

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580419

研究課題名(和文) HBEGF が操る子宮内膜幹細胞ニッチ

研究課題名(英文) The role of HBEGF in bovine endometrial stem cell niche

## 研究代表者

木崎 景一郎 (KIZAKI, Keiichiro)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：40337994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウシ子宮内膜の微小環境(ニッチ)に焦点を当て、子宮内膜幹細胞の増殖分化機構におけるニッチシグナルとしてのヘパリン結合性EGF様増殖因子(HBEGF)の役割について検討した。その結果、EGFRやERBB2が子宮小丘部内膜に豊富に存在すること、HBEGFが示す生物活性の標的は上皮細胞ではなく間質細胞であることが明らかとなり、さらに本効果はMAPK系、特にERKのリン酸化を介していることが考えられた。以上の結果から、HBEGFの標的細胞は間質細胞であり、内膜幹細胞が子宮小丘領域の間質に存在する可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the role of heparin-binding EGF-like growth factor (HBEGF) on bovine endometrial stem cell niche. The present results demonstrated that EGFR and ERBB2 were highly expressed in caruncular endometrium, and HBEGF stimulated the proliferation and migration of endometrial stromal cells through the phosphorylation of ERK, but not in epithelial cells in vitro. These results suggest that endometrial stromal cells will be target cells for HBEGF, and indicating that endometrial stem cell may present in stroma layer in caruncle.

研究分野：農学

キーワード：ヘパリン結合性EGF様増殖因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体内には各種の体性幹細胞が存在し、組織の改変、修復、再生に大きな役割を担っている。子宮内膜は増殖、分化、組織改変という周期性の構造的、機能的变化を繰り返すことから、幹細胞系と強力な再生能・組織構築能の存在が示唆されている。着床はヒトを含む動物の出生率、繁殖効率を左右する重要な機構である。受精胚の着床、胎盤形成過程において、子宮内膜及び栄養膜幹細胞の分化・増殖は必須であり、これらの調和した分化増殖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すことになる。しかし、これら体性幹細胞の分化増殖を誘導、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、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。本増殖因子は膜貫通型タンパク質として産生され、細胞膜上でプロセシング酵素の作用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が、膜結合型 HBEGF も近傍細胞と細胞接着を介して活性を示す。しかし、子宮内膜の幹細胞ニッチにおける HBEGF の機能的役割については明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、着床現象を左右すると考えられる子宮内膜幹細胞の微小環境 (ニッチ) に焦点を当て、胎子側要因との相互作用を検証することを目的とする。

ウシ子宮内膜幹細胞の増殖分化機構におけるニッチシグナルとしてのヘパリン結合性 EGF 様増殖因子 (HBEGF) の役割、着床・胎盤形成時における子宮内膜と胎子側栄養膜の細胞間情報伝達の分子機構について検証し、受胎性向上技術開発の基盤を確立する。

3. 研究の方法

発情周期および妊娠ウシから子宮内膜、絨毛叢組織を採取した。妊娠のステージは、着床期 (妊娠 40 日齢まで)、妊娠初期 (40-100 日)、中期 (100-200 日) および後期 (200 日以降) に大別した。子宮内膜組織として、子宮小丘および小丘間部を分取し、-80℃ に保存した。各組織から TRIzol 試薬を用いて総 RNA を抽出し、High Capacity cDNA 合成キット (アプライド社) を用いて cDNA を調製した。PCR 反応は、Power SYBR 試薬 (アプライド社) を用いて ABI PRISM 7300 リアルタイム PCR システム (アプライド社) により実施した。各遺伝子の定量は、組織由来 cDNA から遺伝子クローニングした標準プラスミドを使用して算出した。

ウシ子宮内膜から常法に従い、内膜間質細胞およ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。栄養膜細胞系 (BT-1, BT-A~L) は、ウシ胚盤胞から作製し継代培養しているものを用いた (Shimada et al. (2001) Placenta; Suzuki et al. (2011) Reproduction)。細胞の増殖能を調べる実験では、CCK-8 試薬 (同仁堂社) を用いて総細胞数を計測した。遊走能を調べる実験では、セルカルチャーインサート (8 μm, ベクトンディッキンソン社) を使用した。また、リン酸化 ERK, JNK および p38 抗体を用いたウエスタンブロット法により、MAPK 系シグナル伝達系の活性化について検討した。

