

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292141

研究課題名(和文)ウシ子宮内膜スフェロイドを用いた胚性分泌因子の解明

研究課題名(英文)Elucidation of embryonic secretory factors using bovine endometrial spheroids

研究代表者

山内 伸彦(Yamauchi, Nobuhiko)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00363325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はウシを対象として、胚によって子宮内膜で発現が誘導される遺伝子の解析、およびその遺伝子発現を誘導する胚性分泌因子の同定を目的とした。ウシ伸長期胚の胚性分泌因子についてLC/MS/MS法で解析した結果、6個のサイトカインと2個の成長因子が特定された。さらに、RNAseq解析で得られた結果から、着床期子宮内膜で発現が上昇する遺伝子について上流因子の検索を行ったところ、IFNTに加えてMIFが制御する想定される遺伝子が含まれていた。これらの結果から、IFNT以外の胚性分泌因子としてMIFが着床期子宮内膜機能を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to analyze genes whose expression is induced by embryos and to identify embryonic secretory factors that induce gene expression in cattle. Analysis of the embryonic secretory factor of bovine elongated embryo by LC / MS / MS resulted in the identification of 6 cytokines and 2 growth factors. Furthermore, from the results obtained by RNAseq analysis, upstream factors were analyzed for genes whose expression increased in the endometrium of the implantation period. As a result, in addition to IFNT, genes considered to be controlled by MIF was included. These results suggested that MIF might control endometrial function during implantation as an embryonic secretory factor other than IFNT.

研究分野：動物繁殖生理学

キーワード：ウシ 子宮内膜 スフェロイド 胚性分泌因子 RNAseq LC/MS/MS

1. 研究開始当初の背景

ウシにおいて、胚依存的に子宮内膜で発現の変化する遺伝子が報告されている。ヒトにおいても胚培養上清を用いた解析により、子宮内膜において *Hoxa10* や *Tgf 1* など複数の遺伝子の発現が変化することが報告されている。これらの結果は、胚の分泌する因子が着床に向けて子宮内膜の遺伝子発現を制御している事を示唆しているが、具体的な因子の解析・同定にまでは至っていない。本研究では、他の動物の子宮で報告のあるいくつかの遺伝子をウシ子宮で解析するとともに、次世代シーケンサーを用いて胚性シグナル応答遺伝子を明らかにする。ついで、ウシ伸長期胚の培養上清を質量分析法によって解析し、さらに胚性シグナル応答遺伝子のプロモーターの情報等をもとに胚性分泌因子を絞り込む。加えて、子宮内膜スフェロイドを用いたバイオアッセイ系によって胚性分泌因子を検証し同定する。

2. 研究の目的

子宮が胚を受け入れ着床へと至る、いわゆる“着床ウィンドウ”の開く期間は動物種によって決まっており、胚による制御を受けるものと考えられている。しかし、着床ウィンドウを確立する子宮の遺伝子はいまだ明らかにされていない。また、その発現を誘導する胚性分泌因子に関しても不明のままである。本研究では経済動物であるウシを対象として、胚によって子宮内膜で発現が誘導される遺伝子(胚性シグナル応答遺伝子)の解析、その遺伝子発現を誘導する胚性分泌因子の同定を目的とする。着床を制御する胚性分泌因子が同定されれば、その受精卵移植への応用によって着床・受胎率の向上へ繋がるものと期待される。

3. 研究の方法

ウシ子宮における胚性シグナル応答遺伝子を検索し、その情報から子宮機能を制御する胚性分泌因子を選抜してバイオアッセイに利用することでウシの胚性分泌因子を同定する。(項目1)いくつかの候補遺伝子をウシ子宮で解析するとともに次世代シーケンサーを用いて胚性シグナル応答遺伝子を網羅的に検索する。(項目2) ついで、ウシ伸長期胚の培養上清を LC/MS/MS によって解析し、項目1で得られた情報から胚性分泌因子を絞り込む。(項目3) ウシ子宮内膜細胞の生体外培養系を用いたバイオアッセイによって胚性分泌因子を検証し同定する。

4. 研究成果

(1) 胚性シグナル応答遺伝子の網羅的検索

三つのステージ(卵胞期、黄体期および妊娠18日目の着床期)の子宮をそれぞれ5頭ずつ採取して遺伝子の調整を行い、次世代シーケンサー(RNAsequence解析)による網羅的な解析を行った。その結果、卵胞期、黄

