

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03133

研究課題名（和文）子宮内ゲノムダイナミクスによるウシ胎盤形成メカニズムの解明と応用

研究課題名（英文）Investigation and application of bovine placental formation by intrauterine genome dynamics

研究代表者

草間 和哉（KUSAMA, Kazuya）

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：30579149

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：ウシの妊娠率は低下の一途をたどっており、その改善には至っていない。原因として胎盤形成不全が考えられるが、その機序は不明である。本研究は、ウシ胎盤トロホプラスト細胞において内在性レトロウイルス由来因子（ERVs）発現調節機構と胎盤形成の関与を明らかにするため、全遺伝子を精査した。その結果、ウシ胎盤組織において2種のERVs因子が着床を境に胎盤形成に必要な2核トロホプラスト細胞に発現することを明らかにした。さらにそれは転写因子PPAR が関与していることを同定した。さらに細胞にPPAR 活性化刺激を与えると、ERVs遺伝子発現が上昇し、2核細胞を増加させた。着床後のウシ胚でも同様の変化が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、妊娠の維持に必須の胎盤形成のメカニズムの一端を明らかにした。胎盤形成においてその構成細胞であるトロホプラストの2核化が多くみられる。しかしながらその形成機序は不明であった。本成果は、機能が未だ不明な内在性レトロウイルス由来因子（ERVs）が関与しており、それらをPPAR 活性化により制御できることを明らかにした。これは、畜産現場で問題となっている着床・胎盤形成不全による早期胚死滅の原因解明および、その抑止につながる成果である。

研究成果の概要（英文）：In Japan, the pregnancy rate in cattle has been steadily declining, and there has been no improvement. A possible cause is placental formation failure, but the mechanism has been characterized. In this study, we performed transcriptome analysis by RNA-seq with bovine placental trophoblast cells to clarify the regulatory mechanism of endogenous retrovirus-derived factors (ERVs) expression and their involvement in placental formation. As a result, we revealed that two types of ERVs are expressed in binuclear trophoblast cells necessary for placental formation after implantation in bovine placental tissue. We also identified that the transcription factor PPAR is involved in this. Furthermore, when the cells were treated with a PPAR activator, ERVs gene expression increased and binuclear cells increased. Similar changes were observed in bovine embryos after implantation.

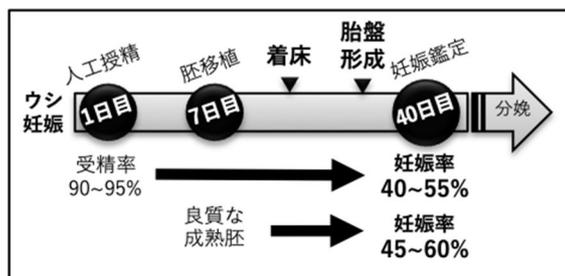
研究分野：生殖科学

キーワード：胎盤 トロホプラスト 着床 内在性レトロウイルス ウシ

1. 研究開始当初の背景

【ウシ妊娠と着床・胎盤形成】

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 (上図)。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、育むという哺乳類のみが持つ器官であり、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、これらの役割は胚盤胞の外側を構成しているトロホブラスト細胞、特に融合した多核のトロホブラスト細胞が担っている。それゆえ、トロホブラスト細胞の融合は胎盤形成・妊娠維持に必須である。これまで申請者は、ヒトやウシ、マウスのトロホブラスト細胞の融合機構を調べてきており、ウシ胎盤内にも2核と3核の融合トロホブラスト細胞が存在し、着床直後から発現することが明らかにしている。しかしながら、その融合の誘導機構や妊娠維持に対する役割など詳細は不明である。

【胎盤と内在性レトロウイルス因子 (ERVs)】

これまで様々な動物種において、トロホブラスト細胞の融合を制御する因子が同定されてきたが、近年では、種特異的に発現している内在性レトロウイルス由来因子 ERVs が重要であることが明らかにされつつある。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、これがトロホブラスト細胞の融合に関与している。申請者は、ウシにおいても特異的な ERVs が発現していることを明らかにしている。さらに、ウシトロホブラスト細胞において cAMP 経路および PPARG 因子の活性化が ERVs 発現を誘導することを確認しており、その発現が着床の前後で劇的に変化することを突き止めている。しかしながら、着床時のどのような刺激が発現変化を誘導するかは不明である。

胎盤は種により形態が異なるにも関わらず同じ働きをしており、その中でも融合トロホブラスト細胞の役割は多岐に渡り、妊娠成立・維持に必須である。さらに、ウシを含む多くの動物種においてトロホブラスト細胞融合および胎盤形成は着床を境に急速に誘導されることから以下の「問い」が提案される。

- ウシトロホブラスト細胞の融合を誘起、制御している分子メカニズムは何か？
- 胚着床はトロホブラスト細胞のゲノムにどのような影響を与えているのか？
- 着床期における子宮内環境因子はトロホブラスト細胞の融合を誘導するのか？
- ウシ2核、3核融合トロホブラスト細胞の違いと役割は何か？

これらの「問い」の解決が早期胚死滅の原因解明及び、その抑止につながる研究基盤となる。

2. 研究の目的

本研究は、胎盤が機能するために必須なトロホブラスト細胞融合の分子調節機構を、着床前後に変化するゲノム修飾と子宮内環境の情報を解析・統合することで明らかにしていく。

3. 研究の方法

初年度から2年間かけて、着床周辺期のトロホプラスト細胞内の遺伝子発現やゲノムの修飾情報などを網羅的に解析していき、データを統合することで細胞融合および ERVs 遺伝子発現機構を明らかにした。3年目から4年目では前半で明らかになったデータを元に、生体内の細胞融合を培養系にて再現した。また、同時に融合トロホプラスト細胞の役割と妊娠成立への寄与について精査した。

(1) ウシにおけるトロホプラスト細胞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-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。

(2) 着床前後期におけるERVs周辺ゲノムの修飾変化の精査

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2核のトロホプラスト細胞に発現することを確認している。着床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、ERVs遺伝子が発現した。さらに、着床後トロホプラスト細胞においてERVs周辺のゲノム修飾(メチル化)が変化していることを明らかにするため、着床前後期におけるウシ胚の遺伝子修飾(DNAメチル化、ヒストン修飾、RNA修飾)を網羅的に解析し、すでに保有している網羅的遺伝子データと合わせて解析することで、より詳細な遺伝子発現マップを作成する。(一部、東京大学と共同研究)

(3) 着床前後期における子宮内環境の胚遺伝子発現への作用

申請者は着床前後期における子宮腔内の全タンパク質だけではなく、子宮内のエクソソームの単離、エクソソーム中に含まれる全タンパク質、およびmiRNAをすでに網羅的に同定しており、着床前後期における子宮内環境を示すデータを多く保有している。着床前後で変化する子宮内環境因子が胚遺伝子発現およびERVs発現に影響を与えるか解析する。さらに、解析より得られる結果は培養モデルにて精査することで、より精度の高い情報を抽出する。

(4) 培養系におけるトロホプラスト細胞融合モデルの確立

申請者は、着床前と着床後それぞれに単離したトロホプラスト細胞を保有しており、着床前の胚から単離したトロホプラスト細胞が細胞融合しないことを確認している。これまで、着床前トロホプラスト細胞、子宮内膜細胞および子宮内腔液を共培養することで、着床過程に最も近い遺伝子発現動態を示すことを明らかにしている。一方、着床後トロホプラスト細胞にて、単層培養と比較し、スフェロイド培養やマトリゲル3次元培養では高反応性から、ERVsがより増加することを見出している。着床前後の2種のトロホプラスト細胞を比較検討し、上記項目(1)、(2)、(3)より得た遺伝子、エピゲノム情報と子宮内環境、さらに培養条件に立体性という項目を加えることで、本来融合しない着床前トロホプラスト細胞を融合可能な状態へと変化させる。

(5) 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細胞を単離し、1、2、3核細胞を分離し、1細胞次世代シーケンス解析を行う（東京大学と共同研究）。発現因子群の違いから、妊娠中におけるその役割をバイオインフォマティクス解析にて検証する。また、単核、多核トロホプラスト細胞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。さらに、受胎、不受胎時における着床前後期から回収した血清を確保しているため、融合トロホプラスト細胞特異的な因子が不受胎牛の血清中で変化するか比較することで、着床・妊娠成立に必須の因子を同定することが可能である。これらの大規模解析の結果をバイオインフォマティクス解析により、リンクさせることで子宮内および血液中の妊娠関連因子の超大規模ネットワークを構築する。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で妊娠率向上に寄与できる。

