

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06385

研究課題名(和文) 血管新生抑制因子によるウシの子宮内膜機能調節とその受胎性への関与

研究課題名(英文) Physiological role of anti-angiogenic factor thrombospondin in the regulation of endometrial function during early pregnancy in cattle

研究代表者

林 憲悟 (Hayashi, Kengo)

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・主任研究員

研究者番号：70563625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、主要な血管新生抑制タンパク質であるトロンボスポンジン(TSP)に着目し、ウシの妊娠初期や長期不受胎に伴う子宮内膜機能の改変におけるTSPの生理的役割を明らかにすることを目的とした。その結果、TSPは胚と子宮内膜間の相互作用により、栄養膜細胞と子宮内膜上皮細胞の接着や栄養膜細胞の浸潤といった、着床に伴う子宮内膜の組織リモデリングや胎盤形成の開始に関与している可能性が示された。さらに、長期不受胎牛の子宮内膜では血管新生が抑制状態にあることが明らかとなり、子宮内膜における適切な血管系の構築が、子宮機能の変化による牛の妊孕性と密接に関連している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、雌牛の受胎機構において、主要な血管新生抑制因子であるトロンボスポンジン(TSP)による子宮内膜血管系の制御および着床に伴う組織再構築の調節因子としての関与という新たな概念が裏付けられた。さらに、子宮内膜におけるTSPの発現動態が長期不受胎牛を摘発するための新たな指標として有用である可能性が示され、TSPを指標とした子宮内膜機能の評価による受胎性の評価法や長期不受胎化の予察法等、雌牛の生産効率改善に資する技術の開発のための基盤的知見を提供する。

研究成果の概要(英文)：This study focused on thrombospondin (TSP), a secreted extracellular matrix protein that plays a major role as a potent angiogenic inhibitor, and aimed to investigate the physiological role of TSP in the regulation of endometrial function during early pregnancy and repeat breeding in cattle. The results demonstrate that TSP may be involved in endometrial tissue remodeling associated with implantation and placental development by interact between the trophoblast and endometrium. In addition, this study showed that repeat breeder cows have a higher expression of both ligands and receptors for TSP and a reduced vascular distribution in the endometrium compared to non-repeat breeder cows, suggesting that the establishment of appropriate endometrial vasculature may be closely associated with fertility in cows due to altered uterine function.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ウシ 子宮内膜 トロンボスポンジン 妊娠 受胎性

1. 研究開始当初の背景

ウシの妊娠早期において、受精後 4 日目頃に子宮に到達した胚は伸長しながら子宮内を浮遊し、2 週目頃から妊娠認識物質であるインターフェロンタウ (IFN) を分泌する。そして、受精から 3 週目頃に子宮内膜表面に対位・接着することで着床が開始する。一方で、着床前の受精後 7~24 日目に胚が死滅して不受胎になることを「早期胚死滅」と呼び、その発生率はウシの全不受胎の約 70% を占めるとされている。早期胚死滅の原因は多岐にわたるが、「胚発生の異常」に加え「子宮内環境の異常」が大きく関与している。ウシの着床と妊娠の成立には胚と協調した子宮内膜機能の適切な変化が不可欠であり、特に着床前の子宮内膜において血管系が密接に関係しており、血流域や血管数の増加が見られる。

妊娠に伴う子宮内膜の血管系の変化は、血管新生および血管リモデリングによる血管網構築を伴い、そこには血管新生因子が関与しているとされている。しかし、主要な血管新生促進因子である血管内皮増殖因子 (VEGF) および塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF2) の妊娠早期のウシ子宮内膜における発現動態を解析した研究では、リガンドおよび受容体ともに、着床前後の子宮内膜では発現が変化しないという結果であった (引用文献 1 および 2)。血管新生は血管新生促進因子と抑制因子のバランスにより制御されていると考えられている。研究代表者はこれまでに得たウシ子宮内膜におけるマイクロアレイ解析の以下の知見より、血管新生促進因子よりも血管新生抑制因子がバランス制御のカギを握るとの着想に至った。

(1) 主要な血管新生抑制因子であるトロンボスポンジン 2 (TSP2) とその受容体 (CD36 および CD47) は、妊娠 18 日目で 15 日目よりも遺伝子発現量が低い。

(2) TSP2 遺伝子発現量は発情周期 18 日目よりも妊娠 18 日目の方が低い。

(3) 生殖器、発情周期、臨床徴候に異常を認めないが人工授精を 3 回以上施しても受胎しないリポートブリーダー牛 (RB 牛) の子宮内膜では、正常に受胎する牛と比較して CD36 遺伝子の発現が亢進している (引用文献 3)。

