

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04579

研究課題名(和文) 妊娠認識時のウシ子宮改編に果たすオートファジー-リソソーム応答機構の解明と制御

研究課題名(英文) Role of autophagy-lysosomal related responses on uterine modulation at the time of maternal-fetal recognition

研究代表者

高橋 昌志 (Takahashi, Masashi)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：10343964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウシ妊娠子宮組織において、プロテアーゼであるカテプシン(CTS)Bの活性化を明らかにし、これがIFN τ による可能性が示唆された。また、IFN τ によるリソソームの活性化も確認された。一方、妊娠子宮およびIFN τ 添加子宮上皮細胞でのCTS遺伝子発現の上昇がみられるものもあったが、オートファジーに直接関連する遺伝子の増加は見られず、その関与は少ないことが示唆された。RNA干渉によるIFN受容体の個別発現阻害によって、IFN τ によるシグナル伝達経路がサブユニット特異的であることを明らかにした。加えて、子宮に接続する頸管組織での非常に高い妊娠特異的な発現遺伝子の変動を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we detected the activation of cathepsin (CTS)B in the pregnant bovine uterine tissue. This activation was thought to be stimulated by interferon tau(IFN τ) secreted by embryo. Although expression of CTS genes was detected by pregnant and IFN τ -treated non pregnant uterine tissue, expression of autophagy related genes was not changed. These results suggest the activation of lysosome and lysosomal CTS is triggered by IFN τ for uterine modulation, but contribution of autophagy is low. Further study is needed to clarify the roles of autophagy. RNA interference of each subunit construction of type I IFN receptor subunit (IFNAR1, R1) by siRNA revealed that IFN τ stimulated signal transduction is dominantly affected by IFNAR1 for inducing IFN related gene expressions. In addition, high levels of pregnancy specific gene expression were detected in the cervical tissue that is directly connected with uterus for the first time.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：妊娠認識 オートファジー・リソソーム ウシ インターフェロン

1. 研究開始当初の背景

国内でウシの人工授精後受胎率は、この20年に約10%低下しており、受精卵移植後の受胎率の50%前後での固定化の現状と併せて、繁殖効率の向上を求める声は高い。受精後、発生を続けながら子宮に初期胚が到達し、透明帯から脱出する8日目前後から着床・胎盤形成開始時の40日までの間に20-30%の胚死滅が起こる。この時期は、胚-母体間の妊娠認識から胚の許容、着床に向けた胚および子宮での形体的、機能的変化が劇的に起こる時期でもある。胚から産生される反芻動物固有の妊娠シグナルタンパク質であるインターフェロン(IFN)シグナルを受けた子宮側の応答に関する研究としては、特に近年の様々な妊娠シグナル応答に関する遺伝子レベルの発現を主として網羅的に実施されており、免疫寛容、遺伝子転写調節、細胞接着および子宮改編など多数の変動遺伝子が明らかにされている。しかし、早期胚死滅解決に関与する決定的なものについては未だ解明されていない。一方、細胞が持つ細胞内不要タンパク質分解・再利用の一つであるオートファジーの着床-子宮改編への関与機構として近年研究が進行している。反芻動物では、ヒツジ子宮でIFNに応答したプロテアーゼ誘導・活性化が報告されたが、ヒトとは異なり、子宮内膜でのアポトーシスや細胞消化を伴わない。このことから、反芻家畜特有な子宮改編の側面からの新たな研究展開が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、ウシの妊娠認識時に受胎産物から分泌されるIFNによる子宮改編について、オートファジー-リソソーム機能との新たな関係を中心としたIFNシグナル経路を明らかにすることを目的とし、(1)妊娠子宮におけるオートファジー・リソソーム動態の検出、(2)IFN刺激によるオ

ートファジー-リソソーム動態の解析、(3)IFNシグナル制御による子宮オートファジー・リソソーム応答性評価および(4)子宮外組織における妊娠応答遺伝子発現解析の研究を実施した。

3. 研究の方法

本研究では、IFNによる子宮改編について、オートファジー-リソソーム機能との新たな関係からIFNシグナル経路の解明・制御による受胎シグナルの向上を図ることを目的とした以下の解析を行った。

(1)人工授精実施後、15、18あるいは発情15,18日目の子宮組織をと畜後にサンプリングし、オートファジー発動時のオートファゴソーム形成時やCTS放出時に活性化することが知られているリソソームの活性を蛍光試薬(Lysotracker)やCTSBの活性指示薬(Magic Red)を用いて検出した。また、採取組織からRNA抽出、cDNA作製後定量PCRにて*ATG3*、*BECN1*および*mTOR*、リソソーム機能関連因子として、リソソーム幕構成主要タンパクである*LAMP2*、カテプシン(*CTS*)-*B*、*D*、*L*、*Z*の遺伝子発現を定量PCRで検出し、IFN感作による子宮内動態を解析した。

