

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05989

研究課題名(和文) エクソソームを介したウシ子宮内膜と栄養膜の細胞間クロストーク

研究課題名(英文) Exosome-mediated intercellular crosstalk between endometrial cells and trophoblasts in cattle

研究代表者

木崎 景一郎 (Kizaki, Keiichiro)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：40337994

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、ウシの子宮内膜及び栄養膜細胞由来エクソソームに内包されるマイクロRNA(miRNA)に焦点をあて、miRNAによる細胞機能制御の分子機構解明を試みた。その結果、子宮内膜及び栄養膜由来のいくつかの特異的miRNAは妊娠関連糖タンパク質(PAG)や胎盤性ラクトジェン(CSH2) mRNAの3'非翻訳領域や翻訳領域に結合する可能性があること、PAGやCSH2と特異的miRNAの発現動態には逆相関が認められたことから、特異的miRNAは胎盤特異的タンパク質の発現を制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、子宮内膜細胞及び栄養膜細胞が産生するエクソソーム由来のmiRNAが相互の細胞に作用して、着床や胎盤形成時の情報伝達に關与する分子機構が明らかになる。即ち、エクソソームを介した細胞機能制御が着床・胎盤形成を確実にするというものであり、エクソソームを中心にした子宮内膜・栄養膜の細胞間クロストークの解明はウシの着床・胎盤形成機構の解明につながる。これらの結果は、牛の受胎性向上技術開発に資する知見であり、miRNAを利用した着床の促進あるいは避妊を調節する薬剤開発への展開を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated on the microRNA (miRNA) contained in bovine endometrial cells and trophoblasts-derived exosomes, and attempted to elucidate the molecular mechanism of cell function by miRNA. As a result, some specific miRNAs from the endometrial cells and trophoblasts may bind to the 3'-untranslated and translated regions of pregnancy-related glycoprotein (PAG) and placenta lactogen (CSH2) mRNA. Inverse correlation of the expression kinetics was observed between trophoblast-specific mRNA and specific miRNA, suggesting that specific miRNA may regulate the expression of PAG and placenta lactogen protein. These results suggest that miRNA contributes to the interaction between endometrial cells and trophoblasts in implantation and placentation in cattle.

研究分野：獣医学、畜産学、動物生命科学

キーワード：マイクロRNA

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトを含む動物の着床現象の成否は出生率、繁殖効率を左右する重要な機構である。受精後の初期胚の着床において、子宮内膜及び栄養膜細胞の相互作用は必須であり、これらの細胞の調和した分化増殖過程が順調に進行しないと早期胚死滅や流産を引き起こすことになる。しかし、これら子宮内膜細胞と栄養膜細胞間の相互作用を調節する要因は完全には明らかになっていない。胎盤は母体側の子宮内膜細胞と胎児側の栄養膜細胞の相互作用により形成される。子宮内膜細胞は上皮細胞(内腔及び腺)と間質細胞から構成される。一方、ウシの栄養膜細胞は二種類に大別され、単核細胞と二核(あるいは多核)細胞からなる。着床期の単核細胞は反芻動物特有のインターフェロン・タウ(IFNT)を産生、分泌する。IFNTは子宮内膜でのプロスタグランジンの産生制御を介して黄体機能の維持に働くと共に初期胚の着床直前の著しい拡張、伸展をもたらすと推測されている。一方、二核細胞は胎盤性ラクトジェンやプロラクチン関連タンパク質等を産生、着床界面では子宮内膜細胞と融合することが知られ、この二核細胞の形成不全は胎盤形成に異常を来すことが明らかになっている。このように、ウシ胎盤の形成過程には栄養膜二核細胞と子宮内膜細胞の「融合」という直接的な接触があるだけでなく、液性因子等による制御機構も存在するが、その分子機構については完全には明らかにされておらず、従来とは異なる視点の機構解明が必要である。

(2) エクソソームは、多くの細胞で分泌される直径 30 nm~150nm 程度の膜小胞であり、血液・体液中に存在することが知られている。近年、血中エクソソームに内包されるマイクロ RNA(miRNA)の特定分子種は疾患バイオマーカーとして注目を集めており、医療分野、特に癌領域では盛んに研究がなされている。一方、エクソソームには miRNA のみならずさまざまなタンパク質が内包、あるいは膜挿入されていることから、エクソソーム産生細胞から別の細胞への miRNA やタンパク質の運搬によって、細胞の機能的変化を引き起こす細胞間情報伝達機構としての役割を担っている可能性が示唆されている。しかし、子宮内膜及び栄養膜細胞間のエクソソームによる情報伝達について検討はなされているものの、その報告は限られており、特にウシなどの反芻動物における検討はほとんどなされていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、1)ウシ子宮内膜及び栄養膜細胞由来エクソソームに内包される特異的 miRNA を同定すること、2)同定 miRNA 分子による細胞機能制御の分子基盤を明らかにし、3)着床及び胎盤形成における子宮内膜細胞と栄養膜細胞の相互作用を解明することである。

