

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08141

研究課題名(和文)牛子宮内膜間質SP細胞の間葉上皮転換による子宮内膜再生機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of endometrial regeneration mechanism by mesenchymal epithelial conversion of bovine endometrial stromal SP cells

研究代表者

松山 秀一 (Matsuyama, Shuichi)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：50455317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ウシ子宮内膜細胞に存在するside population (SP)細胞とSP細胞以外の子宮内膜細胞における遺伝子発現をRNA-seqにより解析した結果、SP細胞は幹細胞/前駆細胞様の特性を有し、その一部は骨髄由来である可能性が考えられた。子宮内膜細胞におけるSP細胞の割合は分娩直後に低く、その後、徐々に増加することが示されており、SP細胞は分娩後に子宮内膜細胞に分化、増殖する可能性が考えられた。また、高産次で低受胎傾向牛の子宮内膜SP細胞割合は低産次で正常受胎牛と同程度であったことから、SP細胞の割合は産次による影響を受けず、SP細胞の多寡が受胎性に影響を及ぼす可能性も低いことが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、牛の子宮に組織幹細胞の性質を持った細胞が存在することが明らかにされ、分娩後の子宮修復に関与する可能性が示されました。牛では分娩後の受胎率が低いことが知られています。この受胎率の低下は分娩後の子宮修復の不具合が一因となっている可能性があります。本研究の成果は、子宮の組織幹細胞を利用することで子宮修復の不具合を改善させるといった、これまでにないアプローチでの受胎率向上技術の開発に寄与することが期待されます。

研究成果の概要(英文)：In this study, the RNA-seq analysis of side population (SP) cell identified in bovine endometrium revealed that SP cells have stem/progenitor cell-like properties, and some of them might be derived from bone marrow. The ratio of SP cells in endometrial cells were low immediately after parturition and then gradually increased, suggesting that SP cells are differentiated and proliferated into endometrial cells after parturition. Besides, the ratio of endometrial SP cells in low fertility cows with a high number of calving was similar to that in normal fertility cows with a low number of calving. From this result, it is possible that the ratio of SP cells is not affected by parity, and the number of SP cells is unlikely to affect fertility in cows.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：幹細胞 子宮 牛

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ウシの繁殖においては、未経産牛は受胎率が比較的高い一方で、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いるが、その原因については未だ解明されていない。これまでの研究から、ウシ胚の子宮内での成長は、それを取り巻く子宮環境によって影響を受けることが示唆されている。子宮は分娩時に胎子の娩出とともに胎盤が剥離して大きく損傷を受ける一方で、その後速やかに子宮内膜が再生されて子宮の修復がおこる。従って、経産牛における受胎率の低下は分娩後の子宮内膜再生の際に不具合が生じた結果、子宮機能が十分に回復しないことが一因であると考えられる。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、例えば、ヒトの子宮では幹細胞が多く含まれる Side population (SP) 細胞が子宮内膜の再生に寄与することが示唆されている。我々はこれまで行った研究において、ウシの子宮内膜管腔上皮細胞以外の子宮内膜細胞に SP 分画が存在することを明らかにしている。さらに、分娩後 10 日、30 日、50 日、100 日で牛子宮内膜組織を採取し、子宮内膜における SP 細胞の割合についてフローサイトメトリー解析によって検討した結果、分娩後 10 日目には 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。また、マウスを用いた実験で、子宮内膜上皮細胞の再生が間葉系-上皮転換、すなわち、子宮内膜間質細胞から子宮内膜上皮細胞への分化転換によって行われることが示されており、分娩後のウシにおいても、子宮内膜管腔上皮以外の子宮内膜に存在する SP 細胞が子宮内膜管腔上皮細胞へ分化転換し、増殖することで子宮内膜再生に寄与する可能性が考えられた。しかしながら、ウシ子宮内膜 SP 細胞が多分化能などの幹細胞特性を有するかは未だ解明されていない。また、SP 細胞が子宮内膜の再生に寄与する場合、分娩後に受胎性が低下するウシでは SP 細胞が少ないかまたはその分化能および増殖能が低下しているため、子宮内膜の再生時に不具合が生じる可能性も考えられるが、子宮内膜に含まれる SP 細胞の割合や能力と産次および受胎性との関係は検討されていない。さらに畜産現場では、子宮内膜炎の治療法としてポビドンヨードを子宮内へ注入する方法が行なわれているが、ポビドンヨードの子宮内投与は子宮内膜炎の起原菌を殺菌すると同時に、子宮内膜上皮細胞に適度な損傷障害を与え、その再生を促すことが期待される。しかし、ポビドンヨードの子宮内投与が子宮内膜 SP 細胞や子宮内膜における遺伝子発現におよぼす影響については未解明のままである。

