

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18767

研究課題名(和文) 哺乳類の母体における胎児認識のための免疫戦略

研究課題名(英文) Maternal immune strategy to recognize conceptus in mammals

研究代表者

草間 和哉 (Kusama, Kazuya)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：30579149

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)：ウシが保有する妊娠認識物質 IFNT の新たな発現制御機構として TEAD2、TEAD4、YAP1 が制御していることを明らかにした。また、2 つ IFNT の発現調節機構の違いについても明らかにした。IFNT により子宮内膜における免疫関連因子や抗原提示に関わる因子が全て上昇することから、着床前に IFNT が子宮内膜の免疫を制御していることを明らかにした。さらに、胚から IFNT を含むエクソソームが分泌されていることを明らかにし、そのエクソソームは時期により含んでいる因子が異なること、さらに、子宮内膜に作用して着床に適した環境を構築していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated novel regulatory mechanisms by which bovine IFNTs were regulated by transcriptional factors TEAD2, TEAD4 and YAP1. In addition, two IFNTs, IFNT2 and IFN-tau-c1, were regulated by different transcription factors. In this study, IFNT up-regulated immune- and antigen presentation-related genes in bovine endometrium, indicating that IFNT regulated immune system against conceptus in pre-implantation endometrium. We identified that conceptus-derived exosome exists in bovine and ovine endometrial lumen, and its components differed during peri-implantation periods. We further indicated that conceptus-derived exosome regulated endometrial condition essential for the conceptus implantation in pre-implantation periods.

研究分野：繁殖分子生物学

キーワード：着床 IFNT ウシ エクソソーム 免疫寛容

## 1. 研究開始当初の背景

本邦において様々な生産技術の開発や研究が行われているが、ウシの繁殖率は年々低下の一途をたどっており、その改善には至っていない。ウシだけではなく、ヒトを含む哺乳類に起こる受精卵の死滅のほとんどは着床周辺期で起こることが知られている。体外受精や受精卵の移植など質の高い受精卵を用いても妊娠・出産率が低いことから、受精卵とそれを受け入れる母体側(子宮内膜)との接着(着床)やその時の子宮内環境の問題(異常免疫反応)があると考えられる。

ウシの受精卵は成熟した後、子宮内膜に接着し、胎盤を形成していく。妊娠にはプロゲステロン(P4)が必須であり、P4を産生し続けるためには黄体が維持されなければならない。ヒトにおいて、受精卵が子宮内膜へ接着すると、受精卵からゴナドトロピンが分泌される。このゴナドトロピンが本来退行する黄体を維持することでP4が分泌され妊娠が維持される。しかしながら、ウシやヒツジなどの反芻動物ではゴナドトロピンは分泌されない。1987年、ヒツジの妊娠認識物質としてインターフェロンタウ(IFNT)が同定された。IFNTはゴナドトロピンと同様に黄体の退行を抑制する。そのためにIFNTを中心とした妊娠補助剤が開発されてきた。一方、IFNTは子宮内の遺伝子発現を調節する。そのため、欧米ではIFNTにより発現が調節されている子宮内膜因子を網羅的に解析する手法が主流となってきている。しかし、それら因子の役割を解明するには至っておらず、繁殖率の改善には至っていない。それ故、IFNT関連因子の機能解析を行うことが必要不可欠であり、それにより本分野の研究が進展し、繁殖率の向上につながる。

## 2. 研究の目的

本研究では着床の前後における胎児-母体間のやりとりを明らかにすることにより、妊娠初期の母体側の胎児認識および受け入れ機構(着床)を免疫戦略という観点から検証する。これらのことから、着床周辺期に起こる哺乳類の妊娠の正常と破綻機構を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 子宮内の胎児に対する免疫因子の発現

非妊娠、妊娠(着床前後)の子宮内膜組織におけるユビキチンまたはユビキチン様因子の発現とそれに関連するリガーゼの発現変化を調べる。また、ISG15とそのE1リガーゼはIFNTにより誘導されることが報告されている。そこでウシ子宮上皮細胞において他のユビキチン様因子とそれに関連するリガーゼの発現がIFNTにより変化するかどうかを確認する。

ユビキチン標識因子を分解するプロテアソームは、免疫状態においてIFNTの作用によって免疫プロテアソームへと変換されることが知られている。そこで着床前後のウシ子宮内膜組織における免疫プロテアソーム関連因子の発現・局在をウェスタンブロットと免疫組織染色により確認する。さらに、子宮上皮細胞にIFNTを添加し、免疫プロテアソーム関連因子の発現変化を解析する。

### (2) ISG15 関連因子のスクリーニング

ISG15は妊娠ウシ子宮内で高発現していることが知られているため、妊娠機構と密接に関わっていることが推察される。そこで、非妊娠と妊娠(着床前後)の子宮内膜ライセートをISG15またはユビキチンにて免疫沈降し、サンプル間で量が変化する因子をLC-MS/MSにより解析する。これによりISG15と結合する胎児由来抗原を同定する。

ISG15またはユビキチン結合因子が着床機構において役割を果たしているか *in vitro* 系にて精査する。当研究室では栄養膜細胞と子宮上皮細胞の共培養にさらに子宮内腔液を添加すると、子宮内腔液を採取した妊娠日を模倣できる培養系を開発している。そこで、ISG15またはその結合因子の発現抑制または強制発現した時の着床の成否を評価する。さらにプロテオーム阻害剤を投与した時の着床への影響を明らかにすることで抗原提示の必要性も確認する。これにより、受精卵が着床するためには、あらかじめ母体が胎児由来抗原を認識している必要があるか解明する。