(2)と場より採取した発情中期子宮の組織、あるいはそこから分離採取した子宮上皮細胞および間質細胞単層培養を確保し、体外培養系に組換えIFNを添加後、(1)の発現遺伝子とともに、CTSB活性に加えてリソソーム活性を蛍光試薬(Lysotracker)を用いて検出した。

(3)I型IFN受容体を構成する二種類のサブユニットに対してsiRNAを設計、化学合成し、RNA干渉を行うことで、サブユニット特異的なIFNによる活性化遺伝子発現の動態を検出した。

(4)一般的に妊娠認識は胚の産生するIFNが子宮内で応答し、その後血中を介した黄体退行や末梢血中の白血球でIFN応答

遺伝子が発現することが知られ、その発言を捕えることで早期妊娠判定への活用が期待されるが、その精度やばらつきには課題が残されている。本研究の中で、追加的に子宮と接続する頸管や腔壁における妊娠応答性についても検出を試みた。

4. 研究成果

(1) 生体より採取した子宮組織における *CTSB* の酵素活性を検出したところ、妊娠子宮において、*CTSB* 活性の明瞭な増加が観察された(図 1)。また、妊娠子宮組織における *CTSB* の増加傾向($P < 0.1$)ならびに *CTSZ* の優位な増加がみられた(図 2)。

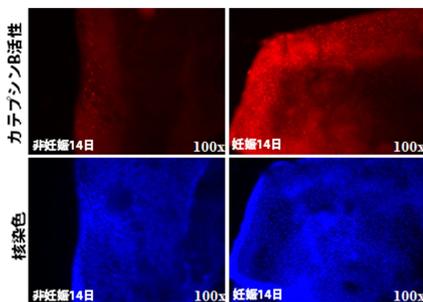


図 1 妊娠、非妊娠子宮内膜組織における *CTSB* 活性

一方、妊娠組織で *CTSB*, *K*, *L* および *Z* の遺伝子発現の有意な増加がみられたが、オートファジー関連の遺伝子発現には妊娠の有無は影響しなかった。このことから、子宮内膜の改編には、オートファジー経路の関与が少なく、リソソームカテプシン動態が大きく関与することが示唆された。

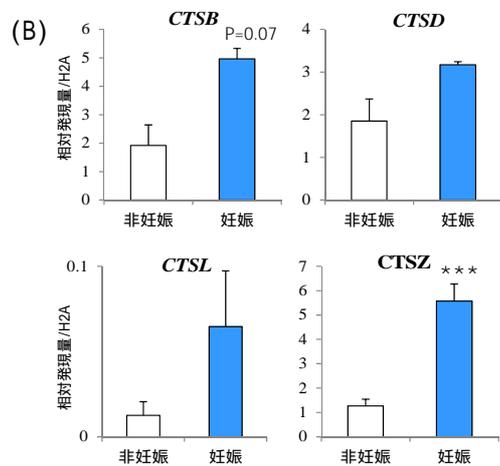
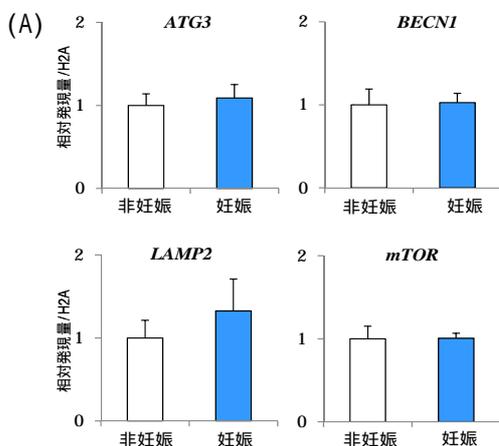


図 2 妊娠、非妊娠子宮内膜組織における(A)カテプシン、(B)オートファジー関連遺伝子の発現 *** $P < 0.001$

(2) 発情中期子宮内膜組織小片を採取し、組換え IFN を添加して 12 時間の組織培養を行い、*CTSB* およびリソソーム活性を検出したところ、両者とも IFN 添加によって活性化が観察された(図 3)。

