

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03111

研究課題名（和文）ウシの妊娠における着床成立時の子宮内環境の解明

研究課題名（英文）Intrauterine environment during implantation in bovine pregnancy.

研究代表者

櫻井 敏博（Sakurai, Toshihiro）

奥羽大学・薬学部・准教授

研究者番号：70568253

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：不受胎牛の子宮内環境の何が受胎できたウシの子宮内環境と異なるかを明らかにするためには、時間・空間的に解析する必要がある。そこで、申請者が樹立した生体外着床モデルを用い、着床成立に寄与する因子を時間・空間的に解析し、同定することが着床成立時の子宮内環境を明らかにすることと考え、検討を行った。改良を行った生体外着床モデルを用いて、着床に關与する細胞がマトリックスであるVersicanを見出した。また、着床過程において子宮間質に集積した免疫細胞から分泌されるIL-6が、胚の伸長に寄与していることが分かった。さらに雌牛の妊娠22日目の血清中SNX5の高発現が、胚損失マーカーとなりうることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分娩間隔の長期化や繁殖成績の低下により、本邦における子牛の生産が減少している。また、現在ウシの繁殖は、凍結精液を子宮内に投与する人工授精によって成り立っているがその受胎率は年々減少している。家畜の生産性の向上は喫緊の課題でありながらも、着床が成立するための子宮内環境・条件を明らかにする研究は世界的に不足している。生体外着床モデルを用いた検討は、着床成立に寄与する因子を時間・空間的に解析し、同定できることが示され、この分野の発展に欠かせないツールであることを証明した。今後、このツールを利用し、着床に寄与する因子群の同定を行っていく。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify what is different in the intrauterine environment of inseminated cows from that of fertile cows, it is necessary to spatiotemporal analyze the intrauterine environment. Using the in vitro implantation model, we, therefore, identified the factors contributing to implantation to clarify the intrauterine environment. We found Versican, which is an extracellular matrix involved in implantation. We also found IL-6 present in the uterine flushing, that is a cytokine contributes to conceptus elongation. We also found that high expression of SNX5 in serum of ewes on day 22 of gestation could be a marker of embryo loss. It was predicted that the concentration gradient of some cytokine is formed by Versican during the bovine implantation process, thereby contributing to the selective accumulation of immune cells in utero and embryo elongation.

研究分野：繁殖学

キーワード：ウシ 子宮 着床 生体外モデル

1. 研究開始当初の背景

大家畜経営者の高齢化や飼料の高騰、離農による生産基盤の縮小が懸念される中、分娩間隔の長期化や繁殖成績の低下により、本邦における子牛の生産が減少している。また、現在ウシの繁殖は、凍結精液を子宮内に投与する人工授精によって成り立っている。その受胎率は年々減少しており、現在は50%あるいはそれを下回ってきており、特に乳牛では低い受胎率になっている。現在の受胎率を60%程度に回復させることができれば、不受胎によって生じる経済的損失を軽減できる。

ウシにおいて受精から妊娠42日の間は、初期胚発生や受精胚と母体間の対話、着床(妊娠20日)初期胎盤形成期に相当する。この期間に半数以上の胚が死滅し、多くの初期胚が子宮内膜への着床期に妊娠を継続できていない。ウシの人工授精および体外受精・胚移植における妊娠30日目の胎子生存率は大差なく、どちらも50%程度である。もし胚側の不受胎要因が初期の発生過程における胚死滅であるならば、優良な受精胚を作出し、子宮内へ移植することによって胎子生存率は人工授精よりも上がるはずである。しかし胎子生存率に大差がないということは、どんなに優良な胚を作出しても子宮内へ移植するために、胚の生存および受胎の成否は子宮内環境に大きく依存していると類推できる。つまり、人工授精にせよ体外受精・胚移植にせよ、着床成立時の子宮内環境・条件を明らかにすることが不妊の原因解明や克服につながると期待できる。

大家畜の生産性の向上は喫緊の課題でありながらも、着床が成立するための子宮内環境・条件を明らかにする研究は世界的に不足している。申請者や海外の研究者らによって、着床周辺期のウシ胚や子宮内膜組織のトランスクリプトーム解析を行ってはいるものの、これらの解析からでは不受胎要因を明らかにすることは未だにできていない。不受胎牛の子宮内環境の何が受胎できたウシの子宮内環境と異なるかを明らかにするためには、時間・空間的に解析する必要がある。そこで、申請者が樹立した生体外着床モデルを用い、着床成立に寄与する因子を時間・空間的に解析し、同定することが着床成立時の子宮内環境を明らかにすることと考えた。