2. 研究の目的

妊娠早期の子宮内膜の血管系がウシの着床や妊娠成立に重要な役割を担っていると考えられているにもかかわらず、現在までその調節機構の詳細は明らかにされていない。上記の学術的背景とこれまでの知見から、本研究は、主要な血管新生抑制因子である TSP ファミリーに着目し、ウシの妊娠早期や長期不受胎に伴う子宮内膜機能の改変における TSP の生理的役割を明らかにすることで、TSP に制御されるウシの子宮内膜機能と受胎性との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 着床期前後のウシ子宮内膜および胚における TSP ファミリーの発現動態の解析

黒毛和種雌牛より、人工授精後 15 日目 (着床前)、18 日目 (着床開始)、20 日目 (着床時)、27 日目 (着床後) の胚および子宮内膜、発情周期 15 日目、18 日目 (発情=0 日) の黄体側子宮内膜を採取した (n=3-5)。各組織から総 RNA を抽出後、TSP リガンド (TSP1、TSP2) および受容体 (CD36、CD47) の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。

(2) 着床期のウシ子宮における TSP ファミリーのタンパク質発現局在の解析

妊娠 19 および 30 日目の黒毛和種雌牛より採取した子宮を灌流固定し、横断切片における TSP および受容体のタンパク質発現局在を免疫組織化学染色により解析した。

(3) リポートブリーダー (RB) および正常に受胎する牛の子宮内膜における TSP ファミリー発現の解析と血管分布状態の比較

黒毛和種雌牛を供試し、発情周期 15 日目 (発情=0 日) の RB 牛 (n=6) および非 RB 牛 (n=5) より、黄体側子宮角の子宮内膜を採取した。総 RNA を抽出後、血管新生因子である VEGF、FGF2、アンジオポエチン (ANGPT) および血管新生抑制因子である TSP の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。TSP および受容体のタンパク質発現局在を免疫組織化学染色により解析した。子宮内膜の血管分布状態を比較するため、血管内皮細胞マーカーであるフォン・ウィレブランド因子 (vWF) の免疫組織化学染色を行った。各切片において子宮内膜を 20 カ所ずつ無作為に抽出し、切片における血管数は vWF 陽性染色血管数を計測し、vWF 陽性染色占有率は ImageJ/Fiji ソフトウェア (<https://imagej.net/software/fiji/>) を用いて解析した。

(4) ウシ子宮内膜における TSP ファミリー発現に及ぼす IFN の影響

黄体期のホルスタイン種経産牛 4 頭より採取した子宮内膜組織片 (50mg) に、ウシ組換え IFN (100ng/ml)、妊娠 18 日目ウシ栄養膜から抽出したタンパク質 (200ng/ml)、妊娠 27 日目ウシ栄養膜から抽出したタンパク質 (200ng/ml) を添加して 24 時間培養した。各組織から総 RNA を抽出後、TSP および受容体の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。

(5) 胚と子宮細胞間のクロストークにおける TSP ファミリーの生理的役割の解明

TSP1 がウシ子宮内膜上皮細胞および栄養膜細胞の増殖能に及ぼす効果の検証

96 ウェル細胞培養プレートにウシ栄養膜細胞株 (BT-1 細胞、n=8) またはウシ子宮内膜上皮細胞 (n=3) を 1×10^5 cells/ml (1 ウェルあたり 100 μ l) 播種し、3 時間の馴致培養の後、TSP1 (0、1、10、100、1000ng/ml) を添加した。72 時間培養した後、WST-8 を用いた比色法 (Cell Counting Kit-8、同仁化学研究所) により 450nm の吸光度を測定した。

TSP1 がウシ栄養膜細胞の浸潤能に及ぼす効果の検証

マトリゲル基底膜マトリックス (0.25mg/ml) をコートした 24 ウェルセルカルチャーインサート (ポアサイズ 8.0 μ m) に 5×10^4 cells/ml (1 ウェルあたり 500 μ l) の BT-1 細胞を播種し、TSP1 (0、1、10、100、1000ng/ml) を添加した (n=4)。144 時間培養した後、各インサートは非浸潤細胞を除去してディフクイック染色液を用いて染色し、総合倍率 100 倍の顕微鏡下で無作為に抽出した 3 視野の浸潤細胞数を計測し平均値を算出した。