体期および着床期でそれぞれ、11091個、10958個および11000個の遺伝子が発現している事が示された。Fold \geq 2、P<0.05の条件で黄体期と卵胞期の遺伝子発現を比較すると、1161遺伝子が卵胞期(卵>黄区)で、681遺伝子が黄体期(黄>卵区)でそれぞれ高い発現を示した。また、同様の条件で黄体期と着床期を比較すると、305遺伝子が着床期(着>黄区)で、300遺伝子が黄体期(黄>着区)でそれぞれ高い発現を示した。これらの遺伝子をIPA解析の分子および細胞機能で分類すると、卵>黄区では Cellular movement、黄>卵区では Lipid metabolism、着>黄区では Cell death and survival、黄>着区では Cell morphology がもっとも高いP値を示した。

(2) 胚性分泌因子の解析

妊娠18日目のウシ伸長期胚をP4添加DMEM/F12培地で24時間培養し、培養上清中に含まれるタンパク質をLC-MS/MS法で解析した。その結果、培養上清中から1091個のタンパク質が同定され、遺伝子情報へと変換してGO解析によって機能解析を行ったところ、904個の遺伝子について情報を得ることが出来た。しかし、その中には分泌性でない因子も含まれていることが示されたため、分泌性因子の特徴であるシグナル配列を有する159個の因子を胚性分泌因子として同定した。さらにこれらの因子についてIPAのデータベースを用いた解析を行い、子宮内膜環境を制御し得る6個のサイトカイン(IFNT, IFN-tau-c1, FAM3C, MYDGF, AIMP1, MIF)と2個の成長因子(GRN, HDGF)が特定された(表1)。これらの因子は、IFNT以外の全ての因子の遺伝子が子宮内膜でも発現していた。(1)で行ったRNAseq解析の結果から、着床期子宮内膜で発現が上昇する遺伝子についてIPA解析により上流因子の検索を行ったところ、IFNTに加えてMIF(マクロファージ遊走阻止因子)が制御していると想定される遺伝子が確認された。これにより、MIFがウシ子宮内膜の遺伝子発現を制御している可能性が示唆された。

表1 胚性分泌因子に含まれるサイトカインおよび成長因子

	遺伝子	主な機能
サイトカイン	<i>IFNT</i> ・ <i>IFN-tau-c1</i>	PGF2 α の発現抑制
	<i>FAM3C</i>	上皮間葉転換(EMT)
	<i>MYDGF</i>	リンパ系細胞の増殖
	<i>AIMP1</i>	TGF β シグナルの制御
	<i>MIF</i>	細胞増殖
成長因子	<i>GRN</i>	細胞増殖
	<i>HDGF</i>	細胞増殖

(3) 特定された胚性分泌因子の検証

IPA解析により、胚性分泌因子としてIFNTに加えてMIFが着床期子宮内膜の遺伝子発現を制御している可能性が示唆された。着床期子宮内膜で発現が上昇するMIF

下流因子として、ARG1、CCL2、IL7、IL23Aが特定された。RNAseq解析の結果から、IFNTおよびMIFが上流因子として推定される遺伝子を表2に示した。

表2 IPA解析による着床期特異的遺伝子上流因子解析

上流因子	着床期で発現が上昇する遺伝子
IFN	ARG1, B2M, CASP4, CCL2, CCR6, CCR7, CD274, CD40, CREM, CXCL10, EIF2AK2, FAM26F, FCG R1A, GBP5, GBP6, HERC6, IFI27, IFI35, IFI6, IFIT3, IRF1, IRF5, IRF9, ISG15, MX1, OAS2, PARP9, PIM1, PSMB9, RSAD2, SERPING1, SOCS3, STAT1, STAT2, TAP1, USP18, WARS
	MIF
	ARG1, CCL2, CCR6, IL23A, IL7

MIFの受容体であるCD74の妊娠18日目の胚および黄体期および着床期の子宮内膜組織における遺伝子発現をRT-PCRで解析した。その結果、CD74の遺伝子は胚では発現しておらず、子宮内膜組織での発現が確認された(図1A)。さらに、RT-qPCRの解析により、CD74の遺伝子発現は黄体期と比較して着床期で上昇することが明らかとなった(図1B)。さらに、子宮内膜上皮細胞と間質細胞それぞれにおけるCD74の遺伝子発現をRT-PCRで解析した結果、CD74遺伝子は上皮細胞でのみ発現している事が示された。