### (3) IFNT の発現調節機構の解明

IFNTの詳細な発現調節機構は不明である。IFNTは胎児-母体間の免疫機構の最も上流に位置していると考えられ、その発現調節機構の解明は、胎児-母体間の免疫機構を明らかにする上で必要である。申請者は、予備検討として転写因子であるTEAD2の強制発現がIFNTの発現を上昇させることを確認している。そこで、TEAD1、3、4と、それらと結合する転写因子YAP、さらにYAPを阻害する因子14-3-3がIFNT発現調節の上流で関与しているか強制発現系と発現抑制系を用いることで明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) IFNTの子宮内膜上皮細胞への投与はユビキチン様物質とそのリガーゼの発現を上昇させた。また、それに伴い、抗原提示に関わる因子群もIFNTの投与により著しく上昇した。これはIFNTが免疫の制御においても関与していることを示した。

(2) ISG15修飾因子の探索過程により、ウシ子宮腔内にはエクソソームが多く存在しており、それは着床の前後により内容物

の成分が変わることを明らかにした。さらに、着床前の胚由来のエクソソームは IFNT などを含み、ウシ子宮内膜に作用して免疫関連遺伝子だけではなく、細胞死も誘導した。これは着床前に胚由来のエクソソームが子宮内膜に作用し、着床に適した環境を構築しているということを示している。

(3) IFNT の発現調節機構の解明について、新たに転写因子 TEAD2 と TEAD4、YAP1 が IFNT の発現調節に関与していることを明らかにし、2つの IFNT の発現調節機構の違いは TEAD2 と TEAD4 を使い分けているということも明らかにした。

#### 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 12 件)

1. Imakawa K, Bai R, Kusama K. Integration of molecules to construct the processes of conceptus implantation to the maternal endometrium. *J Anim Sci* 2018 in press. 査読あり
2. Bai R, Kusama K, Nakamura K, Sakurai T, Kimura K, Ideta A, Aoyagi Y, Imakawa K. Down-regulation of transcription factor OVOL2 contributes to epithelial-mesenchymal transition in a noninvasive type of trophoblast implantation to the maternal endometrium. *FASEB J* 2018 32 3371-3384. 査読あり
3. Kusama K, Nakamura K, Bai R, Nagaoka K, Sakurai T, Imakawa K. Intrauterine exosomes are required for bovine conceptus implantation. *Biochem Biophys Res Commun* 2018 495 1370-1375. 査読あり
4. Bai R, Latifi Z, Kusama K, Nakamura K, Shimada M, Imakawa K. Induction of immune-related gene expression by seminal exosomes in the porcine endometrium. *Biochem Biophys Res Commun* 2018 495 1094-1101. 査読あり
5. Nakamura K, Kusama K, Bai R, Ishikawa S, Fukushima S, Suda Y, Imakawa K. Increase in complement iC3b is associated with anti-inflammatory cytokine expression during late pregnancy in mice. *PLoS One* 2017 12 e0178442. 査読あり
6. Imakawa K, Bai R, Nakamura K, Kusama K. Thirty years of interferon-tau research; Past, present and future perspective. *Anim Sci J* 2017 88 927-936. 査読あり
7. Imakawa K, Bai R, Fujiwara H, Ideta A, Aoyagi Y, Kusama K. Continuous model of conceptus implantation to the maternal endometrium. *J Endocrinol* 2017 233 R53-R65. 査読あり
8. Kusama K, Bai R, Nakamura K, Okada S, Yasuda J, Imakawa K. Endometrial factors similarly induced by IFNT2 and IFNTc1 through transcription factor FOXS1. *PLoS One* 2017 12 e0171858. 査読あり
9. Nakamura K, Kusama K, Bai R, Sakurai T, Isuzugawa K, Godkin JD, Suda Y, Imakawa K. Induction of IFNT-Stimulated Genes by Conceptus-Derived Exosomes during the Attachment Period. *PLoS One* 2016 11 e0158278. 査読あり
10. Kusama K, Bai R, Ideta A, Aoyagi Y, Okuda K, Imakawa K. Regulation of epithelial to mesenchymal transition in bovine conceptuses through the interaction between follistatin and activin A. *Mol Cell Endocrinol* 2016 434 81-92. 査読あり
11. Kusama K, Bai R, Sakurai T, Bai H, Ideta A, Aoyagi Y, Imakawa K. A transcriptional cofactor YAP regulates IFNT expression via transcription factor TEAD in bovine conceptuses. *Domest Anim Endocrinol* 2016 57 21-30. 査読あり
12. Imakawa K, Bai R, Fujiwara H, Kusama K. Conceptus Implantation and Placentation: Molecules related to epithelial-mesenchymal transition, lymphocyte homing, endogenous retroviruses, and exosomes. *Reproductive Medicine and Biology* 2016 15 1-11. 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Kusama K, Bai R, Haeger JD, Pfarrer C, Imakawa K 「PPARG and cAMP regulate bovine endogenous retroviral gene expression necessary for the formation of multinucleate trophectodermal cells」SSR2017, 2017
2. 草間和哉、白汝嵐、今川和彦 「ヒト栄養膜細胞の cAMP 誘導性細胞融合における OVOL1/2 発現制御」日本薬学会第 136 年会、2016 年
3. 草間和哉、白汝嵐、中村圭吾、安田二郎、今川和彦 「ウシ胚 子宮間における上皮間葉系転換 (EMT) の時間特異的

制御」第 108 回日本繁殖生物学会大会、  
2015 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

草間 和哉 (KUSAMA, Kazuya)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・  
特任助教  
研究者番号：30579149

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

今川 和彦 (IMAKAWA, Kazuhiko)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・  
教授  
研究者番号：00291956