

平成22年 6月 5日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19580335  
 研究課題名 (和文) ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子によるウシ子宮内膜細胞の増殖機構の解析  
 研究課題名 (英文) Stimulatory effect of heparin-binding EGF-like growth factor on the proliferation of bovine endometrial cells  
 研究代表者  
 木崎 景一郎 (KIZAKI KEIICHIRO)  
 岩手大学・農学部・准教授  
 研究者番号：40337994

研究成果の概要 (和文) : ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子 (HBEGF) は EGF 受容体 (EGFR) に結合することにより、さまざまな細胞に対して増殖効果や走化性を示す。本研究では、ウシ子宮内膜組織での HBEGF 及び EGFR 遺伝子の発現動態を明らかにすると共に、着床や胎盤形成への HBEGF/EGFR 系の関与及びその分子機構を検討した。その結果、ウシ子宮内膜においても機能的な HBEGF/EGFR 情報伝達システムが存在し、子宮内膜細胞への増殖活性を示すことから、ウシの着床や胎盤形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Heparin-binding EGF-like growth factor (HBEGF) participates in a wide range of physiological and pathological processes through its receptor EGFR. The aim of this study was to identify the expression of HBEGF and EGFR in bovine endometrium, and investigate the role of this system during implantation and placentation in cattle. Present results demonstrate that HBEGF-EGFR signaling system presents in bovine endometrium, and exhibits proliferation potential to the endometrial cells, indicating that the system play crucial role in implantation and placental development in cattle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子, MMP, 子宮, 胎盤

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ウシにおいては受精胚が着床して胎盤を形成する部位は限定されており、子宮小丘と呼ぶ領域である。この部位でだけ受精胚由来の栄養膜細胞と子宮内膜上皮が融合して胎盤節と呼ぶ小さな胎盤とも言える組織を形成する。この領域で主として母子間の栄養供給、ガス交換、情報交換がなされる。この過程が順調に進行しないと早期胚死滅や流産を引き起こし、ウシの生産性を著しく低下させる。ウシでは着床、胎盤形成完了後の胎子の死滅は数%以下であり、着床から胎盤形成に至る子宮内膜機能の解明が受胎率向上に最も重要と言える。胎盤形成部位では大幅な組織改変、細胞増殖が生じる。即ち、子宮内膜組織の細胞外マトリックス (ECM) が改変すると同時に、限局した領域で細胞増殖が誘導される。しかし、その増殖を誘導、調節する要因は明らかになっていない。

(2) ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子 (HBEGF) は EGF ファミリーに属する増殖因子であり、チロシンキナーゼ型受容体である EGF 受容体 (EGFR) に結合することにより、さまざまな細胞に対して増殖効果や走化性を示すことが知られている。本増殖因子は膜貫通型タンパク質である前駆型 HB-EGF として産生されるが、細胞膜上でプロセッシングを受けることにより細胞外ドメイン (遊離型 HBEGF) が遊離し生物活性を示す。近年、このプロセッシング機構にメタロプロテアーゼが関与していることが明らかにされ、ヒト栄養膜細胞の生存性や病態時の心筋細胞肥大のシグナル伝達に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。ウシでは子宮内膜組織と栄養膜における HB-EGF 及びその受容体の局在については報告されているが、妊娠に伴う発現動態やその機能的役割の詳細については全く検討されていない。

## 2. 研究の目的

(1) ウシ子宮内膜細胞への HBEGF の生理作用を明らかにするため、HBEGF 処理後の培養ウシ子宮内膜細胞の増殖能を検証する。

(2) ウシ子宮内膜組織における HBEGF とその受容体の発現動態を明らかにするため、発情周期及び妊娠に伴う遺伝子発現動態をリアルタイム RT-PCR, *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析する。

(3) HB-EGF の活性化プロセッシング機構におけるメタロプロテアーゼ系の関与を明らかにするため、子宮内膜及び胎盤におけるマトリックスメタロプロテアーゼ関連因子の発現動態について検証する。

(4) 当初計画では、HBEGF がウシ子宮内膜細胞に及ぼす生物活性の分子機構を明らかにするため、組換えタンパク質、組換えタンパク質発現細胞及び阻害剤を用いて検討する予定であったが、実験の進行状況を考慮し、より効率的な手法である siRNA を使用した方法に着手した。

## 3. 研究の方法

### (1) 解析試料

発情周期あるいは妊娠 17 日から 252 日齢の黒毛和種牛から、子宮内膜組織 (子宮小丘、子宮小丘間内膜) および胎子側胎盤組織 (絨毛叢、絨毛叢間胎膜) を採取して -80 度に保存し、総 RNA 抽出用試料とした。また、一部の組織片は中性緩衝ホルマリン液中に浸して組織解析用試料とした。

