

博士論文

反芻動物の着床期における
細胞外分泌小胞の役割

中村 圭吾

目次

緒言	・・・1
第1章 ヒツジ子宮灌流液中に含まれる着床関与因子の同定	・・・5
第1節 実験材料及び実験方法	・・・5
1-1. ヒツジ胚/子宮内膜組織の採取、子宮固定、子宮灌流液の回収	
1-2. ヒツジ子宮灌流液からの EVs の単離	
1-3. 透過型電子顕微鏡	
1-4. ナノ粒子解析	
1-5. 二次元電気泳動法 (2D-PAGE)	
1-6. クロマトグラフィータンデムマススペクトロメトリー (LC-MS/MS) 解析	
1-7. ウシ子宮内膜上皮細胞 (EECs) の培養条件	
1-8. リアルタイム RT-PCR 解析	
1-9. ウェスタンブロット解析	
1-10. 免疫組織染色法	
1-11. 統計処理	
第2節 実験結果	・・・12
2-1. 2D-PAGE による子宮灌流液含有タンパク質の分離	
2-2. ヒツジ子宮および胚組織における EVs 関連因子の mRNA 発現	
2-3. ヒツジ胚着床前後の CAPG、AKR1B1 の発現と局在	
2-4. ヒツジ EVs における CAPG 及び AKR1B1 の発現	
2-5. ヒツジ EVs の EECs の IFN 応答因子に対する作用	

第3節 考察	・・・19
第4節 小括	・・・22
第2章 ウシ子宮灌流液中に含まれる EVs の同定とその役割	・・・23
第1節 実験材料及び実験方法	・・・23
1-1. ウシ子宮灌流液の回収	
1-2. ウシ子宮灌流液からの EVs の単離	
1-3. 透過型電子顕微鏡	
1-4. ナノ粒子解析	
1-5. iTRAQ 解析	
1-6. EECs と CT-1 の培養条件	
1-7. リアルタイム RT-PCR 解析	
1-8. ウェスタンブロット解析	
1-9. 統計処理	
第2節 実験結果	・・・27
2-1. ウシ子宮灌流液における EVs の同定	
2-2. ウシ EVs に含まれるタンパク質の同定	
2-3. ウシ EVs の CT-1 と EECs に対する作用	
2-4. ウシ EVs のアポトーシス関連因子に対する作用	
2-5. ウシ EVs の接着因子に対する作用	

第3節 考察	・・・33
第4節 小括	・・・35
第3章 ウシ子宮内 EVs の作用と IFNT 非依存的な役割	・・・36
第1節 実験材料及び実験方法	・・・36
1-1. ウシ子宮灌流液の回収	
1-2. ウシ子宮灌流液からの EVs の単離	
1-3. 透過型電子顕微鏡	
1-4. ナノ粒子解析	
1-5. EECs の培養条件	
1-6. RNA 配列決定、データ、遺伝子オントロジー、および経路分析	
1-7. リアルタイム RT-PCR 解析	
1-8. ウェスタンブロット解析	
1-9. 統計処理	
第2節 実験結果	・・・40
2-1. ウシ子宮灌流液における EVs の同定	
2-2. 非妊娠ウシ EVs の EECs への作用	
2-3. 胚から放出されたウシ EVs の EECs に対する作用	
2-4. ウシ EVs の IFNT 非依存的な作用	
2-5. ウシ EVs の NF- κ B シグナル経路を介した TNF 関連因子への作用	

第3節 考察	・・・49
第4節 小括	・・・52
第4章 ウシ子宮内 EVs の miRNA の胚着床時における役割	・・・53
第1節 実験材料及び実験方法	・・・53
1-1. ウシ子宮灌流液の回収	
1-2. ウシ子宮灌流液からの EVs の単離	
1-3. 透過型電子顕微鏡	
1-4. ナノ粒子解析	
1-5. EECs の培養条件	
1-6. RNA 配列決定、データ、遺伝子オントロジー、および経路分析	
1-7. miRNA 配列決定	
1-8. リアルタイム RT-PCR 解析	
1-9. ウェスタンブロット解析	
1-10. 統計処理	
第2節 実験結果	・・・58
2-1. ウシ子宮灌流液における EVs の同定	
2-2. 胚着床前後の EVs を処置した EECs における転写産物の網羅的比較	
2-3. EECs の免疫関連因子の発現低下に関連する miRNA の同定	
2-4. bta-miR-98 の EECs の免疫関連因子への作用	

第3節 考察	・ ・ ・ 66
第4節 小括	・ ・ ・ 68
総括	・ ・ ・ 69
謝辞	・ ・ ・ 74
引用文献	・ ・ ・ 75

本論文中で使用した略語は以下の通りである。

ACTB : beta actin

AI : artificial insemination

AKR1B1 : aldo-keto reductase family 1, member B1 protein

ARRB1 : arrestin beta 1

BAX : b-cell lymphoma 2-associated X protein

BCL2 : b-cell lymphoma 2

BCL2L15 : b-cell lymphoma 2-like protein 15

BIRC3 : baculoviral inhibitor of apoptosis protein repeat containing 3

BST2 : bone marrow stromal cell antigen 2

CA2 : carbonic anhydrase 2

CAPG : macrophage-capping protein

CASP3 : caspase 3

CASP4 : caspase 4

CD40 : cluster of differentiation 40

CD63 : cluster of differentiation 63

CDX2 : caudal type homeobox 2

CFB : complement factor B

CMOS : complementary metal oxide semiconductor

CSF2 : colony stimulating factor 2

CT-1 : bovine trophoblast CT-1 cells

CTSC : cathepsin C

CXCL2 : C-X-C motif chemokine ligand 2

CXCL3 : C-X-C motif chemokine ligand 3

CXCL5 : C-X-C motif chemokine ligand 5

CYBA : cytochrome b-245 alpha chain

C15 : cyclic day 15

C17 : cyclic day 17

DDBJ : DNA data bank of Japan

DEGs : differentially expressed genes

DMEM : dulbecco's modified eagle's medium

DNA : deoxyribonucleic acid

EEC : endometrial epithelial cell

EEF2 : eukaryotic translation elongation factor 2

EMT : epithelial mesenchymal transition

ET : embryo transfer

EV : extracellular vesicle

EZR : ezrin

GBP4 : guanylate binding protein 4

GO : gene ontology

HSP70 : heat shock protein 70

GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

IDH2 : isocitrate dehydrogenase 2

IER3 : immediate early response 3

IFI27 : interferon alpha-inducible protein 27

IFNT : interferon tau

IgG : immunoglobulin G

IKBKE : inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon

IL1RN : interleukin-1 receptor antagonist protein

IL6 : interleukin 6

ISEV : international society for extracellular vesicles

ISG15 : interferon stimulated gene, 15 kDa

IVF-ET : in vitro fertilization-embryo transfer

LC-MS/MS : liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LGALS9 : galectin 9

lncRNA : long noncoding ribonucleic acid

LTF : lactotransferrin

miRNA : micro ribonucleic acid

MISEV : minimal information for studies of extracellular vesicles

MMP9 : matrix metalloproteinase 9

M-PER : mammalian protein extraction reagent

MSN : moesin

MX1 : myxovirus resistance protein 1

MX2 : myxovirus resistance protein 2

NCR3 : natural cytotoxicity triggering receptor 3

NF- κ B : nuclear factor-kappa B

NFKBIA : nuclear factor-kappa-B-inhibitor alpha

P4 : progesterone

P15 : pregnant day 15

P17 : pregnant day 17

P20 : pregnant day 20

P22 : pregnant day 22

PBS : phosphate buffered saline

PGF2 α : prostaglandin F2 Alpha

PSMC6 : proteasome 26S Subunit, ATPase 6

PVDF : polyvinylidene difluoride

RNA : ribonucleic acid

RSAD2 : radical s-adenosyl methionine domain containing 2

RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction

SELL : selectin L

SDS : sodium dodecylsulfate

STAT1 : signal transducers and activators of transcription 1

STAT2 : signal transducers and activators of transcription 2

TBST : tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20

TNF : tumor necrosis factor

TNFA : tumor necrosis factor alpha

TNFAIP3 : tumor necrosis factor alpha-induced protein 3

TP53 : tumor protein p53

UF 17 : UFs from pregnant day 17

UFs : uterine flushing fluids

VCAM1 : vascular cell adhesion molecule-1

2D-PAGE : two-dimensional gel electrophoresis

緒言

我が国における家畜生産では、繁殖に有利な個体あるいは系統を効率よく生産するために、人工授精などの生殖補助技術が利用されている。しかしながら、我が国の乳用牛と肉用牛の受胎率は、この20年余、低下の一途を辿っており、現在では、乳用牛と肉用牛ともに50%を下回っている¹⁾。受胎率の低下の要因として、飼養環境の変化や育種改良による影響等、様々な要因が考えられているが、未だに原因は分かっていない。そのため、ウシ受胎率の向上は、国内生産の振興のために、極めて重要であり、この改善は急務である。

哺乳類において妊娠が成立するためには、卵子の発達、排卵、受精そして初期胚の発達が重要であるが、とりわけ、着床及びその後の初期胎盤形成が不可欠となる。実際に、胚の生存率は、着床前に比べて、着床を経ることで、劇的に増加することが知られている。このことから、着床が成立するためのメカニズムやそれを促進・補助するような子宮内環境を解明することが、受胎率のさらなる改善につながると推察される。着床過程において、胚はある一定の期間(着床ウインドウ)にのみ子宮内膜へ接着することができる。このとき、胚と子宮内膜の間では様々な因子を通じたコミュニケーションが厳密に制御されていると考えられており、着床は、このコミュニケーションにより互いの存在や状態を認識することで成立する。

着床は、狭義には、胚が子宮内膜へ接着することを指す。広義には、卵管から子宮腔に達した胚盤胞が、透明帯から孵化し、子宮腔内を遊走した後、十分な伸長を経て、子宮内膜への接着や部分的な浸潤を行い、その後初期胎盤を形成するまでの一連のプロセスをいう。この時、胚盤胞は、胎盤の主要細胞となる外側の栄養膜細胞と、内側の内部細胞塊にそれぞれ分化する。ウシの場合、受精後約8日目(発情日=0日)に、胚盤胞は透明帯から脱出(孵化)するが、ヒトやげっ歯類とは異なり、すぐには着床せず子宮腔内を浮遊した後、伸長を開始する。伸長胚は、一層の栄養膜細胞層からなるチューブ様の構造をとり、受精後18日頃には細長い線維状になる。その後、子宮腔内全体を覆うほどに伸長した胚は、受精後約19.5日目に、子宮内膜に接着を開始し、初期胎盤を形成する^{2,3)}。

哺乳類において胚は、その存在を母体側に伝えることで、妊娠を維持する方向へと導くと考えられてきた。このような自身の存在を伝える物質は妊娠認識物質といわれており、ウシやヒツジなどの反芻動物では、インターフェロンタウ (IFNT) が知られている^{4,6)}。IFNT の産生・分泌は、胚の透明帯からの孵化後すぐに開始し、胚の伸長とともに発現量は急激に増加していくが、胚の子宮内膜への着床が始まるとその産生は低下し始める。IFNT の作用は、子宮上皮によるプロスタグランジン F2 α (PGF2 α) のパルス状の分泌を妨げることで、排卵後に形成された黄体の退行を抑制し、妊娠の成立と維持に必要なホルモン・プロゲステロン (P4) の産生を維持する。さらに、IFNT は、黄体機能を維持するだけでなく、黄体から分泌された P4 と協調して、子宮内膜上皮細胞に働きかけ、子宮内膜や腺上皮細胞において胚の生存や発達に必要な遺伝子発現を誘導することや、免疫細胞を誘導する役割を担うことも知られている^{7,8)}。IFNT や P4 が、妊娠において重要なのはいうまでもないが、これまでの研究から、これら因子の発現量やその反応性を制御するだけでは、受胎・妊娠率は改善されないことが明らかになってきた。

これまでは、主に、ホルモンやサイトカインなどの分泌物質が液性因子として細胞間のコミュニケーションを担っているものと考えられてきた。しかしながら、近年、これら分泌物質に加えて、細胞外分泌小胞 (EVs) と呼ばれる小胞顆粒が、新たな細胞間のコミュニケーションツールとして注目されている⁹⁾。EVs は、体内の様々な細胞から分泌されており、血液、唾液、尿、乳汁、羊水などあらゆる体液に存在することが確認されている。EVs は、単体で機能する分泌物質とは異なり、小胞内に、数百、数千以上のタンパク質、DNA、RNAs、脂質、代謝産物などを内包しており、分泌元となる細胞から標的細胞まで遊走、取り込まれた後、これら内包物を標的細胞内で機能させることができる。EVs は、粒子サイズや構成成分、産生機構に基づき、大きく 1) エクソソーム、2) マイクロベシクル、3) アポトーシス小体の 3 種類に分類される (図 1)⁹⁾。エンドソーム由来の直径 50-150 nm の膜小胞が細胞外に分泌されるものをエクソソームと呼んでいる。エクソソームは、分泌元の細胞膜成分や細胞内の物質を含むため、分泌元の細胞の特徴を反映している。マイクロベシクルは、直径 100-1000 nm の小胞で、細胞膜から直接出芽して細胞外に分泌される点が、エクソソームと異なる。マイクロベシクルに関する産生・分泌機構は、未だ部分的にしか明らかになっていないが、マイクロベシクルは、リン

脂質の再分布と細胞骨格タンパク質間の動的な相互作用により生成されると言われている。アポトーシス小体は、直径 100-5000 nm の細胞死により生じた細胞断片である。アポトーシス小体は、エクソソームやマイクロベシクルによる細胞間コミュニケーションの役割とは異なり、主に細胞成分の再利用に寄与していると言われている。EVs のうち、特にエクソソームとマイクロベシクルは、分泌元の細胞膜成分や細胞内の物質を含むため、分泌元の細胞の特徴を反映しており、様々な分野においてその応用が期待されている。繁殖分野においても、この EVs が子宮腔に存在することが明らかとなり、EVs が、着床周辺期の胚と子宮内膜の新たなコミュニケーションツールになり得る知見が増えている。

