

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14838

研究課題名(和文) ウシ血中エクソソーム中のマイクロRNAを利用した超早期妊娠診断法の開発

研究課題名(英文) Establishment of early pregnancy diagnosis using circulating exosomal microRNA in cows

研究代表者

木崎 景一郎 (KIZAKI, Keiichiro)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：40337994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血清、受胎産物および子宮内膜由来のエクソソームに内包されるマイクロRNA(miRNA)に焦点をあて、ウシの早期妊娠診断の新規バイオマーカーとしての可能性を検証した。その結果、非妊娠群と比較して妊娠群の血漿中に多く含まれるmiRNA分子種を明らかにし、さらに血漿中miRNAの個別定量に必要なリファレンス遺伝子となるmiRNA分子種も同定することができた。以上の結果から、これらのmiRNA分子種の測定により、早期妊娠診断が可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the possibility of pregnancy diagnosis in cows using exosomal microRNA (miRNA) as a new biomarker. The present results demonstrated that some miRNAs were highly contained in pregnant plasma compared with non-pregnant. Furthermore, we identified also the reference miRNA for quantification of miRNA in plasma. These results indicate that measurement of selected miRNAs are reliable indicators of pregnancy in cows.

研究分野：農学

キーワード：マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者のグループはウシ子宮および受胎産物の遺伝子発現マイクロアレイを開発し、本ツールを利用したウシの早期妊娠診断法の開発に携わってきた。その結果、末梢白血球、特に顆粒球における遺伝子発現を指標として早期妊娠診断が可能であることを報告した。しかし、測定に際しては血球分離が必要であること、ある程度の血液量を要するという問題点があり、簡便な手法とは言えない。特に分離した血球の純度によっては、遺伝子発現量は全く異なる値を示す点は診断上の大きな問題となる。

(2) 遺伝子発現マイクロアレイの開発において得られたウシ子宮および受胎産物発現遺伝子クローン中にマイクロ RNA (miRNA) 類似の遺伝子配列が多数存在することがわかってきた。miRNA は、短鎖の 1 本鎖 RNA であり、臓器特異的な発現様式を示し、エクソソームに内包され血中に分泌されることが知られている。また、ヒト胎盤や子宮由来エクソソーム中の miRNA が母体血中の T 細胞機能を修飾すること、ヒツジの子宮・胎盤間でのエクソソームを介した miRNA 移送が明らかとなっていることから、受胎産物、若しくは妊娠子宮由来の血中エクソソーム中の miRNA を指標にした妊娠診断が可能ではないかと考えた。

2. 研究の目的

家畜における早期の妊娠診断は生産効率の向上にとって重要である。特にウシでは、発情周期回帰の有無、直腸検査、ホルモン測定および超音波による診断が用いられている。家畜生産性の向上を考える上では、より早期の妊娠の成否判断が望まれるが、現在のところ早期に確実に診断する方法は確立されていない。

本研究では、血清、受胎産物および子宮内膜由来のエクソソームに内包されるマイクロ RNA (miRNA) に焦点をあて、妊娠診断の新規バイオマーカーとしての可能性を検証することを目的とすると共に、候補 miRNA の同定、並びにウシの超早期妊娠診断法の確立を目指す。

3. 研究の方法

着床期 (妊娠 18-21 日齢) および妊娠 35 日齢のウシから胎膜・胎盤および子宮内膜組織を採取し、 -80°C に保存した。また、人工授精 21 日後の個体から採血し、血漿を分離後に -80°C に保存した。各組織からは TRIzol 試薬 (インビトロジェン社) を用いて総 RNA を抽出し、血漿中 miRNA は miRNeasy serum/plasma キット (キアゲン社) を用いて抽出した。各組織および血漿中の miRNA の網羅的発現解析には、独自に開発した miRBase 19.0 対応のウシ・カスタム miRNA マイクロアレイ (アジレント社、755 miRNA 対応配列搭載) を用い、