4. 研究成果

(1) HBEGF の作用部位・時期特定のため、発情周期、着床期、妊娠初期、中期および後期の子宮小丘と小丘間領域内膜における EGFR および ErbB 系の発現を定量的 RT-PCR 法により解析した (図 1)。EGFR および ErbB2 の発現は着床期以降の子宮小丘において増加していたが、ErbB3 では顕著な変化は認められなかった。一方、ErbB4 では妊娠初期以降、小丘間部領域で増加していた。着床期以降に著しい増殖を示す子宮小丘部内膜において、HBEGF の受容体として機能する EGFR および EGFR の二量体化に関わりシグナル伝達の活性化を促す ErbB2 の発現が増加していたことから、内膜幹細胞は着床期以降の子宮小丘に豊富に存在する可能性が示唆された。

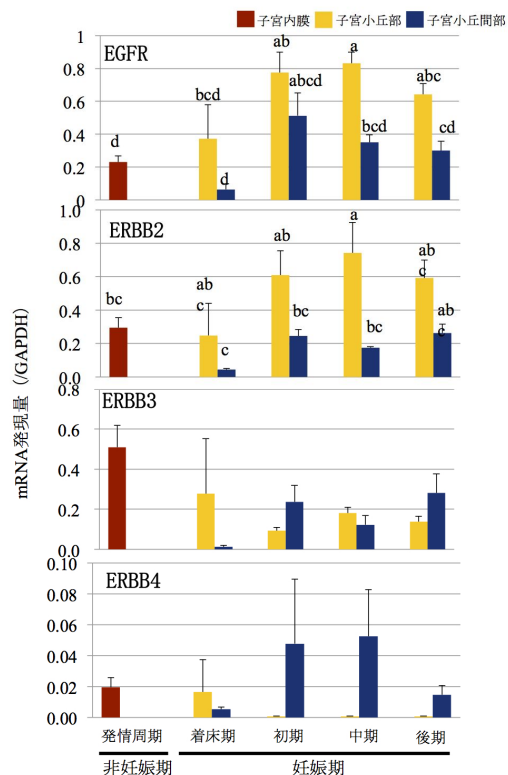


図 1 EGFR および ERBB 系のウシ子宮内膜における発現動態

(2) 子宮内膜細胞への HBEGF の生物活性を明らかにするため、培養子宮内膜細胞への増殖・遊走作用を検討した(図2)。ウシ子宮内膜から分離、培養した間質細胞および上皮細胞に組換え型 HBEGF(1-100 ng/mL)を処理したところ、間質細胞では HBEGF の濃度依存的に増殖能と遊走能が増加したが、上皮細胞では増殖、遊走作用は認められなかった。これらの結果は、HBEGF の標的細胞は子宮内膜間質細胞であること、そして幹細胞が間質に存在する可能性を示している。

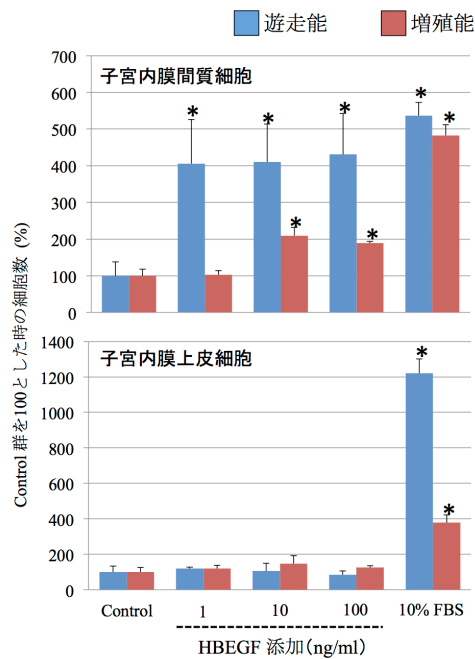


図2 培養子宮内膜間質および上皮細胞の遊走性と増殖性に及ぼす HBEGF の影響

(3) これまでの結果から、ウシ子宮内膜の小丘領域に EGFR および ErbB2 を発現する内膜幹細胞が存在することが示唆されたことから、小丘領域と相互作用し、胎盤節を形成する胎児側絨毛叢・栄養膜細胞における HBEGF、EGFR および ErbB 系について検証した。*in vivo* の絨毛叢における各因子の発現について定量的 RT-PCR 法で調べたところ、EGFR および ErbB 系因子は着床期から妊娠後期にかけて普遍的に発現していた。さらに、HBEGF も発現していたが、妊娠周期に基づく顕著な発現変化は認められなかった。子宮内膜における結果と考え合わせると、子宮小丘領域に存在すると推測される内膜幹細胞は、栄養膜細胞が発現する HBEGF あるいは EGFR を介して Juxtacrine 的に相互作用している可能性が示唆された。