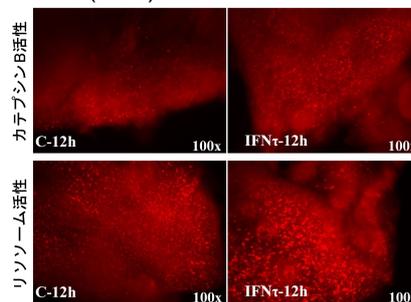


図 3 子宮内膜組織のカテプシン活性化に及ぼす IFN の影響

加えて、同時に採取、培養した子宮内膜上皮細胞に IFN を添加し、*CTS* およびオートファジー遺伝子発現を検出したところ、*CTSL* の有意な増加ならびに *LAMP2* の増加傾向がみられた(図 4)。

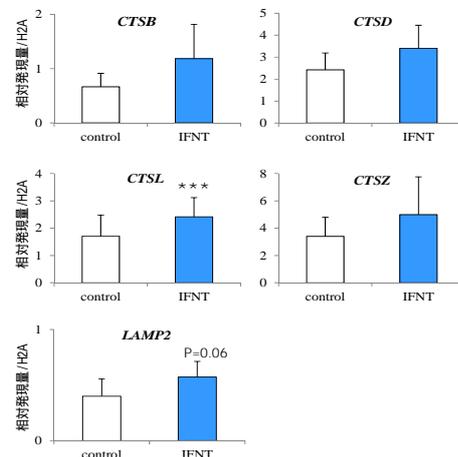


図 4 培養子宮上皮細胞におけるカテプシン、リソソーム関連遺伝子発現に及ぼす IFN の作用 *** $P < 0.001$

(3) siRNA によって受容体サブユニット特異的な抑制に成功した(図 5)。RNA 干渉法による IFNAR の発現抑制は IFN 添加後の ISGs および IFN シグナル関連遺伝子の発現誘導も抑制した。この抑制効果は IFNAR2 よりも IFNAR1 の発現抑制で高いことから、ウシ子宮上皮細胞における IFN によるシグナル伝達は IFNAR1 の発現が重要であることが示唆された(図 6)。細胞死関連遺伝子も IFN 添加後に増加し、IFNAR 発現抑制により抑制された。以上より、着床前ウシ子宮内膜における IFN シグナルは、IFNAR1 サブユニットの発現が重要であり、ISGs の発現を担う可能性が示唆された。

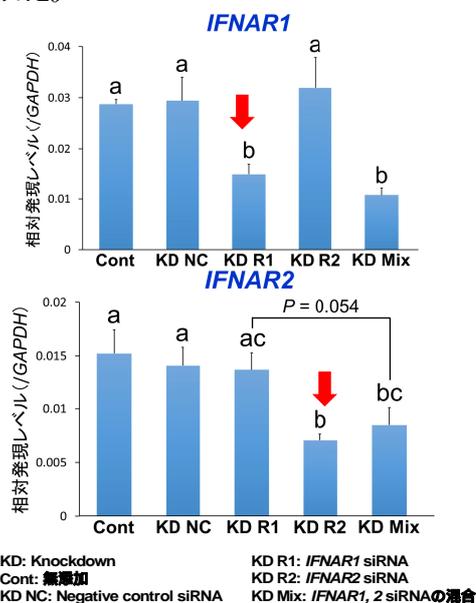


図 5 RNA 干渉による培養子宮上皮細胞における IFN 受容体サブユニットの発現抑制

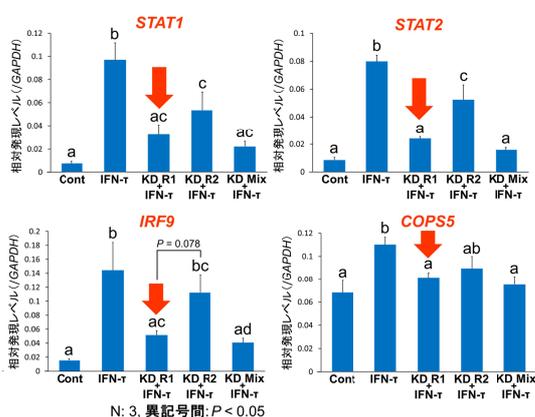


図 6 IFN 受容体サブユニット発現抑制による IFN 誘導遺伝子発現への影響

(4) 妊娠ウシ生体で胚が産生する IFN の産生量がピークになる妊娠 18 日目の子宮組織に接続される子宮頸管の外部組織で IFN 誘導性遺伝子である ISG15, MX1 および MX2 の遺伝子発現を測定したところ、従来、国内外でその発現が妊娠診断に利用可能と評価されている血中白血球での同遺伝子発現量が数倍-10 倍程度であったのに対して、頸管では 80 倍近い ISG15 発現の増加が見られた。国内外で子宮から産生される IFN による白血球への応答性促進が定説である、本研究では、子宮から直接頸管などの子宮外組織に反応してより高い妊娠応答性が起こることが初めて明らかになった(図 7)した。本研究成果を特許申請し、今後、新たな妊娠応答機構の解明を進めると共に、簡易、高精度の早期妊娠診断技術開発への展開が多いに期待される。

