

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03099

研究課題名(和文)ウシ子宮外組織における妊娠応答機構の解明

研究課題名(英文)Pregnancy-specific responses in bovine extra uterine organs

研究代表者

高橋 昌志(Masashi, Takahashi)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：10343964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ウシ妊娠応答を子宮外組織で時間的、空間的に明らかにし、胚の産生するインターフェロン(IFN)の関与動態の解明を目的とした。着床前のウシ胚が子宮内でのIFNの産生ピークである妊娠18日前後の子宮頸管における妊娠依存的なIFN誘導遺伝子の発現増加とともに、頸管粘液中へのIFNの直接移行を初めて明らかにした。加えて、頸管組織の網羅的発現遺伝子解析により、IGFBP3が排卵直前での顕著な増加が明らかとなった。本成果より、低侵襲的に採取可能な頸管組織から妊娠および発情関連因子の検出可能性が示唆され、早期妊娠、発情検出技術開発可能性が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、着床前に子宮内で成長しながら妊娠認識物質であるIFNの産生が最大になる18日前後の早期妊娠時に低侵襲かつ簡易迅速に採取可能な頸管組織における妊娠特異的な遺伝子発現および子宮内のIFNの直接検出を初めて明らかにした。加えて、頸管における発情特異的な発現を示すIGFBP3の遺伝子、蛋白の検出の可能性も提起することができた。本成果は、子宮組織や胚に影響を及ぼすことなく子宮内の胚の直接存在が検出可能であることを国内外での初知見である。今後は、妊娠特異的な発現遺伝子の検出と低侵襲的な早期妊娠検出技術開発への指標として期待されるとともに、発情検出に係る指標の検出と有用性も期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the bovine pregnancy response in extrauterine tissues temporally and spatially and to elucidate the kinetics of the involvement of interferon (IFN) produced by the embryo. We first detected IFN in the cervical mucus as well as the pregnancy-dependent increase in IFN-induced gene expression in the cervix around 18 days of pregnancy, when preimplantation bovine embryos are at their peak production of IFN in the uterus. In addition, RNA sequence analysis of cervical tissue has revealed a marked increase in IGFBP3 expression just before ovulation. These results suggest the possibility of detecting pregnancy- and estrus-related factors in cervical tissues that can be collected less-invasively, and the development of early pregnancy and estrus detection technology is expected.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ウシ 妊娠認識 子宮頸管 インターフェロンタウ インターフェロン誘導遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

受胎率を高めるためには、牛の栄養飼養管理、発情の高精度検出、授精技術などの措置が必須であることは言うまでもないが、妊娠不成立の個体を迅速に発見し、次の授精措置を速やかに行うことも受胎率のみならず空胎期間の短縮としての生産性向上につながるための重要な点である。乳牛においては、授精後の受精成立、胚発生、妊娠認識、着床及び胎盤形成を経て胎子成長と分娩に至る 280 日にわたる期間で様々な時点での胚損耗を経て最終的に産子が得られることになる。その過程で 17%の不授精、授精成立後、1 週間内の胚損耗が 19%、2-4 週間目で 31%と、およそ半数が受精後失われ、特に着床前の胚損耗が約 3 割を占めることが報告されている。人工授精や受精卵移植処置後に受胎確認が実施され、不受胎確認個体では新たな受胎措置がなされる。現在、牛の妊娠診断方法は、超音波診断法や直腸検査法が主流であり、いずれもその信頼度は高いものの、診断が行われるのは授精後一か月以上経過してからである。したがって、牛の発情周期は 21 日であることから、妊娠診断により不受胎確定までの間に人工授精を行う機会を 1 回または 2 回逃すことを意味する。逆に、不受胎牛を速やかに発見し、人工授精を行い受胎すれば、事実上の受胎性向上が可能となる。

現在活用されている早期受胎の可否を確認する手法としては、受精不成立による発情回帰による行動、超音波診断装置による卵胞観察、妊娠成立によって退行しなかった黄体から分泌されるプロゲステロンの血中・乳中の濃度測定、および、近年普及しつつある妊娠 30 日後の胎盤由来妊娠糖タンパク質(PAG)の測定などがある。しかし、黄体退行の時期が個体によっては一定ではないため、プロゲステロン量の増減を評価する際に、黄体未退行による延長なのか、妊娠に伴って維持されているのかの見極めが難しいとともに採取のタイミングの問題も残っている。さらに、乳や血液試料のサンプリング後、前処理や測定に時間を要することや、受託測定の場合、測定機関への発送、測定結果の入手に要する時間等から、授精措置後の受胎不成立時の 21 日前後での発情回帰の判定および速やかな受精処置までには間に合わない可能性が生じ、早期判定技術としてはまだ改善の余地が残されている。また、発情回帰に伴う行動量増加、LH サージによる体温の上昇、頸管粘液成分内ミネラル変動による電気インピーダンス値のリアルタイム検出としてのセンサーが開発されており、発情回帰としての非妊娠診断判定への利用も整備されつつあるが、機器整備へのコスト支出は必要である。

