

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23780279

研究課題名（和文） 新規妊娠認識物質の探索：受胎率向上への展望

研究課題名（英文） Search of novel pregnancy recognition substance: Prospects for improvement of conception rate

研究代表者

櫻井 敏博（SAKURAI TOSHIHIRO）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：70568253

研究成果の概要（和文）：本研究課題の目的は、人工授精（AI）施行後 10 日以内の妊娠初期に起こる母体の変化（血液中と生殖器中）を明らかにし、胚移植（ET）時の妊娠認識を補助することで受胎率の向上を試みることであった。しかしながら、解析が進むに連れ、胚がインターフェロン・タウを分泌する以前では、母体の子宮における遺伝子発現の変化は認められないことが分かったため、当初の予定を変更せざるを得ず、着床周辺期における新規妊娠認識物質の探索を目的とした。本研究では、以下の様な成果が得られた。in vitro でウシの着床過程を再現できる培養系を構築した。また、その時に使用する子宮上皮細胞の不死化細胞を樹立した。また、EGF が着床過程の超初期に分泌されることが重要であることも in vitro 共培養系から分かった。このように in vitro 着床評価系は、どの因子が着床に重要かを判断することができるだけでなく、新規の妊娠補助剤を探索するのにも有用な方法である。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to appear the maternal changes in the blood or uterine that occur in early pregnancy within 10 days after the artificial insemination (AI), to assist the pregnancy recognition at embryo transfer (ET) to improve the conception rate. However, prior to secrete interferon tau from trophecterm, because it was found that changes in gene expression in the uterus of the mother is not observed, it had to be changed the original plan. We, therefore, aimed to explore new pregnancy recognition factors during peri-attachment period. In this study, results were obtained as following: An in vitro coculture system which mimics bovine attachment process was developed. In addition, immortalized cell of uterine epithelial cells was established. Besides, in vitro coculture system appeared EGF secreted into uterine lumen at the initial of attachment process is important. Thus, this in vitro implantation assessment system could be a useful method not only can determine the factors which are important for attachment, but also to explore the improving drugs for pregnancy rate.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：機能性物質

1. 研究開始当初の背景
家畜・ヒト共に胚移植（ET）の技術は発達しているにもかかわらず、この 10 年以上受胎

率は 60～70%で停滞しており、受胎率改善への糸口はつかめていなかった。

2. 研究の目的

申請者らは先行研究で ET を行う 3 日前にウシ末梢血単核球細胞 (PBMCs) を子宮内に注入することにより、受胎率を約 80% にまで改善させた。これを踏まえ、本研究は妊娠初期の子宮内免疫細胞に発現する新規妊娠認識物質と発現時期を同定し、その物質によって誘発される母体の変化を明らかにする。さらに、新規妊娠認識物質の人為的な発現制御法を確立し、その物質を妊娠補助薬として家畜並びにヒトへの臨床応用へと展開するための基礎知見を得ることが目的であった。しかしながら、当初の予定を大幅に変更せざるを得なくなり、着床周辺期における新規妊娠認識物質の探索を最終的な目的とした。

3. 研究の方法

① *in vitro* でウシの着床過程を再現できる培養系の構築を試みた。② また、その時に使用する子宮上皮細胞の不老化を試みた。③ さらに、子宮灌流液のプロテオミクス解析を行い、どの因子が着床に重要であるかを検討した。

4. 研究成果

① *in vitro* でウシの着床過程を再現できる培養系を構築した。この *in vitro* 共培養系は、*in vivo* の着床過程に限りなく近い遺伝子の変化が確認できたことから、この系を用いれば、どの因子が着床過程に重要か評価できるようになった。② *In vitro* 共培養系のネックであった子宮上皮細胞の安定性に関して、不老化子宮内膜上皮細胞を樹立することで対処した。これにより、安定して着床の評価を行えるようになった。③ 子宮灌流液のプロテオミクス解析と *in vitro* 評価系を用いて、EGF が着床に重要であることを明らかにした (投稿準備中)。

このように、我々が構築した *in vitro* 評価系は、着床関連因子のスクリーニングが可能になっただけでなく、着床過程を理解する上で重要な方法だといえ、本研究課題で得られた実験系と知見は、とても有益であり、今後の発展を期待させるものとなった。

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 15 件)

① Bai H, Sakurai T, Someya Y, Konno T, Ideta A, Aoyagi Y, Imakawa K. Regulation of trophoblast-specific factors by GATA2 and GATA3 in bovine trophoblast CT-1 cells. *J Reprod Develop*. 査読有 57:518-525. (2011)

② Sakurai T, Suzuki K, Yoshie M, Hashimoto K, Tachikawa E, Tamura K. Stimulation of tube formation mediated through the prostaglandin EP2 receptor in rat luteal endothelial cells. *J Endocrinol*. 査読有 209:33-43. (2011)

③ Yamakoshi S, Bai R, Chaen T, Ideta A, Aoyagi Y, Sakurai T, Konno T, Imakawa K. Expression of mesenchymal-related genes by the bovine trophoblast following conceptus attachment to the endometrial epithelium. *Reproduction* 査読有 143:377-387 (2012) doi: 10.1530/REP-11-0364

④ Bai H, Sakurai T, Konno T, Ideta A, Aoyagi Y, Godkin JD, Imakawa K. Expression of GATA1 in the ovine conceptus and endometrium during the peri-attachment period. *Mol Reprod Dev*. 査読有 79:64-73. (2012) doi: 10.1002/mrd.21409.

