

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850225

研究課題名(和文) 子宮内膜再生に寄与するウシ子宮内膜幹細胞の同定

研究課題名(英文) Identification of bovine endometrial stem cells contributing to regenerate endometrium

研究代表者

松山 秀一 (MATSUYAMA, Shuichi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所家畜飼養技術研究領域・主任研究員

研究者番号：50455317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウシ子宮内膜上皮細胞からフローサイトメトリー解析によって幹細胞を多く含むとされるSide Population (SP) 画分を得た。ウシ子宮内膜上皮SP細胞の遺伝子発現についてマイクロアレイ解析を行った結果、ヒト子宮内膜上皮SP細胞における遺伝子発現パターンに近いことが明らかとなった。一方で、ウシ子宮内膜上皮SP細胞は骨芽細胞や脂肪細胞に分化しなかったこと、さらには子宮内膜上皮SP細胞を免疫不全マウスの皮下へ移植した後、移植部位に子宮内膜様組織が確認できなかったことから、ウシの子宮内膜再生メカニズムは幹細胞が寄与するヒトの子宮内膜更新とは異なる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The side population (SP) cells, which are thought to have characteristic of somatic stem cells, were identified in the bovine endometrial epithelial cells by flow cytometric analysis. The microarray analysis demonstrated that the expression patterns of bovine endometrial SP cells were similar to those of human endometrial SP cells. Whereas, the culture of bovine endometrial SP cells did not differentiate into osteoblasts or adipocytes. The bovine endometrial SP cells transplanted subcutaneously into nude mice did not generate a cystic mass with endometrial structure. These results suggest that the bovine endometrium regeneration mechanisms during estrous cycle might be different from those of human in which endometrial stem cells contribute to the remodeling process.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ウシ 子宮 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

ウシの繁殖において、未経産牛は受胎率が比較的高い一方で、経産牛では分娩を機に、受胎率が低下することが知られているが、その原因については未だ解明されていない。これまでに、ウシにおける胚の生存や成長と子宮環境との関係についての研究が数多く進められており、胚の子宮内での成長は、それを取り巻く子宮環境によって影響を受けることが示唆されている。また、これまでの我々の研究で、不受胎となる経産牛では授精後比較的早い時期に胚が死滅する可能性が示されていることから、経産牛の受胎率低下は、分娩後の子宮機能の低下により引き起こされるのではないかと考えられる。

子宮は哺乳動物が次世代を残すために重要な器官であり、分娩後は再度繁殖を可能とするため迅速な組織の修復が行われる。一般的に、子宮は分娩時に胎子の娩出とともに胎盤が剥離して大きく損傷を受けるが、その後速やかに子宮内膜が再生されるとともに妊娠可能な子宮環境に修復される。ヒトの場合、分娩から回復した子宮は、エストロゲンやプロゲステロンの支配を受け、子宮内膜は生理周期ごとに脱落と増殖を繰り返し、絶えず更新される。一方、ウシの場合、分娩後 30 日前後で子宮が回復することが示されているが、一度修復された子宮が、その後ヒトと同じように内膜脱落・修復により抜本的な更新がなされることはない。実際、ウシにおいては分娩後 70-100 日に受胎率が高く、この期間を過ぎると著しく低下することが知られており、我々の研究でもこれらの事実を裏付けるかのように、分娩後の経過日数の増加によって、子宮の胚発生支持能力が低下する可能性を示す結果が得られている。

近年、再生医療にむけた幹細胞研究が脚光を浴びており、代表的なものとして、胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が知られているが、これらの人工的に作製される幹細胞ではなく、生体内にも組織の維持・更新・修復に関与している組織幹細胞の存在が確認されている。ヒトの子宮においても組織幹細胞 (子宮内膜幹細胞) の存在が示されており、子宮内膜幹細胞が子宮内膜の更新に寄与することが示唆されている。一方、ヒトとは異なる子宮内膜更新や妊娠維持メカニズムを有するウシにおいては、子宮内膜幹細胞が存在するかどうかについて未だ解明されていない。