## 2. 研究の目的

これまでの国内外の研究の基本アプローチは、妊娠に伴う子宮組織、黄体組織や血液細胞を用いた妊娠応答の検出が主であり、「胚からの IFN」「子宮」「血流」「血液細胞」との傍分泌、内分泌的なシグナルの流れから実施されてきた。これに対して、申請者らは「子宮」「頸管」「外子宮口」「腔前庭」の接続基本構造に着目し、子宮頸管および外子宮口周辺部組織にも子宮内に分泌された IFN の作用が及ぶ可能性を作業仮説として ISG15, MX1, 2 の 3 種の遺伝子発現量を解析した結果、驚くべきことに妊娠 17-18 日目の子宮頸管出口付近の外子宮口粘膜組織で非妊娠組織と比べて 80 倍の ISG15 の発現上昇を検出した。この新知見は、国内外で実施されてきた遺伝子発現の解析研究で得られた、胚から産生される IFN の直接感作を受ける子宮内膜組織での高い応答性に匹敵する発現上昇であると同時に、これまで国内外で報告された妊娠 18 日前後での末梢血白血球での 2-数倍程度の ISG 発現増加を遙かに上回る発現応答性であった。

しかし、応答性の妊娠継時的変化、子宮からの距離による応答性、特に IFN の関与の有無、ならびに ISG 以外の妊娠特異応答因子に関する機構は未解明であり、関連研究も皆無である。本研究では、子宮外における妊娠応答性を ISG の時間、空間的に明らかにし、簡易妊娠判定への実用性を評価するとともに、遺伝子ならびにタンパク質の網羅的な発現解析を行うことで、新規応答因子の探索ならびに IFN の関与動態や生理機能を解明するとともに、より低侵襲的、簡易、迅速な妊娠判定への利活用の可能性を探ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) ISG 発現の時間、空間的変動解析と評価

人工授精実施乳牛を対象にし、授精後 14, 18 および 25 日目の子宮頸管(cervical mucosal membrane:CMM)中深部、外子宮口および腔最深部の組織を低侵襲的に採取し、40-50 日目の超音波診断による妊娠確定後、妊娠、非妊娠区分けてリアルタイム PCR による ISG15, IFIT1,2,3, 遺伝子発現量の比較解析により、応答性の時間的、子宮からの距離的な動態を解析した。

### 2) 妊娠子宮頸管における ISG 刺激因子の同定

採取した妊娠および非妊娠 CMM から IFN 抗体を用いた検出を行った。また、採取組織と非妊娠牛由来白血球との共培養による ISG 誘導の可否を解析した。

### 3) 子宮頸管における新規妊娠/非妊娠応答因子の探索と検証

IFN の産生がピークになる day18-19 の外子宮口の CMM を主な解析対象としてトランスクリプトーム解析を実施し、発現遺伝子および産生タンパク質を探索し、妊娠固有、あるいは IFN 応答因子の動態を解析した。

## 4. 研究成果

### 1) ISG 発現の時間、空間的変動解析と評価

CMM における妊娠、非妊娠牛の時期別 ISG15 発現は、妊娠牛での増加並びに、IFN 産生が最も高くなる妊娠 18 日目での発現増加と、産生が低下する着床時期での発現低下がみられた(図1)。

外子宮口や腔壁における ISG15 の発現については、胚から産生された IFN の直接感作を受ける子宮内膜組織での高い発現量に匹敵する増加が頸管ならびに外子宮口周辺の頸管出口付近でも起こっていることが示され、同時に採取した 18 日目の妊娠個体末梢白血球でみられた約 5 倍の発現増加量を遙かに上回るものであった(図2)。また、ISG として知られる IFIT についても IFIT1,2 における d18 の有意な増加がみられた(図3)。