TSP1 がウシ子宮内膜上皮細胞と栄養膜細胞の接着に及ぼす効果の検証

ウシ子宮内膜上皮細胞を播種しコンフルエントに達した 48 ウェル細胞培養プレートに、蛍光色素 (CytoTracker™、Cell Biolabs) をラベリングした BT-1 細胞を加え、TSP1 (0、1、10、100、1000ng/ml) を添加した (n=3)。48 時間の共培養後に非接着細胞を除去し、接着細胞を溶解して 520nm の蛍光波長を測定した。

4. 研究成果

(1) 着床期前後のウシ子宮内膜および胚における TSP ファミリーの発現動態の解析

子宮内膜において、発情周期 15 から 18 日目で各遺伝子の発現量は増加したが、妊娠牛では増加せず、妊娠 18 日目の TSP リガンド (TSP1、TSP2) および CD36 mRNA は発情周期よりも発現量が低かった。よって、妊娠 18 日目において TSP が抑制されることで子宮内膜の血管新生が活発化する可能性が示された。また、妊娠 27 日目の子宮内膜における TSP1、CD36、CD47 mRNA 発現量は、妊娠 15、18 日目より低かった。さらに、胚における TSP1、TSP2、CD36、CD47 mRNA 発現量は、妊娠 18、20、27 日目において 15 日目よりも低かった。これにより、子宮内膜および胚における TSP ファミリー発現量の減少は、着床に伴う組織再構築に関与している可能性が示された。

(2) 着床期のウシ子宮における TSP ファミリーのタンパク質発現局在の解析

妊娠 19 および 30 日目の両方において、TSP1、TSP2、CD36、CD47 タンパク質は子宮内膜の管腔上皮細胞、腺上皮細胞、一部の間質細胞および血管に加え、二核細胞を含む胚の栄養膜細胞に局在することが明らかとなった (図 1)。よって、TSP は胚と子宮内膜の相互作用により、着床に伴う子宮内膜の改変や胎盤形成の開始に関与している可能性が示された。

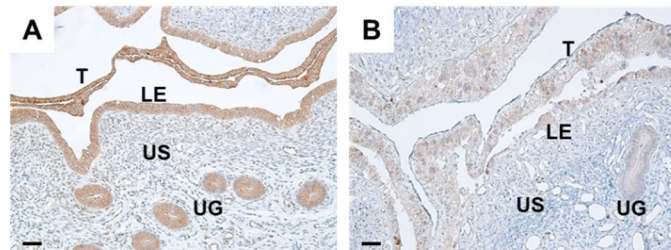


図1: (A) 妊娠19日目および (B) 妊娠30日目のウシ子宮における TSP1タンパク質発現局在 T: 栄養膜細胞、LE: 管腔上皮細胞、UG: 子宮腺、US: 子宮間質 スケールバー=50 μ m

(3) リピーターブリーダー (RB) および正常に受胎するウシの子宮内膜における TSP ファミリー発現の解析と血管分布状態の比較

TSP リガンド (TSP1、TSP2) および受容体 (CD36、CD47) は、RB 牛において非 RB 牛より mRNA 発現量が高かった (図 2)。一方、多くの血管新生因子の発現量は、RB 牛と非 RB 牛の間で有意な差は見られなかった。TSP リガンドおよび受容体は、管腔上皮細胞、腺上皮細胞、一部の間質細胞および血管に局在が認められた。RB 牛は非 RB 牛と比較して子宮内膜の血

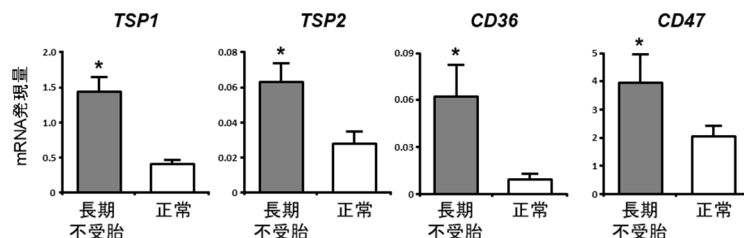


図2: 長期不妊胎牛および正常牛の子宮内膜における、TSPリガンド (TSP1、TSP2) および受容体 (CD36、CD47) の遺伝子発現 (*: $P < 0.05$)