### (2) 定量的リアルタイム RT-PCR (QPCR)

各組織から TRIzol 試薬を用いて総 RNA を抽出すると共に、High Capacity cDNA 合成キットを用いて cDNA を調製した。HBEGF, EGFR, ヘパラーゼ, extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) 等の特異的遺伝子プライマーを Primer Express ソフトウェア (ABI 社) を使用して作成した。Power SYBR 試薬 (ABI 社) を用いた反応を ABI PRISM 7300 リアルタイム PCR システム (ABI 社) を使用して検出した。なお、各遺伝子の定量は各組織由来 cDNA からクローニングした標準プラスミドを使用して算出した。

### (3) *in situ* ハイブリダイゼーション

アンチセンス及びセンス RNA プロブは DIG RNA ラベリングキット (ロシュ社) を使用して調製した。ホルマリン固定組織はパラフィン包埋を行い、7  $\mu$ m の切片を作製した。*in situ* ハイブリダイゼーションは、ペンタナ HX ディスカバリーシステム (ロシュ社) を使用して行い、最終的なアルカリホスファターゼシグナルを NBT/BCIP の発色から検出した。

### (4) 細胞培養

黒毛和種牛子宮から常法に従い、内膜間質細胞及び上皮細胞を分離し、10%ウシ胎子血清を含む DMEM/F12 培養液で培養した。ヒト組換え型 HB-EGF (和光社; 0.1~100 ng/mL) を内膜細胞に処理して 48 時間培養後、WST-8 による発色法、あるいは計算盤を使用した方法により細胞数を計測した。また、各培養細胞から総 RNA を抽出し、遺伝子発現を検索した。

(5) siRNA 実験

標的遺伝子の1本鎖オリゴDNAの設計は、BLOCK-iT™ RNAi Designer (Invitrogen社)を用いて行い、BLOCK-IT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP (Invitrogen社)に挿入してコンストラクトを構築した。培養細胞への導入は、ExGen 500 (Fermentas社)を用いて実施し、導入効率は蛍光顕微鏡観察下でGFPの蛍光から評価した。

4. 研究成果

(1) HBEGF 及び EGFR の遺伝子発現解析

ウシ子宮内膜及び胎盤組織から、HBEGF 及び EGFR cDNA をクローニングし塩基配列を解析したところ、各遺伝子が発現していることが明らかになった。さらに、妊娠に伴う子宮内膜及び胎盤組織における各遺伝子の発現動態を QPCR で調べたところ、HBEGF 遺伝子の発現は妊娠の経過に伴い子宮内膜組織で増加したが、胎子側の絨毛叢や絨毛叢間胎膜では顕著な変動は認められなかった(図1)。一方、EGFR 遺伝子の発現は子宮内膜において胎盤節を形成する子宮小丘で特異的に増加した。絨毛叢や絨毛叢間胎膜においても、妊娠60日以降で増加する傾向であった(図2)。これらの結果から、HBEGF と EGFR の発現は発情周期及び妊娠の各期で異なることが初めて明らかとなり、この特徴的な発現動態が着床や胎盤形成に重要であることが示唆された。