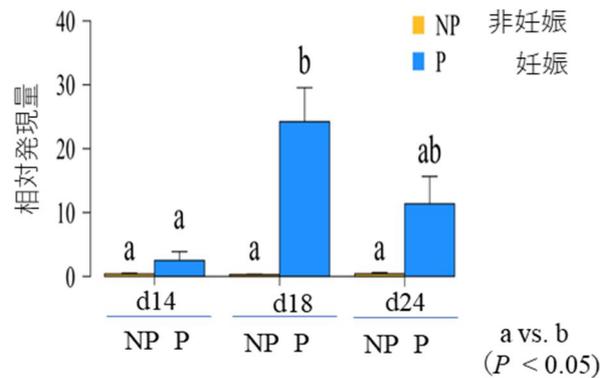


図1 子宮頸管におけるインターフェロン応答遺伝子 (ISG15) の妊娠、非妊娠時期別発現

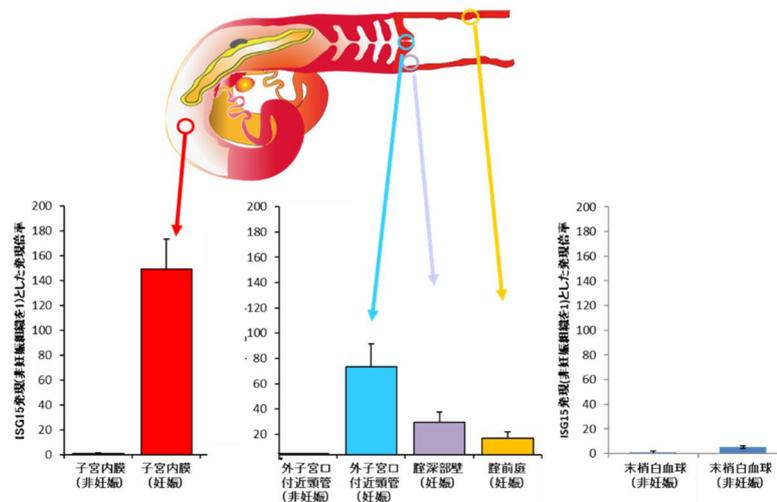
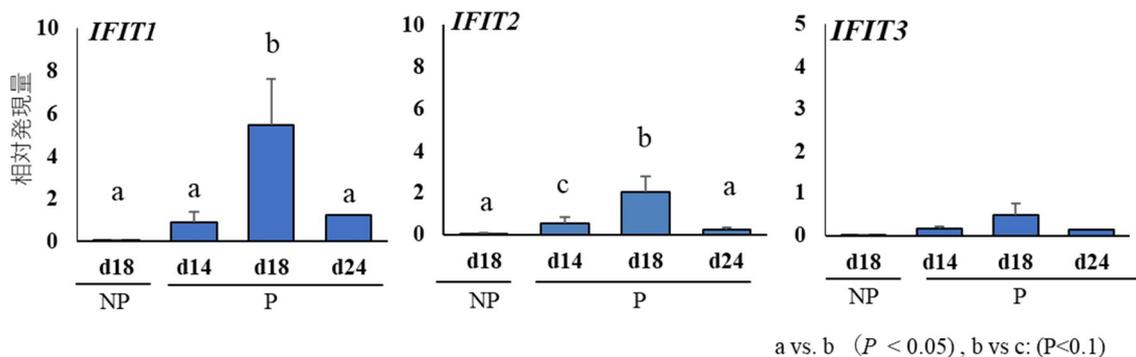


図2 インターフェロン応答遺伝子 (ISG15) の部位別発現の比較



a vs. b ( $P < 0.05$ ), b vs. c ( $P < 0.1$ )

図3 子宮頸管における妊娠経時的な IFIT 発現の変化

本解析結果より、妊娠特異的な interferon 誘導遺伝子は、頸管で顕著な発現上昇を示すとともに、胚が産生する IFN の産生量の変動と同様な発現を示すことが明らかになった。加えて、子宮からの距離が離れるにしたがって ISG の発現増加も減少することから、妊娠子宮内の胚からの因子が時間、空間的に子宮外組織に影響を及ぼすことが初めて明らかになった。

### 2) 妊娠子宮頸管における ISG 刺激因子の同定

D18 の CMM から IFN が検出された(図 4a)。また、d14, 18, 24 の妊娠経過 CMM においては、d18 で IFN のバンドが検出された(図 4b)。