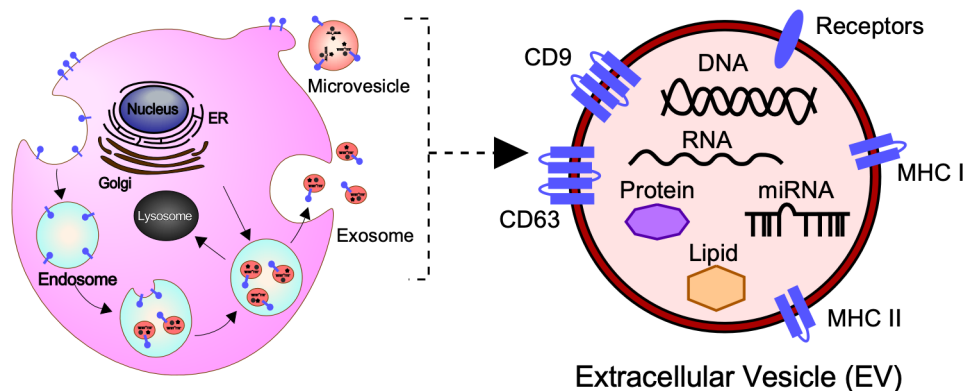


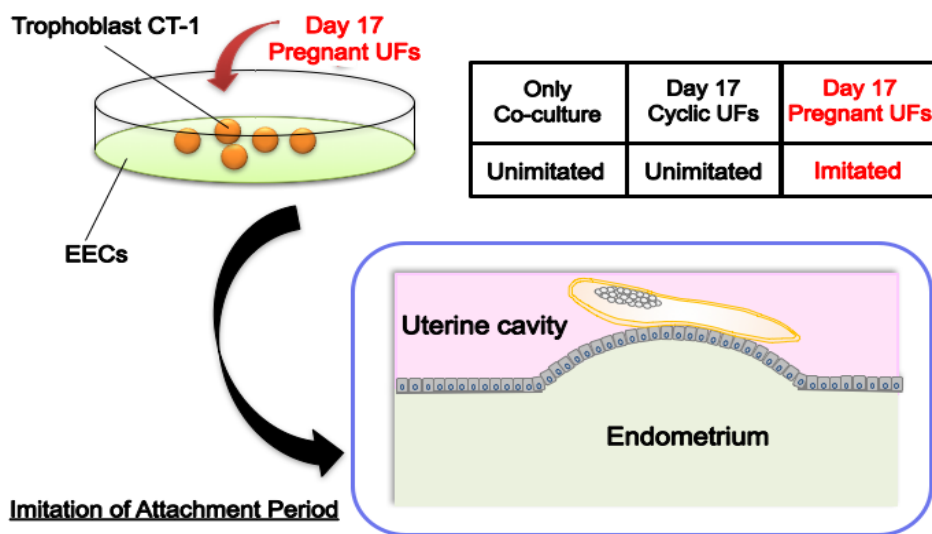
図 1. エクソソームとマイクロベシクルの産生・分泌機構とそれらの内包物

過去に、ウシ胚・栄養膜細胞 (CT-1) とウシ子宮内膜・上皮細胞 (EECs) を用いた生体内の胚着床期を模倣した *in vitro* モデルが確立されている^{10,11)}。この共培養モデルは、CT-1 と EECs の共培養のみ、あるいは共培養下に非妊娠のヒツジやウシの子宮内から回収した子宮灌流液を添加しても *in vivo* の着床期を模倣することはできない。このモデルは、CT-1 と EECs の共培養に、胚着床期のヒツジやウシから回収した子宮灌流液を添加することで、はじめて着床期における子宮内因子の発現動態を再現できる (図 2)。このことは、ヒツジやウシ子宮灌流液が、胚着床成立に重要な因子を含んでいることを示している。しかしながら、子宮灌流液中のどのような因子が着床成立に関与しているのか、そしてその因子の供与体として EVs が関与するかについては不明である。

本研究では、ヒツジとウシをモデルとして用い、反芻動物の胚着床機構を解明することを目的とし、

着床の成立に重要な子宮灌流液を網羅的に精査し、着床関与因子を同定し、その機能を解析した。

第1章では、はじめに、着床周辺期のヒツジ子宮灌流液中のタンパク質を網羅的に精査した。その結果、子宮灌流液には、EVsに関連した因子が多量存在することが明らかとなったため、さらに、EECsを用いて、着床周辺期におけるEVsの役割を解析した。第2章では、ウシの子宮腔内EVsの同定とウシEVsの胚着床期における子宮内膜への作用について解析した。第3章では、ウシ子宮内EVsの作用とIFNT非依存的な役割について、解析を行った。そして、第4章では、ウシ子宮内EVsのmiRNAの胚着床時における役割について検討した。



(Sakurai et al., BOR 2012)

図2. CT-1 と EECs を用いた胚着床期を模倣した in vitro 共培養モデル

第1章 ヒツジ子宮灌流液中に含まれる着床関与因子の同定

胚盤胞へと成長したヒツジ胚は、透明帯からの孵化、伸長を経て、受精後 16.5 日目に子宮内膜へ着床を開始する¹²⁾。生体内の着床期を模倣した *in vitro* モデルは、この時期のヒツジから回収した子宮灌流液を CT-1 と EECs の共培養下に添加することで機能する。このことは、子宮灌流液が、胚着床成立に重要な因子を含んでいることを示している。したがって、本章では、胚着床時の子宮内環境を反映するヒツジ子宮灌流液中に含まれる着床関与因子を同定することを目的とし、二次元電気泳動法 (2D-PAGE) と液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて、非妊娠及び妊娠 17 日のヒツジから回収した子宮灌流液中に含まれるタンパク質を網羅的に解析した。

第1節 実験材料及び実験方法

1-1. ヒツジ胚/子宮内膜組織の採取、子宮固定、子宮灌流液の回収

動物の維持、管理、飼育及び手術は、米国テネシー大学の動物実験委員会により、審査され、承認が得られた。同大学の動物実験委員会のガイドラインに従い、大学内の農場にて飼育されたホワイトフェイス交雑種の雌ヒツジの発情を同期化し、その後、オスと交配させた (交配日=1 日)。また対照群 (非妊娠) としては、同様に発情の同期化を行い、精管結紮したオスと交配させたものを使用した。子宮摘出後、非妊娠および妊娠 15、17 日 (胚着床=16.5 日) の子宮組織内を滅菌した 20 mL の Phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) で洗浄し、そこから伸長胚を含む約 19 mL の子宮灌流液を回収した。続いて、遠心分離 (4 °C、1,000 rpm、5 分間) を行い、胚を子宮灌流液から分離した。また、黄体と同側の子宮角から子宮内膜組織を採取した後、液体窒素で凍結し、東京大学に輸送した。組織切片の作製に関して、妊娠 17 日の雌ヒツジから子宮を摘出後、子宮全体を固定し、固定した子宮全体を、子宮近位部から遠位部に連続的に切開した後、各切片をパラフィン包埋した。

1-2. ヒツジ子宮灌流液からの EVs の単離

プロトコールに従い、非妊娠及び妊娠 15、17 日のヒツジ子宮灌流液に EVs 沈殿溶液 (Exo-Quick-TC、System Biosciences) を加え、インキュベート (4 °C、24 時間) した後、遠心分離 (4 °C、1,500 g、30 分間) により EVs を単離した。単離した EVs を PBS で 3 回洗浄した後、PBS (1 µg/µl) または哺乳動物タンパク質抽出試薬 (M-PER, 1 µg/µl, Thermo Fisher Scientific) に懸濁した。

1-3. 透過型電子顕微鏡

PBS に懸濁したヒツジ EVs をカーボンフィルムプレパラート上に 2 分間置き、濾紙でプレパラート上の余分な PBS を取り除いた。グリッドを乾燥させた後、2 %酢酸ウラニルを含む染色溶液をプレパラートに添加し、2 分間置いた。その後、濾紙で余分な液体を取り除き、プレパラートを室温で一晩乾燥させた。花市電子顕微鏡技術研究所にて、HITACHI H-7600 透過型電子顕微鏡 (Hitachi High-Technologies Corporation) を用いて、プレパラートを分析、撮影した。

1-4. ナノ粒子解析

PBS に懸濁したヒツジ EVs ($2-6 \times 10^8$ 個/ml) を、NanoSight NS300 装置 (NanoSight Ltd)、相補型金属酸化膜半導体 (CMOS) カメラ (Andor Technology) および NanoSight NTA 3.2 ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて、ナノ粒子解析に供し、各可視粒子を追跡ビデオで 30 秒間録画した。その後、Stokes - Einstein 方程式を用いて、サンプル中の粒子のサイズ分布と数 (濃度) を決定した。

1-5. 二次元電気泳動法 (2D-PAGE)

非妊娠及び妊娠 17 日のヒツジ子宮灌流液 (1 µg/µl) に、1:9 の割合で、尿素緩衝液 (0.06 M トリスヒドロキシメチルアミノメタン、1 M チオ尿素、6 M 尿素、3 % CHAPS、1 % Triton X-100) を加え、遠心分離 (4 °C、15,000 g、30 分間) を行った。上清を回収し、Benchmark Plus マイクロプレート分光光度計 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いてタンパク質濃度を測定した。タンパク質濃度を測定後、プロトコールに従い、ヒツジ子宮灌流液を 1 M アクリルアミド溶液と混合し、寒天ゲル (pH:3-10) (ATTO)

及び 5-20 % SDS-ポリアクリルアミド勾配ゲル (ATTO) を用いて、2D-PAGE にて、分離した。2D-PAGE 後、ゲルを SYPRO Ruby (Thermo Fisher Scientific, Inc.) で一晩染色し、蒸留水で洗浄後、LAS-3000 カメラ (FUJIFILM) を用いて、画像を撮影した。

1-6. クロマトグラフィータンデムマスマスペクトロメトリー (LC-MS/MS) 解析

特に上記 1-5 にて、分離、染色した妊娠 17 日のヒツジ子宮灌流液の中で、非妊娠の子宮灌流液と比べ、特に発現が増加していたバンド (タンパク質) を切り取り、トリプシン処理を行った後、LC-MS/MS にて解析し、Mascot search engine にてバンド内に含まれるタンパク質を同定した。

1-7. ウシ子宮内膜上皮細胞 (EECs) の培養条件

岡山大学の動物管理・使用・倫理委員会によって承認されたプロトコールに従い、食肉処理場にて、健康なホルスタイン牛から初期黄体期 (2-5 日) の子宮を入手、摘出し、岡山大学の実験室に輸送した。その後、子宮内腔をトリプシン処理 (0.3 % w/v) し、EECs を単離した。単離した EECs は、10 % (v/v) ウシ胎仔血清 (Invitrogen) 、2 mM グルタミン (Invitrogen)、および抗生物質/抗真菌溶液 (Invitrogen) を含む Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) /F12 培養液にて、37 °C で培養した。なお、細胞特性の変化を避けるために、EECs は、継代培養が 4 回以内のものを使用した。

in vitro 試験では、EECs を、IA 型コラーゲンを塗布した 6 穴プレート (1×10^5 個/well) に播種し、妊娠 17 日のヒツジ子宮灌流液、または非妊娠及び妊娠 15、17 日の EVs をそれぞれ加え (10 μ g/well)、無血清 DMEM/F12 培養液で 48 時間培養した。48 時間後、細胞を回収しその後の解析を行った。

1-8. リアルタイム RT-PCR 解析

プロトコールに従い、ISOGEN (Nippon Gene) を用いて、胚組織、子宮内膜組織、EECs からトータル RNA を抽出した。抽出したトータル RNA (250 ng) を ReverTra Ace qRNA RT Kit (Toyobo) を用いて、cDNA に逆転写し、使用するまで 4 °C で保存した。逆転写した cDNA を、Applied Biosystems STEP One Plus real-time PCR System (Applied Biosystems) を用いて、リアルタイム RT-PCR 解析した。本解析に用

いたプライマーの配列は以下に示す通りである。RT-PCR 反応は、95 °C で 10 秒間の変性反応、60 °C で 45 秒のアニーリング反応と伸長反応を 40 サイクル行った。各サンプル中の mRNA 発現量を比較するため、Comparative Ct 法で解析した。即ち、ある一定の蛍光強度を示したサイクル数を閾値 (Ct) とし、目的遺伝子の Ct と内部標準である *ACTB*、*GAPDH* の Ct より、以下の計算式でサンプル間の発現量の比を求めた。

$$\text{発現量} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{サンプル A}} - \Delta\text{Ct}_{\text{サンプル基準}}$$

$$\Delta\text{Ct}_{\text{サンプル A}} = \text{Ct}_{\text{目的遺伝子サンプル A}} - \text{Ct}_{\text{ACTB または GAPDH サンプル A}}$$

$$\Delta\text{Ct}_{\text{サンプル基準}} = \text{Ct}_{\text{目的遺伝子サンプル基準}} - \text{Ct}_{\text{ACTB または GAPDH サンプル基準}}$$

<i>CAPG</i>	S	5'-AACAGCATGTACTCACCCATCC-3'
	AS	5'-AGTCTCCCGAGAAGAAAATGCC-3'
<i>AKR1B1</i>	S	5'-ACGTATCACGACAAGGACTTGG-3'
	AS	5'-GTTGCCGTCCTCATCCAACG-3'
<i>BCL2L15</i>	S	5'-CTTCTGCCAGAAATGTCATCGC-3'
	AS	5'-TCTCGTAAGCCAAGCTGGAATC-3'
<i>CA2</i>	S	5'-AAGCAGCTTCGCGGAGAATG-3'
	AS	5'-TGCCAGTAAGAGGTCCGTCTTTC-3'
<i>IDH2</i>	S	5'-AGATGGACGGCGATGAGATGAC-3'
	AS	5'-ATCATTGGTCTGGTCACGGTTC-3'
<i>EEF2</i>	S	5'-AGGAGCGTTGCATCACCATC-3'
	AS	5'-TGAGGTTGATGAGGAAGCCAGAG-3'
<i>MSN</i>	S	5'-GTGTGTAAGTGCCTGCTCAGC-3'
	AS	5'-ATGGCAAACCTCCAGCTCAGC-3'

<i>EZR</i>	S	5'-TTTGGCTCGGCGTTGATGC-3'
	AS	5'-TCTTGTCGATGGGCTTGATGAC-3'
<i>STAT1</i>	S	5'-CTCATTAGTTCTGGCACCAGC-3'
	AS	5'-CACACGAAGGTGATGAACATG-3'
<i>STAT2</i>	S	5'-GCACTTGGCTGTCTGGATTGAAG-3'
	AS	5'-ACTCAGAGTCTTGGCTGCATC-3'
<i>BST2</i>	S	5'-TGGTGACCCTGAGGGAGTCTCTG-3'
	AS	5'-ACTCTGTCTTCTTAGTCGCTCCACC-3'
<i>MX1</i>	S	5'-TCTGCAAATGGAGTGCTGTG-3'
	AS	5'-TTCACAAACCCTGGCAACTC-3'
<i>MX2</i>	S	5'-GCAGATCAAGGCACTCATCA-3'
	AS	5'-ACCAGGTCTGGTTTGGTCAG-3'
<i>ISG15</i>	S	5'-GGTATCCGAGCTGAAGCAGTT-3'
	AS	5'-ACCTCCCTGCTGTCAAGGT-3'
<i>ACTB</i>	S	5'-ATATTGCTGCGCTCGTGGTTG-3'
	AS	5'-TAGGAGTCCTTCTGGCCCATG-3'
<i>GAPDH</i>	S	5'-GCATCCCTGAGACAAGATGGTG-3'
	AS	5'-CATTGATGGCAACGATGTCCAC-3'

1-9. ウェスタンブロット解析

M-PER (Thermo Fisher Scientific) に懸濁した胚組織、子宮内膜組織または EVs のタンパク質濃度を、Bradford 法に基づくタンパク質定量試薬 (Bio-Rad) を用いて定量した。タンパク質濃度を測定後、各サンプル (10 µg のタンパク質を含む) に 4×Loading Buffer (200 mM Tris (pH 6.8)、8 % SDS、0.4 % ブロモフェノールブルー) を加え、3 分間煮沸した後、5-20 %グラディエントポリアクリルアミドゲル

