム中に残存した。これら寄生ゲノムとしてのレトロエレメントは、これまで単なるジャンクとして見なされ重要視されてこなかった。しかし近年、これらの寄生ゲノムが、胎盤形成、組織分化、病原性ウイルスからの宿主の防御に必須であるばかりか、生命の根幹である多能性幹細胞の維持・分化にも関与していることが明らかとなってきた。

レトロエレメントが時期・細胞特異的に発現調節されていること、さらには polymorphism が存在することから、妊娠効率の高いウシを選別できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

ウシ胚の伸長期、着床期および胎盤形成期に発現する内在化したレトロウイルス由来遺伝子(LTR型レトロエレメント)を同定し、それらレトロエレメントの発現調節機構および機能を精査する。

### 3. 研究の方法

胚の伸長期から初期胎盤形成期(妊娠17、20および22日の胚)にかけて発現するERVを同定し、レトロエレメントの発現動態と局在を解明し、全長cDNAクローニングを行った。発現調節機構と着床および胎盤形成における機能を明らかにした。

#### (1) ウシ胎盤発現性レトロエレメントの探索

次世代シーケンサーSOLiD3を用いて、着床周辺期胚(妊娠17、20および22日の胚)に発現する全エクソソームを網羅的に解析した。次いで、Ensemblのウシ遺伝子データベースおよびレトロエレメントを検出するソフトウェア「Retrotector」を用いて、LTR型のERVを抽出した。トランスクリプトーム解析データとRetrotectorの情報から、

妊娠17、20および22日の少なくとも2日において発現していること、予想されるORFから少なくとも100アミノ酸をコーディングしていることを条件にウシERVを絞り込んだ。

#### (2) レトロエレメントの胚における発現動態と各組織における発現および局在とその発現調節機構解析

着床周辺期胚におけるレトロエレメントの発現動態をqPCRまたはRT-PCRにて確認した。また、そのレトロエレメントの局在をin situ hybridization法により確認した。その局在から、どのようにレトロエレメントの発現が調節されているか解析を予測し、発現調節機構を検討した。

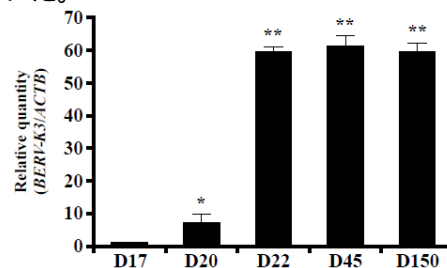
#### (3) レトロエレメントの機能解析

全長クローニングにより得られたアミノ酸配列情報からモチーフ・ドメイン解析を行い、その機能を予測した。また、発現コンストラクトおよびsiRNAを細胞に導入し、全エクソーム解析を行った。

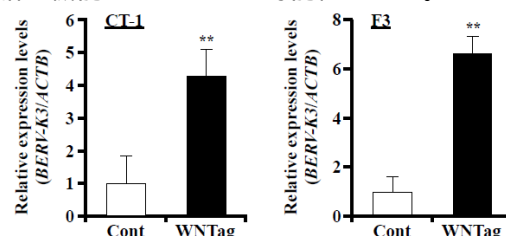
### 4. 研究成果

#### (1) Chr.7に存在するレトロエレメントについて

gagタンパク質由来であるこのレトロエレメントは、着床前(妊娠17日)に発現が弱く、着床時(妊娠20日)に増加し、着床後(妊娠22日)に発現がさらに増加し、妊娠45日および150日の胎児胎盤でも高発現していた。



LTR配列から、このレトロエレメントはLTR/ERV-Kファミリーに属することが予想され、そのためBERV-K3と命名した。BERV-K3の局在は、子宮上皮(管腔・腺)、胚栄養膜細胞であった。胎盤形成に重要な役割を果たす古典的WNTシグナルにより、BERV-K3の発現が誘導されることが明らかとなり、BERV-K3は胎盤機能獲得や維持に必須の役割を演じていると考えられた。BERV-K3の発現に個体差があることから、胎盤機能に差が生じる可能性がある。