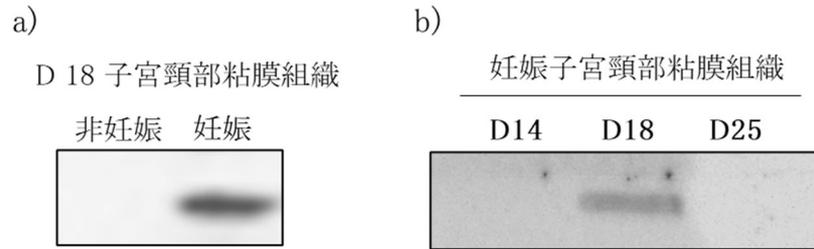


図 4. 妊娠、非妊娠および、妊娠の進行に伴う頸管組織における IFN の検出

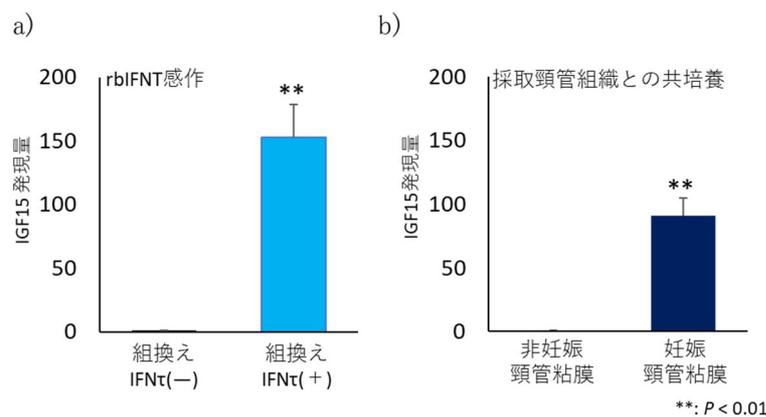


図 5. 妊娠、非妊娠および、妊娠の進行に伴う頸管組織における IFN の検出

妊娠頸管粘膜組織が I 型 IFN 活性を持つかどうかを評価するため、採取綿棒中の CMM サンプルを同じ希釈度として調製した液を非妊娠ウシ抹消白血球(PBL)に添加し、妊娠 CMM 中に含まれると想定される I 型 IFN 活性指標としての ISG15 誘導の有無を解析した。まず、PBL において、IFNT 刺激により ISG15 発現が誘導されることを確認した(図 5a)。次に、PBL に対し非妊娠または妊娠ウシ由来 CMM を添加して培養したところ、妊娠ウシ由来 CMM 溶解希釈液を添加した場合、非妊娠ウシ由来 CMM 希釈液を添加した場合の PBL と比較して有意に高い ISG15 の発現がみとめられた(図 5b)。これに対して、CMM 希釈液のみからは、ISG15 発現は検出されなかった。

これらの結果から、妊娠 18 日の子宮内胚から産生ピークを迎える IFN は、これまで知られていた妊娠認識維持に寄与していることのみならず、子宮内から頸管に移行し、外子宮口で検出が可能であることが初めて明らかになった。

### 3) 子宮頸管における新規妊娠/非妊娠応答因子の探索と検証

人工授精 18 日目で採取した妊娠および非妊娠 CMM から RNA を抽出して RNA sequencing による発現変動遺伝子解析を行った。

複数の発現変動遺伝子が確認され、その中で妊娠で発現減少する遺伝子として(IGFBP3)が見いだされ、その動態に注目した解析を行った。その結果、発情期に高い発現がみられ(図 6a)、さらに発情期における詳細な変動を解析したところ、発情(排卵)1 日前に有意な増加がみられた(図 6b)。加えて採取 CMM における IGFBP3 タンパク質の検出と変動を見たところ、遺伝子発現と同様の変動がみられた(図 6c)。本結果より、新たに頸管組織における発情特異的な IGFBP3 の動態が明らかになった。