を用い電気泳動 (25 mA 定電流) を行った。その後、タンパク質を PVDF メンブランに転写 (128 mA 定電流) し、ブロックエース試薬 (DS Pharma Biomedical) にて室温で 1 時間ブロッキングした。その後、抗 CAPG 抗体 (2 µg/ml、Santa Cruz Biotechnology)、抗 AKR1B1 抗体 (1 µg/ml、Santa Cruz Biotechnology)、抗 IFNT 抗体 (1:1000、Eurofins Genomics, Inc.)、抗 ACTB 抗体 (1:1000、Abcam)、抗 CD63 抗体 (0.25 µg/ml、System Biosciences) または抗 HSP70 抗体 (0.25 µg/ml、System Biosciences) と共に 4 °C で一晩インキュベートした。TBST (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.1% Tween) でメンブランを洗浄 (10 分、3 回) 後、SAP 試薬 (APRO Life Science, Inc.) を用いて、1 時間インキュベートした。TBST で洗浄 (10 分、3 回) 後、化学発光試薬 (Millipore) で発光させ、バンドを確認した。

1-10. 免疫組織染色法

妊娠 17 日のヒツジの子宮内膜組織ブロックのパラフィン包埋切片を 65 °C で 30 分間加熱した後、キシレン及びエタノール溶液に順次浸し、脱パラフィン処理を行った。PBS で洗浄後、抗原賦活化反応として 100 °C に加熱した 10 mM クエン酸緩衝液に組織スライドを浸し、20 分間ボイルした。30 分間室温で静置した後、PBS で洗浄し、プロトコールに従い、Streptavidin/Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories) を使用した後、10 % ヤギ正常血清またはロバ正常血清にて室温で 30 分間ブロッキングを行った。抗 CAPG 抗体 (2 µg/ml、Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、抗 AKR1B1 抗体 (4 µg/ml、Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、ヤギ IgG (10 µg/ml、Santa Cruz Biotechnology, Inc.) またはウサギ IgG (10 µg/ml、Santa Cruz Biotechnology, Inc.) と 4 °C で一晩反応させた。PBS で洗浄 (5 分、3 回) した後、抗ヤギ IgG-HRP (1 µg/ml、Santa Cruz Biotechnology, Inc.) またはウサギ IgG ビオチン結合体 (1:400、Sigma-Aldrich) のいずれかと共に室温で 60 分間インキュベートした。PBS で洗浄 (5 分、3 回) 後、免疫反応性は、アビジン-ペルオキシダーゼ (1:400、Sigma-Aldrich) および AEC 基質キット (Invitrogen) を用いて可視化し、光学顕微鏡 (BX51、Olympus) で撮影した。

1-11. 統計処理

リアルタイム RT-PCR 解析の結果を平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差検定には、t-検定または Tukey-Kramer 検定を用いて、危険率 5% ($p < 0.05$) をもって統計学的に有意差があるものと判定した。

第2節 実験結果

2-1. 2D-PAGE による子宮灌流液含有タンパク質の分離

胚着床期のヒツジ子宮灌流液中に含まれる着床関与因子を同定するために、非妊娠及び妊娠 17 日のヒツジ子宮灌流液を 2D-PAGE で分離した後、SYPRO Ruby で全タンパク質を染色した。非妊娠と妊娠 17 日の子宮灌流液の間で、類似した泳動パターンが見られたが、非妊娠の子宮灌流液と比べて、妊娠 17 日の子宮灌流液で、発現が増加するバンドを確認した (図3)。妊娠 17 日の子宮灌流液の中で、特に発現が増加していたバンドを切り取り、LC-MS/MS に供したところ、合計 267 個のタンパク質が検出された¹³⁾。さらに、DAVID データベース^{14,15)}、ExoCarta¹⁶⁾ により、267 個のタンパク質の中から、13 個を単独で細胞外へ放出される分泌タンパク質、172 個を EVs に内包されて細胞外へ出る EVs 関連タンパク質として、それぞれ同定した。次に、172 個の EVs 関連タンパク質を他の反芻動物の EVs に関連した研究^{17,18)} と照合し、同様に報告があった 8 個の因子 CAPG、AKR1B1、BCL2L15、CA2、IDH2、EEF2、MSN、EZR について、更なる検証を行った。

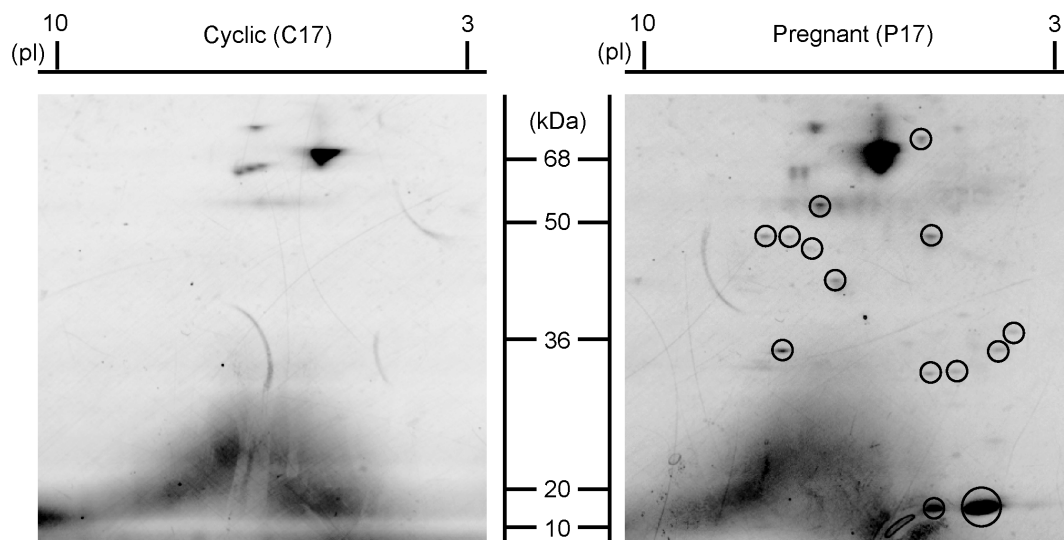


図 3. 2D-PAGE による妊娠 17 日のヒツジ子宮灌流液に特異的なタンパク質の分離

非妊娠 (左) と妊娠 17 日 (右) のヒツジ子宮灌流液の含有タンパク質に対する SYPRO Ruby 染色を行った 2D-PAGE の画像。非妊娠に比べて、妊娠 17 日のヒツジ子宮灌流液で、いくつかの特異的なスポット (タンパク質) が確認され、特に発現変化が大きいスポットは、LC-MS/MS に供された。

2-2. ヒツジ子宮および胚組織における EVs 関連因子の mRNA 発現

8 個の因子が、胚と子宮内膜のどちらに由来する因子であるかを明らかにするため、非妊娠および妊娠 15、17 日の子宮組織および妊娠 15、17 日の胚組織から抽出した RNA を用いて、リアルタイム RT-PCR 解析にて、8 個の因子 *CAPG*、*AKR1B1*、*BCL2L15*、*CA2*、*IDH2*、*EEF2*、*MSN*、*EZR* の mRNA 発現を調べた。8 個の因子のうち、*CAPG* と *AKR1B1* が、主に胚組織で特異的に発現していた (図 4 A, B)。また、*BCL2L15*、*CA2*、*IDH2* は非妊娠及び妊娠 15、17 日の子宮内膜組織で発現しており (図 4 C, D, E)、*EEF2*、*MSN*、*EZR* の発現は、子宮内膜組織と胚組織で類似していた (図 4 F, G, H)。

2-3. ヒツジ胚着床前後の *CAPG*、*AKR1B1* の発現と局在

8 個の因子のうち、*CAPG* と *AKR1B1* が、胚組織にて、特異的に発現していたことから、さらに、これら 2 個の因子に着目した。非妊娠及び妊娠 15、17 日の子宮内膜組織および妊娠 15、17 日の胚組織における *CAPG* と *AKR1B1* タンパク質の発現と局在を検証した。ウエスタンブロット法にて、*CAPG* タンパク質は、mRNA 発現と同様に、妊娠 15、17 日の胚組織にて特異的に発現していることを明らかにした (図 5 A)。*AKR1B1* タンパク質は、妊娠 15、17 日の子宮内膜組織にて微量な発現が認められたが、妊娠 15、17 日の胚組織で多く発現していた。さらに、免疫組織染色法にて、妊娠 17 日のヒツジの子宮内における *CAPG*、*AKR1B1* タンパク質の局在を調べたところ、ウエスタンブロット分析の結果と一致し、どちらも主に胚組織に局在していた (図 5 B)。また、*AKR1B1* タンパク質は、子宮内膜腺上皮組織でも、微量に発現していた。このことから *CAPG* と *AKR1B1* は、主に胚由来の因子であることが示された。

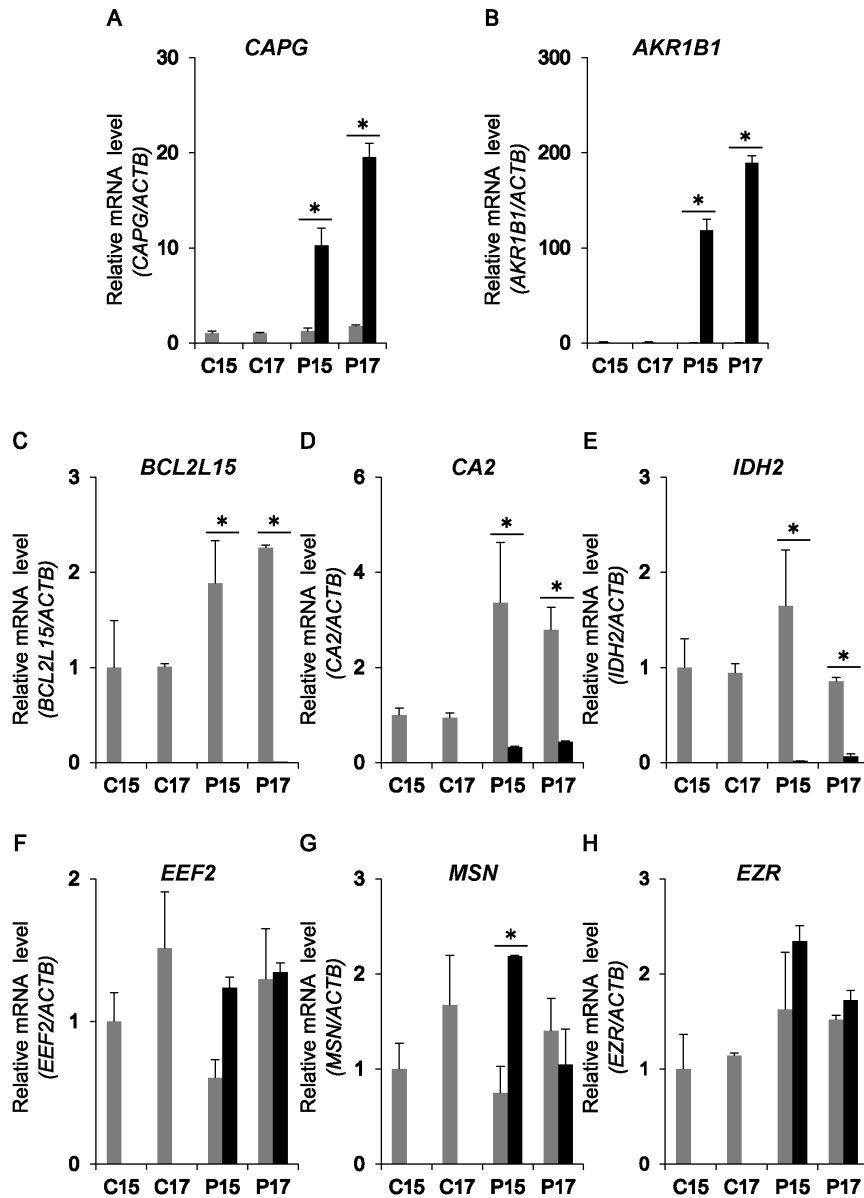


図 4. ヒツジ子宮組織および胚組織における 8 つの EVs 関連因子の mRNA 発現

リアルタイム RT-PCR 解析を用いて、8 つの EVs 関連因子 *CAPG* (A)、*AKR1B1* (B)、*BCL2L15* (C)、*CA2* (D)、*IDH2* (E)、*EEF2* (F)、*MSN* (G)、*EZR* (H) の非妊娠 15 日 (C15)、非妊娠 17 日 (C17)、妊娠 15 日 (P15)、妊娠 17 日 (P17) の子宮内膜組織 (灰色) および P15、P17 の胚組織 (黒色) における mRNA 量を求め、C15 の値を 1 とした相対値で示した (n=3)。グラフは、平均値±標準誤差で示した (P<0.05 vs. 子宮内膜組織もしくは胚組織)。

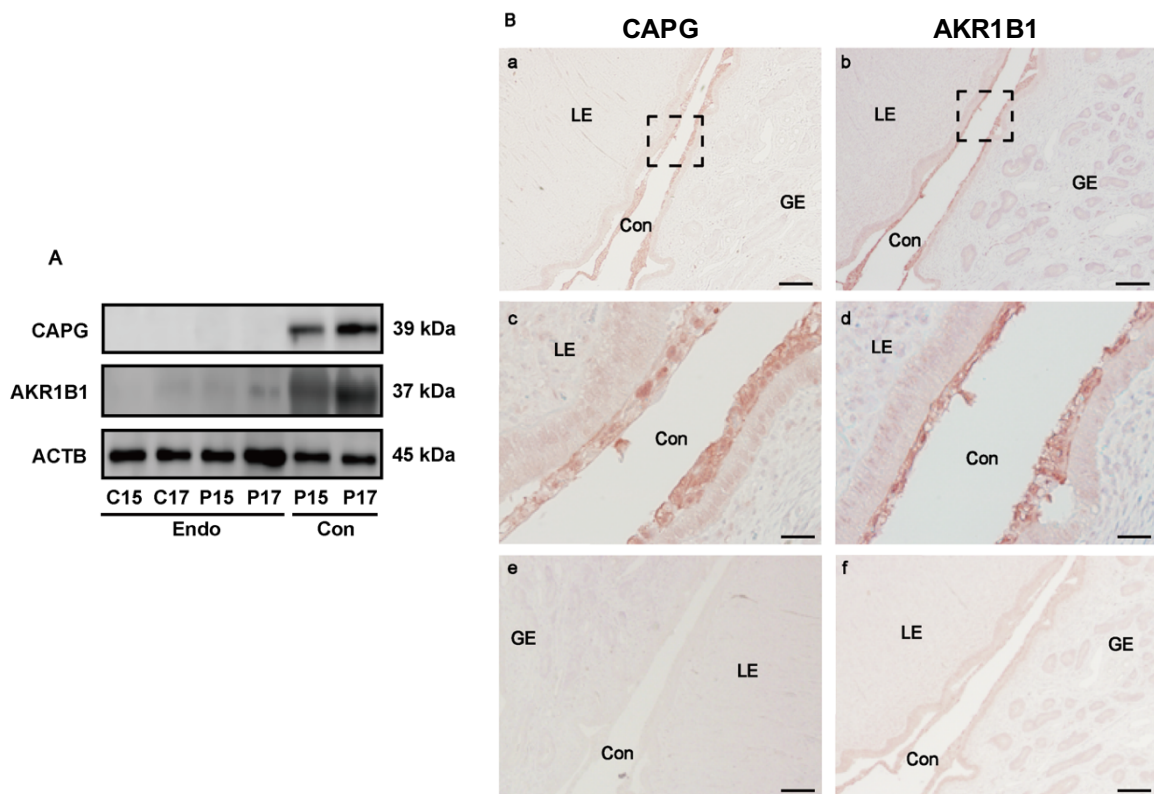


図 5. 胚着床前後のヒツジ子宮内膜と胚における CAPG および AKR1B1 タンパク質の発現と局在

(A) ウェスタンブロット解析にて、C15、C17、P15、P17 のヒツジ子宮内膜組織および P15、P17 のヒツジ胚組織における CAPG または AKR1B1 タンパク質の発現を調べた (n=3)。ACTB を内部標準として使用した。3つの異なる実験結果より代表的なデータを示した。Endo=子宮内膜組織、Con=胚組織を表す。(B) 免疫組織染色により、P17 のヒツジ子宮内における CAPG (a, c, e) と AKR1B1 (b, d, f) タンパク質の局在を確認した。子宮内膜組織切片を、抗 CAPG 抗体 (a, c) またはネガティブコントロールとしてヤギ IgG (e) で染色した。(a) の四角で囲まれた領域を、拡大し (c) として示した。また、子宮内膜組織切片を、抗 AKR1B1 抗体 (b, d) またはネガティブコントロールとしてウサギ IgG (F) で染色した。(b) の四角で囲まれた領域を、拡大し (d) として示した。Con=胚組織、LE=管腔上皮、GE=腺上皮を表す。スケールバーはそれぞれ 250 μ m (a, b, e, f) と 50 μ m (c, d) を示す。