GeneSpring GX (アジレント社) を使用して解析した。遺伝子発現測定用の cDNA は High Capacity cDNA 合成キット (アプライド社) を用いて調製した。PCR 反応は、Power SYBR 試薬 (アプライド社) を用いて ABI PRISM 7300 リアルタイム PCR システム (アプライド社) により実施した。各遺伝子の定量は、組織由来 cDNA から遺伝子クローニングした標準プラスミドを使用して算出した。miRNA 測定用の cDNA は Mir-X miRNA First-Strand Synthesis キット (クロンテック社) を用いて合成し、KOD SYBR qPCR Mix (東洋紡社) を使用したリアルタイム PCR にて測定した。なお、定量の際には各 miRNA の塩基配列に対応するオリゴ DNA を合成して標準曲線を作成した。網羅的発現解析において抽出された miRNA の標的遺伝子の予測には、miRNA_Targets (http://mamsap.it.deakin.edu.au/~amitkuma/mirna_targetsnew/index.html) を用い、miRNA と標的 mRNA の結合部位の解析には、RNAhybrid (<https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>) および miRmap (<http://mirmap.ezlab.org>) プログラムを使用した。miRNA 発現の安定性は NormFinder (<https://moma.dk/normfinder-software>) ソフトウェアを用いて評価した。また、溶血による miRNA 発現定量への影響を評価するために、超音波処理により得た溶血血漿を調製し、定量的 RT-PCR を行った。

4. 研究成果

(1) 栄養膜 (胎盤) および子宮内膜組織に発現する miRNA 分子種について検証すると共に、miRNA マイクロアレイ、特異的 miRNA 分子種測定の基盤確立を試みた。ウシ・カスタム miRNA マイクロアレイを用いて、妊娠 20 日齢付近 (着床期) および 35 日齢の栄養膜における miRNA の発現解析を行った。着床期の栄養膜で有意に高い発現を示す 44 分子種 (2 倍以上, $p < 0.05$) の miRNA が検出され、分子種特異的な定量的 RT-PCR 法により検証を行ったところ、miRNA マイクロアレイとほぼ同様な傾向が認められた (図 1 および 2)。変動 miRNA の標的遺伝子について in silico 解析を実施したところ、4 種類の miRNA 分子種がインターフェロン・タウの 3' 非翻訳領域と相互作用する可能性が示唆された。子宮内膜組織における miRNA の発現については、妊娠 35 日齢の妊娠角と非妊娠角における比較を行ったところ、12 種類の miRNA 分子種の変動が認められた。以上の結果から、着床期の栄養膜および妊娠角子宮内膜に特異的に発現する miRNA 分子種が明らかとなった。さらに、miRNA マイクロアレイと定量的 RT-PCR の検討結果から、特異的 miRNA 分子種測定の測定基盤が確立された。

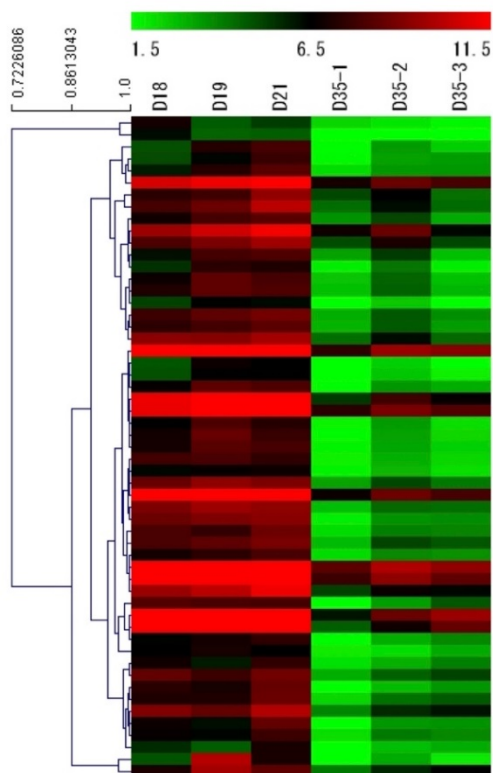


図1 ウシ胎膜に発現する miRNA の網羅的発現解析

着床期 (妊娠 18-21 日齢) および妊娠 35 日齢のウシ胎膜における miRNA 発現についてマイクロアレイを用いて調べた。発現量に差異が認められた分子種について階層型クラスター解析を実施した。