BERV-K3 siRNA をウシ栄養膜細胞 F3 に導入し、全トランスクリプトームを回収した。また、BERV-K3 発現コンストラクトを MDBK 細胞に導入し、全トランスクリプトームを回収した。現在、これらの全エクソーム解析を行っており（未発表データ）、このレトロエレメントの機能を精査している。

HIV などのレトロウイルスは、multivesicular endosome の中で出芽し、エクソソームの放出経路を利用して放出される。そこで、BERV-K3 の機能の 1 つにエクソソームの形成・放出があるか否か検討したが、関与は認められなかった。その検討に伴い、ウシおよびヒツジの妊娠子宮腔内から得たエクソソームを解析したところ、反芻動物の妊娠認識物質であるインターフェロンタウを内包していることを明らかにした。

#### (2) Chr.X に存在するレトロエレメントについて

env タンパク質由来であるこのレトロエレメントは、着床前（妊娠 17 日）に発現が高く、着床時（妊娠 20 日）に低下し、着床後（妊娠 22 日）には、その発現は消失した。ウシ着床過程を再現する培養系において、このレトロエレメントは接着刺激(juxtacrine)によって発現が消失することが分かった。このレトロエレメントの詳細な機能は、今後の検討課題であるが、トランスメンブランドメインを有し、着床後にその発現が消失することから、子宮上皮と胚栄養膜細胞との接着に重要な役割を果たすのではないかと考えられる。

ウシ胚の着床時には、栄養膜細胞において上皮間葉転換(EMT)が起こることを明らかにしている。そこで、このレトロエレメントが EMT に関与しているのか否か検討中である。この解析に伴い、着床時に見られるウシ胚の EMT に、OVOL2 の発現低下が他の EMT 関連因子の発現誘導に関与していることを明らかにした。

#### (3) Chr.Y に存在するレトロエレメントについて

gag/pol タンパク質由来であるこのレトロエレメントは、着床前（妊娠 17 日）に発現が高く、着床時（妊娠 20 日）に低下し、着床後（妊娠 22 日）は、わずかに発現していた。このレトロエレメントは、胚栄養膜細胞において特異的に発現しており、他の組織では発現は確認できなかった。このレトロエレメントの詳細な機能は今後の検討課題であるが、Y 染色体に存在していることから、発現が認められない胚があり、雌雄胚における妊娠過程に差異が生じる可能性が考えられる。（未発表データ）

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

#### 〔雑誌論文〕(計 11 件)

Kusama K, Tamura K, Bai H, Sakurai T, Nishi H, Isaka K, Imakawa K, Yoshie M. Exchange protein directly activated by cAMP promotes transcriptional activation of the decidual prolactin gene via CCAAT/enhancer-binding protein in human endometrial stromal cells. *Reprod Fertil Dev.* (2018) in press. 査読有

Bai R, Kusama K, Nakamura K, Sakurai T, Kimura K, Ideta A, Aoyagi Y, Imakawa K. Down-regulation of transcription factor OVOL2 contributes to epithelial-mesenchymal transition in a noninvasive type of trophoblast implantation to the maternal endometrium. *FASEB J.* (2018) in press. 査読有

Matsushita J, Okamura K, Nakabayashi K, Suzuki T, Horibe Y, Kawai T, Sakurai T, Yamashita S, Higami Y, Ichihara G, Hata K, Nohara K. The DNA methylation profile of liver tumors in C3H mice and identification of differentially methylated regions involved in the regulation of tumorigenic genes. *BMC Cancer.* (2018) 18:317. 査読有

Zhang X, Zong C, Zhang L, Garner E, Sugie S, Huang C, Wu W, Chang J, Sakurai T, Kato M, Ichihara S, Kumagai S, Ichihara G. Exposure of mice to 1, 2-dichloropropane induces CYP450-dependent proliferation and apoptosis of cholangiocytes. *Toxicol Sci.* (2018) 162:559-569. 査読有

