

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月11日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580349

研究課題名（和文） RNA 干渉による着床期特異的遺伝子の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of implantation specific genes using RNA interference

研究代表者

山内 伸彦（YAMAUCHI NOBUHIKO）

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：00363325

研究成果の概要（和文）：着床期特異的遺伝子である *Ihh* と *Foxa2* を標的遺伝子として、生体の子宮を対象とした RNA 干渉法を確立することを目的とした。はじめに、妊娠初期ラット子宮における両遺伝子の発現動態を明らかとした。この情報をもとに生体子宮に両遺伝子の siRNA を導入し、リアルタイム RT-PCR によって抑制効果を検証した。導入 24 時間後では遺伝子レベルでの抑制効果は認められなかったものの、繁殖生理に影響を与えない生体子宮における RNA 干渉法を確立する上で重要な基盤的知見となるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The present study was conducted to establish the RNA interference method for living rat uterus. We set up two implantation specific genes, *Ihh* and *Foxa2*, as a target gene for RNA interference. Firstly, expressional pattern and regulation mechanism was analyzed for these two genes. Based on the information, siRNA of both genes was introduced into the living rat uterus, and the control effect was verified by real-time RT-PCR. After 24h of the introduction, the expression level of genes was not different from the control groups. The results of the present study will be foundational information for establishing the RNA interference method in the living body uterus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学獣医学・応用動物学

キーワード：着床、インディアン・ヘッジホッグ（*Ihh*）、RNA 干渉、子宮、ラット、受精胚

1. 研究開始当初の背景

遺伝子配列やその発現解析にとどまらず遺伝子の具体的な機能を明らかにするには、操作性に優れ、動物種に限定されず、時期および部位特異的に遺伝子発現を抑制できる手法が必須である。近年、その手法として特定の遺伝子発現を抑制できる RNA 干渉法が注

目されている。しかし、生殖器官を対象とした RNA 干渉による遺伝子発現抑制はほとんど報告がない。

2. 研究の目的

生体の子宮における RNA 干渉法を確立できれば、着床期の子宮で時期特異的に発現して

いる遺伝子の機能の解明に有効である。本研究では、子宮で発現している遺伝子を標的としたRNA干渉を行い、性周期および妊娠に影響する事なく遺伝子発現を抑制する条件を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 着床期特異的遺伝子の発現解析：本研究では、着床期特異的遺伝子である *Ihh* と *Foxa2* を生体子宮における RNA 干渉の標的遺伝子として、その発現動態を解析した。

①インディアン・ヘッジホッグ (*Ihh*)：形態形成因子である *Ihh* の発現解析をラット子宮で行った。はじめに、*Ihh* およびその下流因子である *Gli1* の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR によって解析した。ついで、卵巣除去、着床遅延、受容体アンタゴニスト処理の3種類の典型的なステロイドホルモン解析モデルを作成し、*Ihh* および *Gli1* の発現に対する P4 および E2 の影響を解析した。最後に、培養ラット子宮内膜間質細胞を用いてラット組換え *Ihh* タンパク (*rIHH*) の添加実験を行い、*Ihh* の機能解析を試みた。

② *Foxa2*：子宮における *Foxa2* の発現機構や具体的な機能に関する報告はほとんどない。そこで、まずリアルタイム RT-PCR 法によって性周期および妊娠初期ラット子宮における *Foxa2* の遺伝子発現解析を行った。また妊娠 3.5 日の子宮について、*in situ* hybridization によって *Foxa2* mRNA の局在を解析した。さらに、抗 *FOXA2* 抗体を用いた免疫組織化学的手法によりラット子宮における *FOXA2* タンパク質の局在を解析した。また、卵巣除去および受容体アンタゴニストを用いて、卵巣ステロイドホルモンが *Foxa2* mRNA の発現に及ぼす影響を解析した。最後に、培養子宮内膜上皮細胞を用いて、プロゲステロンおよびリコンビナント Hedgehog (*Hh*) タンパク質による *Foxa2* 発現制御機構を解析した。

(2) 生体子宮における RNA 干渉：妊娠 2.5 日目のラット子宮に標的遺伝子 (*Ihh* および *Foxa2*) の siRNA、対照区として遺伝子発現に影響しない control siRNA を導入した。導入試薬として lipofectamine 2000 (LA)、溶媒として体温でゲル化する Pluronic F-127 を PBS に溶解したものを用いその効果を検証した (図 1)。着床に影響しない試薬濃度を確認するために、妊娠 2.5 日目のラット子宮腔内に遺伝子発現に影響しない control siRNA の導入し、6~8 日目に開腹し着床数を調べ、それをもとに導入条件を決定した。ついで、実際に標的遺伝子である *Ihh* と *Foxa2* の siRNA をラット生体子宮内に導入し、24 時間後に子宮におけるそれぞれの遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR によって調べた。