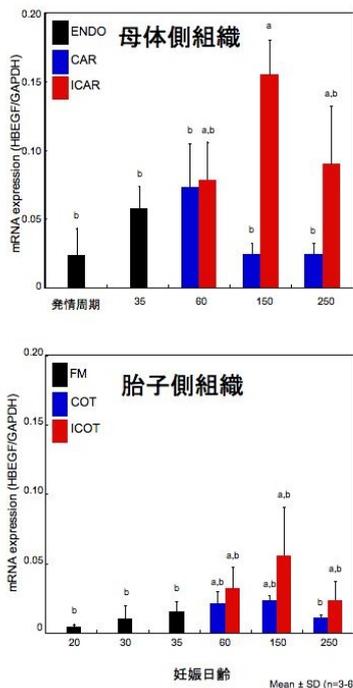


図1 ウシ子宮および胎盤における HBEGF 遺伝子の発現動態

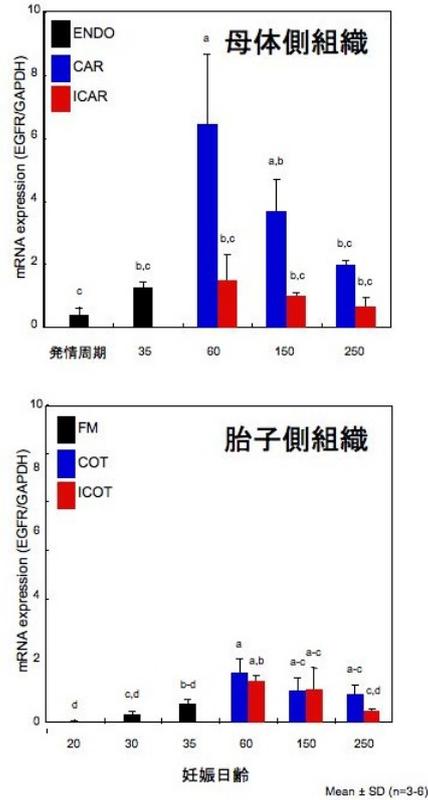


図2 ウシ子宮および胎盤における EGFR 遺伝子の発現動態

(2) HBEGF 及び EGFR 遺伝子の局在

in situ ハイブリダイゼーション法にて発情周期及び妊娠19日齢子宮内膜、妊娠60日齢の胎盤節組織における各遺伝子の局在を検索したところ、HBEGF 遺伝子は内膜上皮や腺上皮、子宮小丘の間質細胞に局在が認められた(図3)。一方、EGFR 遺伝子の発現も子宮小丘部位の間質細胞、内膜上皮細胞に認められたが、HBEGF の場合と比較すると染色性は弱いことがわかった(図4)。

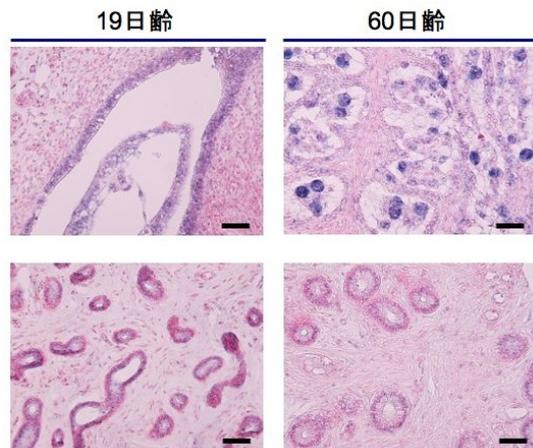


図3 ウシ子宮内膜および胎盤組織における HBEGF 遺伝子の局在

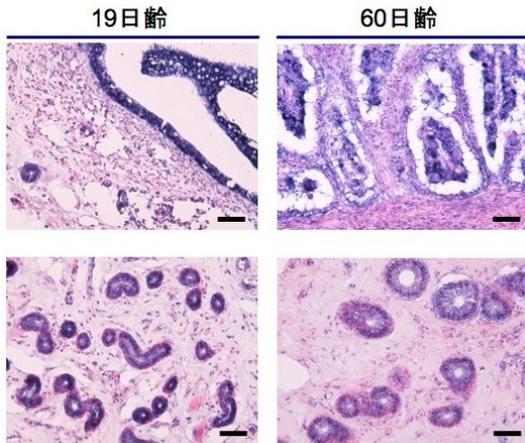


図4 ウシ子宮内膜および胎盤組織におけるEGFR遺伝子の局在

(3) 培養ウシ子宮内膜上皮および間質細胞におけるHBEGFとEGFR遺伝子の発現とHBEGFの生物活性

in vitroの解析を進めるため、発情期子宮から子宮内膜上皮細胞及び間質細胞を分離して培養し、各細胞における各遺伝子の発現

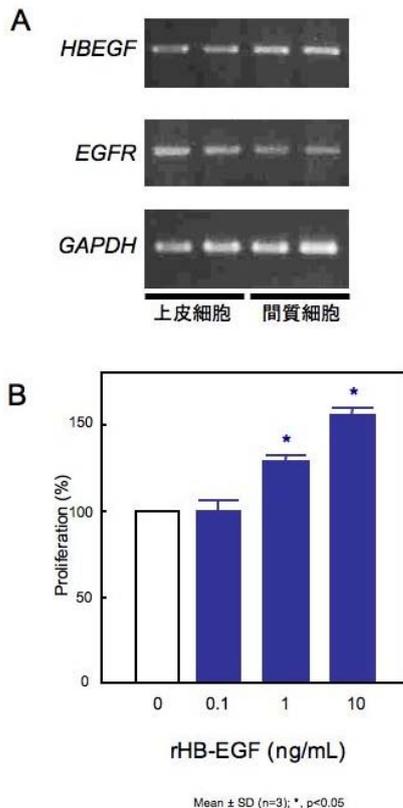


図5 培養ウシ子宮内膜上皮および間質細胞におけるHBEGF及びEGFR遺伝子の発現とHBEGFの生物活性

をRT-PCR法にて調べた。HBEGF及びEGFR遺伝子共に、両培養細胞に発現していることが確認された(図5A)。ヒト組換え型HB-EGF

(0.1~100 ng/mL)を培養ウシ子宮内膜細胞に処理して増殖効果を検討したところ、濃度依存的な増殖促進効果が認められたことから、HB-EGFはウシ子宮内膜細胞に対して増殖活性を示すと共に、EGFR経路による増殖機構の存在が明らかとなった(図5B)。これらの細胞を使用することで、in vitroにおけるHB-EGF・EGFRシステムへのメタロプロテアーゼおよびヘパラーゼ相互作用のさらなる詳細な解析が可能になると考えられる。