Kusama K, Nakamura K, Bai R, Nagaoka K, Sakurai T, Imakawa K. Intrauterine exosomes are required for bovine conceptus implantation. *Biochem Biophys Res Commun.* (2018) 495:1370-1375. 査読有

Sakurai T, Nakagawa S, Bai H, Bai R, Kusama K, Ideta A, Aoyagi Y, Kaneko K, Iga K, Yasuda J, Miyazawa T, Imakawa K. Novel endogenous retrovirus-derived transcript expressed in the bovine placenta is regulated by WNT signaling. *Biochem J.* (2017) 474:3499-3512. 査読有

Zong C, Zhang X, Huang C, Chang J, Garner CE, Sakurai T, Kato M, Ichihara S, Ichihara G. Role of cytochrome P450s in the male reproductive toxicity of 1-bromopropane. *Toxicol Res.* (2016)

5:1522-1529. 査読有  
Zong C, Garner CE, Huang C, Zhang X, Zhang L, Chang J, Toyokuni S, Ito H, Kato M, Sakurai T, Ichihara S, Ichihara G. Preliminary characterization of a murine model for 1-bromopropane neurotoxicity: Role of cytochrome P450. *Toxicol Lett.* (2016) 258:249-258. 査読有  
Nakamura K, Kusama K, Bai R, Sakurai T, Isuzugawa K, Suda Y, Imakawa K. Induction of IFNT-stimulated genes by conceptus-derived exosomes during the attachment period. *PLoS ONE.* (2016) 11: e0158278. 査読有  
Kusama K, Bai R, Sakurai T, Bai H, Ideta A, Aoyagi Y, Imakawa K. A transcriptional cofactor YAP regulates IFNT expression via transcription factor TEAD in bovine conceptuses. *Domest Anim Endocrinol.* (2016) 57:21-30. 査読有  
Bai R, Kusama K, Sakurai T, Bai H, Wang C, Zhang J, Kuse M, Ideta A, Aoyagi Y, Okuda K, Imakawa K. The role of endometrial selectins and their ligands on bovine conceptus attachment to the uterine epithelium during peri-implantation period. *Biol Reprod.* (2015) 93:1-11. 査読有

[学会発表](計 19 件)

Yusuke Kimura, Cai Zong, Kazuo Kinoshita, Shigetada Takasu, Xiao Zhang, Toshihiro Sakurai, Sahoko Ichihara, Gaku Ichihara. Exposure to 1,2-dichloropropane increases expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in human cholangiocytes co-cultured with macrophages. The Society of Toxicology 57th annual meeting (国際学会)(2018)  
Rieka Hasegawa, Cai Zong, Makoto Urushitani, Toshihiro Sakurai, Seiichiro Osako, Gaku Ichihara. Role of Microglial Activation and Neuroinflammation in Neurotoxicity of Acrylamide, an Environmental Soft Electrophile. The Society of Toxicology 57th annual meeting (国際学会)(2018)  
宗才、木村優介、木下和生、高巢成惟、張驍、櫻井敏博、園藤吟史、市原佐保子、市原学、Exposure to 1,2-Dichloropropane increases expression of activation-induced cytidine deaminase in human cholangiocytes co-cultured with macrophages、第 17 回分子予防環境医