### 2. 研究の目的

本研究では、ウシ子宮内膜 SP 細胞の細胞特性について明らかにするとともに、産次や受胎性の異なる牛で SP 細胞の割合との関係を検討することを目的とした。さらに、ウシの子宮内へのポビドンヨード注入が子宮内膜に含まれる SP 細胞の割合や子宮内膜における遺伝子発現におよぼす影響について明らかにし、分娩後の変化と比較検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 食肉センター由来のウシ子宮を用いた。各子宮角腔内を 0.3%トリプシン-0.02% EDTA-PBS (-) で満たし、37°C で 30 分インキュベートした後、管腔上皮細胞を除去した。その後、表面を薬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°C、60 分インキュベートし、細胞を回収した。単離した管腔上皮細胞以外の子宮内膜細胞を DMEM-2% FBS -10 mM HEPES で  $1 \times 10^6$  cells/ml となるように懸濁し、Hoechst33342 (10  $\mu$ g/ml) または Hoechst33342 (10  $\mu$ g/ml) と ABC トランスポーターの阻害剤である Verapamil (50  $\mu$ M) を加えて 37°C、90 分染色した。さらに死細胞を除外するために Propidium Iodide (2  $\mu$ g/ml) で染色した後、フローサイトメトリー解析に供した。FACS SORP Aria2 (BD) を用いて、UV laser (355 nm) により Hoechst を励起し、青色および赤色の蛍光強度をそれぞれ 450/50 nm (Hoechst Blue) および 670LP nm (Hoechst red) 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 Hoechst33342 の排出能の違いによって判別し、SP 細胞および SP 細胞以外の主要な細胞集団である Main population (MP) 細胞をそれぞれセルソーターにより分取し、RNA-seq 解析を行った。SP 細胞と MP 細胞間の発現変動遺伝子 (FDR < 0.05) を検出し、それぞれの細胞で発現が高い遺伝子に対して GO 解析および KEGG パスウェイ解析 (p < 0.05) を行った (n=3)。

(2) 肉用牛を高産次で低受胎傾向牛 (n=4) と低産次で正常受胎牛 (n=4) の 2 群に分け (表 1)、それぞれのウシから発情後 7 日目に子宮内膜組織をバイオプシーによって採取した。採取した子宮内膜組織は上述した方法で子宮内膜細胞を単離した後、フローサイトメトリー解析によって SP 細胞を判別し、その割合を算出した。

表 1 高産次&低受胎傾向牛および低産次&正常受胎牛の月例、体重、ボディコンディションスコア、産歴

	Age (months)	Body weight (kg)	BCS	Parity
高産次&低受胎傾向牛 (n=4)	194.2 $\pm$ 11.4	640.0 $\pm$ 39.3	5.2 $\pm$ 0.7	6.8 $\pm$ 0.9
低産次&正常受胎牛 (n=4)	59.3 $\pm$ 3.0	540.0 $\pm$ 16.6	5.7 $\pm$ 0.0	2.3 $\pm$ 0.3

平均値  $\pm$  標準誤差

(3) 黒毛和種牛 (n=3) を用いて、発情後 7 日目に 2%ポビドンヨード溶液を左右の子宮角に各

50 ml ずつ注入した。ポビドンヨードを注入する直前（0日目）と注入後2、7、14日目に子宮内膜組織をバイオプシーによって採取した。採取した子宮内膜組織から上述した方法により子宮内膜細胞を単離した後、フローサイトメトリー解析によってSP細胞を判別し、その割合を算出した。また、バイオプシーによって採取した子宮内膜組織からRNAを抽出し、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. 14.9)を用いて解析した。

#### 4. 研究成果

(1) ウシ子宮内膜SP細胞において、MP細胞と比較して高発現および低発現であった遺伝子はそれぞれ2851個、2516個であった。さらに、SP細胞で高発現であった遺伝子には、核酸代謝、血管発達といった機能や（表2）、幹細胞の自己複製や分化に関わるシグナリングに関与する遺伝子が多く含まれており（表3）、幹細胞マーカー（MYC, SOX family, NOTCH1, NOTCH4, KLF family, CXCR4, STAT3）や血管内皮細胞、血管周囲細胞のマーカー遺伝子（CD31, CD34, CD146, ENG, vWF, KDR, FLT1）も含まれていた。

表2 MP細胞と比較してSP細胞で発現が高い上位20遺伝子のGO解析

Term	Count	PValue
GO:0016070-RNA metabolic process	768	4.58E-47
GO:0010468-regulation of gene expression	707	1.24E-46
GO:0090304-nucleic acid metabolic process	837	1.81E-45
GO:0051252-regulation of RNA metabolic process	618	1.13E-43
GO:0010556-regulation of macromolecule biosynthetic process	656	1.72E-40
GO:2000112-regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	640	2.82E-40
GO:0006355-regulation of transcription, DNA-templated	584	3.10E-40
GO:2001141-regulation of RNA biosynthetic process	587	7.19E-40
GO:0032774-RNA biosynthetic process	618	7.82E-40
GO:0006351-transcription, DNA-templated	554	1.95E-39
GO:0035556-intracellular signal transduction	497	1.53E-34
GO:0010604-positive regulation of macromolecule metabolic process	514	9.01E-34
GO:0051254-positive regulation of RNA metabolic process	293	1.42E-31
GO:0034654-nucleobase-containing compound biosynthetic process	646	8.34E-31
GO:0045893-positive regulation of transcription, DNA-templated	280	4.15E-30
GO:1902680-positive regulation of RNA biosynthetic process	281	5.60E-30
GO:0034645-cellular macromolecule biosynthetic process	764	5.84E-30
GO:0010628-positive regulation of gene expression	322	3.76E-28
GO:0010629-negative regulation of gene expression	283	4.61E-27
GO:0001944-vasculature development	170	2.08E-26

表3 MP細胞と比較してSP細胞で発現が高い上位20遺伝子のKEGG pathway解析

Term	Count	PValue
bt04668:TNF signaling pathway	48	1.85E-14
bt05164:Influenza A	61	9.45E-13
bt04010:MAPK signaling pathway	77	5.94E-12
bt05168:Herpex simplex infection	62	2.64E-11
bt05200:Pathways in cancer	102	8.33E-11
bt04380:Osteoclast differentiation	48	1.88E-10
bt05169:Epstein-Barr virus infection	42	3.79E-09
bt05166:HTLV-1 infection	71	1.88E-08
bt04068:FoxO signaling pathway	43	4.64E-08
bt05160:Hepatitis C	43	5.91E-08
bt05161:Hepatitis B	45	2.04E-07
bt04014:Ras signaling pathway	62	2.52E-07
bt05162:Measles	43	2.93E-07
bt04062:Chemokine signaling pathway	52	3.15E-07
bt05205:Proteoglycans in cancer	55	4.99E-07
bt04064:NF-kappa B signaling pathway	32	5.04E-07
bt04015:Rap1 signaling pathway	57	5.49E-07
bt05220:Chronic myeloid leukemia	27	1.60E-06
bt04550:Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	40	4.86E-06
bt04620:Toll-like receptor signaling pathway	33	5.22E-06

一方、SP細胞で低発現であった遺伝子には、TCAサイクルに関わる遺伝子が多く含まれていた（表4）。組織幹細胞は活性酸素種による細胞障害を防ぐためにTCAサイクルによるATP合成を抑制している。また、ヒトにおいて幹細胞特性を有する子宮内膜SP細胞は血管内皮前駆細胞に類似した性質を有し、少なくともその一部は骨髄由来の細胞が含まれることが報告されている。これらの報告とRNA-seq解析による本実験結果から、ウシ子宮内膜で確認されたSP細胞も幹細胞/前駆細胞様の特性を有し、その一部は骨髄由来である可能性が考えられた。これまでの我々の研究で、ウシの子宮内膜細胞におけるSP細胞の割合は分娩直後に低下していたことに加え、マウスでは分娩後に子宮内膜幹細胞が細胞増殖を示すことが報告されていることから、ウシの分娩後の子宮内膜においてもSP細胞が分化して新たな子宮内膜細胞を供給することにより、分娩直後に一時的にSP細胞割合が低下した可能性が考えられた。

表4 MP細胞と比較してSP細胞で発現が低い上位20遺伝子のGO解析

Term	Count	PValue
GO:0042773-ATP synthesis coupled electron transport	22	2.20E-07
GO:0007166-cell surface receptor signaling pathway	291	4.11E-07
GO:0022904-respiratory electron transport chain	25	8.51E-07
GO:0045333-cellular respiration	37	9.02E-07
GO:0055086-nucleobase-containing small molecule metabolic process	103	1.01E-06
GO:0043436-oxoacid metabolic process	117	1.16E-06
GO:0019752-carboxylic acid metabolic process	116	1.41E-06
GO:0006631-fatty acid metabolic process	58	3.16E-06
GO:0001649-osteoblast differentiation	42	1.28E-05
GO:0006753-nucleoside phosphate metabolic process	92	1.37E-05
GO:0006029-proteoglycan metabolic process	20	1.39E-05
GO:0034440-lipid oxidation	25	1.93E-05
GO:0019395-fatty acid oxidation	24	3.80E-05
GO:0002062-chondrocyte differentiation	25	3.94E-05
GO:0016054-organic acid catabolic process	39	4.07E-05
GO:0046395-carboxylic acid catabolic process	36	4.25E-05
GO:0009117-nucleotide metabolic process	88	5.06E-05
GO:0010647-positive regulation of cell communication	182	5.54E-05
GO:0009141-nucleoside triphosphate metabolic process	49	6.77E-05
GO:0002253-activation of immune response	50	7.84E-05

(2) 高産次で低受胎傾向牛のSP細胞割合は低産次で正常受胎牛と同程度であった（図1）ことから、SP細胞の割合は産次による影響を受けず、また、SP細胞の多寡が受胎性に影響を及ぼす可能性も低いことが考えられた。

(3) ポビドンヨードの子宮内投与後、子宮内膜細胞に対するSP細胞の割合は、投与後2日目に増加した後、投与後7日目に低下し、その後、投与後14日目には再び増加した（図2）。この投与後7日目から14日目のSP細胞割合の変化は分娩後10日目から30日目にかけて見られる変化と同様であり、ポビドンヨードの子宮内投与後においてもSP細胞が子宮内膜細胞に分化、増殖する可能性が考えられた。また、投与後2日目に見られたSP細胞割合の増加は、SP細胞が分化前に一過性に増殖する可能

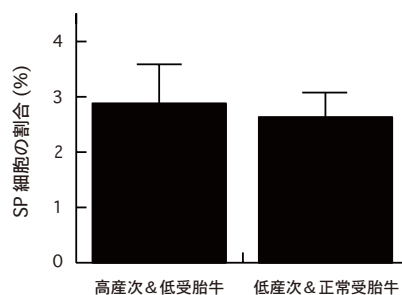


図1 高産次 & 低受胎牛および低産次 & 正常受胎牛における子宮内膜細胞に対するSP細胞の割合（平均値 ± 標準誤差）

性を示しており、分娩直後にも同様の変化が起こっている可能性も考えられた。

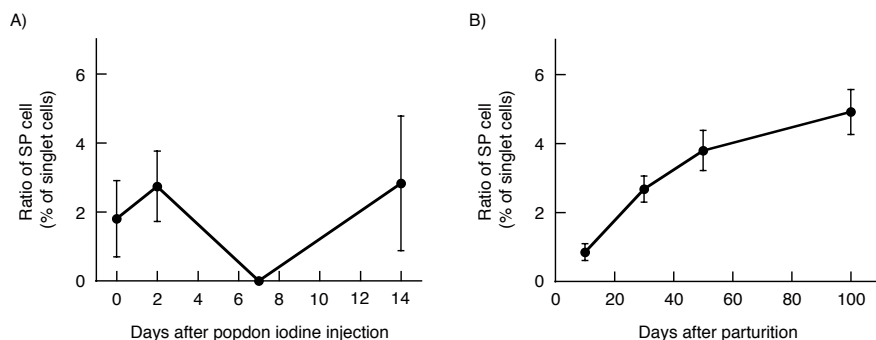


図2 A) ポビドンヨード子宮内投与後の子宮内膜細胞に対するSP細胞割合の変化 (n=3)、B) 分娩後の子宮内膜細胞に対するSP細胞割合の変化 (n=8) (平均値 ± 標準誤差)

ポビドンヨード投与による子宮内膜の遺伝子発現は、ポビドンヨード投与後0日(投与直前)、2日、7日、14日目と投与後日数が経過するに従い発現量が高くなる遺伝子が545個(0日目 v. s. 2日目)、266個(2日目 v. s. 7日目)、251個(7日目 v. s. 14日目)であった(図3)。一方、投与後日数が経過するに従い発現量が低くなる遺伝子は280個(0日目 v. s. 2日目)、390個(2日目 v. s. 7日目)、304個(7日目 v. s. 14日目)であった(図4)。さらに、投与後に発現量が高くなる266個の遺伝子(2日目 v. s. 7日目)のうち、分娩後も発現量が高くなっていった遺伝子(10日目 v. s. 30日目)は0個であり、投与後に発現量が高くなる251個の遺伝子(7日目 v. s. 14日目)のうち、分娩後も発現量が高くなっていった遺伝子(30日目 v. s. 50日目)は7個であった(図4)。また、投与後に発現量が低くなる390個の遺伝子(2日目 v. s. 7日目)のうち、分娩後も発現量が低くなっていった遺伝子(10日目 v. s. 30日目)は1個であり、投与後に発現量が低くなる304個の遺伝子(7日目 v. s. 14日目)のうち、分娩後も発現量が低くなっていった遺伝子(30日目 v. s. 50日目)は3個であった(図4)。以上の結果から、ポビドンヨードの子宮注入後と分娩後では、ともにSP細胞の分化、増殖による子宮修復が起こる可能性が考えられた一方で、その他の子宮内膜再生機序は異なる可能性が示された。

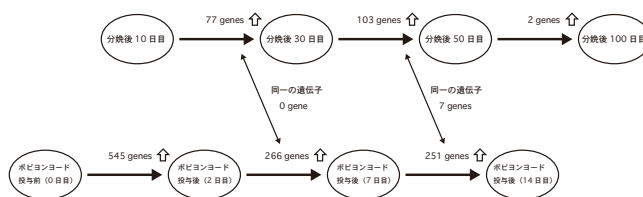


図3 ポビドンヨード投与後および分娩後において発現量が上昇した遺伝子の数

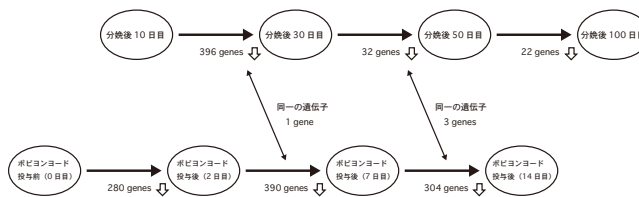


図4 ポビドンヨード投与後および分娩後において発現量が低下した遺伝子の数

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 館林亮輝、阿部良哉、中村翔、美辺詩織、木村康二、森田康広、大蔵聡、松山秀一
2. 発表標題 ウシ子宮内膜細胞のSide population解析
3. 学会等名 平成30年度 愛知県農学系 4 機関による研究交流会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 館林亮輝、中村翔、美辺詩織、古澤軌、阿部良哉、森田康広、大蔵聡、木村康二、松山秀一
2. 発表標題 ウシ子宮内膜Side population細胞における幹細胞マーカーの発現解析
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019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