### 3. 研究の方法

申請者の先行研究(科研費研究補助金:挑戦的萌芽研究 15K14838、H27~29)において見出した着床期のウシ栄養膜で高発現している miRNA 分子種を解析対象とした。miRNA の標的遺伝子の予測には、miRNA\_Targets

([http://mamsap.it.deakin.edu.au/~amitkuma/mirna\\_targetsnew/index.html](http://mamsap.it.deakin.edu.au/~amitkuma/mirna_targetsnew/index.html))を用い、miRNA と標的 mRNA の結合部位の解析には、RNAhybrid(<https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>)及び miRmap(<http://mirmap.ezlab.org>)プログラムを使用した。着床期から妊娠後期(妊娠 18-297 日齢)のウシ子宮内膜組織、胎膜及び胎盤から TRIzol 試薬(インビトロジェン社)を用いて総 RNA を抽出した。遺伝子発現測定用の cDNA は High Capacity cDNA 合成キット(アプライド社)を用いて調製した。PCR 反応は、Power SYBR 試薬(アプライド社)を用いて ABI PRISM 7300 リアルタイム PCR システム(アプライド社)により実施した。各遺伝子の定量は、組織由来 cDNA から遺伝子クローニングした標準プラスミドを使用して算出した。miRNA 測定用の cDNA は Mir-X miRNA First-Strand Synthesis キット(クオンテック社)を用いて合成し、KOD SYBR qPCR Mix(東洋紡社)を使用したリアルタイム PCR にて測定した。なお、定量の際には各 miRNA の塩基配列に対応するオリゴ DNA を合成して標準曲線を作成した。miRNA の機能解析については、栄養膜特異的タンパク質を発現するウシ培養栄養膜細胞系 BT-C 細胞、あるいは標的遺伝子を強制発現させた HEK293T 細胞へエレクトロポレーション法(Gene Pulser MXcell, Bio-Rad)あるいは Lipofectamine 3000(Invitrogen)を使用して合成 miRNA mimic を導入した。導入後の細胞からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロットを用いて胎盤特異的タンパク質を検出した。

### 4. 研究成果

(1) miRNA\_Targets 及び RNAhybrid を用いて、miR-2328-3p をはじめとした子宮内膜及び栄養膜特異的 miRNA の標的遺伝子の抽出及び in silico 解析を行った。miRNA\_Targets を用いた in silico 解析による標的遺伝子の探索では、妊娠関連糖タンパク質(PAG)ファミリー等を含む胎盤特異的遺伝子が miR-2328-3p の標的遺伝子として検出された。また、RNAhybrid による結合部位の特定では、miR-2328-3p が PAG1 mRNA の 3' 非翻訳領域に結合する可能性が

示された。ウシ子宮内膜・胎盤組織中の miR-2328-3p 及び PAG1 の発現動態を調べたところ、miR-2328-3p は着床期から妊娠後期にかけて、胎子組織側での発現が減少した。一方、PAG1 では発現が増加する傾向がみられ、負の相関関係を示したことから、miR-2328-3p が PAG1 mRNA に結合することによって、PAG1 タンパク質の発現を調節している可能性が示唆された。一方、さらに解析を進めたところ miR-2305 は PAG1 mRNA の翻訳領域に結合する可能性が示された。PAG1 を発現するウシ栄養膜細胞系 BT-C 細胞に合成 miRNA 配列を導入し、PAG タンパク質の産生に及ぼす影響を検討しようとしたが、BT-C 細胞への遺伝子導入により細胞が死滅したため、合成 miRNA の効果を判定することができなかった。そこで、PAG1 を強制発現させたヒト胎児腎細胞 293 (HEK293T) に合成 miR-2305 mimic を導入し、PAG1 発現への影響を検討した。導入した miR-2305 mimic 量を定量したところ、mimic 導入群において miR-2305 含有量は有意に高値を示したことから、miRNA 導入は確認された。しかし、PAG1 タンパク質量を調べたところ、mimic 導入群と非導入群間で差は認められなかった。強制発現ベクターを用いた実験系ではプロモーター活性が高く導入遺伝子の転写活性が強いため、miRNA の効果を検出できなかった可能性が考えられる。