学研究会 (2018)  
長谷川莉慧霞、宗才、漆谷真、大迫誠一郎、櫻井敏博、市原学、ソフトな親電子性物質アクリルアミドの中枢神経毒性におけるミクログリアの役割、第 17 回分子予防環境医学研究会 (2018)  
長谷川莉慧霞、宗才、漆谷真、大迫誠一郎、櫻井敏博、市原学、アクリルアミド中枢神経毒性における神経炎症の役割、第 88 回日本衛生学会学術総会 (2018)  
木村優介、宗才、木下和生、高巢成惟、市原佐保子、櫻井敏博、園藤吟次、市原学、ジクロロプロパンはマクロファージ共存下胆管細胞の遺伝子改変酵素 mRNA 発現を誘導する、第 88 回日本衛生学会学術総会 (2018)  
宗才、木村優介、木下和生、高巢成惟、張驍、櫻井敏博、市原佐保子、市原学、マクロファージと共培養したヒト胆管細胞において 1,2-ジクロロプロパン曝露は AID の発現を増加させる、日本薬学会第 138 年会 (2018)  
長谷川莉慧霞、宗才、漆谷真、大迫誠一郎、櫻井敏博、市原学、アクリルアミドの中枢神経毒性における神経炎症の役割、日本薬学会第 138 年会 (2018)  
長谷川莉慧霞、宗才、櫻井敏博、大迫誠一郎、市原学、アクリルアミド中枢神経毒性における神経炎症の役割に関する実験的研究、日本産業衛生学会 第 45 回産業中毒生物学的モニタリング研究会 (2017)  
Kazuhiro Tamura, Mikihiro Yoshie, Kazuya Kusama, Hanako Bai, Toshihiro Sakurai, Kazuhiko Imakawa, Hirotaka Nishi, IsakaKeiichi Isaka, Eiichi Tachikawa. Regulation of decidual proratein through EPAC-mediated CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP-b) in endometrial stromal cells. Fourth World Congress of Reproduction Biology (WCRB2017)(国際学会)(2017)  
Rulan Bai, Kazuya Kusama, Toshihiro Sakurai, Kazuhiko Imakawa. Down-regulation of a transcription factor OVOL2 initiates EMT-related gene expression in the bovine trophoblasts. 50th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (国際学会)(2017)  
宗才、黄晋彦、エドウィンガーナー、張靈逸、張驍、櫻井敏博、加藤昌志、市原佐保子、市原学、1-プロモプロパン神経毒性のマウスモデルの確立、第 88 回日本産業衛生学会 (2015)  
宗才、エドウィンガーナー、黄晋彦、張靈逸、張堯、豊国伸哉、櫻井敏博、市原佐保子、市原学、P450 を阻害して肝臓毒性を減弱させることでマウス神経毒

性モデルを確立する、フォーラム 2015 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (2015) プラニッチサンドラ、市原佐保子、呉文亭、渡邊英里、櫻井敏博、ポーランドソニア、トランラン、市原学、シリカナノ粒子の表面修飾はマウス肺炎症反応に影響を与える、フォーラム 2015 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (2015) 渡邊英里、プラニッチサンドラ、市原佐保子、呉文亭、ポーランドソニア、トランラン、林田有紗、長田百合果、張靈逸、櫻井敏博、市原学、マウスにおけるシリカナノ粒子の表面修飾と炎症誘導作用との関係、第 43 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 (2015) 櫻井敏博、市原学、高巢成惟、木村優介、圓藤陽子、圓藤吟史、胆管由来細胞を用いたハロゲン化炭化水素の遺伝毒性評価系の確立、第 43 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 (2015) Sandra Vranic, Sahoko Ichihara, Wenting Wu, Eri Watanabe, Toshihiro Sakurai, Sonja Boland, Lang Tran, Gaku Ichihara. Surface modification of silica nanoparticles affects inflammatory response in murine lung. The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicology (2015) Cai Zong, Edwin Garner, Chin-Yen Huang, Lingyi Zhang, Xiao Zhang, Toshihiro Sakurai, Shinya Toyokuni, Sahoko Ichihara, Gaku Ichihara. Establishment of murine model for neurotoxicity of 1-bromopropane, an alternative to ozone-depleting solvents. The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicology (2015) Kazuhiro Tamura, Mikihiro Yoshie, Kazuya Kusama, Kazuhiko Imakawa, Toshihiro Sakurai, Hanako Bai, Hirotaka Nishi, Keiichi Isaka, Naoko Kuwabara, Eiichi Tachikawa. Epac signal enhances decidual prolactin expression via C/EBPβ expression in human endometrial stromal cells. IFPA2015 (国際学会) (2015)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況(計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 敏博 (SAKURAI, Toshihiro)  
東京理科大学・薬学部薬学科・助教  
研究者番号 : 70568253

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

( )