管数が少なく、vWF 陽性染色占有率が低いことが明らかとなり、RB 牛の子宮内膜では血管新生が抑制状態にあることが示唆された。

(4) ウシ子宮内膜における TSP ファミリー発現に及ぼす IFN の影響

ウシ組換え IFN、妊娠 18 日目および妊娠 27 日目ウシ栄養膜由来タンパク質の添加により、ウシ子宮内膜組織片における *TSP1*、*TSP2*、*CD36*、*CD47* mRNA 発現に有意な変化は認められなかった。したがって、胚由来の妊娠認識物質やタンパク質は、妊娠初期の子宮内膜における TSP ファミリー発現の主要な調節因子として作用していないことが明らかとなった。

(5) 胚と子宮細胞間のクロストークにおける TSP ファミリーの生理的役割の解明

TSP1 がウシ子宮内膜上皮細胞および栄養膜細胞の増殖に及ぼす効果の検証

ウシ子宮内膜上皮細胞および BT-1 細胞ともに、TSP1 添加により細胞増殖に有意な変化は認められず、TSP1 は両細胞の増殖には積極的に関与していない可能性が示された。

TSP1 がウシ栄養膜細胞の浸潤能に及ぼす効果の検証

BT-1 細胞の浸潤は、TSP1 (1000ng/ml) 添加により促進された (図 3)。これにより、TSP1 は栄養膜細胞の浸潤を促進することで、ウシ胎盤形成における組織再構築の調節に関与する可能性が示された。

TSP1 がウシ子宮内膜上皮細胞と栄養膜細胞の接着に及ぼす効果の検証

ウシ子宮内膜上皮細胞と BT-1 細胞の接着は TSP1 (1000ng/ml) 添加により抑制された。これにより、研究成果 (1) で明らかとなった、着床期の子宮内膜上皮細胞と胚における TSP ファミリー遺伝子発現の減少は、両細胞の接着を促進する可能性が示された (図 4)。

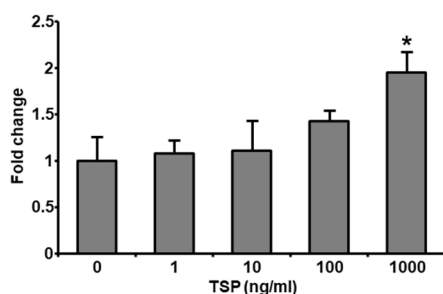


図3: TSP1がBT-1細胞の浸潤能に及ぼす効果 (* : P<0.05 vs. 0ng/ml)

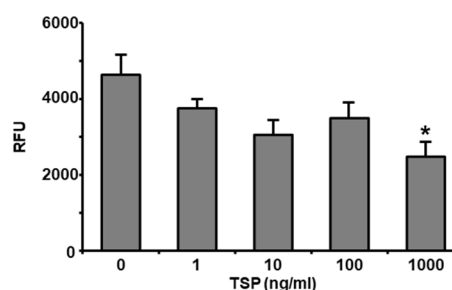


図4: TSP1が子宮内膜上皮細胞とBT-1細胞の接着に及ぼす効果 (* : P<0.05 vs. 0ng/ml)

< 引用文献 >

1. Okumu LA, Forde N, Mamo S, McGettigan P, Mehta JP, Roche JF, Lonergan P. Temporal regulation of fibroblast growth factors and their receptors in the endometrium and conceptus during the pre-implantation period of pregnancy in cattle. *Reproduction*. 2014. 147: 825-834.
2. Hayashi KG, Hosoe M, Fujii S, Kanahara H, Sakumoto R. Temporal expression and localization of vascular endothelial growth factor family members in the bovine uterus during peri-implantation period. *Theriogenology*. 2019. 133: 56-64.
3. Hayashi KG, Hosoe M, Kizaki K, Kanahara H, Saito S, Takahashi T, Sakumoto R. Differential gene expression profiling of endometrium during the mid-luteal phase of the estrous cycle between a repeat breeder (RB) and non-RB cows. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2017. 15: 20.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Ken-Go Hayashi, Ryosuke Sakumoto | 4. 巻 254 |
| 2. 論文標題 Differential expression of pro- and anti-angiogenic factors in the endometrium between repeat breeder and normally fertile cows | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Animal Reproduction Science | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anireprosci.2023.107265 | 査読の有無 有 |
| 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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 林憲悟、作本亮介 |
| 2. 発表標題 リピートブリーダーおよび正常に受胎する牛の子宮内膜における血管新生因子および血管新生抑制因子の発現と血管分布状態の比較 |
| 3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会大会 |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|