

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15357

研究課題名(和文)低酸素環境における胚と子宮の相互作用の解析

研究課題名(英文)Analysis of fetal-maternal interaction in hypoxic environment

研究代表者

俵 花子 (Bai, Hanako)

北海道大学・農学研究院・助教

研究者番号：60775443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、大気中と子宮内環境の酸素濃度の違いに着目した。計画では、ウシ胚および子宮内膜細胞を用いた低酸素細胞培養系の確立、ウシ胚および子宮内膜細胞の重要候補因子の抽出と解析、妊娠成立に必要な低酸素応答経路の構築を目標とした。ウシ胚および栄養膜細胞CT-1、F3細胞を用いた培養を試みたが、安定して維持継代できなかった。子宮内膜細胞は、通常および低酸素条件での比較を行った。については子宮内膜上皮細胞に絞り、計画より遅れたが低酸素条件でのタンパク質レベルの発現解析に着手し、候補因子の検証を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、通常は大気中と同じ条件で行っている細胞培養実験を子宮内環境を想定した酸素濃度でのを行い、その中で発現変動する候補因子を解析した。まだ精査が必要な段階であるが、これら因子およびその機能の検証により、妊娠成立のための知見が得られることが期待できる。得られる結果は新規知見であるため学術的意義は大きく、現在私たちヒトにおいても不妊は社会的問題となっていることからその社会的意義も大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the difference between oxygen concentration in the atmosphere and in utero environment. The objective of this study are: 1. Establishment of hypoxic cell culture system using bovine embryo and endometrial cells, 2. Identification and analysis of important candidate factors of bovine embryo and endometrial cells, and 3. Construction of hypoxic response pathway(s) necessary for pregnancy establishment. 1. I tried culture using bovine embryo and trophoblast cell CT-1 and F3 cells, but we could not stably maintain. Endometrial cells were compared in normal and hypoxic conditions. With regard to 2, and 3, I focused on only endometrial epithelial cells. Now I examine expression analysis of protein levels under hypoxic conditions and are investigating candidate factors.

研究分野：繁殖学

キーワード：子宮 ウシ 低酸素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国内外において、生殖補助技術および関連研究は目覚ましく発展してきた。それらは、性周期のコントロールや発情の同期化には多大な効果を発揮している。しかし、こうした技術を用いても、妊娠率の向上には至っていない。ウシの人工授精受胎率は現在 50% を下回り、停滞している。これは畜産農家にとって大きな損失である。私たちヒトを含む哺乳類でも、受精卵(胚)の大部分が着床前に死滅してしまう。体外受精や胚移植には、高品質の胚が用いられているにもかかわらず、妊娠率は低い。すなわち、妊娠の成立には、胚の品質だけでなく母体の胚受容能力(妊娠認識力)も重要だといえる。

反芻動物の妊娠成立には、胚・栄養膜細胞からのインターフェロン・タウ(IFNT)産生が必要である。IFNTは母体子宮の受容体を介して働き、黄体を維持することにより妊娠成立に寄与する。また、IFNTは子宮上に多くの遺伝子発現を誘導する。すなわち、反芻動物の妊娠成立には、胚のIFNT産生と子宮の応答が必須である。

申請者は、通常行う細胞培養条件が、子宮内の生理的環境を反映していない点に着目した。妊娠成立時の、胚によるIFNT産生と子宮の応答は低酸素環境で行われている。胚と子宮の相互作用を研究するにあたり、生理的条件に近い環境で実験を行う必要があると考えた。それにより、見落としている重要因子や現象を捉えられるのではないかと考えた。そこで、子宮内の生理的環境に近い条件、すなわち細胞がストレスの少ない条件におかれたときの変化を検証し、妊娠成立機構の解明につながる新規知見を得たいと考え、本申請に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、子宮の生理的環境である低酸素環境において、妊娠成立に至るための胚・栄養膜細胞と子宮細胞の遺伝子発現変化を明らかにし、受胎率向上に結びつく基礎知見を得ることとした。

3. 研究の方法

(1) 胚・栄養膜細胞および子宮内膜細胞の低酸素培養系の確立と評価

食肉処理場より、ウシ卵巣組織および子宮組織を採取する。卵巣から採卵し、体外受精を行う。体外受精胚を約8日間培養し、孵化後の胚を培養皿に接着させ、栄養膜細胞を得る。反芻動物の胚・栄養膜細胞のマーカーとして、反芻動物の妊娠認識シグナルIFNTの発現を確認する。哺乳類共通の栄養膜細胞因子であるCDX2、GATA3発現も確認する。また、ウシ栄養膜細胞CT-1細胞およびF3細胞を併せて用いる。