2-4. ヒツジ EVs における CAPG 及び AKR1B1 の発現

ウエスタンブロット解析により、EVs 関連因子として同定された CAPG と AKR1B1 タンパク質が、妊娠 15、17 日の子宮灌流液に存在することを明らかにした (図 6 A)。このことから、子宮灌流液中の EVs が、胚着床には重要だと仮定し、EVs についてさらに検証した。子宮灌流液から EVs を単離し、透過型電子顕微鏡により粒子径を確認したところ、直径約 150 nm の粒子が検出された (図 6 B)。さらに、ナノ粒子解析により、単離した粒子の大きさを計測した結果、平均 131.8 nm、標準偏差 61.9 nm、最頻値 102.1 nm、範囲 50-200 nm であった (図 6 C)。次に、単離した非妊娠および妊娠 15、17 日の粒子の中で、EVs マーカータンパク質 CD63 と HSP70 の発現を調べたところ、すべてにおいて陽性であった (図 6 D)。一方、胚由来の CAPG および AKR1B1 タンパク質は、妊娠 15、17 日のヒツジ子宮灌流液から単離された EVs においてのみ発現していた。これらの結果から、胚着床期の妊娠 15、17 日のヒツジ子宮灌流液には、CAPG と AKR1B1 タンパク質を含む胚から放出された EVs が存在することが明らかとなった。

2-5. ヒツジ EVs の EECs の IFN 応答因子に対する作用

胚着床期において胚から産生・分泌される重要な因子 IFNT が、EVs 中にも存在するかをウエスタンブロット解析にて検証した。その結果、妊娠 15、17 日のヒツジ子宮灌流液から単離した EVs に、IFNT が含まれていることが明らかになった (図 7 A)。次に、この IFNT を含む EVs が子宮内膜に作用するのかを、EECs における IFN 応答因子の発現を指標に検証した。非妊娠および妊娠 15、17 日のヒツジ子宮灌流液またはそこから単離した EVs を EECs に添加し、48 時間培養後、IFN 応答因子 *STAT1*、*STAT2*、*MX1*、*MX2*、*BST2*、*ISG15* の遺伝子発現を調べた。未処置群や非妊娠の EVs を処置した群と比べて、妊娠 15、17 日のヒツジ子宮灌流液とそこから単離した EVs は、EECs における IFN 応答因子の *STAT1*、*STAT2*、*MX1*、*MX2*、*BST2*、*ISG15* の遺伝子発現を上昇させた (図 7 B)。これらの結果は、胚から放出された IFNT を含む EVs が、EECs の IFN 応答因子の発現を上昇させたことを示している。

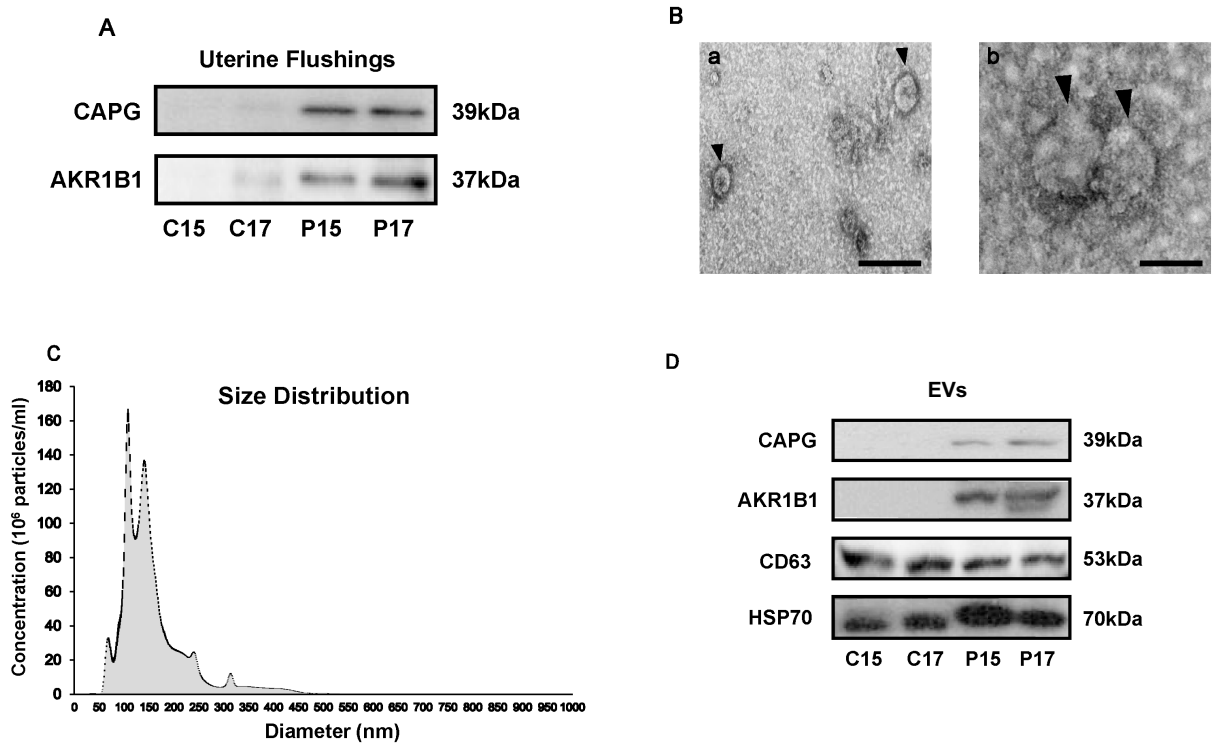


図 6. 妊娠 15、17 日のヒツジ子宮灌流液におけるエクソソーム関連因子 CAPG と AKR1B1 の同定

(A) ウェスタンブロット解析にて、C15、C17、P15、P17 のヒツジ子宮灌流液における CAPG と AKR1B1 タンパク質の発現を調べた (n=3)。3 つの異なる実験結果より代表的なデータを示した。(B) 透過型電子顕微鏡により、子宮灌流液中の EVs 像を確認した。スケールバーはそれぞれ 200 nm (a) と 100 nm (b) を示す。(C) ナノ粒子解析を用いて、妊娠 17 日のヒツジ子宮灌流液中に存在する粒子径のサイズの範囲を調べた (n=3)。灰色は、3 つのサンプルの平均値を示し、黒色は標準誤差を表す。(D) ウェスタンブロット解析にて、C15、C17、P15、P17 のヒツジ EVs における EVs マーカータンパク質 CD63、HSP70 と EVs 関連因子 CAPG、AKR1B1 タンパク質の発現を調べた (n=3)。3 つの異なる実験結果より代表的なデータを示した。

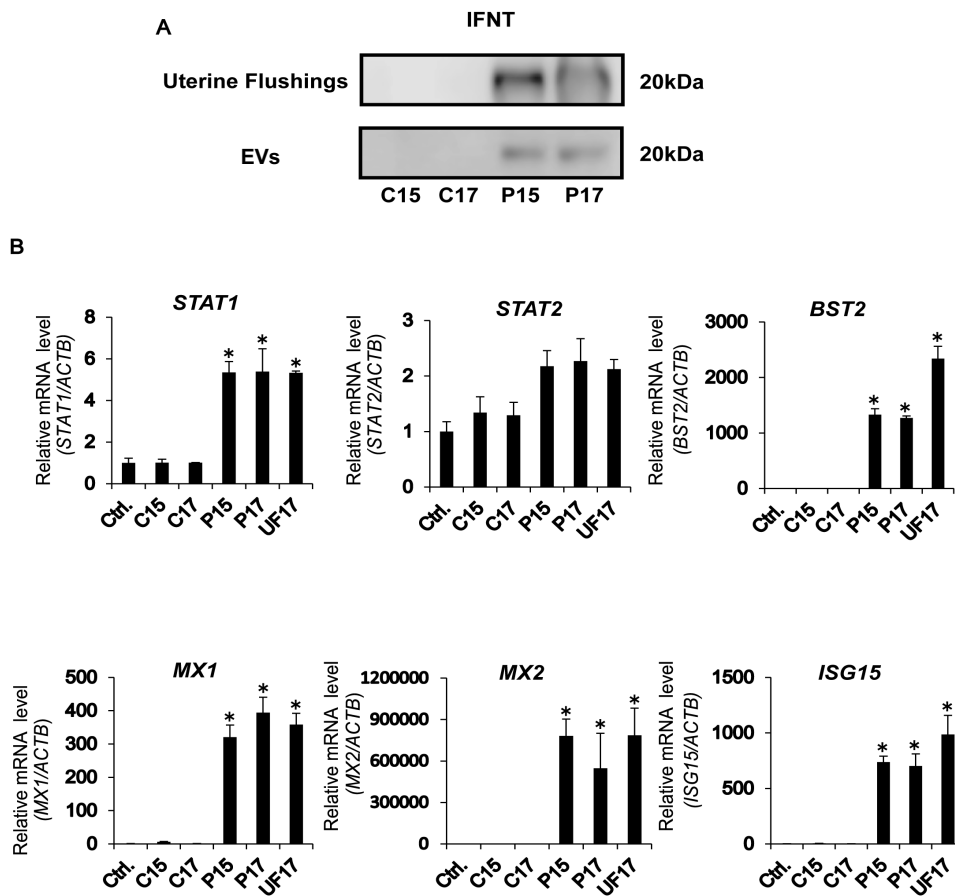


図 7. 非妊娠および妊娠 15、17 日のヒツジ子宮灌流液と EVs における IFNT の存在とこれら EVs の EECs に対する作用

(A) ウェスタンブロット解析にて、C15、C17、P15、P17 のヒツジ子宮灌流液と EVs における IFNT タンパク質の発現を調べた (n=3)。3 つの異なる実験結果より代表的なデータを示した。(B) EECs に対する EVs の作用を検証した。EECs は、C15、C17、P15、P17 のヒツジ EVs (10 μ g) または P17 のヒツジ子宮灌流液 (10 μ g) の処置とともに 48 時間培養された。その後、リアルタイム RT-PCR 解析を用いて、*STAT1*、*STAT2*、*BST2*、*MX1*、*MX2*、*ISG15* の EECs における mRNA 量を求め、無処置 (Ctrl.) の値を 1 とした相対値で示した (n=3)。グラフは、平均値 \pm 標準誤差で示した (P<0.05 vs. Ctrl.)。

第3節 考察

非妊娠 17 日のヒツジ子宮灌流液と比較し、胚着床後の妊娠 17 日のヒツジ子宮灌流液には、多くの EVs に関連するタンパク質が存在した。さらに、胚から産生・分泌される IFNT が、胚着床期のヒツジ子宮灌流液中の EVs にも存在し、この IFNT を含む EVs は、EECs における IFN 応答因子の遺伝子発現を上昇させた。本研究は、胚着床周辺期において、ヒツジ胚から放出された IFNT を含む EVs が、子宮内膜に作用することで、胚着床に適した子宮内環境を構築している可能性を示唆している。しかしながら、この生理的意義についてはさらに検討が必要である。

妊娠 17 日のヒツジ子宮灌流液には、267 個の妊娠特異的なタンパク質が含まれており、*in silico* 解析にて、これらのタンパク質の中から、13 個の分泌タンパク質と 172 個の EVs 関連タンパク質が、それぞれ同定された。このことから、子宮灌流液中の EVs が、胚着床には重要だと仮定し、EVs についてさらに検証した。国際細胞外小胞学会 (ISEV) が発行するガイドライン (MISEV) によると、EVs は、粒子サイズや構成成分、産生・分泌機構に基づき、エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体の 3 種類に分類され、サンプル中の EVs の存在を確認するために、EVs 像、粒子径、EVs マーカータンパク質を調べるのが求められている⁹⁾。一方で、現在の技術では、EVs に分類される上記 3 種類の粒子を、それぞれ単離することは難しい。本章では、EVs 像、粒子径、EVs マーカータンパク質の存在を確認し、非妊娠および妊娠 15、17 日の子宮灌流液に EVs が存在することが示された。なお、今回の実験では、試薬により EVs を回収後、プロトコールに加えて、EVs を PBS により 3 回洗浄することで、分泌タンパク質等の EVs に非特異的なタンパク質の影響を可能な限り小さくしている。本研究の結果と同様に、胚着床前のヒツジ子宮灌流液に EVs が存在することが報告されている^{19,20)}。さらに、主に妊娠 15、17 日のヒツジ胚で発現している CAPG および AKR1B1 は、胚着床期の子宮灌流液から単離した EVs にも存在しており、このことは、胚から CAPG と AKR1B1 を含む EVs が子宮腔に放出されていることを示している。胚着床前のウシの子宮灌流液中に 30 個の胚由来のタンパク質が存在し、それらは EVs を介して胚と子宮内膜との間のコミュニケーションを促進しているとの報告がある¹⁸⁾。これらの知見から、胚着床期に胚から放出され