2. 研究の目的

我々は、経産牛における受胎率の低下は、分娩後の子宮内膜再生の不具合に原因があるのではないかと着想した。本研究では、ウシの分娩後における子宮内膜再生メカニズムを明らかにする第一歩として、ウシの子宮内膜に幹細胞が存在することを明らかにするとともにその分化能について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 未経産牛の子宮を取り出し、各子宮角腔内を 0.3%トリプシン-0.02% EDTA-PBS (-) で満たし、37 °C で 60 分インキュベートした後、上皮細胞を分離、回収した。単離した子宮内膜上皮細胞はラット尾腱由来コラーゲンでコートしたフラスコに播種し、上皮系の幹細胞用無血清培養液を用いて培養した (37 °C, 5% CO₂ in air)。培養した子宮内膜上皮細胞を DMEM-2% FBS -10 mM HEPES で 1x10⁶ cells/ml となるように懸濁し、Hoechst33342 (10 µg/ml) のみ、または Hoechst33342 (10 µg/ml) と ABC トランスポーターの阻害剤であるペラパミル (50 µM) を加えて 37 °C、90 分染色した。さらに死細胞を除外するために Propidium Iodide (2 µg/ml) で染色した後、フローサイトメトリ-解析に供した。MoFlo Astrios (Beckman Coulter Inc.) を用いて、UV 光源 (350 nm) により Hoechst 33342 を励起し、Hoechst blue および Hoechst red の蛍光強度を、それぞれ 448/59 および 692/75 nm のバンドパスフィルターを用いて検出した。SP 細胞とそれ以外の細胞 (Major population, MP 細胞) は Hoechst 33342 の排出能の違いによって判別した。

(2) ウシの子宮内膜上皮培養細胞から MoFlo Astrios を用いて SP 細胞と MP 細胞を分取し、それぞれの細胞から QIAGEN RNeasy Micro Kit を用いて RNA を抽出した。蛍光色素 (Cy3) で標識した後、Agilent Bovine V2 Microarray (Design ID: 023647) 上でハイブリダイズさせ、相対的な遺伝子発現量を検出した。ハイブリダイゼーション実験およびアレイスキャニングに関しては、農業生物資源研究所オープンラボ「マイクロアレイ解析室」で行い、得られたデータは GeneSpring GX software (ver. 12.1) を用いて解析した。

(3) ウシの子宮内膜上皮培養細胞から MoFlo Astrios を用いて SP 細胞を分取した後、骨芽細胞分化用培地 (hMSC BulletKit, Lonza PT-3002) および脂肪細胞分化用培地 (hMSC BulletKit, Lonza PT-3004) を用いて培養し、それぞれ骨芽細胞および脂肪細胞に分化誘導した。骨芽細胞については Calcium deposition 染色により、脂肪細胞への分化は Oil Red O 染色によりそれぞれ確認した。また、骨芽細胞および脂肪細胞への分化については、ウシ骨髄細胞をポジティブコントロールとして用いた。

(4) ウシの子宮内膜上皮培養細胞から MoFlo Astrios を用いて SP 細胞を分取した。細胞培養液 (5 µl) で SP 細胞約 7500 個を懸濁し、マトリゲル (15 µl, BD 354234) と混合した後、免疫不全マウスの皮下に注入した。

4. 研究成果

(1) 上皮系の幹細胞用無血清培養液で培

養したウシ子宮内膜上皮培養細胞を Hoechst33342 で染色後、フローサイトメトリー解析を行った結果、子宮内膜上皮培養細胞には蛍光強度の低い領域に突出した細胞集団が存在し、この細胞集団は ATP binding cassette (ABC) トランスポーターの阻害剤であるベラパミル存在下で消失した。また、子宮内膜上皮細胞における SP 分画の割合は一定でなく個体間で大きく変動していた。(図1)

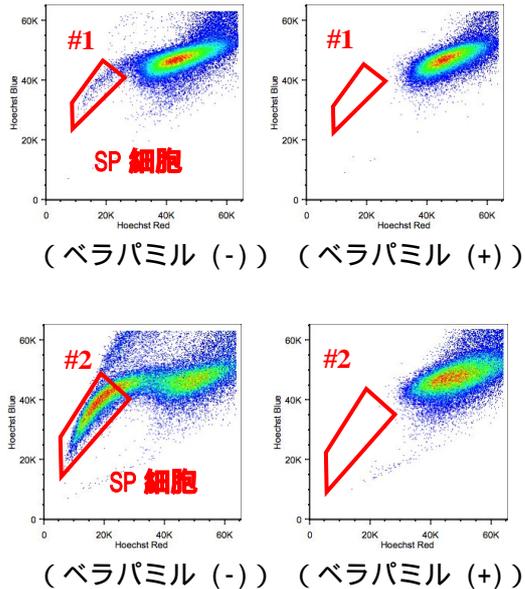


図1 ウシ子宮内膜上皮培養細胞(#1, #2)のフローサイトメトリー解析

(2) ウシ子宮内膜上皮 SP 細胞および MP 細胞で発現する遺伝子についてクラスター解析を行った結果、SP 細胞と MP 細胞では異なる遺伝子発現パターンを示した(図2)。さらに、SP 細胞と MP 細胞で発現量の異なる遺伝子について GO 解析を行った結果、SP 細胞では組織・上皮増殖や細胞接着、免疫機能に関わる遺伝子の発現量が高いことが明らかとなった。(表1)