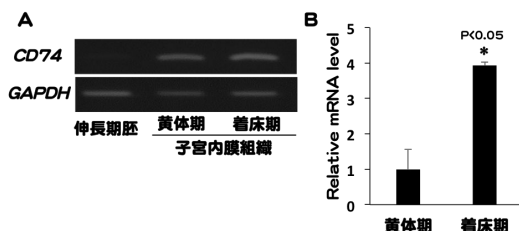


図1 ウシ伸長期胚および子宮内膜組織におけるMIF受容体CD74遺伝子の発現。(A) 妊娠18日目の伸長期胚および黄体期、着床期子宮内膜における遺伝子発現をRT-PCRで解析。黄体期および着床期子宮内膜における遺伝子発現をRT-qPCR (B) で解析。

これらの因子の発現に対するリコンビナントMIF(rMIF)およびIFNTと同じI型IFNであるIFNAの影響について、培養ウシ子宮内膜上皮細胞を用いた解析を行った。遺伝子としては、MIFとIFNTの両方が上流因子として推定されるCLC2、およびMIFのみが上流因子として推定されるIL23Aの発現を解析した(図2)。その結果、CLC2はIFNA添加区で有意な発現上昇が認められた(P<0.05)。一方、IL23AはrMIF添加区においてのみ有意に高い値を示した(P<0.05)。

これらの結果は胚性分泌因子であるMIFが、IFNTとは独立して、MIF独自にウシ子宮内膜上皮細胞の遺伝子発現を制御し得る事を明らかにしたものであり、IFNT以外の胚性分泌因子としてMIFが着床期子宮内膜機能を制御している可能性が示唆された。

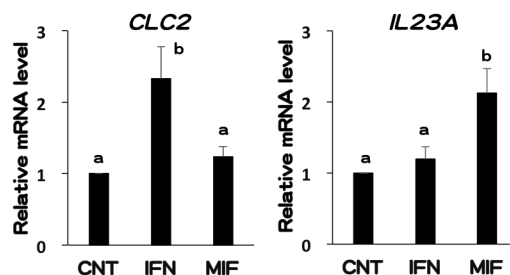


図2 ウシ子宮内膜上皮細胞のCLC2およびIL23Aの発現に対するIFNAおよびMIFの影響。異符号間に有意差あり(P<0.05)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Akizawa H, Nagatomo H, Odagiri H, Kohri N, **Yamauchi N**, Yanagawa Y, Nagano M, **Takahashi M**, **Kawahara M**. Conserved roles of fibroblast growth factor receptor 2 signaling in the regulation of inner cell mass development in bovine blastocysts. Mol Reprod Dev. 2016; 83(6): 516-25.

El-sharawy M, Eid E, Darwish S, El-razek IABD, Islam MR, Kubota K, **Yamauchi N**, El-shamaa I. Effect of Organic and Inorganic Selenium Supplementation on Semen Quality and Blood Enzymes in Buffalo Bulls. Anim Sci J. 2016; accepted for publication on September 15th.

Islam MR, Yamagami K, Yoshii Y, **Yamauchi N**. Growth factor induced proliferation, migration, and lumen formation of rat endometrial epithelial cells in vitro. J Reprod Dev. 2016; 62(3): 271-8.

Yamagami K, Islam MR, Yoshii Y, Mori K, Tashiro K, **Yamauchi N**. Preimplantation embryo-secreted factors modulate maternal gene expression in rat uterus. Cell Tissue Res. 2016; 364(2): 453-63.

Zhao L, Isayama K, Chen H, **Yamauchi N**, Shigeyoshi Y, Hashimoto S, Hattori MA. The nuclear receptor REV-ERBa represses the transcription of growth/differentiation factor 10 and 15 genes in rat endometrium stromal cells. Physiol Rep. 2016;4(2). pii: e12663.

Egashira A, **Yamauchi N**, Islam MR, Yamagami K, Tanaka A, Suyama H, El-Sayed el-SM, Tabata S, Kuramoto T. Kid depletion in mouse oocytes associated with multinucleated blastomere formation and inferior embryo development. Anim Sci J. 2016;87(8):1048-54.

Egashira A, **Yamauchi N**, Tanaka K, Mine C, Otsubo H, Murakami M, Islam MR,

Ohtsuka M, Yoshioka N, Kuramoto T. Developmental capacity and implantation potential of the embryos with multinucleated blastomeres. *J Reprod Dev.* 2015;61(6):595-600.

Yamauchi K, **Yamauchi N**, Yamagami K, Nakamura N, Yamashita S, Md. Rashedul Islam, Tabata S, Yahiro K, Tamura T, Hashizume K, Hattori MA. Development of an in vitro model for the analysis of bovine endometrium using simple techniques. *Anim Sci J.* 2015; 85: 523-31.