子宮内膜組織を培養皿に接着させ、周囲に遊走した細胞から上皮細胞を得る。得られた細胞を、通常の細胞培養条件(5% CO₂, O₂ 制御なし, 38.5°C)と低酸素条件(5% CO₂, 5% O₂, 38.5°C)で培養し、遺伝子発現変化を調べる。培地および血清は全て通常培養時(5% FBS, DMEM)と同様に行った。細胞の形態変化を観察するとともに細胞の増殖性を細胞増殖アッセイにより確認する。

(2) 低酸素環境下における網羅的遺伝子発現解析

上記(1)で得られた、通常の細胞培養条件および低酸素培養条件における子宮内膜上皮細胞からタンパク質を回収し、発現変化をプロテオーム解析(LC-MS)により調べる。公開データベースを用いて解析し、低酸素培養により発現上昇する重要因子およびその経路を同定する。今回、プロテオーム解析を行う機会を得られたため、当初の計画において行う予定であったDNAアレイまたはRNA-Seqによる遺伝子発現の網羅的解析については実施していない。

4. 研究成果

(1) ウシ胚および栄養膜細胞CT-1、F3細胞を用いた培養を試みたが、安定して維持継代できなかった。ウシ胚では、哺乳類共通の栄養膜細胞因子であり、IFNTの上流因子であるCDX2、GATA3発現に関しては、数回の継代中もmRNAでの発現が確認できたが、IFNTの発現については維持することができなかった。子宮内膜細胞は、通常の細胞培養条件および低酸素培養条件で培養し、5%の低酸素条件においては形態および増殖性に問題ないことが確かめられたため以降の解析に用いた。予備検討としては、1%の低酸素条件においても検証したが、細胞の状態が安定しなかったため以降の解析には用いていない。

(2) 子宮内膜上皮細胞に絞り、計画より遅れたが低酸素条件でのタンパク質レベルの発現解析に着手した。プロテオームの解析の結果について、DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)等の公開データベースを用いて解析した。子宮内膜上皮細胞において検出された全てのタンパク質は約2500であった。そのうち、通常の培養条件では発現が全く検出されず、低酸素培養条件でのみ発現が確認できたものが約90であった。解析については、定量性はないため、今回は発現の増減ではなく有無にのみ着目した。また、機能のカテゴリーについては、6のカテゴリーに分類された。このうち20個のタンパク質について着目し、現在候補因子として検証を進めている。今後は、これらの候補因子をさらに絞り込み、その発現および機能解析まで行うことができれば子宮側のみであるが、有意義な知見を得られることが期待できる。

(3) その他の成果について：当初設定していた、(1)(2)の計画については遅れが生じたため、温度の負荷による酸化ストレス増加や、より採取しやすい血液細胞を用いたストレス評価を行った。これらについても細胞の酸化状態という観点から派生的に行った実験であるため、成果報告を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件) *筆頭・責任著書分のみ記載

1. **Bai H**, Talukder MAS, Kunii H, Itoh T, Kawahara M, Takahashi M.
Evaluation of the immune status of peripheral blood monocytes from dairy cows during the periparturition period.
J Reprod Dev. 2019. Accepted. 査読有

2. 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; 64: 193-197. 査読有
DOI: 10.1262/jrd.2017-128

3. **唄花子**、川原学、高橋昌志. 反芻動物の妊娠認識と成立機構.
家畜栄養生理研究会報. Vol. 62, No. 1, 2018. (総説) 査読有

〔学会発表〕(計 13 件) *筆頭・責任著書分のみ記載

1. 小松 正明, 鈴木 惇文, 国井 宏樹, 川原 学, 木村 康二, 高橋 昌志, **唄花子**.
ウシ子宮内膜上皮細胞を用いた暑熱負荷培養およびインターフェロン・タウ応答性の検証
第 111 回 日本繁殖生物学会. 信州. 2018.

2. **唄花子**, Shabur Md Abdus Talukder, 国井 宏樹, 伊藤 月乃, 川原 学, 高橋 昌志.
乳牛の分娩前後における末梢血単核球のストレスおよび免疫関連因子の解析
第 111 回 日本繁殖生物学会. 信州. 2018.

3. **唄花子**、川原学、高橋昌志. 反芻動物の妊娠認識と成立機構.
家畜栄養生理研究会. 東京. 2018.

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://lab.agr.hokudai.ac.jp/anim/breed/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。