

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15644

研究課題名（和文）子宮内における新規インターフェロン誘導性因子の同定と機能解析

研究課題名（英文）Identification and analysis of interferon stimulated genes in the uterus

研究代表者

唄 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）：本申請課題研究では、妊娠率の向上に向けて、受精卵（胚）と母体子宮の相互作用を明らかにするための基礎知見を得ることを目的とした。哺乳動物の妊娠成立に必要な共通項としてインターフェロン誘導性遺伝子（ISGs）に着目し、機能解析を行った。R2年度は、ウシの子宮内膜細胞へのIFNT感作実験を行い、タンパク質レベルで子宮内膜細胞に発現が誘導される新規ISGsを明らかにした。R3年度は、同定した子宮細胞におけるISGs候補の機能解析に取り組んだ。当初からの変更はあったものの、現在解析中のISGs候補は今後も検証を続けていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インターフェロン・タウは反芻動物に特異的な妊娠認識物質であるが、妊娠成立時のI型インターフェロンおよびインターフェロン誘導性遺伝子（ISGs）の発現はヒトやマウスを含む哺乳動物に広く共通している。本研究で新たに着目したISG候補も、過去の知見からヒトでの発現が確認されているため、今後もさらに機能解析を進めることにより、将来的に家畜生産からヒトの生殖医療にも広く貢献できる可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to obtain the basic knowledge to elucidate the interaction between the embryo and the maternal uterus in order to improve the pregnancy rate. First, treatment of IFNT were conducted on bovine endometrial cells to identify novel ISGs whose expression is induced in endometrial cells at the protein level. Then, functional analysis of ISGs candidates in uterine endometrial cells was performed. Although there have been some changes from the original plan, the ISGs candidates currently under analysis will continue to be validated.

研究分野：妊娠、着床

キーワード：ウシ 子宮 インターフェロン誘導性遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

### ウシの妊娠成立とインターフェロン・タウ

日本のウシの人工授精による受胎率は 50%程度と低調であり、ヒトの生殖医療の受胎率は約 25%とさらに低い。この妊娠初期における不受胎は哺乳動物に共通しており、解決すべき課題である。生殖医療の現場では、高品質の胚を移植に用いているにも関わらず、妊娠率が低いことから、妊娠が成立するためには胚だけでなく、母体の「子宮内環境」が極めて重要であること示唆している。

ウシを含む反芻動物の妊娠には、着床前の胚が分泌するインターフェロン・タウ (IFNT) が必要である。IFNT は、妊娠に必要なプロゲステロンを産生する黄体機能を維持することにより、妊娠の成立に寄与する。IFNT は、胚が透明帯から脱出してから着床時にかけて子宮内に大量に分泌されるが、胚が子宮に接着を始めると速やかに低下する。このような特徴的な発現動態と、黄体の維持物質として発見されたことから、反芻動物の妊娠成立を担う因子として、発現制御機構の解明を目指した研究が盛んに行われてきた。これまでの研究により、IFNT 遺伝子発現制御に関与する因子も多く明らかになってきたが、IFNT の発現制御だけでは受胎率の向上にはつなげていないのが現状である。

### インターフェロンによる ISG 誘導

IFNT は、黄体を維持するとともに、子宮内膜細胞において多くのインターフェロン誘導性因子 (ISG) の発現を誘導することにより、子宮内環境を整えられている。通常、ISG は細胞にウイルスが感染するとインターフェロンにより誘導されて、細胞防御の役割を担う。一方で、ウシの着床期の子宮では、ウイルス感染とは関係なく、胚からの IFNT により ISG が誘導される。IFNT は反芻動物に特異的な遺伝子であるが、哺乳動物は共通して着床期にインターフェロンおよびその下流の ISG を発現している。すなわち哺乳動物は、それぞれ着床の様式も遺伝子発現も大きく異なるが、種に特有の機構を用いて ISG を発現させる意義があるはずである。本研究では、インターフェロンにより誘導される ISG 発現が妊娠成立に必須の役割を担っているのではないかと仮説を立てた。現在、インターフェロンの作用は、マイクロアレイや RNA シーケンスにより遺伝子発現を網羅的に解析する手法が主流となっている。しかし、ISG は単にインターフェロン感作のマーカーとして用いられているだけで、個々の ISG の機能について詳細な解析はほとんど行われていない。そのため、ISG の生理機能を調べる必要があると考えた。

