

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14566

研究課題名（和文）レトロエレメントによる胎盤の構築メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigation of assembly mechanism of placenta by retroelement

研究代表者

草間 和哉（Kusama, Kazuya）

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：30579149

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、哺乳類の妊娠に必須である胎盤の形成機構を明らかにすることを目的としている。特に、その構成細胞である「トロホプラスト細胞」の詳細な融合機構と、ゲノムに隠れている内在性レトロウイルス因子（ERVs）に着目して研究を行った。その結果、胎盤形成を調節している因子を網羅的な大規模解析にて同定した。さらに一部の因子はERVsの発現も調節していた。本研究はウシの胎盤形成を調節する因子群を初めて同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦において様々な生産技術の開発や研究が行われているが、ウシの妊娠率は年々低下の一途をたどっており、その改善には至っていない。この原因の一つとして胎盤の形成不全が考えられる。本研究は、この胎盤の形成メカニズムを、内在性レトロウイルス因子（ERVs）に着目し明らかにしようと試みた。その結果、ERVsと胎盤形成を調節する因子を同定した。これは、胎盤形成不全による早期胚死滅の原因解明及び、その抑止につながり、学術領域だけでなく、畜産現場にも有益な効果を与えることが出来る。

研究成果の概要（英文）：Placental formation requires trophoblast cell fusion in many mammalian species. In the bovine species, endogenous retroviruses (ERVs) proteins are expressed in fused trophoblast cells. ERVs are thought to induce cell-cell fusion in the bovine species, but molecular mechanisms by which ERVs are transcribed have not been well characterized. To investigate the mechanism by which ERVs were expressed in fused trophoblast cells, we performed global RNA sequencing analyses with bovine trophoblast cells, identifying important genes related by placentation. Of these, several genes regulated the expression of ERVs. These indicate that identifying factors could regulate trophoblast fusion essential for bovine placentation.

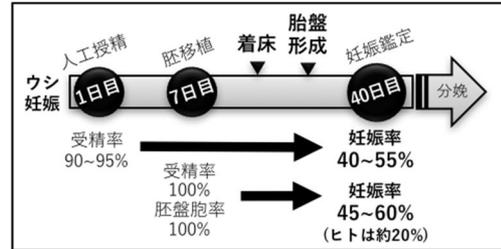
研究分野：繁殖生物学

キーワード：胎盤 トロホプラスト 内在性レトロウイルス因子 細胞融合 着床 エピジェネティクス ウシ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦において様々な生産技術の開発や研究が行われているが、ウシの妊娠率は年々低下の一途をたどっており、その改善には至っていない。ウシは人工授精や胚移植を駆使しても妊娠早期に約半数の胚が死滅してしまう。畜産現場において、この問題の解決は急務である。この原因の一つとして着床の失敗や胎盤の形成不全が考えられる(右下図)。これらを解決するため、多くの着床の研究がされているが、そのメカニズムの解明には至っていない。一方、胎盤は胎子を守り、育むという機能においては哺乳類で同じだが、その形態は動物種間で著しく異なる。胎盤は胎子-母体間の栄養・ガスの交換や免疫的バリア機能を果たしており、これらはトロホプラスト細胞が担っている。このとき胎子側からみて、母親由来の血液や細胞に触れる最前線にはトロホプラスト細胞、特に融合した多核のトロホプラスト細胞を配置する。これまで、ヒトやマウスのトロホプラスト細胞の分化・融合機構が調べてきたが、その全ては明らかとなっていない。一方、ウシ胎盤内にも融合した2核と3核のトロホプラスト細胞があることが報告されている。2核細胞は胎盤形成の初期から多く見られるのに対して、3核細胞は中期から観察されるが、その数はわずか数%しか存在しない。しかしながら、その分化・融合の誘導機構など詳細は不明である。