⑤ Sakurai T, Bai H, Bai R, Arai M, Iwazawa M, Zhang J, Konno T, Godkin JD, Okuda K, Imakawa K. Coculture system that mimics *in vivo* attachment processes in bovine trophoblast cells. *Biol Reprod*. 査読有 87:1-11 (2012) doi: 10.1095/biolreprod.112.100180.

⑥ Bai H, Sakurai T, Ideta A, Aoyagi Y, Godkin JD, Imakawa K. Expression and Potential Role of GATA6 in Ruminant Trophoblasts during Peri-implantation Periods. *J Mamm Ova Res*. 査読有 29: in press. (2013)

⑦ Chaen T, Konno T, Egashira M, Bai R, Nomura N, Nomura S, Sakurai T, Imakawa

K. Estrogen-dependent uterine secretion of osteopontin activates blastocyst adhesion competence. *PLoS One*. 査読有 7:e48933. (2013) doi: 10.1371/journal.pone.0048933.

⑧ Kim MS, **Sakurai T**, Bai H, Bai R, Sato D, Nagaoka K, Chang KT, Godkin JD, Min KS, Imakawa K. Presence of Transcription Factor OCT4 limits Interferon-tau Expression during the Pre-attachment Period in Sheep. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 査読有 26:638-645 (2013)

⑨ Nakagawa S, Bai H, Sakurai T, Nakaya Y, Konno T, Miyazawa T, Gojobori G, Imakawa K. Dynamic Evolution of Endogenous Retrovirus-Derived Genes Expressed in Bovine Conceptuses during the Period of Placentation. *Genome Biol Evol.* 査読有 5:296-306 (2013) doi: 10.1093/gbe/evt007.

⑩ Kusama K, Yoshie M, Tamura K, Kodaka Y, Hirata A, **Sakurai T**, Bai H, Imakawa K, Nishi H, Isaka K, Nagai T, Nagao T, Tachikawa E. Regulation of decidualization in human endometrial stromal cells through exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac). *Placenta*. 査読有 34:212-221 (2013) doi: 10.1016/j.placenta.2012.12.017.

⑪ **Sakurai T**, Bai H, Bai R, Sato D, Arai M, Okuda K, Ideta A, Aoyagi Y, Godkin JD, Imakawa K. Down-regulation of Interferon Tau Gene Transcription With a Transcription Factor, EOMES. *Mol Reprod Dev.* 査読有 In press (2013) doi: 10.1002/mrd.22171.

⑫ 唄花子, **櫻井敏博**, 染谷 洋平, 今川 和彦, 栄養膜細胞由来インターフェロン・タウの妊娠認識のための戦略: 過去、現在、未来への可能性、*日本受精着床学会誌* 査読有 29:275-282 (2012)

⑬ Bai H, **Sakurai T**, Fujiwara H, Ideta A, Aoyagi Y, Godkin JD, Imakawa K. Functions of interferon tau as an immunological regulator for establishment of pregnancy. *Reproductive Medicine and Biology. Reproductive Medicine and Biology* 査読有 11:109-116 (2012) doi:10.1007/s12522-011-0117-2

⑭ Bai H, **Sakurai T**, Godkin JD, Imakawa K. Expression and potential role of GATA factors in trophoblast development. *J Reprod Develop.* 査読有 59:1-6 (2013)

⑮ 唄花子、**櫻井敏博**、藤原浩、出田篤司、青柳敬人、今川和彦、反芻動物の妊娠・着床期における研究の現状と課題、*日本畜産学会報* in press (2013)

[学会発表] (計3件)

① **Sakurai T**, Establishment of invitro assessment system for conceptus attachment to the uterine epithelial cells、日本・ポーランド二国間交流事業共同セミナー (岩手) 2011年9月13-15日

② **Sakurai T**, Bai H, Konno T, Okuda K, Godkin JD and Imakawa K, Transcriptional down-regulation of IFNT expression during the peri-implantation period in ruminants, **Society for the Study of Reproduction 44th Annual Meeting**. Portland, Oregon, USA. 2011年7月31日-8月4日

- ③ **櫻井敏博**、唄花子、荒井未来、奥田潔、今川和彦、不死化ウシ子宮内膜上皮細胞の樹立、**日本畜産学会 第116回大会** (広島) 2013年3月

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0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0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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 敏博 (SAKURAI TOSHIHIRO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特

任助教

研究者番号: 70568253

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし