様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ５ 月 ３１ 日現在

機関番号：１５３０１
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2017～2018
課題番号：１７Ｋ１９３２２

研究課題名（和文）ウシ胚伸長を達成する人工子宮腺構築

研究課題名（英文）Culture system of bovine uterine gland for establishment of elongtion of bovine conceptus in vitro

研究代表者
木村　康二（KIMURA, Koji）

岡山大学・環境生命科学研究科・教授

研究者番号：５０３５５０７０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ウシ子宮内膜組織を酵素処理することにより、子宮腺組織をその部分的構造を維持して単離することが可能となり、さらにこれをマトリゲル内に包埋して培養することにより、従来のプラスティックシャーレ上培養よりも分泌能を高く維持することが出来る手法を開発した。このようにして得られた細胞は性ステロイドホルモンに対して感受性を持ち、これに応答して子宮分泌タンパク質の遺伝子発現を変化させることが示された。本課題の成果によって、様々な条件下でウシ子宮腺の分泌機能を研究することが可能となり、今後ウシ受胎性向上研究に大いに役立つことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ウシの妊娠継続には子宮内環境が重要であり、子宮腺がこれを支配する。子宮腺の機能を維持できる培養方法はこれまで開発されておらず、よって子宮腺機能については解明されていないことが多い。本課題では子宮腺をその構造を維持したまま回収する手法の開発に成功しただけでなく、従来法よりも優れた新規の培養方法を確立し、その有効性を示すことが出来た。この成果はウシの受胎性向上の技術開発につながる有用なものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established a method for isolation of bovine endometrial glands enzymatically and its culture system by embedding them in the matrigel. When the isolated uterine glands were cultured by this novel method, the gene expressions of the secretory proteins from bovine endometrium were significantly increased compared to those of glands cultured on plastic dishes (conventional culture method). Moreover, the glands cultured by this novel method had ability to react with sexual steroid hormones such as estradiol 17b and progesterone. The results of the present study are valuable for research on factors which affect the protein secretion ability of the uterine gland and contribute the study on improvement of fertility of cattle.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：子宮腺　3次元培養　ウシ　分泌タンパク質

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９、ＣＫ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

ウシの受精卵（胚）はヒトやマウスと異なり、子宮に到達してすぐに着床せず、しばらくの間、子宮と接着することなく浮遊して発育する。その間、ウシ胚は球形から紐状に形態を変化させながら伸長する（伸長胚）。この独特の発生機構を利用して、様々な技術開発が可能である。伸長胚は目視できるほど大きく、ヒト胚のように細胞のバイオプシーに必須の顕微鏡・特殊機器が不要で、且つ発生が進んでいるために多くの細胞の採取か可能である。これはゲノム情報を利用した胚の遺伝子診断を容易にし、優良家畜生産に貢献する。我々は伸長胚の移植技術を開発し、簡易なバイオプシーによる胚の性判別による産子産み分け技術を確立した。

この取り組みの中で、我々は子宮から回収した伸長胚は個体によって成長が様々で目視できないほど小さい場合もあり、その場合は伸長胚の利点を生かせないという問題に直面した。ウシにおいて体外受精・体外培養技術はほぼ完成しているが、体外で伸長胚まで発育させる技術がなく、このような小さな胚は利用できない。この問題を克服するために、体外で胚を伸長させる技術の開発が必要と発想した。

子ヒツジに高濃度プロジェステロン処理をすると子宮腺の発達が抑制され子宮腺欠損(uterine gland knock-out:UGKO)ヒツジが作出可能で、これらのヒツジでは胚の伸長が見られない。このことから子宮腺が胚伸長に必須であることが示され、体外でのウシ胚伸長のためには子宮腺由来の因子が必要である。しかしながらその因子は同定されておらず、また子宮腺の体外培養技術も確立していない。

２．研究の目的

ウシ胚は子宮内でしばらくの間着床することなく、球形から紐状に形態を変えながら伸長する（伸長胚）。伸長胚はウシ初期胚やヒト・マウスなどの伸長しない種の胚と比べて、目視可能なぐらい大きい（0.1 ミリ vs 数ミリ～数センチ）ので、細胞のバイオプシーが容易であり、胚の性判別や遺伝子診断などのゲノム情報を利用できる（Kimura & Matsuyama, 2014）。このように伸長胚を用いれば、様々な新機軸の技術開発が可能となり、家畜繁殖に大きな技術革新をもたらすことが期待できる。しかしながら、現在、ウシ胚の体外培養は受精後７日間が限度であり、伸長期までの胚の培養は非常に困難である。

ヒツジの研究において、産後直ぐの子羊へのプロジェステロン投与により子宮腺の形成が阻害され、子宮腺欠損(Uterine gland knock-out: UGKO)個体が作出されることが報告されている（Spencer et al., 1999）。これら UGKO ヒツジにおいては、子宮内での胚伸長が見られず、その後胚死滅に至ることから、子宮腺からの分泌物が胚の伸長および生存に大きく関わることが示唆されている（Gray et. al., 2001）。以上の報告から、体外での伸長胚の作出には、体外で子宮腺を培養・構築する技術が必要である。

子宮腺は立体的な管状構造を持ち、子宮内腔から内膜層内に陥入・分枝している。子宮腺は子宮腺上皮細胞から構成される単層円柱上皮からなるが、一般的なプラスティックシャーレー上での子宮腺上皮細胞の培養では、腺上皮細胞は上述のような円柱状の形態を持たず、平面的に増殖する。この円柱形から平面的な形態的変化は細胞の頂底極性（上下の違い）を消失させ、細胞の機能を奪う。子宮腺上皮においては、頂底極性の消失により分泌機能が大きく損なわれる可能性がある。

本課題ではウシ伸長胚の体外作製技術の一環として、新規のウシ子宮腺の体外培養および構築について検討することを**目的とする。**

３．研究の方法

（１）　ウシ子宮腺の単離とその培養法の確立

本研究の第一段階として、ウシ子宮内膜から子宮腺を単離する方法の確立を行った。子宮

内膜には大きく分けて、子宮内腔上皮、子宮腺上皮、間質細胞の３種の細胞が存在している。内腔上皮は子宮内腔表面に存在しているため、子宮腔内にトリプシン溶液を添加し、剥離させて回収し、間質細胞は残りの内膜を細切し、コラゲナーゼで消化後、セルストレーナーでろ過することにより採取している。我々はセルストレーナー残渣に子宮腺断片が存在するのではないかと仮定した。また、採取した子宮腺をマトリゲル内に包埋して培養可能かについて検討した。

食肉センターからウシ子宮を採取し、黄体側子宮角内腔にトリプシン溶液を 10-20 ml 注入し、37°Cで放置した。30 分後、溶液を除去した後、子宮角を正中線方向に切開して内腔表面をメスで削り取るとともに内腔表面をペーパータオルで拭い完全に上皮細胞を除去した。次に子宮小丘間の内膜固有層を採取し、メスまたはハサミを用いて細切した。組織塊はコラゲナーゼにより 2 時間 37°Cで振盪培養して消化し、消化物は大きな組織片を取り除いたのち、75μm のナイロンメッシュでろ過した。ナイロンメッシュに残った子宮腺を洗浄回収した。

回収した子宮腺を 50%マトリゲル内に包埋したのち固化させ、ゲル上に培養液を重層して培養を行った。培養開始 1 週間後、ゲル内の子宮腺を形態学的に観察した。また各発情周期の子宮から回収した子宮腺における分泌タンパク質（APOA1, ARSA, CTGF, MEP1B, SERPINA14, SPP1）の遺伝子発現についても検討した。

（２）　ゲル包埋培養ならびにプラスチックシャーレ―上培養したウシ子宮腺上皮細胞の遺伝子発現の違いと性ステロイドホルモンの影響

本課題ではゲル包埋および従来法のプラスティックシャーレ―上培養したウシ子宮腺上皮細胞における分泌性タンパク質の遺伝子発現の検討および性ステロイドホルモン添加がそれらの遺伝子の発現に及ぼす影響について検討した。性周期ステージⅡ（発情後 5-10 日）の子宮内膜から（１）で用いた方法によって子宮腺を単離し、それをマトリゲル包埋またはプラスティック上でエストラジオール 17β・プロジェステロン存在非存在下で培養した。７日後に細胞を回収し、分泌性タンパク質（APOA1, ARSA, CTGF, MEP1B, SERPINA14, SPP1）の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法で検討した。

４．研究成果

（１）ウシ子宮腺の単離とその培養法の確立

前述の方法によってウシ子宮腺組織を単離することが出来た（図１）。ウシの発情周期の各ステージ（Ⅰ：day 0-5, Ⅱ:day 5-10, Ⅲ:day 11-17, Ⅳ:day 18-21）の子宮腺を単離し、APOA1, ARSA, CTGF, MEP1B, SERPINA14, SPP1 の遺伝子発現を検討した（図２）。検討した遺伝子の多くは発情周期中のステージⅢおよびⅣで発現が上昇していた。特に SERPINA14 および MEP1B はステージⅠおよびⅡでの発現が他のステージと比較して、非常に低い値であった。一方、APOA1 および CTGF はステージⅠでの遺伝子の発現がステージⅡよりも有意に高く、黄体期から発情後まで発現が維持されていた。

図１　単離したウシ子宮腺

また、単離した子宮腺を 50%マトリゲル内に包埋して培養したところ、培養開始７日で内腔に分泌液を貯留した胞状の細胞塊（シスト）を形成することが明らかとなり（図３）、分泌能が維持されていることが示された。これまでウシ子宮腺の単離および子宮分泌タンパク質の遺伝子発現についての報告はなく、子宮腺単離と体外培養は初めての報告であり、今後様々な研究

に利用されることが期待出来る。

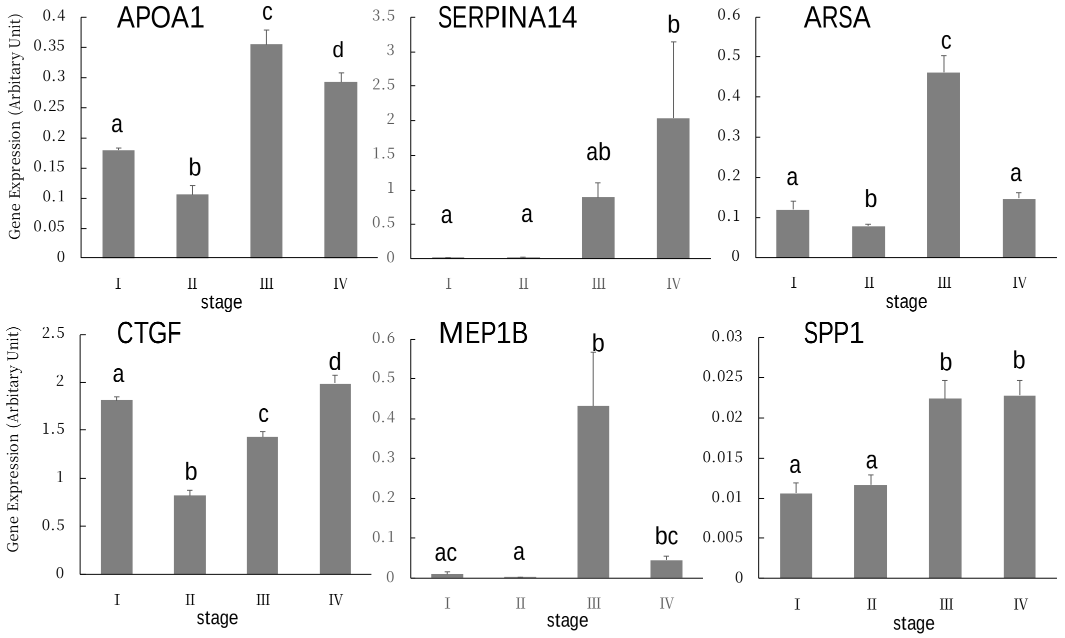

図２　発情周期各ステージのウシ子宮腺の分泌タンパク質遺伝子発現

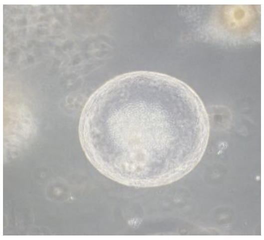

図３　マトリゲル内で子宮腺を培養して得られたシスト

（２）　ゲル包埋培養ならびにプラスチックシャーレ―上培養したウシ子宮腺上皮細胞の遺伝子発現の違いと性ステロイドホルモンの影響

次に単離した子宮腺をマトリゲル包埋培養またはプラスティックシャーレ上平面培養し、培養開始後７日に細胞を回収して上記６遺伝子の発現を定量した。すべての遺伝子において、有意にマトリゲル包埋培養において有意に遺伝子の発現が上昇した。このことから一般的な平面培養よりもマトリゲル包埋培養の方が子宮腺の分泌能を高く維持されることが明らかとなった。また、マトリゲルにエストラジオール 17β（E2）およびプロゲステロン（P4）を添加して子宮腺を培養し、上記 6 遺伝子の発現について検討したところ、遺伝子によってステロイドホルモンに対する反応性に違いが見られた（図 4)。