### 免疫細胞による ISG 分泌

着床期の子宮内において、インターフェロンによる感作を受けるのは、子宮内膜細胞だけではない。着床期の子宮内では、免疫細胞の集積が報告されている。ヒトやウシにおいて、免疫細胞である末梢血単核球 (PBMC) を培養後、子宮内に移植することにより、受胎率が向上したという報告もある。これは、免疫細胞が妊娠の成立に積極的に関与していることを示唆しているが、その機構については不明である。子宮内に存在する免疫細胞も、インターフェロンによる感作を受けて ISG を発現すると考えられる。ISG 発現は、子宮や免疫細胞を含む様々な組織でみられることから、全身性の応答が示唆される。この応答では、全身を巡ることが可能である免疫細胞が役割を担うと考えられる。そのため、母体子宮内でインターフェロンに感作を受ける免疫細胞についても検証する必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

上記の背景より、哺乳類の妊娠成立過程において、明らかにされていない子宮側の要因として、ISG の機能に着目した。そこで本研究では、インターフェロン発現に続く、子宮細胞および免疫細胞における ISG の機能を明らかにすることにより、妊娠成立機構の解明につながる知見を獲得することを当初の研究の目的としていた。

## 3. 研究の方法

### (1) ISG 候補遺伝子の選定

これまでに ISG の発現は、マイクロアレイや RNA シーケンスによる遺伝子発現の網羅的発現解析が中心に行われていた。そこで、IFNT を処置したウシ子宮内膜上皮細胞のプロテオーム解析 (LC-MS) から、タンパク質レベルで発現が変化する新規 ISG 候補を調べた。由来個体の異なる子宮組織から採取した子宮内膜上皮細胞を用いて 4 回の実験を行い、処置濃度および処置時間は、当研究室の過去の知見および予備検討から 500IU、12 時間に設定した。またプロテオーム解析結果から得られた候補 ISG の遺伝子発現をリアルタイム PCR により確認した。

## ( 2 ) ISG 候補遺伝子の発現の検証

( 1 ) の ISG 候補遺伝子の選定について、( 1 ) では培養子宮内膜上皮細胞を用いて IFNT 処置および候補遺伝子の選定を行ったため、実際のウシ子宮内膜組織における遺伝子およびタンパク質発現をリアルタイム PCR および免疫染色により調べた。

## ( 3 ) 子宮細胞における ISG の機能解析

ISG の機能解析はほとんど行われていない。そこで、子宮内膜細胞における ISG の作用を発現増加系を用いて検証した。( 1 ) の子宮内膜上皮細胞のプロテオーム解析から見出した新規 ISG 候補の全長を組み込んだ発現ベクター ( pcDNA-ISGs ) を作製して、ウシ子宮内膜上皮細胞に導入し、発現増加を行った。また、リコンビナントタンパク質を用いてウシ子宮内膜上皮細胞への添加実験を行った。

## ( 4 ) 当初計画からの変更点について

( 3 ) の子宮細胞における ISG の機能解析では、当初 siRNA を用いた発現抑制も行う予定であったが、発現増加系の実験を主に行ったため発現抑制については今後行う予定である。

候補 ISG について、免疫細胞への作用を検証したが、血液を採取する個体ごとのばらつきが大きかったため検証を進めていない。代わりに各種生殖関連細胞への作用の検証に着手することとした。IFNT により、細胞の増殖性の向上を示唆する結果を得ているが、これについては検証中である。

