

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18806

研究課題名(和文)ウシ子宮内膜再生メカニズムの解明

研究課題名(英文)Investigation on mechanism of bovine endometrial regeneration

研究代表者

松山 秀一(Matsuyama, Shuichi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門 飼養管理技術研究領域・主任研究員

研究者番号：50455317

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)：本研究では、幹細胞活性を有すると報告されているSide population (SP) 細胞はウシ子宮内膜間質に存在し、子宮内膜上皮には含まれないことが示された。また、子宮内膜間質細胞は骨芽細胞や脂肪細胞への分化能を有することが明らかとなった。さらに、子宮内膜細胞におけるSP細胞の割合は分娩後10日目には低く、分娩後100日目にかけて徐々に増加することが明らかとなり、このようなSP細胞の発現変動にはペプチターゼ活性に関わる遺伝子が関与する可能性が示された。以上の結果から、分娩後の子宮内膜再生にはウシ子宮内膜間質に存在するSP細胞が関与する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The side population (SP) cells, which are thought to have characteristic of somatic stem cells, were identified in the bovine endometrial stromal cells but not endometrial epithelial cells by flow cytometric analysis. The bovine endometrial SP cells had a potential to differentiate into mesenchymal cell lineage. The ratio of SP cells in the endometrial cells was increased as the days passed after parturition, and the genes associated with peptidase activity might involved in the increase in ratio of SP cells after parturition. These results suggested that the SP cells in bovine endometrial stromal cells participated with the endometrial regeneration after parturition.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ウシ 子宮 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

ウシの繁殖において、経産牛では分娩を機に受胎率が低下することが知られており、その一因として子宮回復不全が挙げられる。子宮は分娩時に胎盤が剥離して大きく損傷を受けると同時に、その後速やかに子宮内膜が再生することで修復される。したがって経産牛における子宮回復不全には、分娩後の子宮内膜再生の不具合が関与していると考えられるが、ウシの分娩後における子宮内膜再生メカニズムは未だ解明されていない。我々はこれまでに、ウシ子宮内膜においても幹細胞活性を有すると報告されている Side population (SP) 細胞が存在することを明らかにしており、子宮内膜幹細胞が子宮内膜の再生に寄与する可能性を示唆している。さらに、子宮内膜細胞における SP 分画の割合は一定でなく、個体間で大きく変動していたことから、ウシの子宮が分娩に伴う損傷を受けた際に、ウシ子宮内膜に存在する SP 細胞が前駆細胞として増殖、分化することで子宮内膜の再生に寄与するといった修復システムを有している可能性がある。

元来、生体には損傷を受けた組織や器官を自律的に修復する能力が備わっており、各々の器官における修復機序についても次第に明らかになりつつある。例えば、ヒトの肝臓においては損傷を受けた場合のみ、多分化能を持たずに限られた分化を示す特殊な細胞(例: 小型肝細胞)が出現し、この細胞が前駆細胞として一過性に増幅して分化することにより肝臓の機能を回復させる可能性が示唆されている。申請者らの研究においても、ウシ子宮内膜上皮細胞を上皮系の幹細胞用無血清培養液で培養することにより、明らかに形態学的に異なる小型の子宮内膜上皮細胞が得られており、これらの小型子宮内膜上皮細胞が前駆細胞として増殖し、分化することで、ウシの子宮内膜再生に寄与する可能性も考えられる。

2. 研究の目的

我々は、ウシの子宮が分娩に伴う損傷を受けた際に、ウシ子宮内膜に存在する SP 細胞または小型子宮内膜上皮細胞が前駆細胞として増殖、分化することで子宮内膜の再生に寄与する可能性があると考えた。そこで本研究では、分娩後における SP 細胞の経日的な発現変動について明らかにするとともに、ウシ小型子宮内膜上皮細胞の分化能について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) と殺した黒毛和種牛から子宮を取り出し、各子宮角腔内を 0.3%トリプシン-0.02% EDTA-PBS (-)で満たし、37 で 30 分インキュベートした後、上皮細胞を分離、回収した。その後、表面を葉さじで掻き取った後、残った子宮内膜をハサミで細かく切り刻み、0.2% コラゲナーゼ-DMEM で 37、60 分インキュベ