(4) マトリックスメタロプロテアーゼ関連因子の発現動態

HB-EGFの活性化プロセッシング機構におけるメタロプロテアーゼ系の関与を明らかにするため、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-2及びMMP-9の発現動態について調べたところ、MMP-2については妊娠の進行に伴い、子宮内膜での発現は減少傾向を示し、胎盤節を形成する絨毛叢及び絨毛叢間胎膜では妊娠後期に発現が増加することが明らかになった。一方、MMP-9の遺伝子発現も子宮内膜及び胎盤組織において認められたが、その発現量はMMP-2と比較して僅かであり、また妊娠に伴う変化は認められなかった。さらに、MMPの産生や活性化に関与するEMMPRINについても発現動態を調べたところ、妊娠に伴い特徴的な発現パターンを示すことが初めて明らかになった。また、in situハイブリダイゼーションの結果から、MMP-2及びMMP-9遺伝子は着床期の胎子-母体接着領域の子宮小丘間質層に発現していることが明らかとなり、本領域でのHBEGF活性化に関与している可能性が示唆された。EMMPRINについても同様に、着床期の受胎産物に強い発現が認められたことから、MMPの産生、あるいは、活性化を促進することによりHBEGF/EGFR系の活性化に関与していることが考えられた。

(5) HBEGFがウシ子宮内膜細胞に及ぼす生物活性の分子機構の解析

HBEGF/EGFRシステムの分子機構を解明すべくsiRNAを使用した方法を試行した。現時点では、実際の標的遺伝子をノックダウンするまでには至っていないが、培養細胞への効率的な導入法の構築及び遺伝子発現抑制法を確立した。今後、本法を利用して詳細な解析が可能になったと考える。

## 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2件)

①Mishra BM, Kizaki K, Koshi K, Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Sato T, Ito A, Hashizume K. (2010)

Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and its related extracellular matrix degrading enzymes in the endometrium during estrous cycle and early gestation in cattle. *Reprod. Biol. Endocrinol.* (accepted) 査読有

② Kizaki K, Ushizawa K, Takahashi T, Yamada O, Todoroki J, Sato T, Ito A, Hashizume K. (2008)

Gelatinase (MMP-2 and -9) expression profiles during gestation in the bovine endometrium. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6: 66. 査読有

[学会発表] (計6件)

①Mishra BM, Kizaki K, Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Sato T, Ito A, Hashizume K. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer during bovine pregnancy

第102回日本繁殖生物学会大会, 平成21年9月12日, 近畿大学農学部 (奈良県)

②木崎景一郎, 橋爪一善.

子宮内膜のターンオーバーとMMP, 第14回日本病態プロテアーゼ学会学術集会, 平成21年8月22日, 千里ライフサイエンスセンター (大阪府)

③Kizaki K, Tanaka Y, Suzuki Y, Furusawa T, Ushizawa K, Hosoe M, Takahashi T, Hashizume K.

Isolation of binucleate trophoblastic cells from bovine placenta, 42nd Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 平成21年7月19日, David L. Lawrence Convention Center, Pittsburgh, Pennsylvania (米国)

④木崎景一郎, 伊賀浩輔, 牛澤浩一, 高橋透, 橋爪一善.

ウシ子宮内膜組織におけるへパリン結合性EGF様増殖因子の発現, 日本畜産学会第110回大会, 平成21年3月27日, 日本大学 (神奈川県)

⑤ Kizaki K, Sugawara K, Hasegawa Y, Hashizume K.

Model of the Caruncular Cell Proliferation in Bovine and Gene Expression Profiling in the Model, 41st Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction,

平成20年5月30日, Sheraton Keauhou Bay Resort and Spa, Kailua-Kona, Hawaii (米国)

⑥田中義顕, 木崎景一郎, 橋爪一善.

ウシ栄養膜由来細胞系、BT-1細胞の増殖と分化に及ぼすRA、PMAおよびFGFの影響, 第144回日本獣医学会学術集会, 平成19年9月4日, 酪農学園大学 (北海道)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木崎 景一郎 (KIZAKI KEIICHIRO)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号: 40337994

### (2) 研究分担者

橋爪 一善 (HASHIZUME KAZUYOSHI)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号: 10355737

### (3) 連携研究者

伊賀 浩輔 (IGA KOSUKE)

(独) 農業・食品産業技術総合研究機構・

東北農業研究センター・主任研究員

研究者番号: 00343963

(H19: 研究分担者

H20~H21: 連携研究者)