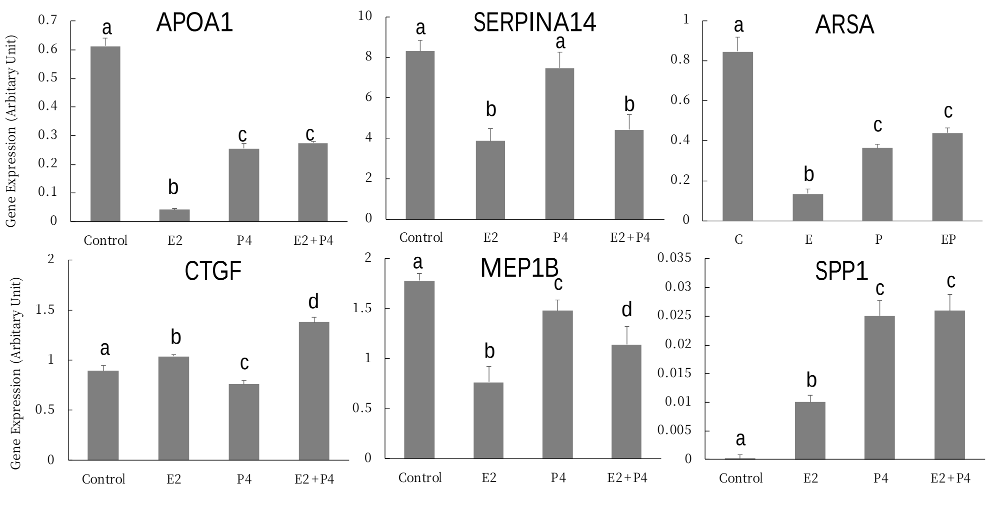

図4　性ステロイドホルモンがゲル包埋培養ウシ子宮腺の遺伝子発現に及ぼす影響

APOA1およびARSAはE2､P4の単独･共添加ともに対照区より有意に発現が低下した｡SERPINA14はE2の存在下では発現が有意に低下したが､P4の単独添加では対照区と有意な差は認められなかった。CTGF では E2 が存在していれば発現は有意に増加するが、P4 単独の添加では有意に発現は減少した。MEP1B はステロイドホルモン存在下では有意に発現が低下した。SPP1 では対照区で遺伝子の発現はほぼ確認できなかったが、E2 単独、P4 単独添加でその発現量は有意に上昇し、共添加は相乗効果を示さなかった。以上の結果から、マトリゲル内で子宮腺を培養して得られたシストは平面培養よりも分泌能が高く、またシストにおける分泌タンパク質の遺伝子発現はステロイドホルモンにより影響を受けることが明らかとなった。このことから今回開発した子宮腺のゲル内培養は一般的な平面培養よりも子宮腺の機能を維持していることが示され、また性ステロイドホルモンに対して感受性を有することから、今後、ウシ子宮腺機能の開発やこれを用いたウシ胚培養法開発が期待できる。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　１件）

Sakai S, Hagihara N, Kuse M, Kimura K, Okuda K. Heat stress affects prostaglandin synthesis in bovine endometrial cells. J Reprod Dev, 20;64(4):311-317. doi: 10.1262/jrd.2018-051. (2018)　査読有

〔学会発表〕（計　５件）

（１）山田亜依、高見恵都、酒井駿介、山本ゆき、木村康二 :暑熱環境下におけるウシ子宮内膜プロスタグランジン分泌と温度感受性 TRP チャネルとの関係　第 68 回関西畜産学会 (徳島、2018 年 9 月 24-25 日)

（２）Koji Kimura, Takashi Fujii, Shuichi Matsuyama, Hiroki Hirayama: Nonsurgical transfer of bovine elongating conceptus and its application for genomic evaluation. The 5th Japan-Korea-China Joint Symposium (Nagano, September 16, 2018)

（３）山田 亜依, 高見 恵都, 酒井 駿介, 山本 ゆき, 木村 康二:暑熱によるウシ子宮内膜のプロスタグランジン分泌増加と温度感受性チャネルの関係　第 111 回日本繁殖生物学会 (長野、2018 年 9 月 12 - 16 日）

（４）Ai Yamada, Keito Takami, Shunsuke Sakai, Yuki Yamamoto, and Koji Kimura:TRP channels, sensors for temperature, are localized on bovine endometrium and involved in incease of prostaglandin prodeuction of bovine endomtrial stromal cells under heat stress. 51st Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction (New Orleans, USA, July 10-13, 2018)

（５）Shunsuke Sakai, Mami Yagi, Nao Fujime, Mariko Kuse, Ryosuke Sakumoto, Yuki Yamamoto, Kiyoshi Okuda and Koji Kimura: Heat stress influences the effect of interferon tau on the secretion of prostaglandins in bovine endometrial cells. Fourth World Congress of Reproductive Biology (Okinawa, Japan, September 27-29, 2017)

６．研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：山本　ゆき

ローマ字氏名：Yuki YAMAMOTO

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。