2. 研究の目的

申請者が樹立した着床過程を再現する生体外着床モデルは、ウシ子宮上皮細胞の単層培養上に胚の構成細胞であるウシ栄養膜細胞株(CT-1細胞)を播種し、さらに着床時(妊娠20日)の子宮灌流液を添加する。子宮灌流液の添加は、着床時の胚と母体間の擬似的な対話を可能にし、生体内において着床成立後の栄養膜細胞におけるインターフェロン・タウ(IFNT)の発現低下を生体外着床モデルにおいても再現することができた。子宮灌流液非添加では、栄養膜細胞が子宮上皮細胞に接着しようとも栄養膜細胞におけるIFNTの発現低下は見られない。つまり、子宮灌流液中のいずれかの因子(群)が、胚と子宮上皮細胞との正規の細胞接着を可能にしたと考えられる。そのため、子宮灌流液中のどの因子が着床を可能にしたのかを同定できれば、妊娠補助剤として確立できると考え、子宮灌流液の解析を行った。また、初期胚の損失は、胚と子宮内膜間の対話不足が主な原因である。この対話を制御する因子(群)が同定できれば、早期妊娠時における損失の分子機構がよりよく理解できる。そこで、胚損失した雌ウシを検出できるマーカーとなる候補分子を同定することも目的とした。

さらに、申請者は、胚移植の3日前(0日目=発情日)に末梢血単核球(PBMC)を子宮内に投与することによって受胎率が改善できることを確認しているが、生産現場でこの技術を導入するには、新たな装置の購入や操作手順の煩雑性から難しい。そこで、PBMC子宮内投与による子宮内環境改善機序を明らかにし、生産現場で容易に利用できる受胎率向上技術として新たに確立することを目指す。

3. 研究の方法

ウシ子宮内膜上皮および間質細胞の不活化および三次元培養法の確立

ウシ子宮内膜上皮細胞および子宮間質細胞に不活化ベクター(HPV-16 E6/E7、hTERT)を導入し、スクリーニングを行い、不活化細胞の樹立を試みた。樹立した子宮間質不活化細胞をマトリゲルで包埋(1mm³)し、培養した。その子宮間質細胞を包埋したマトリゲルの周囲に子宮上皮不活化細胞を播種した。これを栄養膜細胞株との共培養に用いた。また別法として、Transwellを用い、マトリゲルをコーティングしたインサートチャンパー内に子宮上皮細胞を、下部のウェルに子宮間質細胞を播種した。これを栄養膜細胞株との共培養に用いた。

新規ウシ生体外着床モデルの樹立

申請者が樹立した着床生体外モデルは、単層培養した子宮上皮細胞上に低接着プレートでスフェロイド化させた栄養膜細胞株を播種し、さらに着床期の子宮灌流液を添加するという方法であった。これをより生体に近い条件とするために上記の子宮細胞の三次元培養を行い、新たな生体外着床モデルとして樹立を試みた。三次元培養を行った子宮を模した細胞塊とウシ栄養膜

細胞株（スフェロイド）を低接着の96穴プレート上で共培養を行った。同様にTranswellを用いた共培養も行った。in vivoでの着床時（妊娠20日、0日目＝発情日）におけるウシ胚ならびに子宮組織での遺伝子発現変化とin vitroでの着床を再現する生体外着床モデルにおける子宮上皮細胞ならびに栄養膜細胞株での遺伝子発現変化を比較し、生体外着床モデルがどれほどin vivoの着床を再現できているかを比較検討した。さらに、子宮灌流液中のエクソソーム内にmiRNAの存在を確認できていることから、ウシ着床期胚（妊娠17日（着床前）および20日（着床日））のmiRNAをカスタムしたマイクロアレイにより網羅的解析を行い、子宮灌流液中のエクソソーム内のmiRNAが胚あるいは子宮組織のどちらの由来かを同定した。

ウシの着床にかかわるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンパーシカン（Versican）の同定

Versicanは、細胞接着や浸潤に関わる細胞外マトリックスを構成する重要な分子であるが、着床に関する研究は殆どない。そこで、着床期のウシ胚でのRNA-seq法による網羅的解析からVersicanの発現が確認できたため、ウシ胚ならびに子宮内膜組織でのVersican isoformをRT-PCR法により確認した。また、着床時の発現を組織切片ならびにTranswellを用いた生体外着床モデルにおいて検討した。