た EVs が、内包するタンパク質を運搬することで、EECs の遺伝子発現の調節に関与していることが考えられる。

胚とがん細胞には、類似した特徴が見られる。例えば、どちらの細胞とも、上皮間葉転換 (EMT) を経て、接着能や浸潤能を獲得する^{21,22)}。また、低酸素状況下で、胚やがん細胞は、増殖や血管新生を促進することが報告されている^{23,24)}。さらに、近年、がん細胞から放出された EVs が、がん細胞と隣接する細胞とのコミュニケーションを調節することで、がんの発生や浸潤に貢献していることが示されている²⁵⁻²⁷⁾。これらの知見は、がん細胞と同様に、胚もまた、胚と子宮内膜との間のコミュニケーションを促進するために、EVs を産生している可能性を示唆している。CAPG は、さまざまな種類のがんで過剰に発現していることが報告されている²⁸⁻³⁰⁾。さらに、CAPG は、細胞の運動性を亢進し³¹⁾、上皮細胞のコラーゲンや培養されたニワトリの心臓断片への浸潤を誘導することが知られている³²⁾。また、AKR1B1 も EMT や血管新生に関連する因子として報告されている^{33,34)}。胚とがん細胞は、EMT や血管新生などの様々な共通の特徴を有することから、胚由来の EVs に含まれる CAPG や AKR1B1 もまた、がんの接着や浸潤と類似した機能を活用し、胚着床に関与している可能性が示唆される。

胚から産生・分泌される IFNT は、子宮内膜上皮による PGF2 α のパルス状の分泌を妨げることで、排卵後に形成された黄体の退行を抑制し、妊娠の成立と維持に必要な P4 の産生を維持する³⁵⁾。しかし、近年興味深いことに、IFNT の子宮外や内分泌への作用も注目され始めてきた。例えば、妊娠中のヒツジの末梢血細胞で、MX 遺伝子の発現が、IFNT のシグナル伝達に応答して上昇することが報告されている³⁶⁾。また、非妊娠のヒツジの黄体と比較し、妊娠したヒツジの黄体では、IFNT の影響により好中球の数が増加するとの報告がある³⁷⁾。さらに、IFNT は、頸静脈血および肝組織における ISG15 の遺伝子発現を誘導するとともに、子宮静脈を介して黄体の ISG15、STAT1、STAT2 を含むいくつかの IFN 応答因子の発現を誘導している^{38,39)}。臓器間のコミュニケーションツールとして働く EVs は、血液中にも存在することが報告されており^{40,41)}、さらに本研究において、IFNT が EVs に含まれていることが明らかになった。これらの知見から、IFNT を含む EVs が子宮外組織における IFN 応答因子の発現にも関与していることが示唆される。しかしながら、IFNT が、黄体や抹消血細胞のような子宮外

組織で直接的または間接的に作用するメカニズムについては不明であり、胚から分泌された IFNT が、どのように黄体や子宮外組織に到達するかを明らかにするためには、さらなる検証が必要である。

結論として、本研究は、胚着床期のヒツジの子宮腔に、胚から放出された EVs が存在し、この IFNT を含む EVs が、ウシ EECs の IFN 応答因子の遺伝子発現を誘導していることを明らかにした。しかしながら、本研究では、ヒツジ胚由来の EVs の同じ反芻動物であるウシ EECs に対する作用を検証したことから、反芻動物共通の現象として捉えるためには、更なる検討が必要である。

第4節 小括

本章では、胚着床期の妊娠 17 日のヒツジから回収した子宮灌流液中に含まれるタンパク質を網羅的に解析・検証し、以下の新知見を得た（本研究結果は、PLoS One, **11**, e0158278, 2016¹³⁾に報告した）。

- (1) 妊娠 17 日のヒツジ子宮灌流液には、267 個の妊娠特異的なタンパク質が含まれており、これらの多くは EVs に関連したタンパク質であることを同定した。
- (2) EVs 関連因子の CAPG と AKR1B1 の mRNA 及びタンパク質が、主に胚で特異的に発現していた。
- (3) 非妊娠および妊娠 15、17 日のヒツジ子宮灌流液には EVs が存在した。さらに、主に胚で発現している CAPG および AKR1B1 は、胚着床期の子宮腔 EVs にも存在した。
- (4) 胚から産生・分泌される IFNT が、胚着床期のヒツジ子宮灌流液中の EVs にも存在した。さらに、この IFNT を含む EVs は、EECs における IFN 応答因子の遺伝子発現を上昇させた。

第2章 ウシ子宮灌流液中に含まれる EVs の同定とその役割

第1章では、胚着床期のヒツジの子宮腔に胚由来の EVs が存在することを示した。さらに、胚から放出された IFNT を含む EVs は、EECs の IFN 応答因子の遺伝子発現を上昇させた。このことから、胚着床期において、子宮腔 EVs は、子宮内膜に作用することで、胚着床に適した子宮内環境を構築している可能性が推察された。そこで、本章では、ヒツジと同じ反芻動物であるウシ子宮腔内での EVs の同定と、さらに胚着床期におけるウシ EVs の子宮内膜への作用について検討した。

第1節 実験材料及び実験方法

1-1. ウシ子宮灌流液の回収

ドナーとして黒毛和種 (3-7 歳)、レシピエントとして未経産ホルスタイン (14-18 月齢) を使用した。全ての動物実験は、全農 ET センター動物実験委員会と東京大学倫理委員会 (IRB 番号 7A-6-605) の承認を経て、実施された。レシピエントの未経産ホルスタインの発情周期を同期化するためにクロプロステノール 0.75 mg を 1 回注射した。過排卵誘起および人工受精した妊娠 7 日 (発情=0 日) の黒毛和種から、胚移植に使用する胚を採取した。その後、採取した胚盤胞 2 個を発情周期 7 日に、レシピエントウシの子宮角に非外科的に移植した。次いで、妊娠 17、20、22 日の子宮組織内を滅菌した 500 mL の PBS (pH 7.2) で洗浄し、そこから伸長した胚を含む約 500 mL の子宮灌流液を、非外科的に回収した。回収した子宮灌流液から、胚を取り除き、その後、遠心分離 (4 °C、4,000 g、5 分間) にて、細胞断片を子宮灌流液から分離し、上清を 0.22 μm のメンブレンでろ過した後、実験で使用するまで -80 °C で保存した。

1-2. ウシ子宮灌流液からの EVs の単離

第1章、第1節、1-2 と同様に、プロトコールに従い、妊娠 17、20、22 日のウシ子宮灌流液に Exo-Quick-TC (System Biosciences) を加え、インキュベート (4 °C、24 時間) 後、遠心分離 (4 °C、1,500 g、

30 分間) により EVs を単離した。単離した EVs を PBS で 3 回洗浄した後、PBS (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) または M-PER (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Thermo Fisher Scientific) に懸濁した。

1-3. 透過型電子顕微鏡

第 1 章、第 1 節、1-3 と同様に PBS に懸濁したウシ EVs を透過型電子顕微鏡にて撮影した。

1-4. ナノ粒子解析

第 1 章、第 1 節、1-4 と同様に、妊娠 17、20、22 日のウシ子宮灌流液から単離され PBS 中に懸濁した EVs ($2\text{-}6\times 10^8$ 個/ml) を、ナノ粒子解析に供し、各可視粒子を追跡ビデオで 30 秒間録画した。その後、Stokes-Einstein 方程式を用いて、サンプル中の粒子のサイズ分布と数 (濃度) を決定した。

1-5. iTRAQ 解析

PBS に懸濁した妊娠 17、20、22 日のウシ EVs を、30 ml の iTRAQ 溶解緩衝液 (50 mM TAEB、0.1% SDS) に再懸濁した。総タンパク質 (100 mg) をトリプシンにて消化し、プロトコールに従い、iTRAQ 試薬と反応させた。Agilent 3100 OFFGEL 分画器 (Agilent Technologies) を用いて、サンプルの分画を行った。さらに、Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、質量分析を行い、Mascot ソフトウェアを用いて、タンパク質を同定し、定量した。

1-6. EECs と CT-1 の培養条件

第 1 章、第 1 節、1-7 と同様に、EECs の単離と培養を行った。

CT-1 は、フロリダ大学にて、妊娠 10-11 日の体外受精により作出されたウシ胚盤胞から樹立され、その後東京大学に輸送された。CT-1 を、非必須アミノ酸 (Life Technologies)、2 mM グルタミン (Life Technologies)、2 mM ピルビン酸ナトリウム (Life Technologies)、55 mM 2-メルカプトエタノール (Life Technologies)、抗生物質/抗真菌溶液 (Life Technologies) を添加した 10 % (v/v) ウシ胎仔血清 (Life Technologies) を含む DMEM 培養液 (和光純薬工業) にて、37 °C で培養した。

in vitro 試験では、EECs または CT-1 を、IA 型コラーゲンを塗布した 12 穴プレート (5×10^4 個/well) に播種し、妊娠 17、20、22 日のウシ EVs をそれぞれ処置し (10 $\mu\text{g}/\text{well}$)、無血清 DMEM/F12 培養液で 48 時間培養した。培養後、細胞を回収し、その後の解析を行った。

1-7. リアルタイム RT-PCR 解析

プロトコールに従い、ISOGEN (Nippon Gene) を用いて、EECs からトータル RNA を抽出した。抽出したトータル RNA (100 ng) を用いて、第 1 章、第 1 節、1-8 と同様の方法、条件で解析した。また、*STAT1*、*STAT2*、*MX1*、*MX2*、*ISG15*、*ATCB*、*GAPDH* は第 1 章、第 1 節、1-8 と同様のプライマーを用いた。*BCL2*、*BAX*、*CASP3*、*SELL*、*TNFA*、*TP53*、*VCAMI* のプライマー配列は以下に示す通りである。

<i>BCL2</i>	S	5'-AGAGCGTCAACCGGGAGAT-3'
	AS	5'-GACAGCCAGGAGAAATCAAACA-3'
<i>BAX</i>	S	5'-ATCGGAGATGAATTGGACAG-3'
	AS	5'-CCTTGAGCACCAGTTTGC-3'
<i>CASP3</i>	S	5'-CACGGAAGCAAATCAGTGGAC-3'
	AS	5'-CGACAGGCCATGCCAGTATT-3'
<i>SELL</i>	S	5'-ACAGCCCTCTGCTACACAGCTTC-3'
	AS	5'-GGGGCCTCCAAAGGCACACA-3'
<i>TNFA</i>	S	5'-CCACGTTGTAGCCGACATCA-3'
	AS	5'-ATGAGGTAAAGCCCGTCAGC-3'
<i>TP53</i>	S	5'-AGAAGTTGGAGCACATGACG-3'
	AS	5'-ATACTCCGCGCGTAAATTCC-3'
<i>VCAMI</i>	S	5'-AGAAGAGCCAACATGACAGGGTCA-3'
	AS	5'-TCAAGGAAGCCTGAACCCCCAGT-3'

1-8. ウェスタンブロット解析

第1章、第1節、1-9と同様の方法でEVsからタンパク質を抽出し、サンプルを調製した。1次抗体は、抗IFNT抗体、抗CD63抗体、抗HSP70抗体(第1章、第1節、1-9と同様)を用いた。

1-9. 統計処理

リアルタイム RT-PCR 解析の結果を平均値 ± 標準誤差で示した。有意差検定には、Dunnnett 検定を用いて、危険率 5% ($p < 0.05$) をもって統計学的に有意差があるものと判定した。

第2節 実験結果

2-1. ウシ子宮灌流液における EVs の同定

妊娠 17、20、22 日 (胚着床=19.5 日) のウシ子宮灌流液から EVs を単離し、EVs マーカータンパク質 CD63、HSP70 の発現を調べたところ、全サンプルで陽性であった (図 8 A)。また、直径 50-150 nm の EVs 像が確認された (図 8 B)。さらに、妊娠 17、20、22 日の粒子径は、妊娠 17 日の EVs で平均 108.9 nm、標準偏差 39.4 nm、妊娠 20 日の EVs で平均 119.9 nm、標準偏差 55.3 nm、妊娠 22 日の EVs で平均 136.9 nm、標準偏差 55.0 nm であった (図 8 C)。これらの結果から、ウシの胚着床周辺期の子宮腔に EVs が存在することが示された。

2-2. ウシ EVs に含まれるタンパク質の同定

第 1 章にて、胚着床周辺期のヒツジの子宮灌流液から単離された EVs が、EECs に作用することを示した。しかし、胚着床周辺期の EVs に含まれるタンパク質についての詳細は不明である。そこで、胚着床周辺期の EVs 中のタンパク質を網羅的に同定するために、妊娠 17、20、22 日のウシ EVs を iTRAQ 解析に供した。その結果、妊娠 17、20、22 日のウシ EVs の中から、合計 596 個のタンパク質が検出され、そのうち 172 個は、サンプル間で相対発現量が 1.5 倍以上変化していた⁴²⁾。

2-3. ウシ EVs の CT-1 と EECs に対する作用

子宮内膜から放出された EVs が、ヒツジ胚の IFNT の生成・分泌を促すことが報告されている¹⁵⁾。そこで、妊娠 17、20、22 日のウシ EVs が、CT-1 において、IFNT とその転写因子 CDX2 の発現を誘導するのか検討した。CT-1 に妊娠 17、20、22 日のウシ EVs をそれぞれ 10 µg ずつ処置し、48 時間培養後、CT-1 における IFNT、CDX2 発現をリアルタイム RT-PCR 解析により検証した。その結果、CT-1 に EVs を処置しても、未処置群と比べて、IFNT、CDX2 発現は変化しなかった (図 9 A)。

第 1 章にて、胚着床周辺期のヒツジ EVs が、IFNT を含み、EECs にて、IFN 応答因子の遺伝子発現を誘導することを示した。さらに本章で、iTRAQ 解析により、IFNT が、妊娠 17、20、22 日のウシ EVs

中に存在することを確認した。その量は妊娠 17 日のウシ EVs で最も多く、妊娠 22 日の EVs で最も少なかった。この結果は、ウエスタンブロット解析においても同様であった (図 9 B)。そこで、ヒツジと同様に、IFNT を含むウシ EVs が、EECs における IFN 応答因子発現を誘導するのか検討した。EECs に妊娠 17、20、22 日のウシ EVs をそれぞれ 10 μ g ずつ処置し、48 時間培養後に、EECs の IFN 応答因子の発現をリアルタイム RT-PCR 解析により検証した。未処置群と比べ、妊娠 17、20、22 日のウシ EVs は、EVs 中の IFNT 濃度に依存し、EECs における IFN 応答因子 *ISG15*、*MX1*、*MX2*、*STAT1*、*STAT2S* の遺伝子発現を上昇させた (図 9 C)。これらの結果は、胚着床周辺期において、胚から放出された IFNT を含むウシ EVs が、EECs の IFN 応答因子の発現を上昇させたことを示している。