Yamagami K, **Yamauchi N**, Kubota K, Nishimura S, Chowdhury VS, Yamanaka K, Takahashi M, Tabata S, Hattori MA. Expression and Regulation of Foxa2 in the Rat Uterus during Early Pregnancy. *J Reprod Dev.* 2014;60:469-75.

〔学会発表〕(計 28 件)

藤原泰佑, 山下聖世, **山内伸彦**. 着床期ウシ子宮内膜における I 型 IFN を介した MMPs の制御機構. 第 122 回日本畜産学会、2017 年 3 月 29 日、兵庫県神戸市.

政家裕典, 西野要, 高橋凜, **山内伸彦**. ウシ伸長期胚が産生するサイトカインおよび成長因子の解析. 第 122 回日本畜産学会、2017 年 3 月 29 日、兵庫県神戸市.

高橋凜, 高武亜衣, 西野要, 政家裕典, **山内伸彦**. ウシ子宮内膜間質細胞におけるプロジェステロン誘導性因子の探索. 第 122 回日本畜産学会、2017 年 3 月 29 日、兵庫県神戸市.

Md. Rashedul Islam, 吉井裕香, 池口祐子, **山内伸彦**. Early implantation in vitro as revealed by co-culture of embryos and cultured uterine explants. 第 109 回日本繁殖生物学会、2016 年 9 月 11 日、神奈川県相模原市.

池口祐子, Md. Rashedul Islam, **山内伸彦**. ラット子宮における線維芽細胞増殖因子受容体の発現解析. 第 109 回日本繁殖生物学会、2016 年 9 月 11 日、神奈川県相模原市.

政家裕典, **山内伸彦**. ウシ伸長期胚が分泌するサイトカインおよび成長因子の検索. 第 109 回日本繁殖生物学会、2016 年 9 月 11 日、神奈川県相模原市.

Mohamed El-Sharawy, Asami Tanaka, Hikaru Suyama, M. R. Islam, **N. Yamauchi**. Effect of Cdc42 inhibitor on maturation rate of mouse cumulus and denuded oocytes during in vitro maturation. The 17th AAAP Animal Science Congress, August 24, 2016, Fukuoka, Fukuoka.

H. Masaka, S. A. A. Musavi, M. R. Islam, **N. Yamauchi**. Screening of embryo secreted factors using bovine elongated embryos. The 17th AAAP Animal Science Congress, August 23, 2016, Fukuoka, Fukuoka.

S.A.A. Musavi, H. Masaka, M. R. Islam,

K. Tashiro, **N. Yamauchi**. Differential gene expression analysis in bovine uterus at follicular, luteal and implantation stage. The 17th AAAP Animal Science Congress, August 23, 2016, Fukuoka, Fukuoka.

M. R. Islam, Yuka Yoshii, Yuko Ikeguchi, **N. Yamauchi**. Development of an in vitro model to study uterine functions using in vitro cultured rat uterine explants. The 17th AAAP Animal Science Congress, August 23, 2016, Fukuoka, Fukuoka.

西野要, 藤原泰佑, Md. Rashedul Islam, **山内伸彦**. ウシ子宮内膜における β -catenin の発現解析. 第 121 回日本畜産学会、2016 年 3 月 26 日、東京都武蔵野市.

高武亜衣, 諫山慧志郎, Md. Rashedul Islam, 藤原泰佑, **山内伸彦**. ウシ子宮内膜上皮細胞のマトリゲル三次元培養. 第 121 回日本畜産学会、2016 年 3 月 26 日、東京都武蔵野市.

諫山慧志郎, 高武亜衣, **山内伸彦**. ウシ子宮内膜上皮細胞における RNA 干渉法を用いた FOXA2 の機能解析. 第 121 回日本畜産学会、2016 年 3 月 26 日、東京都武蔵野市.

山上一樹, 吉井裕香, Md. Rashedul Islam, **山内伸彦**. 胚由来因子による着床期ラット子宮遺伝子の発現調節. 第 33 回日本受精着床会、2015 年 11 月 26 日、東京都江東区.

田中愛咲実, 陶山晃, 山上一樹, 江頭昭義, 蔵本武志, **山内伸彦**. マウスの胎仔線維芽細胞および卵母細胞に対する Cdc42 抑制の影響. 第 33 回日本受精着床会、2015 年 11 月 26 日、東京都江東区.