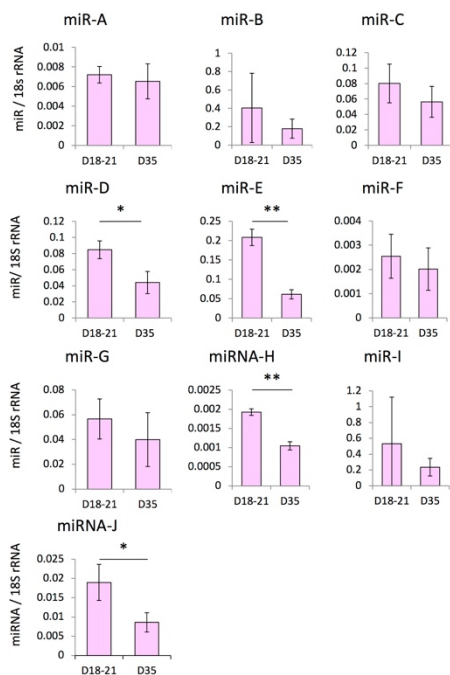


図2 定量的 RT-PCR 法による検証
マイクロアレイ解析で抽出した分子種について、定量的 RT-PCR で検証した。

(2) 人工授精後 21 日の牛から EDTA 採血管を用いて採血し、血漿を得た。血漿中 miRNA は miRNeasy serum/plasma キットを用いて抽出し、miRNA マイクロアレイによる解析を行った。なお、人工授精後 21 日の妊娠牛 (n=4) および非妊娠牛 (n=3) での比較を実施した。755 個のウシ miRNA を標的にしたマイクロアレイで検出可能であった miRNA は 128 分子種であり、子宮内膜や胎膜と比較して検出された分子種数は少なく、そのうち 105 分子種は子宮内膜や胎膜と共通していた (図3)。また、高発現を示す上位 10 分子種の miRNA では、妊娠牛と非妊娠牛での発現差は認められなかった。一方、妊娠および非妊娠牛群で発現の認められた miRNA のうち 2 倍以上の変動を示したものは 5 つ存在した。その 5 分子種の miRNA すべてが妊娠牛で上昇していた。さらに妊娠牛では発現していたが非妊娠牛で検出されなかった miRNA は 33 分子種であった。以上の結果から、妊娠血漿中に特異的に検出される miRNA 分子種が明らかとなった。

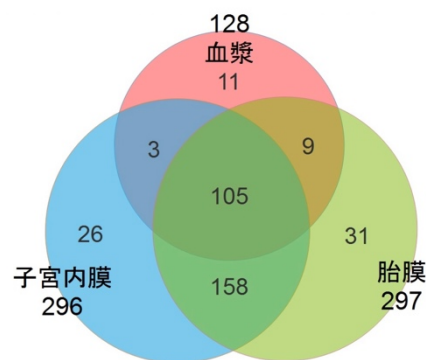


図3 血漿、子宮内膜および胎膜における発現 miRNA 数の比較

マイクロアレイにより検出された miRNA の分子種数を血漿、子宮内膜および胎膜で比較し、ベンダイアグラムで示した。

(3) miRNA マイクロアレイ解析の結果から得られた妊娠牛血漿中で発現量が上昇していた miRNA 分子種について、合成オリゴ DNA を用いて標準曲線を作成したところ、良好な直線性が得られ副産物も認められなかった。これらの miRNA 分子種について、妊娠牛および非妊娠牛間の比較を行ったところ、いくつかの分子種は妊娠牛血漿中で高い発現量を示した。さらに、マイクロアレイ解析で検出された miRNA について、NormFinder を用いて発現安定性を解析し、安定性が高かったリファレンス遺伝子候補の miRNA を選出、定量的 RT-PCR による検証を行った。この定量結果を NormFinder で解析したところ、最適なりファレンス遺伝子として 3 種類の miRNA 分子種を選出された (表)。また、これらの miRNA 分子種の発現量は溶血による影響を受けなかった