2-4. ウシ EVs のアポトーシス関連因子に対する作用

胎盤から分泌された EVs が、ヒト T 細胞および末梢血単核細胞においてアポトーシスを誘導することが報告されている⁴³⁾。そこで、胚着床周辺期の胚及び子宮内膜においても、ウシ EVs がアポトーシスを誘導するか検証した。CT-1 及び EECs に妊娠 17、20、22 日のウシ EVs をそれぞれ 10 μ g ずつ処置し、48 時間培養後に、CT-1 及び EECs におけるアポトーシス関連因子 *BCL2*、*BAX*、*CASP3*、*TNFA*、*TP53* 発現をリアルタイム RT-PCR 解析により検証した。その結果、CT-1 に EVs を処置しても、未処置群と比べ、アポトーシス関連因子の発現は変化しなかったが、EECs では、未処置群と比べて、妊娠 17 日のウシ EVs の処置群にて、アポトーシス関連因子 *BAX*、*CASP3*、*TNFA*、*TP53* の遺伝子発現が上昇した (図 10 A)。一方で、妊娠 20、22 日のウシ EVs の処置群では、アポトーシス関連因子の遺伝子発現は変化しなかった (図 10 B)。

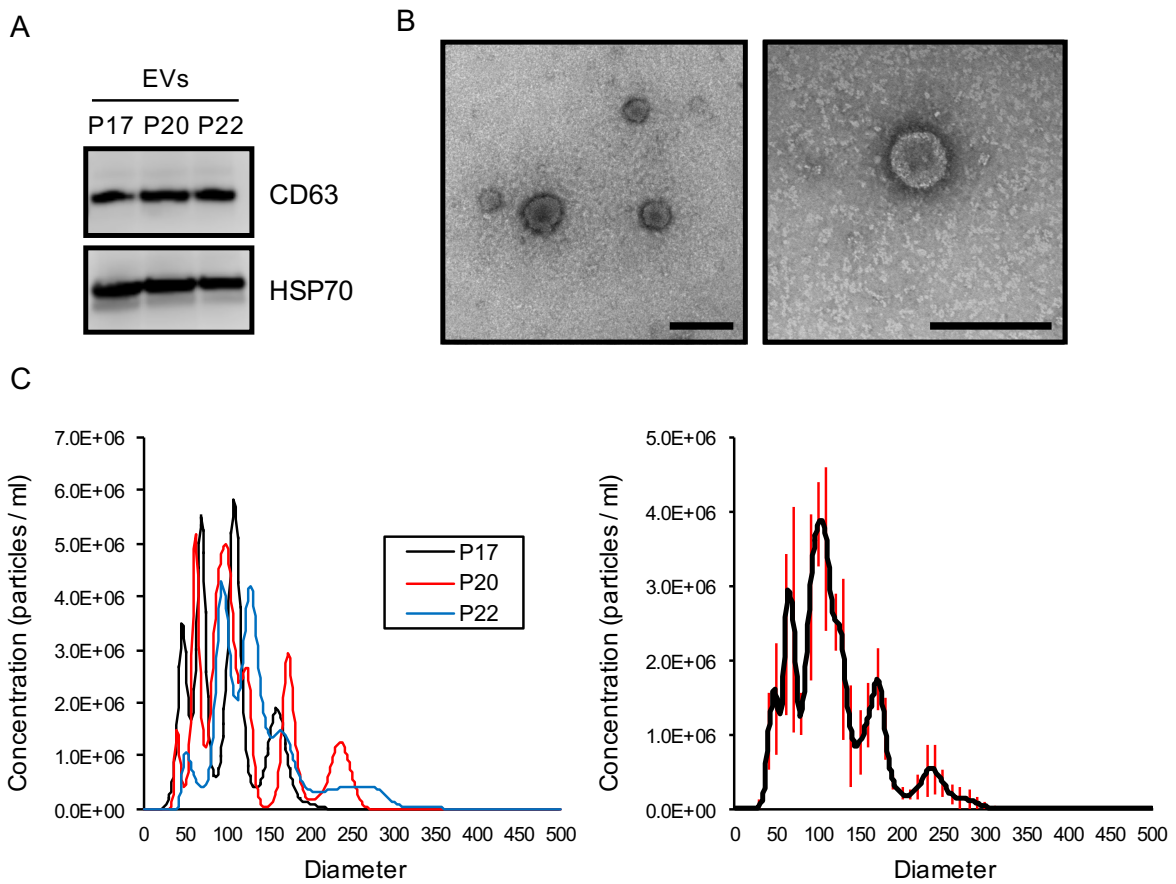


図 8. 妊娠 17、20、22 日のウシ子宮灌流液から単離された EVs の特徴

(A) ウェスタンブロット解析にて、P17、妊娠 20 日 (P20)、妊娠 22 日 (P22) のウシ子宮灌流液から単離した EVs における EVs マーカータンパク質 CD63、HSP70 の発現を調べた (n=3)。3 つの異なる実験結果より代表的なデータを示した。(B) 透過型電子顕微鏡により、子宮灌流液中の EVs 像を確認した。スケールバーは 200 nm を示す。(C) ナノ粒子解析を用いて、P17、P20、P22 のウシの子宮灌流液中に存在する粒子径のサイズの範囲を調べた。左図は、それぞれのサンプルの粒子径の大きさを示し、右図の黒色は、3 つのサンプルの平均値を示す。また右図の赤色は標準誤差を表す。

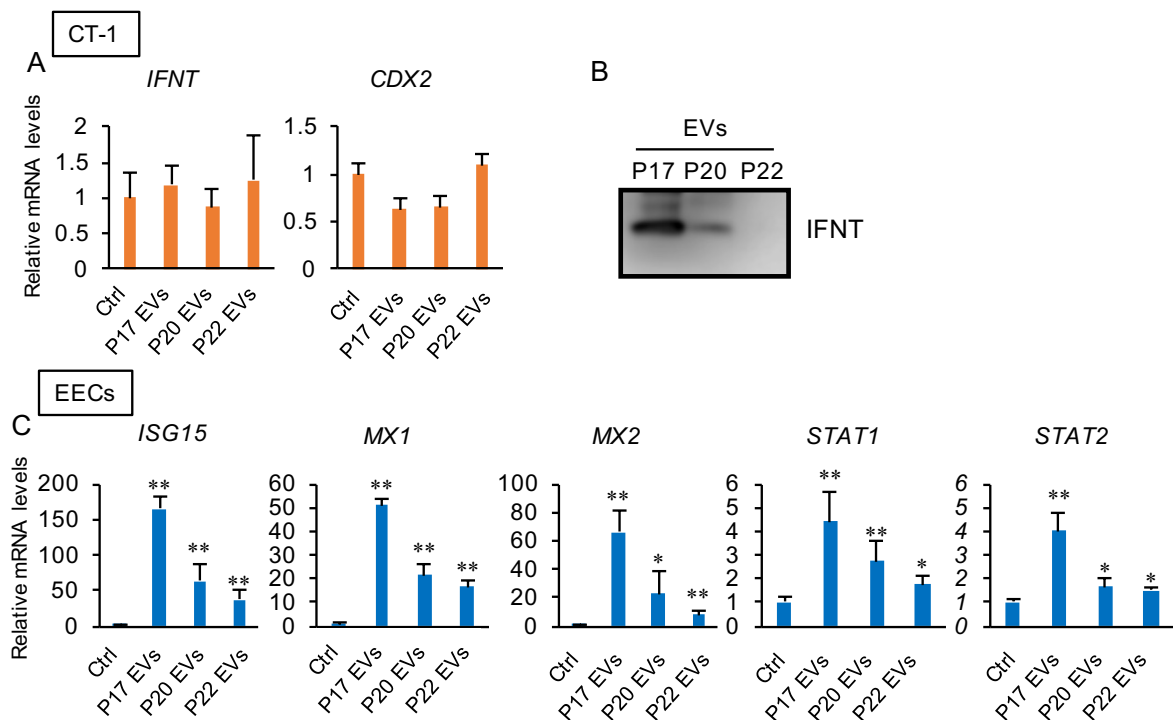


図9. 妊娠17、20、22日のウシEVsのCT-1におけるIFNTとCDX2に対する作用とEECsにおけるIFN応答因子に対する作用

(A) CT-1のIFNTとCDX2に対するEVsの作用を検証した。CT-1は、P17、P20、P22のウシEVs(10 μg)の処置とともに48時間培養された。その後、リアルタイムRT-PCR解析を用いて、IFNT、CDX2のCT-1におけるmRNA量を求め、無処置(Ctrl.)の値を1とした相対値で示した(n=3)。グラフは、平均値±標準誤差で示した。(B) ウェスタンブロット解析にて、P17、P20、P22のウシEVsにおけるIFNTタンパク質の発現を調べた(n=3)。3つの異なる実験結果より代表的なデータを示した。(C) EECsのIFN応答因子に対するEVsの作用を検証した。EECsは、P17、P20、P22のウシEVs(10 μg)の処置とともに48時間培養された。その後、リアルタイムRT-PCR解析を用いて、ISG15、MX1、MX2、STAT1、STAT2のEECsにおけるmRNA量を求め、Ctrl.の値を1とした相対値で示した(n=3)。グラフは、平均値±標準誤差で示した(**P<0.01, *P<0.05 vs. Ctrl.)。

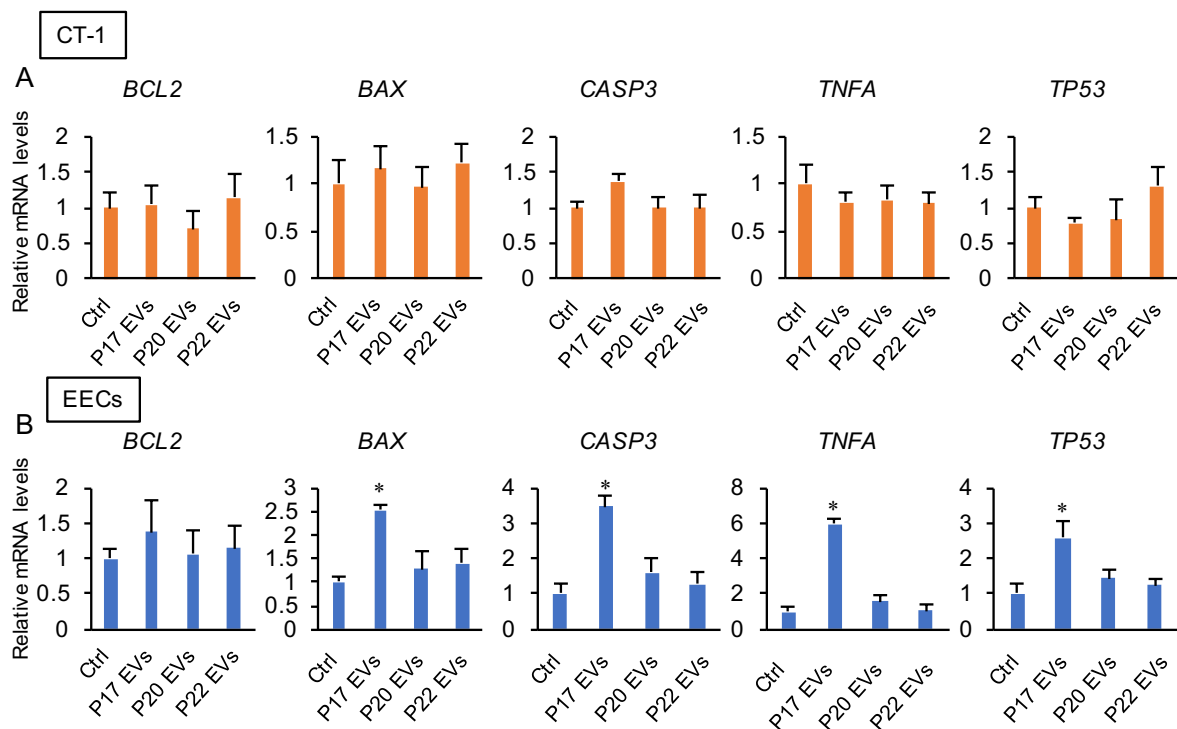


図 10. 妊娠 17、20、22 日のウシ EVs の CT-1 と EECs におけるアポトーシス関連因子に対する作用

(A) CT-1 のアポトーシス関連因子に対する EVs の作用を検証した。CT-1 は、P17、P20、P22 のウシ EVs (10 μ g) の処置とともに 48 時間培養された。その後、リアルタイム RT-PCR 解析を用いて、*BCL2*、*BAX*、*CASP3*、*TNFA*、*TP53* の CT-1 における mRNA 量を求め、無処置 (Ctrl.) の値を 1 とした相対値で示した (n=3)。グラフは、平均値±標準誤差で示した。(B) EECs のアポトーシス関連因子に対する EVs の作用を検証した。EECs は、P17、P20、P22 のウシ EVs (10 μ g) の処置とともに 48 時間培養された。その後、リアルタイム RT-PCR 解析を用いて、*BCL2*、*BAX*、*CASP3*、*TNFA*、*TP53* の EECs における mRNA 量を求め、Ctrl. の値を 1 とした相対値で示した (n=3)。グラフは、平均値±標準誤差で示した (P<0.01 vs. Ctrl.)。

2-5. ウシ EVs の接着因子に対する作用

妊娠 20、22 日のウシ子宮灌流液を EECs に添加することで、胚着床に重要な接着因子 *VCAM1* と *SELL* の発現が上昇することが報告されている^{11,44)}。そこで、胚着床周辺期のウシ子宮灌流液中の EVs が、これら接着因子の発現を誘導するのか検証した。EECs に妊娠 17、20、22 日のウシ EVs をそれぞれ 10 μ g ずつ処置し、48 時間培養後に、EECs における *VCAM1* と *SELL* 発現をリアルタイム RT-PCR 法にて解析した。その結果、未処置群と比べ、妊娠 20、22 日のウシ EVs は、EECs における *VCAM1* 発現を上昇させた (図 11 A)。一方、妊娠 17 日のウシ EVs は、*VCAM1* 発現に変化を及ぼさなかった。また、未処置群と比べ、妊娠 17、20、22 日のウシ EVs は、EECs の *SELL* 発現に変化を及ぼさなかった (図 11 B)。

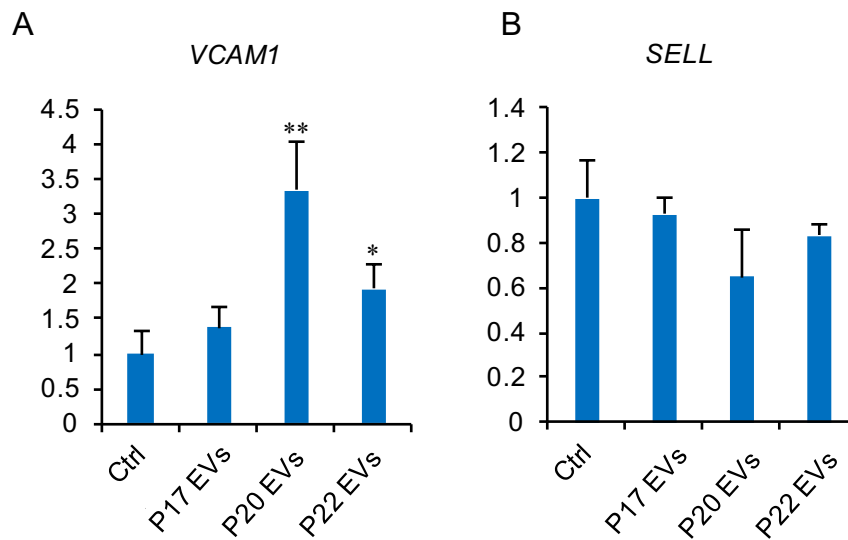


図 11. 妊娠 17、20、22 日のウシ EVs の EECs における接着因子に対する作用

EECs の接着因子に対する EVs の作用を検証した。EECs は、P17、P20、P22 のウシ EVs (10 μ g) の処置とともに 48 時間培養された。その後、リアルタイム RT-PCR 解析を用いて、*VCAM1*、*SELL* の EECs における mRNA 量を求め、Ctrl. の値を 1 とした相対値で示した (n=3)。グラフは、平均値 \pm 標準誤差で示した (**P<0.01, *P<0.05 vs. Ctrl.)。