吉井裕香, 山上一樹, Md. Rashedul Islam, **山内伸彦**. ラット子宮における Sulf1 の発現および局在の解析. 第 108 回日本繁殖生物学会、2015 年 9 月 17 日、宮崎県宮崎市.

陶山晃, 田中愛咲実, 山上一樹, 江頭昭善, 蔵本武志, **山内伸彦**. 染色体制御因子 Kid および Cdc42 抑制による多核化とアポトーシス誘導の関係. 第 108 回日本繁殖生物学会、2015 年 9 月 17 日、宮崎県宮崎市.

Md. Rashedul Islam, 山上一樹, 吉井裕香, **山内伸彦**. In Vitro Culture of Rat Uterine Explants: Characterization, Hormonal Regulation and In Vitro Decidualization. 第 108 回日本繁殖生物学会、2015 年 9 月 17 日、宮崎県宮崎市.

藤原泰佑, 山下聖世, 山上一樹, 田中綾, **山内伸彦**. ウシ子宮内膜におけるカテプシン遺伝子の発現解析. 第 120 回日本畜産学会、2015 年 9 月 11 日、北海道江別市.

K. Yamagami, Md. Rashedul Islam, Y. Yoshii, **Yamauchi**. Preimplantation embryo-secreted factors modulate maternal gene expression in rat uterus. Society for the Study of Reproduction, 48th Annual Meeting, June 18, 2015, San Juan, Puerto Rico.

②S. Yamashita, T. Fujihara, R. Tanaka, Md.

Rashedul Islam, N. Yamauchi. Type I interferon regulates Matrix Metalloproteinases (MMPs) expression of the bovine endometrial cells in vitro. Society for the Study of Reproduction, 48th Annual Meeting, June 18, 2015, San Juan, Puerto Rico.

②山下聖世, 山上一樹, 田中綾, 藤原泰佑, 山内伸彦, 服部眞彰. ウシ子宮内膜ヘテロスフェロイドを用いた MMP 制御機構の解明. 第 118 回日本畜産学会, 2015 年 3 月 29 日, 栃木県宇都宮市.

③田中綾, 山下聖世, 藤江周一郎, 藤原泰佑, 山内伸彦, 服部眞彰. ウシ子宮内膜上皮細胞に対する FGF9 の影響. 第 118 回日本畜産学会, 2015 年 3 月 29 日, 栃木県宇都宮市.

④M. R. Islam, K. Yamagami, Y. Yoshii, N. Yamauchi, MA Hattori. Effects of Epidermal Growth Factor and Hepatocyte Growth Factor on Rat Endometrial Epithelial Cells Proliferation, Migration and Lumen Formation In Vitro. The 16th AAAP Animal Science Congress, November 12, 2014, Yogyakarta, Indonesia.

⑤K. Yamauchi, N. Yamauchi, K. Yamagami, S. Yamashita, M. R. Islam, Shoji Tabata, K. Yahiro, T. Tamura, MA Hattori. Development of an in vitro model for the analysis of bovine endometrium using Micro Sphere Array. The 16th AAAP Animal Science Congress, November 12, 2014, Yogyakarta, Indonesia.

⑥田中綾, 山下聖世, 藤江周一郎, 藤原泰佑, 山内伸彦, 服部眞彰. ウシ子宮内膜におけるプロジェステロン誘導性分泌性因子の検索. 第 7 回日本暖地畜産学会, 2014 年 10 月 26 日, 宮崎県宮崎市.

⑦田中愛咲実, 山上一樹, 江頭昭義, 蔵本武志, 山内伸彦, 服部眞彰. マウス胎仔線維芽細胞における染色体分配制御因子 Kid および Cdc42 の発現と機能解析. 第 107 回日本繁殖生物学会, 2014 年 8 月 23 日, 北海道帯広市.

⑧藤江周一郎, 山下聖世, 中村暢寿, 山内伸彦, 服部眞彰. ウシ子宮内膜における Indian Hedgehog の発現とその制御. 第 107 回日本繁殖生物学会, 2014 年 8 月 23 日, 北海道帯広市.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/chiku>

[1/lrp-top.html](http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/chiku)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 伸彦 (Yamauchi, Nobuhiko)
九州大学大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 00363325

(2) 研究分担者

川原 学 (KAWAHARA, Manabu)
北海道大学大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 70468700

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

エムディ ラシェッド イスラム
(Md. Rashedul Islam)
モハメッド エルシャーウィー
(Mohamed El-Sharawy)