ことから、妊娠牛と非妊娠牛における血漿中 miRNA の定量解析時に使用できるリファレンス遺伝子 miRNA を明らかにした。

表 リファレンス遺伝子 miRNA の選定

Rank	Gene name	Stability value	P value
1	bta-miR-2455	0.133	
2	bta-miR-1224	0.148	
3	bta-miR-2428	0.158	
4	bta-miR-1260b	0.176	
5	bta-miR-2316	0.257	P<0.005
6	bta-miR-1835	0.284	
7	bta-miR-6528	0.350	
8	bta-miR-2478	0.490	P<0.001
9	bta-let-7g	0.643	P<0.005
10	bta-miR-128	0.668	P<0.001
11	bta-miR-2888	1.216	P<0.001
Best Combination	bta-miR-2428/bta-miR-2455	0.095	-

定量的 RT-PCR による定量結果を NormFinder を用いて解析した結果を示した。妊娠牛群と非妊娠牛群で Ct 値に有意差がみられた miRNA については P 値を示した。

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 2 件)

①Yoshino H, Toji N, Sasaki K, Koshi K, Yamagishi N, Takahashi T, Ishiguro-Oonuma T, Matsuda H, Yamanouchi T, Hashiyada Y, Imai K, Izaike Y, Kizaki K, Hashizume K. (2017) A predictive threshold value for the diagnosis of early pregnancy in cows using interferon-stimulated genes in granulocytes. *Theriogenology* 107, 188-193. (査読有り) doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.014.

②Toji N, Shigeno S, Kizaki K, Koshi K, Matsuda H, Hashiyada Y, Imai K, Takahashi T, Ishiguro-Oonuma T, Hashizume K. (2017) Evaluation of interferon-stimulated genes in peripheral blood granulocytes as sensitive responders to bovine early conceptus signals. *Vet. J.* 229, 37-44. (査読有り) doi: 10.1016/j.tvjl.2017.10.007.

[学会発表] (計 8 件)

①Yoza A, Toji N, Ishiguro-Oonuma T, Takahashi T, Hosoe M, Hashizume K, Kizaki K. Expression profile of microRNA in bovine endometrium at peri-implantation.

The 4th World Congress of Reproductive Biology, 2017.

②Kizaki K, Kikuchi M, Toji N, Ishiguro-Oonuma T, Takahashi T, Hashizume K. Prospective functions of newly identified interferon tau-responder cytidine/uridine monophosphate kinase 2 and Hes Family BHLH transcription factor 4 genes in bovine peripheral blood cells. The Society for the study of reproduction 2017 Annual meeting, 2017.

③Toji N, Kizaki K, Ishiguro-Oonuma T, Takahashi T, Hashizume K. Leukemia inhibitory factor receptor alpha links to placental lactogen expression in bovine trophoblast binucleate cells. The Society for the study of reproduction 2017 Annual meeting, 2017.

④小野歌純, 與座明祥, 田路矩之, 石黒(大沼)俊名, 伊賀浩輔, 木崎景一郎. ウシ血中 microRNA の発現プロファイルとリファレンス遺伝子の探索. 第 160 回日本獣医学会学術集会, 2017.

⑤Hashizume K, Kizaki K, Toji N, Yoshino H, Takahashi T, Yamagishi N, Izaike Y. A validation study for pregnancy diagnosis by bovine interferon-stimulated genes, specifically ISG15 and MX2, SSR 49th Annual Meeting, 2016.

⑥佐藤良平, 石黒(大沼)俊名, 高橋透, 橋爪一善, 木崎景一郎. 血管新生制御因子バソヒビンのウシ子宮・胎盤における発現動態. 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016.

⑦與座明祥, 石黒(大沼)俊名, 高橋透, 細江実佐, 橋爪一善, 木崎景一郎. ウシ栄養膜に発現する miRNA の探索. 第 109 回日本繁殖生物学会大会, 2016.

⑧與座明祥, 石黒(大沼)俊名, 高橋透, 橋爪一善, 木崎景一郎. ウシ栄養膜細胞系への効果的な遺伝子導入. 第 89 回日本生化学会大会, 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木崎 景一郎 (KIZAKI, Keiichiro)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号: 40337994

(2) 連携研究者

高橋 透 (TAKAHASHI, Toru)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号: 20355738

(3) 連携研究者

渡辺 大作 (WATANABE, Daisaku)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：10406895

(4) 連携研究者

伊賀 浩輔 (IGA, Kosuke)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター・主任研究員

研究者番号：00343963