これまで、ヒトやマウスをはじめとするトロホプラスト細胞の融合を制御する因子が多く同定されてきたが、その詳細は不明であった。近年、レトロウイルス由来の配列がゲノムに入り込み、内在化した因子 ERVs が着目されている。一部の ERVs 因子はウイルスと同様に膜融合作用を示す因子であり、これがトロホプラスト細胞の融合に関与しているとされている。このタイプの ERVs はウシを含む多くの動物種で確認されている。しかしながら、その発現制御機構は不明である。

2. 研究の目的

本研究は、ゲノムに隠れている内在性レトロウイルス因子 (ERVs) に着目し、着床前後における胚トロホプラスト細胞のゲノムの状態変化と、トロホプラスト細胞の分化・融合機構から胎盤の形成メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ウシにおけるトロホプラスト細胞の分化・融合の制御メカニズムの解明

申請者はすでに、ウシトロホプラスト細胞において2種の内在性レトロウイルス因子 (ERVs) が cAMP または PPARG シグナルの活性化により誘導されることを明らかにしている。さらに、詳細な ERVs 発現調節機構を明らかにするため、cAMP または PPARG シグナル活性化時における遺伝子発現変化を RNA シークエンシング (RNA-seq) を用いて網羅的に解析している。RNA-seq より得た結果から、ERVs を誘導する転写因子を同定し、ゲノムへの結合、ヒストンの修飾が変化するか精査する。さらに同定した転写因子から、細胞内シグナル伝達経路を薬理学的手法を用いて探索する。これにより、ウシトロホプラスト細胞の融合に必須な ERVs 発現のための詳細な分子メカニズムが明らかになる。

(2) 着床前後期における ERVs 周辺ゲノムの修飾変化の解明

申請者は着床前後のウシ胎盤・子宮組織にて2種の内在性レトロウイルス因子 (ERVs) が着床を境に発現することを確認している。さらに、その発現は着床直後から見られる2核のトロホプラスト細胞に局在していると考えられる。一方、着床前後の組織から単離したトロホプラスト細胞に cAMP と PPARG 刺激を与えたところ、着床後トロホプラスト細胞でのみ ERVs を発現した。このことから、着床前後では ERVs 周辺のゲノム修飾 (メチル化) が変化しているため、発現誘導刺激を受け付けていないと仮定した。そこで、着床前トロホプラスト細胞のゲノムメチル化を除去 (5 アザシチジン処置) した後、ERVs の発現誘導刺激を与えた後に ERVs が発現するか確認する。さらに、着床前後の胚 (トロホプラスト細胞) のゲノムメチル化の変化を解析する。これにより、着床前後におけるトロホプラスト細胞の ERVs 誘導刺激に対する感受性の変化をゲノムの修飾の状態から明らかにする。

(3) 2核、3核トロホプラスト細胞内因子の発現と役割の同定

これまで2核、3核トロホプラスト細胞の違いは明らかにされていない。妊娠中期から後期のウシ胎盤からトロホプラストを単離し、1、2、3核細胞を分離し、1細胞次世代シークエンサー解析を行う。発現因子群の違いから、妊娠中におけるその役割を in silico 解析にて検証する。さらに、単核、多核の役割がよく調べられているヒトやマウスと共通であるか比較し、共通点を抽出する。(1)、(2)の結果と総合し、着床前後のゲノムの状態や着床後の融合トロホプラスト細胞の発現率などから、着床・胎盤形成の成功率が変化するか精査する。ウシ融合トロホプラスト

細胞の重要性を機能面から明らかにし、それらを調節することにより妊娠率向上を試みる。

4. 研究成果

(1) ウシにおけるトロホプラスト細胞の分化・融合の制御メカニズムの解明

PPARG や cAMP 刺激したウシトロホプラスト細胞の RNA-seq データと着床前後のウシ胚組織の RNA-seq を比較解析したところ、いくつかの転写因子群が ERVs の発現に関与していることを明らかにした。またこれらの因子のノックダウンは ERVs 発現を変化させ、関与していることを示した。さらに、同定した因子の上流因子の阻害剤を用いて、薬理学的手法にて検証した結果、ノックダウンと同様の結果を示した。これらのことから、ERVs を制御するいくつかの細胞内シグナル経路を明らかにした。