第3節 考察

妊娠 17、20、22 日 (胚着床=約 19.5 日) のウシ子宮灌流液から EVs を単離した。さらに、iTRAQ 解析により、妊娠 17、20、22 日のウシ EVsの中から、合計 596 個のタンパク質を同定した。そのうち 172 個は、サンプル間で相対発現量が 1.5 倍以上変化していた。また、胚から産生・分泌される IFNT は、単離したウシ EVs にも含まれていた。これは、胚着床周辺期において、ヒツジと同様、ウシの子宮腔にも胚から分泌された EVs が存在することを示している。さらに、IFNT を含むウシ EVs は、EECs の IFN 応答因子の遺伝子発現を誘導し、ウシ子宮腔内 EVs が、胚着床周辺期の子宮内膜に作用することを明らかにした。さらに、子宮腔内ウシ EVs は、CT-1 には作用しなかったが、EECs においてアポトーシス関連因子および接着分子の mRNA 発現を上昇させた。これは、着床周辺期のウシ EVs が、子宮内膜に作用することで、胚着床に適した子宮内環境を構築していることを示唆している。

妊娠 13 日のヒツジの子宮腔内に放出された子宮内膜 EVs が、ヒツジの胚栄養膜細胞において、Toll 様受容体を介して、IFNT の分泌を誘導することが報告されている¹⁹⁾。しかし、本研究では、妊娠 17、20、22 日のウシ EVs の処置により、CT-1 における IFNT および CDX2 発現は上昇しなかった。このことから、子宮内 EVs による IFNT の産生・分泌を誘導する作用機序は、妊娠過程により異なること、そして、その違いは、EVs 中の特定の因子に起因していることが推察された。一方で、ヒツジでの結果と同様に、IFNT を含む妊娠 17、20、22 日のウシ EVs は、EECs における IFN 応答因子 *ISG15*、*MX1*、*MX2*、*STAT1*、*STAT2* の遺伝子発現を上昇させた。これら知見により、IFNT は、反芻動物の子宮腔内において、分泌タンパク質として、もしくは EVs に含まれる形で、それぞれ子宮内膜に作用していることが示唆された。

アポトーシスは、多細胞生物の細胞で増殖制御機構として管理・調節された、細胞死の一種である。子宮内膜上皮を含む多くの生殖組織や細胞では、アポトーシスを通じ、発生過程において、不要な細胞が取り除かれている⁴⁵⁾。ヒトの研究において、EVs が活性化した免疫細胞にアポトーシスを誘導することが示されている⁴³⁾。本研究にて、妊娠 17 日のウシ EVs が、EECs のアポトーシス関連因子、*BAX*、*CASP3*、*TNFA*、*TP53* の発現を促進させることが明らかとなった。特に、*TNFA* は、子宮内膜に

においてアポトーシスを誘導する因子として知られている^{46,47)}。さらに、EVs に含まれる miRNA や lncRNA が、アポトーシスを誘導することが報告されている⁴⁸⁻⁵⁰⁾。これらの知見は、胚着床期において、妊娠 17 日のウシ EVs に含まれるタンパク質やノンコーディング RNA が、子宮内膜上皮のアポトーシスを誘導し、接着に不要な一部の細胞を取り除くことで、胚着床を調整していることを示唆している。

VCAM1 と SELL は、胚が子宮内膜に着床するための重要な接着因子である。ヒトの子宮では、妊娠初期において胚盤胞が着床するために、SELL 接着システムが必須であることが確認されている⁵¹⁾。また、不妊症患者の子宮内膜において、着床周辺期の VCAM1 の発現が、正常な患者と比べて、有意に低いことが報告されている⁵²⁾。過去に、妊娠 20、22 日のウシ子宮灌流液が、EECs での VCAM1 と SELL の発現を誘導することが報告されている^{11,44)}。本研究にて、胚着床直後の妊娠 20 日と 22 日のウシ EVs が、EECs の VCAM1 発現を上昇させることを明らかにした。この結果により、妊娠 20、22 日のウシ EVs が、子宮内膜の VCAM1 の発現を誘導することで、胚の子宮内膜への着床において重要な役割を持つ可能性が示唆された。一方で、妊娠 20、22 日のウシ EVs の処置による SELL の発現変化は見られなかった。妊娠 20、22 日のウシ子宮灌流液は、SELL の発現を誘導したことを考えると、子宮内膜の SELL は、ウシ子宮灌流液中の、EVs 以外の因子により発現が制御されていることが推察された。

結論として、本研究は、ウシの子宮腔にも胚から分泌された EVs が存在し、さらに、IFNT を含むウシ EVs が、EECs のアポトーシス関連因子および着床因子の発現を誘導していることを明らかにした。

第4節 小括

本章では、胚着床期のウシの子宮腔内における EVs の作用について *in vitro* 試験にて検討を行い、以下の新知見を得た (本研究結果は、*Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495, 1370-1375, 2017⁴²⁾ に報告した)。

- (1) 妊娠 17、20、22 日のウシ子宮灌流液から EVs を単離した。さらに、これらウシ EVs の中から、合計 596 個のタンパク質を同定し、そのうち 172 個は、サンプル間で相対発現量が 1.5 倍以上変化していた。
- (2) 胚から産生・分泌される IFNT が、妊娠 17、20、22 日のウシ EVs にも存在した。また、胚着床周辺期において、ウシ EVs は、EECs の IFN 応答因子 *ISG15*、*MX1*、*MX2*、*STAT1*、*STAT2* の遺伝子発現を上昇させた。
- (3) 妊娠 17 日のウシ EVs は、EECs において、アポトーシス関連因子 *BAX*、*CASP3*、*TNFA*、*TP53* の遺伝子発現を上昇させた。
- (4) 妊娠 20、22 日のウシ EVs は、EECs において、接着因子 *VCAMI* の遺伝子発現を上昇させた。

第3章 ウシ子宮内 EVs の作用と IFNT 非依存的な役割

第1章、第2章にて、胚着床周辺期のヒツジやウシの子宮腔内に EVs が存在し、それらが子宮内膜に作用していることを見出した。しかし、同時に、胚着床周辺期の子宮腔内には多量の IFNT が存在しており、EVs 本来の効果と IFNT の作用を区別することが困難であった。そこで、本章では、胚着床期における EVs の子宮内膜に対する IFNT とは別の経路を介した効果について検証するため、非妊娠および胚着床期の EVs と IFNT をそれぞれ EECs に添加し、これら細胞の転写産物を網羅的に解析・比較検討した。

第1節 実験材料及び実験方法

1-1. ウシ子宮灌流液の回収

第2章、第1節、1-1 と同様の方法で、非妊娠及び妊娠 17 日のウシ子宮灌流液を回収した。

1-2. ウシ子宮灌流液からの EVs の単離

第2章、第1節、1-2 と同様の方法で、非妊娠及び妊娠 17 日のウシ子宮灌流液から EVs を単離した。

1-3. 透過型電子顕微鏡

第1章、第1節、1-3、第2章、第1節、1-3 と同様の方法で、PBS に懸濁したウシ EVs を透過型電子顕微鏡にて撮影した。

1-4. ナノ粒子解析

第1章、第1節、1-4、第2章、第1節、1-4 と同様の方法で、非妊娠及び妊娠 17 日のウシ子宮灌流液から単離され PBS 中に懸濁した EVs ($2\text{-}6 \times 10^8$ 個/ml) を、ナノ粒子解析に供し、各可視粒子を追跡

ビデオで 30 秒間録画した。その後、Stokes-Einstein 方程式を用いて、サンプル中の粒子のサイズ分布と数 (濃度) を決定した。

1-5. EECs の培養条件

第 1 章、第 1 節、1-7、第 2 章、第 1 節、1-6 と同様の方法で、ウシ EECs を単離、培養した。

in vitro 試験では、EECs を、IA 型コラーゲンを塗布した 12 穴プレート (5×10^4 個/well) に播種し、非妊娠及び妊娠 17 日のウシ EVs をそれぞれ単独処置 (10 μ g/well)、または NF- κ B インヒビターの選択的 I κ B キナーゼ阻害剤 (TPCA1) (20 nM/well, ab14522, Abcam) を共処置し、無血清 DMEM/F12 培養液で 48 時間培養した。培養後、細胞を回収し、その後の解析を行った。

1-6. RNA 配列決定、データ、遺伝子オントロジー、および経路分析

プロトコールに従い、ISOGEN (Nippon Gene) を用いて、EECs からトータル RNA を抽出した。その後、TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina) を用いて、ハイスループット配列決定ライブラリーを作成し、Macrogen Japan にて、解析を行った。一次配列データは、DNA data bank of Japan (DDBJ) 配列リードアーカイブに保存した (DRR174782-DRR174790)。ショートリードデータのレファレンスゲノム (bosTau8) に対するアラインメントには TopHat を用いた。さらに Cufflinks を用いたデータ処理によって、個々の転写産物の再構築を行い、遺伝子発現レベルの定量結果を FPKM (Fragments per kilobase of exon per million mapped sequence reads) 正規化により算出するとともに、FPKM が 1 以下のものは取り除いた。その後、Enrichr ツール (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) を用いて、遺伝子オントロジー (GO) 解析とエンリッチシグナル伝達経路解析を行った。さらに、本実験にて得られた RNA-seq のデータセットを、妊娠 15 日のウシ胚と共培養した子宮内膜外植片のデータセットと^{53,54}、IFNT を処置した EECs から得られた RNA-seq のデータセット (DRR083698-DRR083699)⁵⁵ と比較した。

1-7. リアルタイム RT-PCR 解析

添付のプロトコールに従い、ISOGEN (Nippon Gene) を用いて、EECs からトータル RNA を抽出した。抽出したトータル RNA (100 ng) を用いて、第 1 章、第 1 節、1-8、第 2 章、第 1 節、1-7 と同様の方法、条件にて解析した。また、*ACTB*、*GAPDH* は第 1 章、第 1 節、1-8、第 2 章、第 1 節、1-7 と同様のプライマーを用いた。*BIRC3*、*CD40*、*CSF2*、*CXCL2*、*CXCL3*、*CXCL5*、*IL6*、*MMP9*、*NFKBIA*、*TNFAIP3* のプライマーの配列は以下に示す通りである。

<i>BIRC3</i>	S	5'-TCCAGATGTGGCCGTTGACT-3'
	AS	5'-CCTTCGGTTCCCAATTGCTC-3'
<i>CD40</i>	S	5'-CGGTAAAGGCGAATTCTTGTC-3'
	AS	5'-GCCTTCGACACATACACAAGTG-3'
<i>CSF2</i>	S	5'-GAATGACACAGAAGTCGTCTCTG-3'
	AS	5'-AAGGAGCCCATGAGACTAGTG-3'
<i>CXCL2</i>	S	5'-AGAAGCTCTTGGATGGCTGTTCCA-3'
	AS	5'-AGATGGCCTTAGGAGGTGGTGATT-3'
<i>CXCL3</i>	S	5'-ACTGTGGCCAAACCGAAGTC-3'
	AS	5'-TTGGTGCTGCCCTTGTTTAG-3'
<i>CXCL5</i>	S	5'-TCGCCACTATGAGACTGCTATC-3'
	AS	5'-AACGCAGCTCTCTCACAACG-3'
<i>IL6</i>	S	5'-ACCGAAGCTTCATTAAGCG-3'
	AS	5'-TTCTGCCAGTGTCTCCTTGC-3'
<i>MMP9</i>	S	5'-CCCGGATCAAGGATACAGCC-3'
	AS	5'-GGGCGAGGACCATACAGATG-3'
<i>NFKBIA</i>	S	5'-TCCTGCACTTAGCCATCATCC-3'
	AS	5'-TCTGGCTGGTTAGTGATCACAG-3'

<i>TNFAIP3</i>	S	5'-TTGCAACATCCTCAGAAGGC-3'
	AS	5'-AAATCCCACCCACCTTCAGAG-3'

1-8. ウェスタンブロット解析

第1章、第1節、1-9、第2章、第1節、1-8と同様の方法でEVs及びEECsからタンパク質を抽出し、サンプルを調製した。1次抗体には、抗CD63抗体(第1章、第1節、1-9、第2章、第1節、1-8と同様)、抗HSP70抗体(第1章、第1節、1-9、第2章、第1節、1-8と同様)、抗ACTB抗体(第2章、第1節、1-8と同様)、抗CD40L抗体(1:100, ARP33831_P050, Aviva Systems Biology)、抗TNFA抗体(1:1000, GTX38917, GeneTex)、抗NF-kB p65抗体(1:1000, C22B4, Cell signaling Technology)、抗NF-kB p65抗体(acetyl K310)(1:1000, ab19870, Abcam)を用いた。得たバンドをデンストメトリーにより数値化し、目的バンド値を、HSP70値またはNF-kB p65値で補正することにより、各サンプル間のタンパク質量の比を求めた。

1-9. 統計処理

リアルタイム RT-PCR 解析の結果を平均値 ± 標準誤差で示した。有意差検定には、Tukey-Kramer 多重比較を行い、危険率 5% ($p < 0.05$) をもって統計学的に有意差があるものと判定した。

第2節 実験結果

2-1. ウシ子宮灌流液における EVs の同定

非妊娠及び妊娠 17 日のウシ子宮灌流液から EVs を単離し、EVs マーカータンパク質 CD63、HSP70 の発現を調べたところ、全サンプルで陽性であった (図 12 A)。また、直径 50-150 nm の EVs 像が検出された (図 12 B)。さらに、非妊娠及び妊娠 17 日の粒子径は、非妊娠 17 日の EVs で平均 116.4 nm、標準偏差 50.2 nm、妊娠 17 日の EVs で平均 108.9 nm、標準偏差 39.4 nm であった (図 12 C)。これらの結果から、ウシの胚着床期の子宮腔に EVs が存在することが示された。