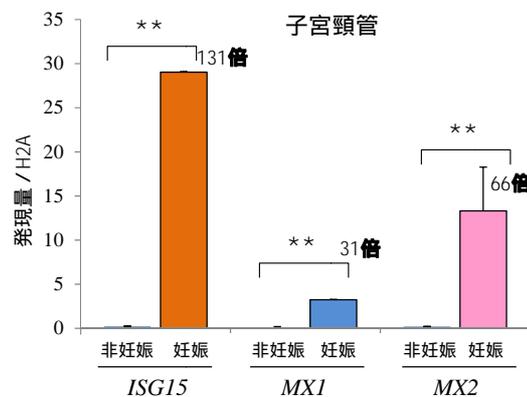


図 7 子宮頸管における妊娠特異的遺伝子発現の増加 ** P<0.01

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 8 件)

(1)鈴木惇文、木村康二、唄花子、川原学、高橋昌志、インターフェロン- 化学合成ペプチドによるウシ子宮内膜細胞活性リガンド領域の探索、北海道畜産草地学会報、2018 年印刷中 査読有

(2)Talukder MAS, Balboula AZ, Shirozu T, Kim SW, Kunii H, Suzuki T, Ito T, Kimura

K, Takahashi M. Activation of lysosomal cathepsins in pregnant bovine leukocytes. *Reproduction*. 155:515-528. 2018. 査読有

(3)Yamanaka KI, Khatun H, Egashira J, Balboula AZ, Tatemoto H, Sakatani M, Takenouchi N, Wada Y, Takahashi M. Heat-shock-induced cathepsin B activity during IVF and culture compromises the developmental competence of bovine embryos. *Theriogenology*. 114: 293-300. 2018. 査読有

(4)Kikuchi K, Kozai K, Hojo T, Sakatani M, Okuda K, Bai H, Kawahara M, Takahashi M. Evaluating the electrical impedance and mucus-related gene expression of uterine endometrial tissues in mares. *J Reprod Dev*. 2018 Jan 7. doi: 10.1262/jrd.2017-128. 査読有

(5)Shirozu T, Iwano H, Ogiso T, Suzuki T, Balboula AZ, Bai H, Kawahara M, Kimura K, Takahashi H, Bai R, Kim SW, Yanagawa Y, Nagano M, Imakawa K, Takahashi M. Estrous cycle stage-dependent manner of type I interferon-stimulated genes 1 induction in the bovine endometrium. *J Reprod Dev*. 63: 211-220, 2017. 査読有

(6)Aboelenain M, Balboula AZ, Kawahara M, El-Monem Montaser A, Zaabel SM, Kim SW, Nagano M, Takahashi M. Pyridoxine supplementation during oocyte maturation improves the development and quality of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*. 91:127-133. 2017. 査読有

(7)Shirozu T, Sasaki K, Kawahara M, Yanagawa Y, Nagano M, Yamauchi N, Takahashi M. Expression dynamics of bovine MX genes in the endometrium and placenta during early to mid pregnancy. *J Reprod Dev*.62:29-35. 2016. 査読有

(8)Aboelenain M, Kawahara M, Balboula

AZ, Montasser AE, Zaabel SM, Okuda K, Takahashi M. Status of autophagy, lysosome activity and apoptosis during corpus luteum regression in cattle. *J Reprod Dev*. 61:229-336.2015. 査読有

[学会発表](計13件)

(1) M.A.S. Talukder, A.Z. Balboula, H. Iwano, T. Suzuki, T. Ito, H. Bai, M. Kawahara, M. Takahashi. Effect of IFN- τ on lysosomal function in bovine leukocytes during early pregnancy. 第124回日本畜産学会大会 2018年3月28日「東京大学(東京都・文京区)」優秀英語発表賞受賞

(2) M.A.S. Talukder, A.Z. Balboula, H. Iwano, T. Suzuki, T. Ito, H. Bai, M. Kawahara, M. Takahashi. Elucidation of lysosomal cathepsins in bovine blood leukocytes during early pregnancy. 1st International Conference on Challenges for Future Agriculture. 2018年1月27日「(Mymensingh)Bangladesh」Best oral presentation award 受賞