4. 研究成果

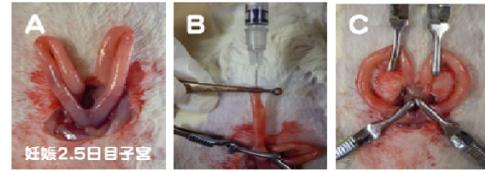


図1 siRNA導入時のラット生体子宮の様子。麻酔機開腹 (A) し、27G注射針、1mlシリンジを使い直接子宮腔内に siRNAを導入 (B) し10分放置 (C) 後閉腹。

(1) ラット子宮における着床期特異的遺伝子の発現

①インディアン・ヘッジホッグ (*Ihh*)：妊娠初期ラット子宮では *Ihh* が発現しており、子宮内膜上皮細胞において妊娠 3.5 日目 (着床前) から妊娠 5.5 日目の着床期にかけて、一過性に発現上昇を示すことが明らかとなった。さらに下流遺伝子 *Gli1* は子宮内膜上皮細胞とその近傍の間質細胞で *Ihh* と同調的な発現パターンを示した (図 1)。種々の解析の結果、*Ihh* の発現は P4 によって誘導され、着床期には E2 によりその発現が増強・維持されることが明らかとなった。対して下流因子 *Gli1* の発現は P4 により誘導される一方で、着床期には E2 によって抑制されることが明らかとなった。*rIHH* は単独の添加では *Gli1* の発現を誘導しないことが明らかとなった。一方で、P4 が *Hh* の受容体である *Ptc1* の発現を誘導することを明らかとし、その結果、P4 と *rIHH* の同時添加区において *Gli1* の発現が誘導することを発見した。

以上の結果から、*Ihh* シグナリングはラット子宮においてステロイドホルモンにより適切に制御され、上皮-間質細胞間相互作用を介して着床に関与することが示唆された。

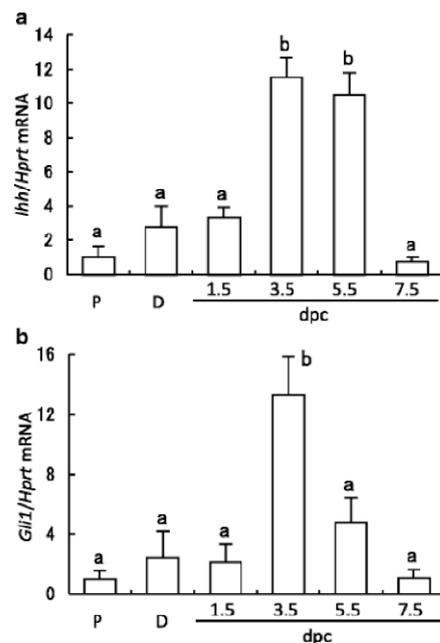


図2 ラット子宮における *Ihh* (a) および *Gli1* (b) の発現。P：発情前期、D：発情休止期、dpc：性交後日数。

②Foxa2: ラット子宮においてFoxa2 mRNAが妊娠3.5日に一過性の発現上昇を示し(図2)、腺上皮に局在することが認められた。また、FOXA2タンパク質は腺上皮細胞の核に局在し(図3)、一方で、腔上皮、間質、筋層における発現は認められなかった。さらに、FOXA2タンパク質は妊娠3.5および4.5日に強く発現する傾向が認められた。最後に、Foxa2 mRNAの発現はE2によって抑制され、リコンビナントHhタンパク質に誘導されることが明らかとなった。