さらに、着床前後のウシ胚の RNA-seq の結果や子宮内因子のデータから、エクソソーム関連因子が大きく変化していたことから、ERVs にエクソソームが関与しているのかについても、精査した。ERVs への効果については認められなかったが、着床時の胚 子宮間のコミュニケーション機構を明らかにすることができ、本研究の着目している機構とは異なるが、結果として着床に必須なメカニズムの一部を明らかにすることが出来た。

(2) 着床前後期における ERVs 周辺ゲノムの修飾変化の解明

着床前後期におけるウシ子宮組織切片にて、ERVs の発現・局在を確認したところ、着床直後から融合 2 核細胞において局在していることを確認できた。着床前後から単離したトロホプラスト細胞を用いて、PPARG や cAMP 刺激により ERVs の遺伝子上でのヒストン修飾を確認したところ、両刺激によりヒストン H3 の 9,27 番目のリジンのメチル化レベルが減少し、アセチル化レベルが上昇した。さらに、ヒストンのアセチル化薬においても ERVs の発現は上昇した。一方、メチル化を除去 (5 アザシチジン処置) しても ERVs の発現は変化しなかった。このことから、ゲノムの脱メチル化よりもヒストンのアセチル化が ERVs の発現制御する上で重要であることを示した。

(3) 2 核、3 核トロホプラスト細胞内因子の発現と役割の同定

ERVs の発現に重要な細胞内シグナルの活性化やヒストンの修飾変化による感受性の増大を培養ウシトロホプラスト細胞に施すことで融合細胞がわずかに増加することを確認できた。

(1), (2), (3)の成果は、哺乳類だけが持つ胎盤の形成メカニズムを明らかにするための基礎となる。さらに、ERVs の発現制御のみならず動物種間の着床時のゲノムの状態や ERVs 因子の共通点、非共通点をさらに明らかにすることで、様々な動物において着床や胎盤形成を調節することが出来る。本研究成果は着床・胎盤形成不全による早期胚死滅の原因解明及び、その抑止につながる基礎研究結果である。これらはヒトにも応用できることから、学術領域、畜産現場だけでなく医療現場にも有益な効果を与えることが出来る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakamura Keigo, Kusama Kazuya, Ideta Atsushi, Kimura Koji, Hori Masatoshi, Imakawa Kazuhiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Effects of miR-98 in intrauterine extracellular vesicles on maternal immune regulation during the peri-implantation period in cattle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41598-019-56879-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Keigo, Kusama Kazuya, Ideta Atsushi, Imakawa Kazuhiko, Hori Masatoshi	4. 巻 159
2. 論文標題 IFNT-independent effects of intrauterine extracellular vesicles (EVs) in cattle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 503~511
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1530/REP-19-0314	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 草間 和哉, 田村 和広, 堀 正敏, 今川 和彦
2. 発表標題 ウシ胎盤細胞融合における内在性レトロウイルス遺伝子の発現調節機構の解明
3. 学会等名 第112回 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 圭吾, 草間 和哉, 出田 篤司, 今川 和彦, 堀 正敏
2. 発表標題 子宮内エクソソーム miR-98 による胚着床時の母体免疫系の抑制
3. 学会等名 第112回 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuya Kusama, Rulan Bai, Masako Suzuki, John Grealley, Kazuhiko Imakawa
2. 発表標題 Bovine endogenous retroviral genes necessary for the trophoblast fusion are up-regulated by PPARG and cAMP after conceptus implantation
3. 学会等名 Society for the study of Reproduction (SSR) 51st Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	今川 和彦 (Imakawa Kazuhiko)		