PBMCが分泌する因子の解析

着床の場である子宮内膜組織では、子宮内膜細胞や免疫細胞などがサイトカインを分泌し、栄養膜細胞の細胞増殖に関与している。実際、胚移植3日前のPBMCの子宮内投与により胚の伸長が促進されることを確認しているが、そのメカニズムについては明らかにしていない。PBMCが分泌する因子のいずれが、胚の伸長を促進させたのかを検討した。非妊娠牛からPBMCを単離し、FBS添加あるいはFBS添加無しの培地で24時間培養した後、Total RNAを抽出した。これらのTotal RNAを用いて、RNA-seq法による網羅的解析を行った。この解析で得られた因子の組換えタンパク質を栄養膜細胞に処置し、胚の伸長に寄与する因子を同定した。

胚損失雌ウシ検出マーカーの同定

発情後7日（0日目＝発情日）に胚移植を行った未経産牛から17日、20日および22日に末梢血を採取し、メタボロームおよびグローバルプロテオーム解析法であるiTRAQ解析を行い、妊娠の判定に用いることのできる因子の探索を行った。メタボローム解析では、17日、20日および22日の血清成分の一部を妊娠の成否の判断に用いた。iTRAQ解析では、20日および22日の血清タンパク質を分離・解析し、上位25個のタンパク質を用いたヒートマップ解析により、20日および22日に妊娠・非妊娠の判断に用いた。

4. 研究成果

ウシ子宮内膜上皮および間質細胞の不死化および三次元培養法の確立

新規ウシin vitro着床モデルの樹立

子宮間質細胞を包埋したマトリゲルの周囲に子宮上皮細胞を播種した子宮様塊を用いた共培養およびTranswellを用いた共培養において、従来の共培養との比較および生体サンプルのRNA-seqデータとの比較を行ったところ、Transwellを用いた共培養が従来の方法に比べてより生体に近い、遺伝子発現変化が見られた。そこで、Transwellを用いた共培養を新規の生体外着床モデルとした。Transwellを用いた共培養系の利点は、インサートチャンバーのメンブレンを切り離し、OCTコンパウンドで包埋することによって、着床した部位の横断面を観察できることにある。つまり、着床部位の断面を免疫染色法などによって評価できるという利点がある。In vivo胚と共培養に供した栄養膜細胞との遺伝子発現変化の比較検討により生体外着床モデルは、in vivoでの遺伝子発現変化を限り無く忠実に再現できていた。このことは、生体外着床モデルにおいて添加する着床時の子宮灌流液中に存在する分泌因子およびエクソソームによって、着床が制御されていること、また、胚と子宮上皮細胞の物理的な接触刺激によって着床に向けた遺伝子発現が誘導されていることを示唆した。ウシ着床期胚（妊娠17日（着床前）および20日（着床日））に発現するmiRNAをカスタムマイクロアレイにより網羅的解析を行ったところ、妊娠17日に比べ妊娠20日に発現が増加したmiRNAを73、減少したmiRNAを66見出した。続いて子宮灌流液中のエクソソーム内のmiRNAが胚あるいは子宮組織のどちらの由来かを同定した。同定したmiRNAに関しては、論文投稿準備段階にあるので詳細は省略する。

ウシの着床にかかわるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンパーシカン（Versican）の同定

ウシ着床期の子宮組織に発現するVersicanの4つのisoform（V0、V1、V2、V3）をRT-PCRにより確認したところ、V0とV2の強い発現が確認できた。局在を免疫染色法により確認したところ、非妊娠期子宮では子宮上皮細胞の基底膜および深部の子宮内膜腺（endometrial glands）に存在していた。これはヒアルロン酸結合タンパク質（HABP）の局在と一致していた。妊娠期子宮では、妊娠の初期（妊娠5日）に発現が高く、着床期（妊娠17日）に近づくにつれて、発現が低下していくことがRT-PCR法および免疫染色法により確認できた。妊娠初期（妊娠5日）でのVersicanの発現部位は、子宮管腔から遠い深部の子宮内膜腺に局限していた。また着床期（妊娠20日）では栄養膜細胞と子宮間質に集積してきている免疫細胞に発現が認められた。ま