(3) Masashi Takahashi. Evaluation and regulation of intracellular cysteine protease to improve the quality and, International Conference on Beef Cattle improvement and industrialization in China. Proceedings (招待講演)(国際学会) 2017年11月30日「Yangling(China)」

(4) 高橋昌志. Evaluation of epigenetic status and regulation of SCNT and progeny embryos, 中国西北農業科技大学獣医学部招聘セミナー講演(招待講演) 2017年10月18日「Yangling(China)」

(5)M. A. S. Talukder, A. Z. Balboula, T. Shirozu, T. Suzuki, H. Bai, M. Kawahara, M. Takahashi. Evaluation of lysosomal cathepsins and lysosomes in bovine blood leukocytes during early pregnancy. 第123回日本畜産学会大会 2017年9月6日 信

州大学(長野県・伊那市) 優秀英語発表賞
(6) 国井宏樹、伊藤月乃、小木曾貴季、鈴木
惇文、Balboula Ahmed Zaky、唄 花子、永
野昌志、川原 学、高橋昌志、胚由来 IFNT
によるウシ子宮外組織での新規応答性検出、
第 1 2 3 回日本畜産学会大会、2017 年 9 月 6
日 信州大学(長野県・伊那市) 優秀発表賞
(7) 鈴木 惇文、白水 貴大、岩野 弘暉、小木
曾 貴季、山内 伸彦、柳川 洋二郎、永野 昌
志、唄 花子、川原 学、高橋 昌志、発情
期及び妊娠認識時のウシ子宮組織における
オートファジー-カテプシン関連因子の発現
動態、第 109 回日本繁殖生物学会大会 2016
年 9 月 12 日「麻布大学(神奈川県・相模原市)」
(8) 白水 貴大、鈴木 惇文、岩野 弘暉、
小木曾 貴季、金 星佑、唄 花子、川原
学、木村 康二、高橋 昌志、サブユニット
特異的な I 型インターフェロン (IFN) 受容
体発現抑制による IFN- シグナル関連遺伝
子発現への影響 第 109 回日本繁殖生物学会
大会 2016 年 9 月 12 日「麻布大学(神奈川県・
相模原市)」
(9) Shirozu Takahiro, Suzuki Toshiyuki,
Iwano Hiroki, Ogiso Takatoshi, Bai
Hanako, Kawahara Manabu, Kimura Koji,
Takahashi Masashi . The effect of knock
down of IFNAR by RNAi on expression of
interferon- induced genes in bovine
endometrial epithelial cells . The 17th
Asian-Australian Association of Animal
Production Societies Animal Science
Congress. 2016 年 8 月 22 日 「九州産業大
学(福岡県・福岡市)」
(10) Takahashi Masashi, Role of cysteine
protease on the quality and developmental
competence of bovine oocyte. Symposium
SY-07, The 17th Asian-Australian
Association of Animal Production Societies
Animal Science Congress. 2016 年 8 月 24 日
「九州産業大学(福岡県・福岡市)」

(11) Takahiro Shirozu, Hanako Bai, and
Takahashi Masashi, Expression of ISGs in
pregnant uterus. The meeting at National
Institute of Animal Science, Animal
Genetic Research Center, 2016 年 4 月 20 日
招待講演 「 Namwon(Korea) 」

(12) LI Jianye、前地真奈、郡 七海、
MansourAboelenain、Ahmed-ZakyBalboula、
金 星佑、成煥厚、唄 花子、川原 学、
高橋昌志、Dynamics of lysosomal cathepsin
in bovine oocytes and preimplantation
embryos. 第 1 2 1 回日本畜産学会大会
2016 年 3 月 28 日「日本獣医生命大学(東京
都・武蔵野市)」

(13) 高橋昌志 I 型インターフェロン応答
性カタボリック活性の検出によるウシ妊娠
シグナル検出に向けて、国立研究開発法人
農業・食品産業技術総合研究機構主催「牛
の受胎率改善および受胎性評価に関する技
術シーズ研究会」招待講演、2015 年 11
月 17 日 「エポカルつくば(茨城県・つく
ば市)」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：反芻動物の妊娠判定方法
発明者：高橋昌志、國井宏樹、伊藤月乃、川
原 学、唄 花子、鈴木惇文
権利者：北海道大学
種類：特願
番号：2017-163839
出願年月日：2017 年 8 月 29 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.agr.hokudai.ac.jp/anim/breed/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 昌志(TAKAHASHI, Masashi)
北海道大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：10343964