ートし、間質細胞を回収した。単離した子宮内膜上皮細胞および間質細胞を DMEM-2% FBS-10 mM HEPES で 1×10^6 cells/ml となるように懸濁し、Vybrant DyeCycle Violet stain (5 mM) のみ、または Vybrant DyeCycle Violet stain (5 mM) と ABC トランスポーターの阻害剤である fumitremorgin C (5 mM) を加えて 37、90 分染色した。さらに死細胞を除外するために Propidium Iodide (2 μ g/ml) で染色した後、フローサイトメトリー解析に供した。Attune[®] acoustic focusing cytometer を用いて、violet laser (405 nm) により Vybrant DyeCycle Violet stain を励起し、青色および赤色の蛍光強度を、それぞれ 450/50 nm (VL1) および 603/48 nm (VL3) のバンドパスフィルターを用いて検出した。SP 細胞とそれ以外の細胞は Vybrant DyeCycle Violet stain の排出能の違いによって判別した。

(2) 同一の黒毛和種牛から分娩後 10、30、50、100 日目に子宮内膜組織をバイオプシーによって採取した(n=8)。その後、発情後 1、7、12、18 日目にも子宮内膜組織をバイオプシーによって採取した(n=4)。採取した子宮内膜組織は上述したとおり細かく切り刻み、コラゼナーゼ処理により間質細胞を単離した後、フローサイトメトリー解析によって SP 細胞を判別し、その割合を明らかにした。各 SP 細胞の割合については、One-way repeated-measures ANOVA を行った後、Turkey 法により統計解析を行った。

(3) 分娩後 10 日、30 日、50 日、100 日目にバイオプシーによって採取した子宮内膜組織から QIAGEN RNeasy Plus Universal Mini Kit を用いて RNA を抽出した。蛍光色素 (Cy3) で標識した後、Agilent Bovine V2 Microarray (Design ID: 023647) 上でハイブリダイズさせ、相対的な遺伝子発現量を検出した。ハイブリダイゼーション実験およびアレイスキャニングに関しては、農業生物資源研究所オープンラボ「マイクロアレイ解析室」で行い、得られたデータは GeneSpring GX software (ver.12.1) を用いて解析した。

(4) ウシ子宮内膜小型上皮培養細胞(P2)および間質培養細胞(P2)を、骨芽細胞分化用培地 (hMSC BulletKit, Lonza PT-3002) および脂肪細胞分化用培地 (hMSC BulletKit, Lonza PT-3004) を用いて培養し、それぞれ骨芽細胞および脂肪細胞に分化誘導した。骨芽細胞については Calcium deposition 染色により、脂肪細胞への分化は Oil Red O 染色によりそれぞれ確認した。また、骨芽細胞および脂肪細胞への分化については、ウシ骨髄細胞をポジティブコントロールとして用いた。

4. 研究成果

(1) 子宮内膜間質細胞には蛍光強度の低い領域に突出した細胞集団が存在し、この細胞集団は ATP binding cassette トランスポー

ターの阻害剤である fumitremorgin C 存在下で消失した(= SP 細胞)。一方、子宮内膜上皮細胞では、このような SP 細胞の存在は確認できなかった(図 1)。

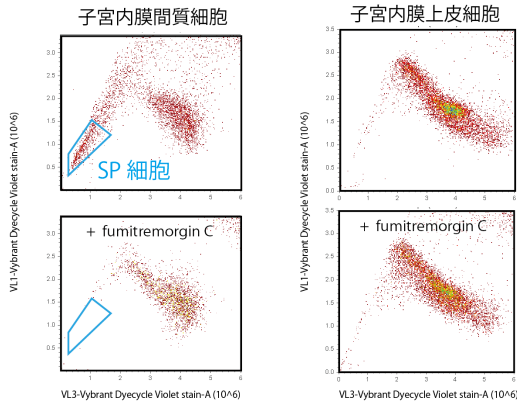


図 1 ウシ子宮内膜間質細胞(左)およびウシ子宮内膜上皮細胞(右)のフローサイトメトリ解析

(2) 分娩後の子宮内膜における SP 細胞の割合は、分娩後 10 日目に SP 細胞の割合が低く、その後徐々に増加することが明らかとなった(図 2)。一方、発情周期における SP 細胞の割合の変化は見られなかった(図 3)。

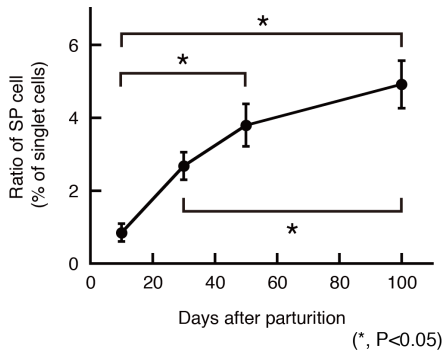


図 2 分娩後の子宮内膜における SP 細胞割合の変化 (n=8)