た、着床周辺期（妊娠 17 日、20 日および 22 日）の胚でも検討したところ、妊娠 22 日（着床後）の胚に V0 と V2 の強い発現が認められた。また、Transwell を用いた生体外着床モデルにおいても同様に、着床している栄養膜細胞に発現が認められた。Versican が、そのコンドロイチン硫酸鎖を介して、L-selectin や CD44 といった白血球の輸送に関与する白血球接着分子と相互作用することが報告されている。Versican はその豊富なコンドロイチン硫酸側鎖を持ち、ケモカインと Versican が共局在する子宮組織において、特定のケモカインと相互作用して、haptotactic なケモカインの濃度勾配の形成を助けているのではないかと考えている。この濃度勾配によって、着床期に集積する免疫細胞の遊走を選択的に制御することにより、着床成立に向けた子宮内膜のリモデリングが行われるのではないかと推測している。

PBMC が分泌する因子の解析

着床期の子宮灌流液の添加によって、生体外着床モデルは成立する。つまり、子宮灌流液中の因子（群）が着床に関与している。そこで着床期の子宮灌流液中の網羅的解析を行い、着床期に子宮内に分泌された約 8,000 のタンパク質を見出した。これらの因子群の中から着床成立に必須の最低限の因子群を絞り込む必要がある。また、胚移植の 3 日前に自己の PBMC を子宮内に投与することによって受胎率が向上することから、PBMC が子宮内環境をリモデリングし、着床に影響を与えていると考えられる。そこで、RNA-seq を用いて FBS 添加・非添加で 1 日培養した PBMC の網羅的解析を行い、子宮灌流液中の因子との照合を行った。その結果、様々なサイトカインが一致していることが確認できた。中でも IL-6 が栄養膜細胞の増殖を促進していることが明らかとなった。これは、PBMC の子宮内投与によって胚の伸長がみられた *in vivo* での結果と一致しており、IL-6 が胚の伸長に対して主要な因子であることが分かった。今後、IL-6 を分泌している免疫細胞の同定と、子宮灌流液中の因子と一致したサイトカインについて着床にどのように関与するのか検討していく。

胚損失雌ウシ検出マーカーの同定

発情後 7 日（0 日目 = 発情日）に胚移植を行った未経産牛の妊娠 17 日、20 日および 22 日の末梢血のメタボロームおよびグローバルプロテオーム解析法である iTRAQ 解析を行った。それらの解析データを用いた ROC 解析により、未経産牛の非妊娠を検出する 5 つの候補タンパク質を同定し、そのうち 22 日目の血清中の SNX5 が最も高い曲線下面積（AUC）を有していた（0.983）。また、ウェスタンブロッティング法により、未経産牛の非妊娠 22 日目の血清から SNX5 の高発現が認められた。この結果は、胚移植を行った未経産牛の妊娠 22 日目の血清中に SNX5 が高濃度で検出されることが、早期の胚損失を予測できることを見出した。

以上のように、着床過程において免疫細胞は能動的な役割を果たし、分泌するサイトカインによって、胚の伸長を促進させること、プロテオグリカンである Versican によってサイトカインの濃度勾配が形成され、それにより免疫細胞の選択的な集積や胚の子宮上皮細胞へ遊走に関与していることが予想された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 8件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murata Hirona, Kunii Hiroki, Kusama Kazuya, Sakurai Toshihiro, Bai Hanako, Kawahara Manabu, Takahashi Masashi	4. 巻 105
2. 論文標題 Heat stress induces oxidative stress and activates the KEAP1-NFE2L2-ARE pathway in bovine endometrial epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 1114～1125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioab143	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 該当する

1. 著者名 Kusama Kazuya, Bai Rulan, Matsuno Yuta, Ideta Atsushi, Sakurai Toshihiro, Nagaoka Kentaro, Hori Masatoshi, Imakawa Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Characterization of Serum Metabolome and Proteome Profiles Identifies SNX5 Specific for Pregnancy Failure in Holstein Heifers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 309～309
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/life12020309	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kazuya Kusama, Rulan Bai, Yuta Matsuno, Atsushi Ideta, Toshihiro Sakurai, Kentaro Nagaoka, Masatoshi Hori, Kazuhiko Imakawa
2. 発表標題 Identification of novel candidate factor SNX5 specific for pregnancy failure in Holstein heifers
3. 学会等名 Reproductive and urinary physiology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshihiro Sakurai, Jyunpei Abe, Rina Fukaya
2. 発表標題 Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced cell proliferation in the first trimester trophoblast cell line by cinnamon extract
3. 学会等名 Placenta
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
研究 分担者	草間 和哉 (Kusama Kazuya) (30579149)	東京薬科大学・薬学部・助教 (32659)	
研究 分担者	唄 花子 (Bai Hanako) (60775443)	北海道大学・農学研究院・助教 (10101)	

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
---------	---------