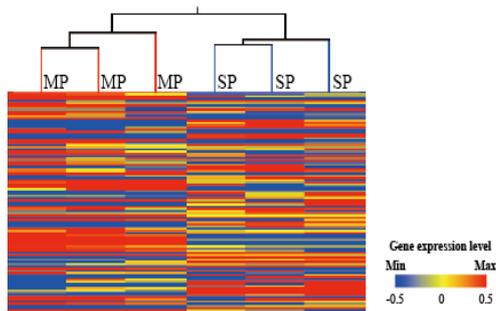
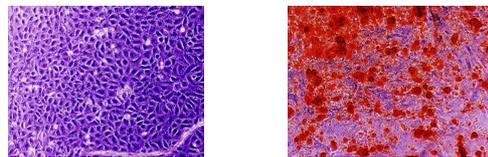


図2 ウシ子宮内膜上皮 SP 細胞および MP 細胞の遺伝子発現における Heatmap

表1 ウシ子宮内膜上皮 SP 細胞と MP 細胞で発現量の異なる遺伝子における GO 解析

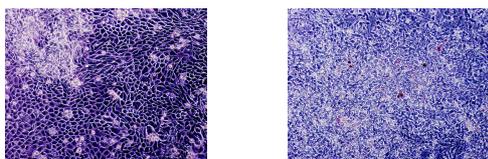
GO Term	p-value	Number of Differentially Expressed Genes
MHC class I protein complex	0.000	10
antigen processing and presentation	0.000	15
tissue development	0.000	37
epithelium development	0.000	23
MHC protein complex	0.000	11
antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	0.000	7
antigen processing and presentation of peptide antigen	0.000	8
biological adhesion	0.000	31
cell adhesion	0.000	31
immune system process	0.000	45

(3) ウシの子宮内膜上皮 SP 細胞は、骨芽細胞分化用培地 (hMSC BulletKit, Lonza PT-3002) を用いて培養したが、骨芽細胞への分化は認められなかった(図3)。また、脂肪細胞分化用培地 (hMSC BulletKit, Lonza PT-3004) を用いた培養も行ったが、脂肪細胞への分化は認められなかった(図4)。このように、ウシの子宮内膜上皮 SP 細胞はヒト子宮内膜幹細胞で示されているような多分化能を示さないことから、ウシの子宮内膜再生メカニズムは幹細胞が寄与するヒトの子宮内膜更新とは大きく異なる可能性が示唆された。



(ウシ子宮内膜 SP 細胞) (ウシ骨髄細胞)

図3 骨芽細胞分化用培地で培養したウシ子宮内膜上皮 SP 細胞およびウシ骨髄細胞の Calcium deposition 染色像 (x40)



(ウシ子宮内膜 SP 細胞) (ウシ骨髄細胞)

図4 脂肪細胞分化用培地で培養したウシ子宮内膜上皮 SP 細胞およびウシ骨髄細胞の Oil Red O 染色像 (x40)

(4) マトリゲルと混合したウシ子宮内膜上皮 SP 細胞を免疫不全マウスの皮下に注入した 65 日後に移植部位を確認したが、テラトーマは形成されなかった(図5)。



図5 マトリゲルと混合したウシ子宮内膜上皮 SP 細胞を注入した後、65 日目の免疫不全マウス

5．主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1件)

松山秀二、古澤 軌、池田光美、木村康二、
ウシ子宮内膜上皮細胞における Side
Population の遺伝子発現解析、第 107 回日本
繁殖生物学会大会、2015.8.20-24、帯広畜産
大学

6．研究組織

(1)研究代表者

松山 秀一 (MATSUYAMA, Shuichi)
独立行政法人農業・食品産業技術研究機
構・畜産草地研究所・家畜飼養技術研究領
域・主任研究員
研究者番号：50455317