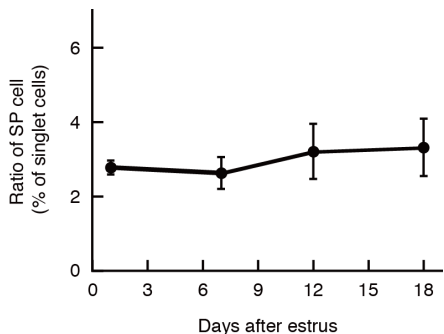


図 3 発情周期における子宮内膜の SP 細胞割合の変化 (n=4)

(3) 子宮内膜組織において、分娩後 10 日、30 日、50 日、100 日目と分娩後日数が経過するに従い発現量が高くなる遺伝子 (P<0.05, Fold change>2.0) は 99 個(10

日 v.s. 30 日) 327 個(30 日 v.s. 50 日) 0 個(50 日 v.s. 100 日)であり、分娩後 10 日目より 30 日目で発現が高く、かつ分娩後 30 日目より 50 日目で発現が高かったのは 5 個であった(図 4)。さらに、Gene Ontology (GO) 解析を行った結果、これらの遺伝子はペプチターゼ活性に關与する遺伝子群であった(表 1)ことから、ペプチターゼ活性に關わる遺伝子が SP 細胞の発現パターンに影響を及ぼす可能性が考えられた。

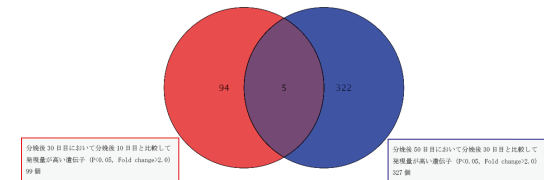


図 4 分娩後 10 日目より 30 日目で発現が高い遺伝子と分娩後 30 日目より 50 日目で発現が高い遺伝子の Venn diagram

表 1 分娩後 10 日目より 30 日目で発現が高く、かつ分娩後 30 日目より 50 日目で発現が高かった遺伝子における GO 解析

UP related genes (5 genes)					
GO ACCESSION	GO Term	Genes in Category		Genes in List in Category	
		n	%	n	p-value
GO:0008235	metallopeptidase activity	21	1	0.229	0.068
GO:0004180	carboxypeptidase activity	21	1	0.229	0.068
GO:0004181	metallocarboxypeptidase activity	13	1	0.142	0.068

(4) ウシ小型子宮内膜上皮細胞は、骨芽細胞、脂肪細胞への分化は認められなかった一方で、子宮内膜間質細胞は骨芽細胞や脂肪細胞への分化能を有することが明らかとなった(図 5、図 6)。

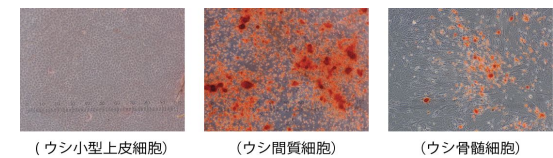


図 5 骨芽細胞分化用培地で培養したウシ小型子宮内膜上皮細胞、間質細胞、骨髄細胞の Calcium deposition 染色像 (x100)

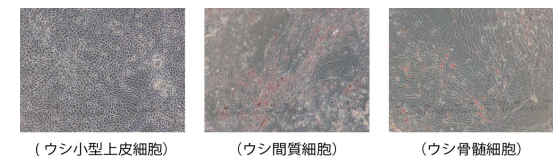


図 6 脂肪細胞分化用培地で培養したウシ小型子宮内膜上皮細胞、間質細胞、骨髄細胞の Oil Red O 染色像 (x100)

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

松山秀一、美辺詩織、中村 翔、古澤 軌、池田光美、木村康二、分娩後のウシ子宮内膜における Side population 細胞の

発現挙動、第 109 回日本繁殖生物学会大会、2016.9.11-15、麻布大学(神奈川県・相模原市)

松山秀一、古澤 軌、池田光美、美辺詩織、木村康二、ウシ子宮内膜上皮細胞における Side population 細胞の解析、第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015.9.17-20、宮崎大学(宮崎県・宮崎市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山 秀一 (MATSUYAMA, Shuichi)
独立行政法人農業・食品産業技術研究機構・畜産研究部門・飼養管理技術研究領域・主任研究員
研究者番号：50455317