4．研究成果

ウシトロホプラストにおける内在性レトロウイルス由来因子(ERVs)発現調節機構を明らかにするため、トロホプラスト細胞における遺伝子発現変化を RNA-seq を用いて網羅的に解析した。さらに着床前後期におけるウシ胚の RNA-seq 解析と組み合わせることで生体内でも同様に変化している遺伝子を抽出した。その結果、着床前後のウシ胎盤組織にて2種の内在性レトロウイルス因子(ERVs)が着床を境に2核のトロホプラスト細胞に発現することを明らかにした。RNA-seq より得た結果から、ERVs を誘導する転写因子として PPAR を同定した。さらに、ゲノムへの結合、ヒストンの修飾が変化するか精査したところ、着床後トロホプラスト細胞において ERVs 周辺のゲノム修飾(DNA メチル化、ヒストンアセチル化)が変化していることを明らかにし、PPAR を活性化させたトロホプラスト細胞においても同様の結果であった。さらに、細胞内シグナル伝達経路を薬理学的手法を用いて検証した。トロホプラスト細胞にいくつかの細胞内シグナルの活性化刺激を与えると、ERVs 遺伝子発現が上昇し、2核細胞が増加した。また、これらのシグナル関連因子は着床後のウシ胚でも同様の変化が見られた。しかしながら、当初の予定である3核のトロホプラストの作成には至らず、更なる検討が必要である。さらに、着床前後期におけるウシ胚由来のエクソソームを単離し、それに含まれる miRNA を網羅的に解析したところ多くの miRNA が変化していることを明らかにしている。今後、これら miRNA のトロホプラストの2核化に対する役割について解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Kazuhiko Imakawa, Kazuya Kusama, Tomoko Kaneko-Ishino, So Nakagawa, Koichi Kitao, Takayuki Miyazawa, Fumitoshi Ishino	4. 巻 11
2. 論文標題 Endogenous Retroviruses and Placental Evolution, Development, and Diversity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11152458	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 Kazuya Kusama, Ayaka Satoyoshi, Mana Azumi, Mikihiro Yoshie, Junya Kojima, Yumi Mizuno, Masanori Ono, Hiroataka Nishi, Takeshi Kajihara, Kazuhiro Tamura	4. 巻 13
2. 論文標題 Toll-like receptor signaling pathway triggered by inhibition of serpin A1 stimulates production of inflammatory cytokines by endometrial stromal cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 966455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2022.966455	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 Kanoko Yoshida, Kazuya Kusama, Mana Azumi, Mikihiro Yoshie, Kiyoko Kato, Kazuhiro Tamura	4. 巻 150
2. 論文標題 Endoplasmic reticulum stress-regulated high temperature requirement A1 (HTRA1) modulates invasion and angiogenesis-related genes in human trophoblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 267-274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2022.10.003	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 Rulan Bai, Kazuya Kusama, Yuta Matsuno, Hanako Bai, Toshihiro Sakurai, Koji Kimura, Kazuhiko Imakawa	4. 巻 14
2. 論文標題 Expression of NFIL3 and CEBPA regulated by IFNT induced-PGE2 in bovine endometrial stromal cells during the pre-implantation period	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1075030
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2023.1075030	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 Yoshida K, Kusama K, Fukushima Y, Ohmaru-Nakanishi T, Kato K, Tamura K	4. 巻 22
2. 論文標題 Alpha-1 Antitrypsin-Induced Endoplasmic Reticulum Stress Promotes Invasion by Extravillous Trophoblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22073683	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 Kusama K, Fukushima Y, Yoshida K, Sakakibara H, Tsubata N, Yoshie M, Kojima J, Nishi H, Tamura K	4. 巻 27
2. 論文標題 Endometrial epithelial-mesenchymal transition (EMT) by menstruation-related inflammatory factors during hypoxia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Human Reproduction	6. 最初と最後の頁 gaab036
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/molehr/gaab036	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 Kusama K, Rashid MB, Kowsar R, Marey MA, Talukder AK, Nagaoka K, Shimada M, Khatib H, Imakawa K, Miyamoto A	4. 巻 12
2. 論文標題 Day 7 Embryos Change the Proteomics and Exosomal Micro-RNAs Content of Bovine Uterine Fluid: Involvement of Innate Immune Functions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in genetics	6. 最初と最後の頁 676791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2021.676791	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 該当する

1. 著者名 Kusama K, Yamauchi N, Yoshida K, Azumi M, Yoshie M, Tamura K	4. 巻 571
2. 論文標題 Senolytic treatment modulates decidualization in human endometrial stromal cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and biophysical research communications	6. 最初と最後の頁 174-180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.07.075	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 K, Kusama K, Hori M, Imakawa K	4. 巻 573
2. 論文標題 The effect of bta-miR-26b in intrauterine extracellular vesicles on maternal immune system during the implantation period	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and biophysical research communications	6. 最初と最後の頁 100-106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.08.019	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 Kusama K, Fukushima Y, Yoshida K, Azumi M, Yoshie M, Mizuno Y, Kajihara T, Tamura K	4. 巻 162
2. 論文標題 PGE2 and Thrombin Induce Myofibroblast Transdifferentiation via Activin A and CTGF in Endometrial Stromal Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 bqab207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endo/bqab207	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 Kusama K, Bai R, Matsuno Y, Ideta A, Sakurai T, Nagaoka K, Hori M, Imakawa K	4. 巻 12
2. 論文標題 Characterization of Serum Metabolome and Proteome Profiles Identifies SNX5 Specific for Pregnancy Failure in Holstein Heifers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life12020309	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 Yoshida K, Yano A, Kusama K, Ishikawa G, Tamura K	4. 巻 23
2. 論文標題 Alpha 1 Antitrypsin Regulates Trophoblast Syncytialization and Inflammatory Factor Expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23041955	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 K, Kusama K, Suda Y, Fujiwara H, Hori M, Imakawa K	4. 巻 21
2. 論文標題 Emerging Role of Extracellular Vesicles in Embryo-Maternal Communication throughout Implantation Processes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 5523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21155523	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 中村 圭吾, 草間 和哉, 須田 義人, 堀 正敏, 今川 和彦	4. 巻 92
2. 論文標題 反芻動物の着床期における細胞外分泌小胞エクソソームの役割と展望	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本畜産学会報	6. 最初と最後の頁 131-139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2508/chikusan.92.131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	堀 正敏 (HORI Masatoshi) (70211547)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------