## 4 . 研究成果

### ( 1 ) ISG 候補遺伝子の選定

IFNT を処置したウシ子宮内膜上皮細胞のプロテオーム解析から、タンパク質レベルで発現が変化する新規 ISG 候補を調べた。全ての発現タンパク質のうち、4 反復の実験のうち、3 回以上 IFNT 処置区のみで発現が増加したものに注目した。この中には IFIT, OAS といった、インターフェロンにより発現が誘導されることがよく知られている遺伝子が含まれていたことから、解析結果の妥当性が裏付けられた。また新規 ISG として、ESM, NDRG, NSD, P4HA が含まれていた。これらの結果は遺伝子発現をリアルタイム PCR によっても確認した。

### ( 2 ) ISG 候補遺伝子の発現の検証

ウシ子宮内膜組織における遺伝子およびタンパク質発現をリアルタイム PCR および免疫染色により調べた。卵巣初見から、性周期の卵胞期、黄体期 ( 前期、中期、後期 ) と分けて子宮組織を採取し、周期ごとの発現変化を調べた。今回の調べた ISG では、周期に伴う有意な変化はみられなかった。そのため、今後実験に用いる子宮組織のステージについても区別することなく任意のものを用いることとした。また、子宮内膜組織の子宮小丘および小丘間由来細胞においても、組織間での発現に差はみられなかった。

新規 ISG について、子宮内膜組織切片を作製してのタンパク質の発現を調べた。このうち ESM の発現は上皮細胞および間質細胞の両方でみとめられ、子宮小丘および小丘間由来細胞についても同様にみとめられた。発情ステージにおける差はみとめられなかった。NDRG, NSD, P4HA については、適切な抗体がなく検証できなかったため、今後検証する必要がある。また今回は安定して入手できるウシ非妊娠子宮を用いて検証を行ったが、今後は妊娠子宮組織を用いた検証が必要である。

### ( 3 ) 子宮細胞における ISG の機能解析

新規 ISG 候補とした ESM, NDRG, NSD, P4HA の発現ベクター ( pcDNA-ISGs ) を作製して、ウシ子宮内膜上皮細胞に導入し、発現増加実験を試みた。子宮内膜上皮細胞への遺伝子導入効率が悪かったため、子宮内膜間質細胞や、生殖系細胞を用いても検証を行っている。また、リコンビナントタンパク質を用いて子宮内膜上皮細胞への添加実験を行っている。これらについても検証中であるが継続して行う。

以上の結果より、IFNT により誘導されるいくつかの新規 ISG を見出すことができた。しかしその発現および機能については十分に解析ができていないため、今後さらなる解析が必要であり、今後も継続して取り組んでいく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Bai Hanako, Hiura Hitoshi, Obara Yoshiaki, Kawahara Manabu, Takahashi Masashi.	4. 巻 103
2. 論文標題 Short communication: Menaquinone-4 (vitamin K2) induces proliferation responses in bovine peripheral blood mononuclear cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dairy Science	6. 最初と最後の頁 7531 ~ 7534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3168/jds.2019-17987	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 -

1. 著者名 Bai Hanako, Ukita Haruka, Kawahara Manabu, Mitani Tomohiro, Furukawa Eri, Yanagawa Yojiro, Yabuuchi Naoto, Kim Heejin, Takahashi Masashi	4. 巻 91
2. 論文標題 Effect of summer heat stress on gene expression in bovine uterine endometrial tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13474	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 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 -

1. 著者名 Bai Hanako, Arai Hikoji, Ikuta Kentarou, Ishikawa Sho, Ohtani Yoshihisa, Iwashita Kunihiro, Okada Nao, Shirakawa Hitoshi, Komai Michio, Terada Fuminori, Obara Yoshiaki	4. 巻 93
2. 論文標題 Effects of dietary vitamin K3 supplementation on vitamin K1 and K2 (menaquinone) dynamics in dairy cows.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13680.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13680	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11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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