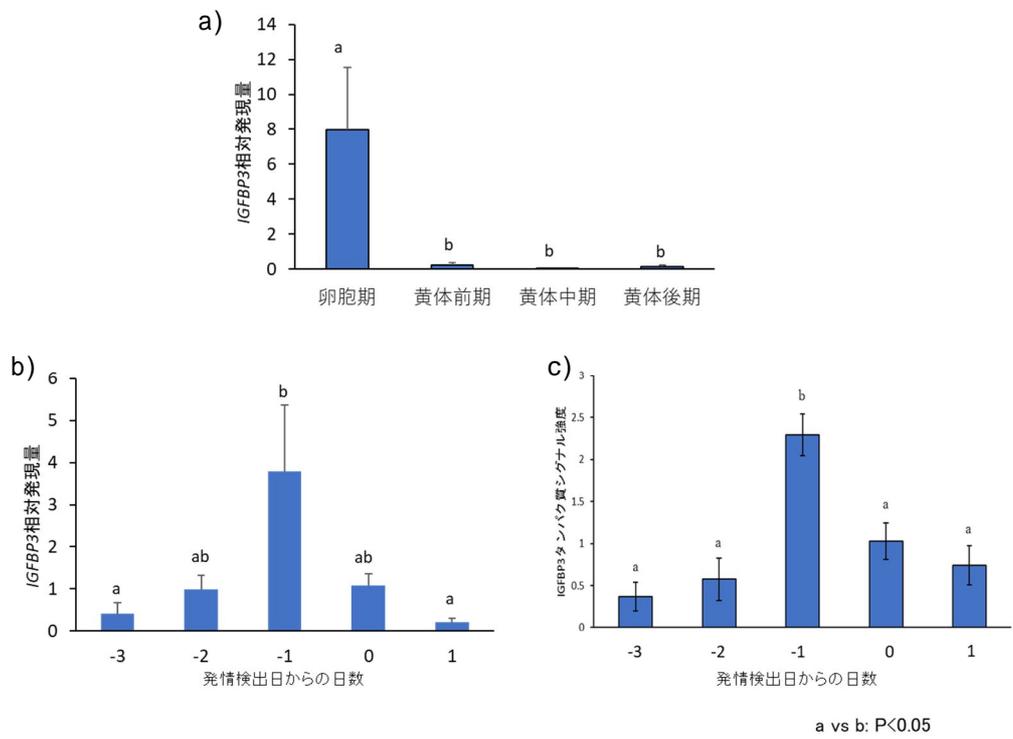


図6. 妊娠、非妊娠および、妊娠の進行に伴う頸管組織における IGFBP3 の検出

本研究成果は、子宮外組織である頸管部周辺位における妊娠特異的な発現遺伝子の検出と変動を始めて明らかにした成果であり、と、低侵襲的な早期妊娠検出技術開発への指標として期待されるとともに、発情検出に係る指標の検出と有用性も期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 高橋昌志	4. 巻 41
2. 論文標題 牛の子宮外組織における早期妊娠応答性検出の試み	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 繁殖技術	6. 最初と最後の頁 3-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高橋昌志	4. 巻 304
2. 論文標題 ウシの簡易・高精度な早期妊娠応答性検出の試み	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 家畜人工授精	6. 最初と最後の頁 3-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 BAI Hanako, SHABUR Talukder Md Abdus, KUNII Hiroki, ITOH Tsukino, KAWAHARA Manabu, TAKAHASHI Masashi	4. 巻 65
2. 論文標題 Evaluation of the immune status of peripheral blood monocytes from dairy cows during the periparturition period	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 313 ~ 318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Rahman Al Nur Md. Iftexhar, Yamashita Seiya, Islam Md. Rashedul, Fujihara Taisuke, Yamaguchi Hayato, Kawahara Manabu, Takahashi Masashi, Takahashi Hideyuki, Gotoh Takafumi, Yamauchi Nobuhiko	4. 巻 91
2. 論文標題 Type I interferon regulates matrix metalloproteinases clearance of the bovine endometrial spheroid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Bai Hanako, Ukita Haruka, Kawahara Manabu, Mitani Tomohiro, Furukawa Eri, Yanagawa Yojiro, Yabuuchi Naoto, Kim Heejin, Takahashi Masashi	4. 巻 91
2. 論文標題 Effect of summer heat stress on gene expression in bovine uterine endometrial tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13474	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kunii Hiroki, Kubo Tomoaki, Asaoka Natsuki, Balboula Ahmed Z., Hamaguchi Yu, Shimasaki Tomoya, Bai Hanako, Kawahara Manabu, Kobayashi Hisato, Ogawa Hidehiko, Takahashi Masashi	4. 巻 569
2. 論文標題 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and machine learning application for early pregnancy detection using bovine vaginal mucosal membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 179 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.07.015	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 唄 花子、川原 学、高橋昌志	4. 巻 43
2. 論文標題 いまさら聞けない、インターフェロン・タウと妊娠認識の話	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本胚移植学雑誌	6. 最初と最後の頁 85-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 嶋崎 知哉, 窪 友瑛, 國井 宏樹, 浜口 悠, 浅岡 那月, 唄 花子, 川原 学, 小川 英彦, 小林久人, 高橋 昌志
2. 発表標題 ウシ子宮頸管粘膜組織における妊娠時発現低下遺伝子の検出
3. 学会等名 日本繁殖生物学会113回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 國井 宏樹, 窪 友瑛, 浅岡 那月, 嶋崎 知哉, 古山 敬祐, 木村 康二, 唄 花子, 川原 学, 高橋 昌志
2. 発表標題 妊娠ウシ子宮頸管におけるISGs発現誘導へのIFNTの直接関与
3. 学会等名 日本繁殖生物学会113回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 唄 花子, 三谷 朋弘, 川原 学, 高橋 昌志
2. 発表標題 夏季および冬季におけるウシ子宮内膜組織の遺伝子発現の検証