(4) *in vitro* 培養系における機能解析を進めるため、ウシ栄養膜細胞系(BT細胞系)における各因子の発現について検討した(図3

および4)。使用した BT-1 および BT-A から L の 13 細胞系において HBEGF の普遍的な発現は認められたが、TGF- $\alpha$  や FGF-2 等の増殖因子群は細胞系列によって発現動態が異なっていた(図3)。これらの結果は、HBEGF が栄養膜細胞系の機能発現に重要な役割を果たしていることを示している。また、EGFR および ErbB 系因子も 13 細胞系において発現が認められたこと(図4)から、Juxtacrine を介した内膜幹細胞との相互作用解析に有用なツールとして使用できる可能性がある。

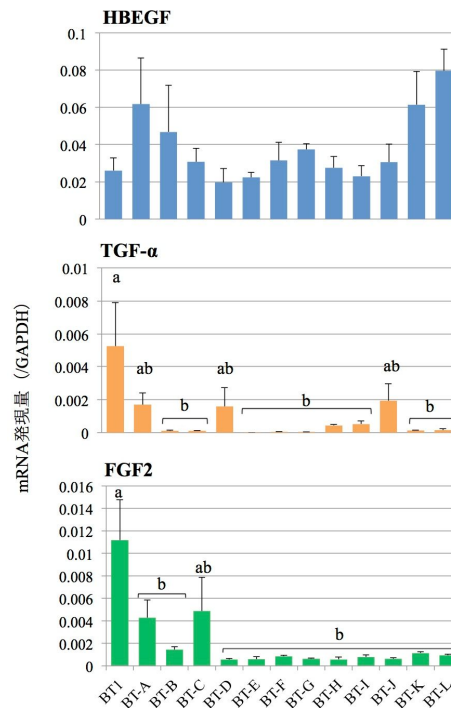


図3 BT細胞系における増殖因子の発現動態

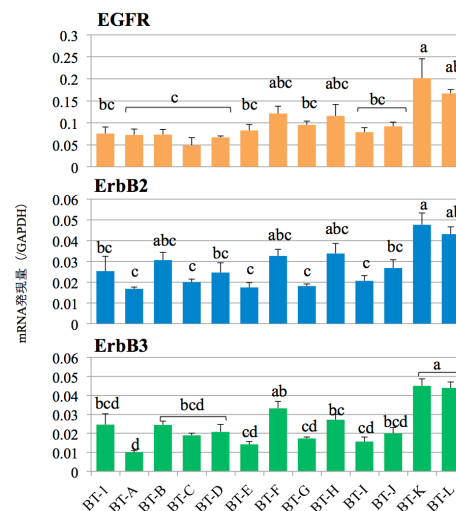


図4 BT細胞系におけるEGFRおよびERBB系の発現動態

(5)これまでの結果から、HBEGFの標的細胞は子宮内膜間質細胞であり、幹細胞が間質、特に子宮小丘に存在している可能性、さらに栄養膜細胞とのJuxtacrine的な相互作用が示唆されたことから、推定された作用様式の細胞間情報伝達分子機構について、*in vitro*培養系を用いて検証した。培養子宮内膜間質細胞の組換え型HBEGF処理(100 ng/mL)によるERK、JNKおよびp38タンパク質のリン酸化について抗リン酸化タンパク質抗体を用いたウエスタンブロット法で調べたところ、JNKおよびp38ではHBEGF処理によるリン酸化は認められなかったが、ERKタンパク質は処理15分後からリン酸化が認められた(図5Aおよび5B)。一方、ウシ栄養膜細胞系(BT細胞系)ではERKとJNKのリン酸化が認められたが、培養子宮内膜上皮細胞では、いずれのシグナルタンパク質のリン酸化は検出されなかった。活性化が認められたMAPK系カスケードと細胞増殖能および遊走能との関連性を調べるために、各カスケード系の阻害剤を用いて検討した。U0126(ERK阻害剤)処理により、HBEGFによる子宮内膜間質細胞の増殖能および遊走能が完全に抑制された(図5C)。また、BT細胞系では、U0126、あるいはSP600125(JNK阻害剤)処理により、遊走能が抑制されることが明らかになった。これらの結果は、HBEGFのEGFRを介した生物活性の発現に、MAPKカスケード系が重要な役割を果たしていること、さらに細胞種により、その経路が異なることを示唆するものである。