(2) PAG2 及び胎盤性ラクトジェン (CSH2) についても、PAG1 と同様に発現動態を調べ、miR-2328-3p 及び miR-2305 と比較した。ウシ子宮内膜・胎盤組織中の PAG2 及び CSH2 の発現動態は、miR-2328-3p 及び miR-2305 とは対照的に妊娠に伴い発現が増加する傾向がみられ、有意な負の相関が認められたことから、両 miRNA が PAG2 及び CSH2 mRNA に結合することによって、各タンパク質の発現を調節している可能性が示唆された。miRNA\_Targets 及び RNAhybrid を用いた in silico 解析により、これら miRNA の結合部位について詳細に調べたところ、miR-2328-3p 及び miR-2305 は PAG2 mRNA の翻訳領域に結合する可能性が示された。栄養膜細胞株 BT-C への遺伝子導入の改善を図ることができなかったため、HEK293T 細胞に PAG2 cDNA 全長の塩基配列を挿入した発現ベクターと miR-2305 mimic あるいは Scramble miRNA を共に導入した。bta-miR-2305 の細胞内含有量は、mimic を導入したもので有意に高値を示した。ウエスタンブロッティング法を用いて、PAG2 タンパク質の発現量の測定を行ったところ、mimic 導入時の発現量はその他のものと比較して、有意な発現量の差はみられなかった。同様にして、miR-2328-3p mimic あるいは Scramble miRNA を共に導入したところ、miR-2328-3p の発現量は mimic を導入したもので有意に高値を示した。しかし、PAG2 タンパク質の mimic 導入時の発現量は低下することではなく、むしろ高値を示した。一方、これら栄養膜特異的 miRNA の発現分布を定量的リアルタイム PCR を用いて調べたところ、miR-2305 及び miR-2328-3p の発現量は各種組織の間で大きな差はみられなかったことから、栄養膜特異的 miRNA として抽出した miR-2328-3p 及び miR-2305 は、子宮及び胎盤においてのみ高発現しているわけではなかった。

(3) 培養栄養膜細胞への合成 miRNA mimic 導入条件等の改良を進めていたが、最終的に効率よく合成 miRNA mimic を導入するところまで至らなかった。原因としては、導入手法というよりは使用する培養栄養膜細胞の継代数の影響が大きいようであり、より継代数が少ない細胞系を使用することにより導入が可能であることが考えられた。一方、これまでに PAG ファミリーや CSH2 などのウシ栄養膜細胞特異的遺伝子の発現を調節すると考えられた miR-2328-3p 及び miR-2305 以外の栄養膜特異的 miRNA について検討を加えたところ、新たな miRNA を見出した。各妊娠日齢の子宮内膜・胎盤組織中の miR-671、miR-1777b 及び miR-2881 の発現動態は栄養膜特異的 miRNA の発現動態と有意な負の相関が認められたこと、さらに in silico 解析により PAG1、PAG2 及び CSH2 遺伝子の翻訳領域にこれらの miRNA の結合部位が存在することから、miR-671、miR-1777b 及び miR-2881 が栄養膜特異的遺伝子の mRNA に結合することによって、各タンパク質の発現を調節している可能性が示唆された。また、miR-671、miR-1777b 及び miR-2881 の全身諸臓器における発現分布を定量的リアルタイム PCR で調べたところ、miR-1777b 及び miR-2881 の発現量は各種組織の間で大きな差はみられなかったが、miR-671 は胎盤と妊娠子宮内膜に特異的に発現していることが明らかになった。miR-671 は妊娠時の母体生殖器に特異的に発現し、栄養膜と子宮内膜の細胞間相互作用に関与している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 K. Ono, S. Okamoto, C. Ninomiya, N. Toji, T. Kanazawa, T. Ishiguro-Oonuma, T. Takahashi, K. Iga, K. Kizaki	4. 巻 79
2. 論文標題 Analysis of circulating microRNA during early gestation in Japanese black cattle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Domestic Animal Endocrinology	6. 最初と最後の頁 106706
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.domaniend.2021.106706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本さくら、小野歌純、與座明祥、田路矩之、石黒（大沼）俊名、伊賀浩輔、木崎景一郎
2. 発表標題 妊娠ウシ血中マイクロRNAの網羅的解析
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木崎景一郎、岡本さくら、石黒（大沼）俊名、高橋透、伊賀浩輔
2. 発表標題 妊娠ウシ血中のマイクロRNA定量に関する基礎的検討
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中津祥也、與座明祥、石黒（大沼）俊名、高橋透、木崎景一郎
2. 発表標題 miR-2328-3pのウシ子宮内膜・胎盤における標的遺伝子の探索
3. 学会等名 日本畜産学会第125回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中津祥也, 與座明祥, 石黒(大沼)俊名, 高橋 透, 木崎景一郎
2. 発表標題 ウシ妊娠子宮内膜および胎盤で発現するマイクロRNAの特性
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二宮千秋, 木崎景一郎, 石黒(大沼)俊名, 金澤朋美, 高橋 透, 伊賀浩輔
2. 発表標題 妊娠ウシ血中のマイクロRNA定量に関する基礎的検討II
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊佳和子, 石黒(大沼)俊名, 金澤朋美, 高橋 透, 伊賀浩輔, 木崎景一郎
2. 発表標題 ウシPLAC1の発現分布
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	高橋 透  (Takahashi Toru)  (20355738)	岩手大学・農学部・教授    (11201)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	伊賀 浩輔  (Kosuke Iga)  (00343963)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター・上級研究員    (82111)	
連携研究者	石黒（大沼） 俊名  (Ishiguro-Oonuma Toshina)  (60452695)	岩手大学・農学部・准教授    (11201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関