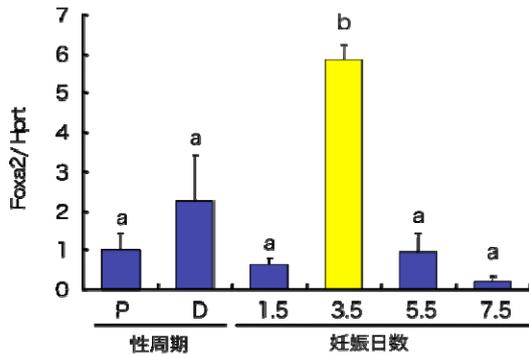


図3 性周期および妊娠初期のラット子宮におけるFoxa2の発現。P: 発情前期、D: 発情休止期。

これらの結果は、Foxa2が着床期の子宮、特に腺上皮細胞において重要な役割を持つことを示唆するものである。

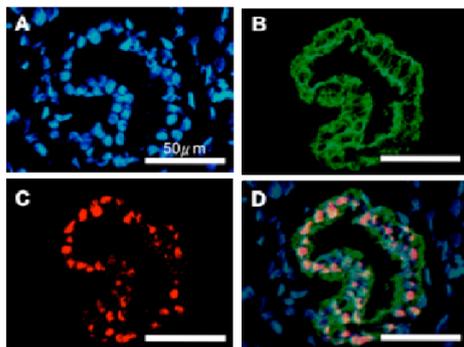


図4 ラット子宮内腺上皮におけるFOXA2の局在発現。免疫蛍光組織化学法によるFOXA2の細胞内局在を解析した。A: Hoechst, B: Cytokeratin, C: FOXA2, D: Hoechst & Cytokeratin & FOXA2。

(2) 生体子宮におけるRNA干渉

はじめに、HVJ-Eベクターおよびリポフェクトアミンを導入試薬として子宮内に投与したが、試薬が膣の穴から流出する等の問題点が見つかり、安定した方法の確立には至らなかった。そこで、遺伝子導入試薬にF127 pluronic gelを添加し、粘性を持たせることによって膣からの試薬の流出を軽減することができた。240pmol以上のsiRNAを子宮腔内に導入したところ、control siRNAを導入した子宮角において着床数の有意な減少が見られた(図5)。導入遺伝子量を検索した結果、80pmol以下の子宮では、未処理区に着床数と比べ有意な減少は認められなかった。よって、

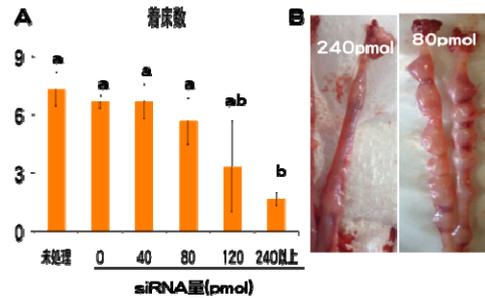


図5 Control siRNA導入後の着床数。A: siRNA量と着床数の関係、B: 導入後6~8日目の子宮における着床状況。

遺伝子導入量は80pmolとした。この条件でIhh siRNAおよびFoxa2 suRNAを子宮腔内に導入し、それぞれの遺伝子の発現を測定したが、control区とsiRNA導入区での発現量の差はなかった(図6)。この原因として、siRNAが子宮組織に導入されていない、導入はできていたが抑制が持続しなかったことが考えられる。これらの結果は、繁殖生理に影響を与えない生体子宮におけるRNA干渉法を確立する上で重要な基盤的知見となる。

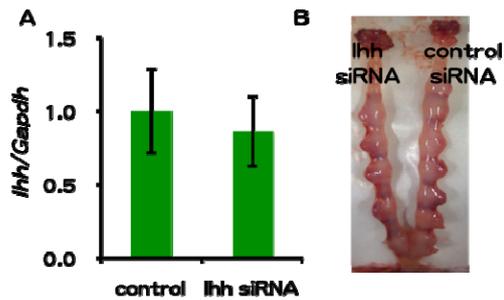


図6 生体ラット子宮におけるIhh siRNA導入による遺伝子抑制効果。A: siRNA導入24時間後のIhh mRNA発現、B: 導入後6~8日目の子宮における着床状況。遺伝子抑制効果は認められず、着床数も減少しなかった。

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)

- ① K. Kubota, N. Yamauchi, K. Yamagami, S. Nishimura, T. Goubaru, K. Yamanaka, C. Wood, T. Soh, M. Takahashi, MA. Hattori. Steroidal regulation of Ihh and Gli1 expression in the rat uterus. Cell Tissue Res. 2010 May;340(2):389-95. 査読有

[学会発表] (計 10件)

- ① N. Yamauchi et al. Development of the Endometrial Spheroids as a Model for Implantation In Vitro. 国際生殖シンポジウム. 2011年、9月14日. いわて県民

情報交流センター・アイーナ, 岩手県盛岡市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 伸彦 (YAMAUCHI NOBUHIKO)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：00363325

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：