3. 学会等名 日本繁殖生物学会113回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ho Thieu Khoi, Kohei Homma, Jun Takanari, Hanako BAI, Manabu KAWAHARA, Masashi TAKAHASHI
2. 発表標題 Effect of a standardized extract of <i>Asparagus officinalis</i> stem on non-heat shock induction of HSP70 in relation with antioxidant system in bovine cumulus cells
3. 学会等名 日本繁殖生物学会113回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ho Thieu Khoi, Kohei Homma, Jun Takanari, Tomohiro Mitani, Hanako BAI, Manabu KAWAHARA, Masashi TAKAHASHI
2. 発表標題 Effect of a standardized extract of <i>Asparagus officinalis</i> stem on heat-shock protein 70 regulated progesterone synthesis in bovine cumulus-granulosa cells
3. 学会等名 日本畜産学会128回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅岡那月、國井宏樹、古山敬祐、窪 友瑛、浜口 悠、小川 英彦、小林久人、唄 花子、川 原 学、木村康二、高橋昌志
2. 発表標題 ウシ外子宮口粘膜組織におけるIFIT1の妊娠特異的発現
3. 学会等名 日本繁殖生物学会113回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田 寛菜、小松 正明、唄 花子、川原 学、高橋 昌志
2. 発表標題 暑熱負荷培養時のウシ子宮内膜上皮細胞における酸化ストレスの検証
3. 学会等名 日本繁殖生物学会113回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋昌志
2. 発表標題 A new approach for early pregnancy detection in cattle
3. 学会等名 ミズーリ大学動物科学部門 研究セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Natsuki ASAOKA, Hiroki KUNII, Keisuke KOYAMA, Tomoaki KUBO, Yu HAMAGUCHI, Hidehiko OGAWA, Hisato KOBAYASHI, Hanako BAI, Manabu KAWAHARA, Masashi TAKAHASHI
2. 発表標題 Pregnancy-specific expression of IFIT1 in the bovine cervical mucosal membrane
3. 学会等名 マンマーパテイン大学 北海道大学国際ジョイントシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masashi TAKAHASHI
2. 発表標題 Heat stress impact on livestock reproduction
3. 学会等名 ミャンマーパテイン大学 北海道大学国際ジョイントシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masashi TAKAHASHI
2. 発表標題 Heat stress impact on livestock reproduction
3. 学会等名 ベトナム カントー大学 研究セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masashi TAKAHASHI
2. 発表標題 Maternal and fetal recognition of pregnancy and pregnancy detection in cattle
3. 学会等名 ベトナム カントー大学 研究セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國井 宏樹, 窪 友瑛, 浅岡 那月, 嶋崎 知哉, 唄 花子, 川原 学, 高橋 昌志
2. 発表標題 膣底部発現変動遺伝子を用いたRT-LAMP法および機械学習によるウシ簡易迅速妊娠判定モデルの検討
3. 学会等名 日本繁殖生物学会114回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 唄 花子, 國井 宏樹, 川原 学, 高橋 昌志
2. 発表標題 ウシ子宮内膜上皮細胞における暑熱負荷培養時の酸化ストレス応答経路の検証
3. 学会等名 日本繁殖生物学会114回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高橋昌志 第7章「繁殖」p103-120	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 200
3. 書名 畜産学概論 小林 泰男編	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 反芻動物の妊娠判定方法	発明者 高橋昌志 高橋宏樹 国井月乃 伊藤学 川 原花子 唄悳文 鈴木	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、W02019044885A1	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	窪 友瑛  (Tomoaki Kubo)  (50825338)	地方独立行政法人北海道立総合研究機構・農業研究本部 酪 農試験場・研究職員  (80122)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------