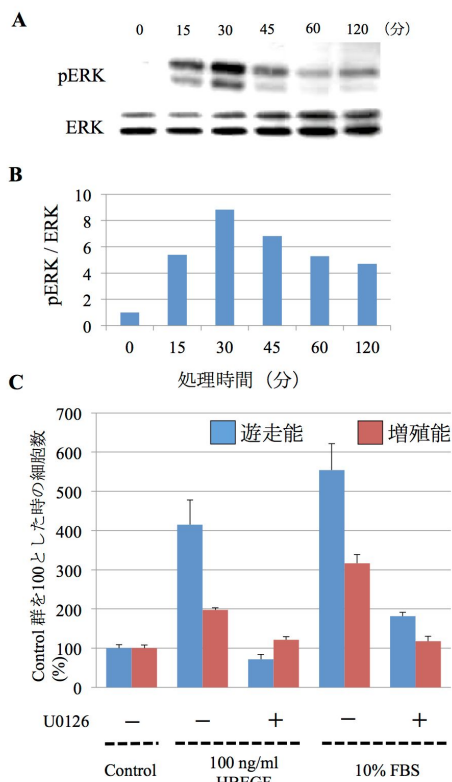


図5 子宮内膜間質細胞におけるリン酸化ERKの検出とERK阻害剤の遊走性、増殖性に及ぼす影響

#### 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4件)

Awad M, Koshi K, Kizaki K, Takahashi T and Hashizume K (2014)

SOLD1 is expressed in bovine trophoblast cell lines and regulates cell invasiveness. *Reprod Biol Endocrinol.* 12:55.

Ohta T, Koshi K, Ushizawa K, Hosoe M, Takahashi T, Yamaguchi T, Kizaki K and Hashizume K (2014)

Expression profiles of perforin, granzyme B, and granulysin genes during the estrous cycle and gestation in the bovine endometrium. *Anim. Sci. J.* 85(7):763-769.

Awad M, Kizaki K, Takahashi T, Hashizume K (2013)

Dynamic expression of SOLD1 in bovine uteroplacental tissues during gestation. *Placenta* 34(8):635-641.

Mishra B, Koshi K, Kizaki K, Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Sato T, Ito A, Hashizume K (2013)

Expression of ADAMTS1 mRNA in bovine endometrium and placenta during gestation. *Domest. Anim. Endocrinol.* 45(1):43-48.

[学会発表](計10件)

林憲悟, 細江実佐, 的場理子, 木崎景一郎, 高橋透, 作本亮介 (2014), アドレノメデュリンによるウシ栄養外胚葉細胞の遺伝子発現動態の変化. 第107回日本繁殖生物学会大会, 2014年8月21日-24日, 帯広畜産大学(北海道)

Awad Mahmoud, 越勝男, 鈴木康規, 木崎景一郎, 橋爪一善 (2013), Bovine SOLD1(a member of Ly-6 superfamily) expression was regulated by scaffold condition. 第156回日本獣医学会学術集会, 2013年9月20日-22日, 岐阜大学(岐阜県)

越勝男, 古澤軌, 徳永智之, 木崎景一郎,

橋爪一善 (2013), ウシ子宮内膜間質細胞を用いた ISG15 および IDO1 遺伝子上流配列のインターフェロン応答性の解析. 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 12 日-14 日, 東京農工大学 (東京都)

林憲悟, 作本亮介, 細江実佐, 木崎景一郎, 橋爪一善, 高橋透 (2013), リピートブリーダーおよび正常に受胎する牛における子宮内膜遺伝子発現の網羅的解析による比較. 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 12 日-14 日, 東京農工大学 (東京都)

古川翔, 木崎景一郎, 橋爪一善 (2012), ウシ着床期におけるヘパリン結合性上皮増殖因子 (HBEGF) の機能解析. 第 105 回日本繁殖生物学会大会, 2012 年 9 月 7 日, 筑波大学 (茨城県)

Aawad M, Kizaki K, Takahashi T, Hashizume K (2012), Expression of SOLD1 in bovine trophoblast cell lines. 第 105 回日本繁殖生物学会大会, 2012 年 9 月 7 日, 筑波大学 (茨城県)

古川翔, 木崎景一郎, 細江実佐, 林憲悟, 高橋透, 橋爪一善 (2012), ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子の着床界面における役割. 第 154 回日本獣医学会学術集会, 2012 年 9 月 16 日, 岩手大学 (岩手県)

## 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・教授  
研究者番号: 4 0 3 3 7 9 9 4

### (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: 1 0 3 5 5 7 3 7  
(定年退職により, 平成 25 年度末をもって研究分担者から削除)