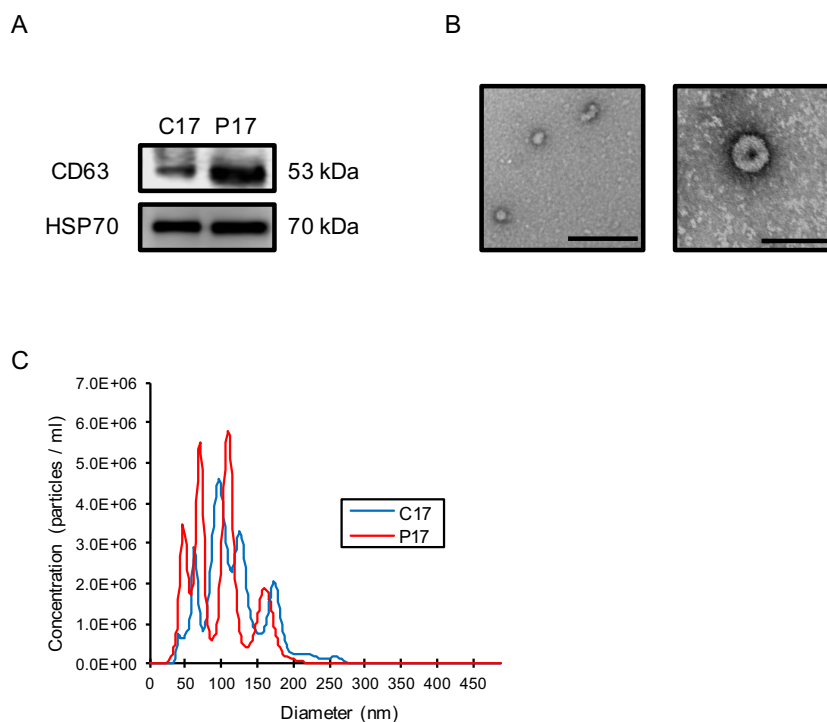


図 12. 非妊娠及び妊娠 17 日のウシ子宮灌流液から単離された EVs の特徴

(A) ウェスタンブロット解析にて、C17、P17 のウシ子宮灌流液から単離した EVs における EVs マーカータンパク質 CD63、HSP70 の発現を調べた (n=3)。3 つの異なる実験結果より代表的なデータを示した。(B) 透過型電子顕微鏡により、子宮灌流液中の EVs 像を確認した。スケールバーはそれぞれ 400 nm (左) と 200 nm (右) を示す。(C) ナノ粒子解析を用いて、C17、P17 のウシ子宮灌流液中に存在する粒子径のサイズの範囲を調べた。図は、それぞれのサンプルの粒子径の大きさを示す。

2-2. 非妊娠ウシ EVs の EECs への作用

非妊娠 EVs の EECs への作用を検証した。非妊娠の子宮灌流液から単離したウシ EVs を、EECs へ処置し 48 時間培養後、これら細胞の全転写産物を RNA-seq にて解析し、合計 9164 個の転写産物を同定した。非妊娠 EVs の処置により、未処置群と比べて、同定した全転写産物のうち、8 個の遺伝子発現が上昇しており、11 個の遺伝子発現が減少していた ($q < 0.05$) (図 13 A)。一方、非妊娠 EVs 処置群と未処置群をペアプロット比較したところ、EECs における発現変動遺伝子 (DEGs) は、非常に少なかった (図 13 B)。

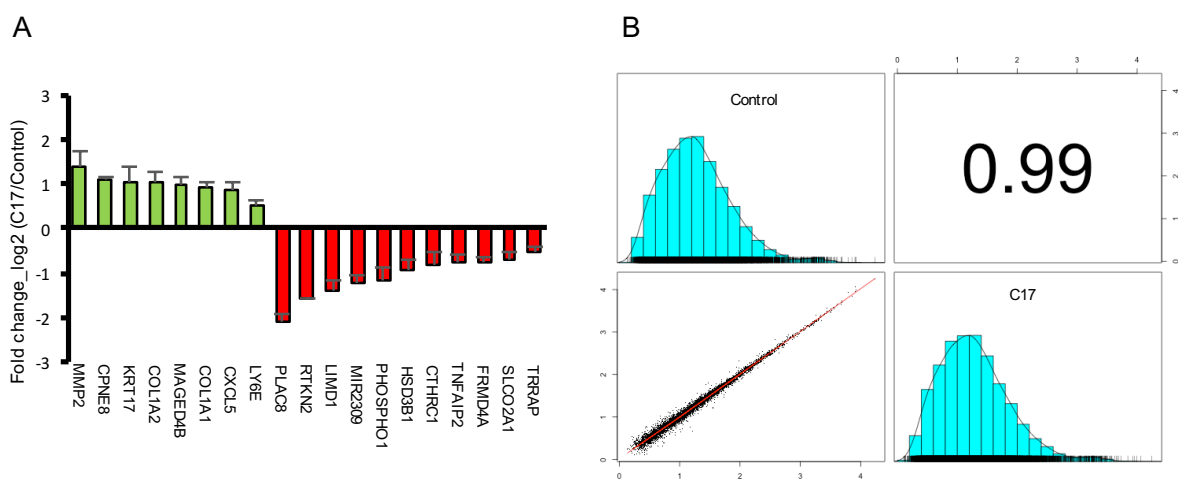


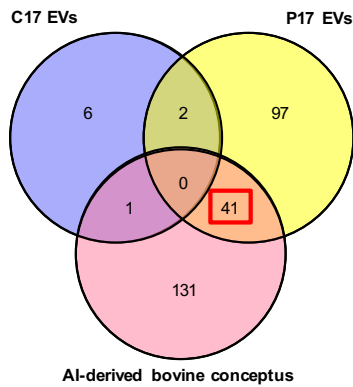
図 13. 非妊娠のウシ子宮内 EVs の EECs の転写産物への作用

EECs は、C17 のウシ EVs (10 μ g) の処置とともに、または無処置 (Control) で 48 時間培養され、その後、これら細胞の転写産物を RNA-seq にて解析した。データは、3 つの異なる *in vitro* 実験から得られた。(A) EECs にて、無処置群と比べ、C17 のウシ EVs の処置により相対発現量が 2 倍以上変化している DEGs が、19 個同定された ($q < 0.05$ vs. Control)。 (B) 図は、無処置群と C17 の EVs 処置群のグループ間のペアプロット比較と各グループの密度プロットを表している。また、数字は、無処置群と C17 のウシ EVs 処置群のグループ間の相関係数を示す。

2-3. 胚から放出されたウシ EVs の EECs に対する作用

第 1 章と第 2 章により、胚着床周辺期のヒツジやウシの子宮腔内には EVs が存在し、それらが子宮内膜に作用していることが示された。本実験では、子宮内膜において、胚により発現が誘導される転写産物の検証を行った。はじめに、非妊娠及び妊娠 17 日のウシ EVs をそれぞれ EECs に処置し、48 時間培養後、これら細胞における全転写産物を RNA-seq にて解析し、未処置群と比べて、発現量が 2.0 倍以上変化している DEGs を抽出した ($q < 0.05$)。未処置群と比べて発現量が 2.0 倍以上変化した DEGs は、非妊娠の EVs で 9 個、妊娠 17 日の EVs で 140 個だった。次に、これら DEGs を妊娠 15 日のウシ胚と共培養した子宮内膜組織片から得られた RNA-seq のデータセット^{53,54)}と比較した。その結果、妊娠 17 日のウシ EVs 処置群と妊娠 15 日のウシ胚共培養群との間で、41 個の DEGs が共通していた (図 14 A)。このことは、EECs の 41 個の DEGs が胚から分泌された EVs により制御されていることを示唆している。さらに、これら 41 個の DEGs をエンリッチングシグナル伝達経路解析と GO 解析に供したところ、最も関連性の高いシグナル伝達経路および生物学的機能として、それぞれ「インターフェロンシグナル伝達」と「I 型インターフェロンに対する細胞応答」が同定された (図 14 B)。

A



B

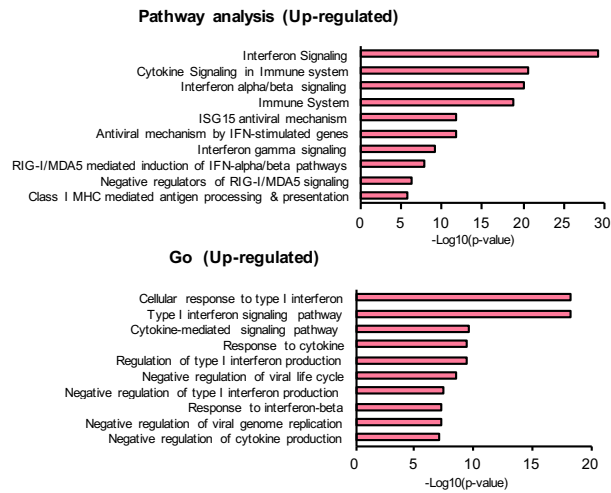


図 14. 胚由来 EVs の EECs における転写産物への作用

(A) ベン図は、EECs にて、無処置群と比べて、C17 及び P17 のウシ EVs とウシ胚の処置によりそれぞれ相対発現量が 2 倍以上変化している DEGs を示す ($q < 0.05$ vs. Control)。このうち、P17 の EVs とウシ胚処置群との間で、41 の転写産物 (赤長方形) が共通していた。(B) P17 の胚由来のウシ EVs 処置により EECs で発現が上昇した 41 個の転写産物をエンリッチシグナル伝達経路解析と GO 解析に供し、これら DEGs の機能性を分類した。

2-4. ウシ EVs の IFNT 非依存的な作用

胚は着床期に、IFNT とは別の経路を介しても子宮内膜の転写産物の発現を誘導することが知られているが⁵³⁾、その発現制御機構や作用機序は不明である。そこで、胚着床期における EVs が、IFNT 非依存的にも、子宮内膜の転写産物の発現を誘導していると仮定し、EVs の IFNT 非依存的な作用について検証を行った。前述の非妊娠及び妊娠 17 日のウシ EVs 処置群で、未処置群と比べて発現量が 2.0 倍以上変化した DEGs を、IFNT の処置により EECs で 2.0 倍以上変化した 114 個の DEGs⁵⁵⁾ と比較し、妊娠 17 日のウシ EVs の処置により、IFNT 非依存的に変動する 82 個の DEGs を同定した (図 15 A)。これら 82 個の DEGs をエンリッチシグナル伝達経路解析と GO 解析に供し、最も関連性の高いシグナル伝達経路および生物学的機能として、それぞれ「腫瘍壊死因子 (TNF) シグナル伝達経路」と「炎症反応」を同定した (図 15 B)。詳細を表 1 と表 2 にまとめた。さらに、TNF シグナル伝達経路関連因子として抽出された 9 個の因子 *CXCL2*、*CXCL3*、*CXCL5*、*CSF2*、*NFKBIA*、*TNFAIP3*、*IL6*、*BIRC3*、*MMP9* 発現をリアルタイム RT-PCR 解析で調べたところ、RNA-seq 解析の結果と類似し、EECs では、TNF シグナル伝達経路関連因子の発現が上昇していることが明らかになった (図 15 C)。

2-5. ウシ EVs の NF- κ B シグナル経路を介した TNF 関連因子への作用

EECs とウシ EVs の TNF 受容体とリガンドの発現について検証した。前述の妊娠 17 日のウシ EVs の処置により、IFNT 非依存的に発現が変化していた 82 個の DEGs の中から、TNF 受容体を探したところ、TNF 受容体スーパーファミリーの *CD40* が含まれていた (図 16 A)。さらに、*CD40* 発現をリアルタイム RT-PCR 解析で調べたところ、RNA-seq 解析の結果と同様に、その発現が上昇していた (図 16 A)。この結果から、EECs において、妊娠 17 日のウシ EVs の処置により、TNF 受容体である *CD40* の発現が、IFNT 非依存的に上昇することが明らかになった。さらに、妊娠 17 日の EVs には、非妊娠の EVs と比べて、*CD40* と結合する *CD40* リガンドタンパク質が多く存在していた (図 16 B)。しかしながら、*TNFA* 発現は検出できなかった。次に、EECs において、ウシ EVs がどのようなシグナル経路を介して TNF 関連因子の発現を上昇させているのかを検証した。*CD40* と *CD40* リガンドの結合は、NF- κ B シグナル経路を活性化することが報告されている⁵⁶⁾。そこで、妊娠 17 日のウシ EVs の子宮内

膜上皮細胞における NF- κ B シグナル経路への作用を検証した。妊娠 17 日のウシ EVs を EECs に添加し、48 時間培養後、ウェスタンブロット解析にて、トータル NF- κ B と NF- κ B のアセチル化を調べたところ、妊娠 17 日のウシ EVs 処置により、NF- κ B シグナル経路が活性化した (図 16 C)。CD40L を含む妊娠 17 日ウシ EVs の NF- κ B シグナル経路に対する効果をさらに調べるために、NF- κ B インヒビター T CPA1 を用いて検証した。その結果、妊娠 17 日のウシ EVs 処置による TNF 関連因子 CXCL2、CXCL3、CXCL5、CSF2、NFKBIA、TNFAIP3、IL6、BIRC3、MMP9 の発現上昇は、NF- κ B インヒビターにより抑制された (図 16 D)。

表 1. P17 のウシ EVs により IFNT 非依存的に発現が誘導されるエンリッチシグナル伝達経路関連因子

Enrichment pathway	P-value	Genes
Up-regulation		
TNF signaling pathway	1.08E-10	NFKBIA, IL6, CSF2, TNFAIP3, CXCL3, MMP9, CXCL2, CXCL5, BIRC3
NOD-like receptor signaling pathway	3.57E-08	NFKBIA, IL6, CXCL8, TNFAIP3, CXCL2, BIRC3
Cytokine-cytokine receptor interaction	2.40E-07	IL22RA1, CD40, IL6, CSF2, CXCL8, CXCR4, CXCL3, CXCL2, CXCL5
Transcriptional misregulation in cancer	1.53E-07	CD40, IL6, CSF2, CXCL8, NFKBIZ, PLAT, MMP9, BIRC3
NF-kappa B signaling pathway	6.82E-07	NFKBIA, CD40, CXCL8, TNFAIP3, CXCL2, BIRC3
Legionellosis	1.11E-06	NFKBIA, IL6, CXCL8, CXCL3, CXCL2
Chemokine signaling pathway	3.02E-06	NFKBIA, CXCL8, CXCR4, ARRB1, CXCL3, CXCL2, CXCL5
Salmonella infection	1.02E-05	IL6, CSF2, CXCL8, CXCL3, CXCL2
Rheumatoid arthritis	1.28E-05	IL6, CSF2, CXCL8, MMP1, CXCL5
Intestinal immune network for IgA production	2.00E-05	PIGR, CD40, IL6, CXCR4

表 2. P17 のウシ EVs により IFNT 非依存的に発現が誘導される GO とその関連因子

GO_BP Term	P-value	Genes
Up-regulation		
Inflammatory response	1.16E-08	PTGFR, CD40, IL6, NCR3, CXCL8, CXCR4, CXCL3, CXCL2, CXCL5, APOL3
Response to molecule of bacterial origin	4.01E-08	CD40, IL6, CXCL8, TNFAIP3, CXCL3, CXCL2, CXCL5
Response to lipopolysaccharide	5.05E-08	CD40, IL6, CXCL8, ZC3H12A, TNFAIP3, CXCL3, CXCL2, CXCL5
Regulation of leukocyte chemotaxis	5.76E-08	CD40, IL6, CXCL8, ZC3H12A, TNFAIP3, CXCL3, CXCL2, CXCL5
Positive regulation of leukocyte migration	1.09E-07	CXCL5, CXCL3, CXCL2, NFKBIA, CXCL8, CD40
Regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	4.13E-07	NFKBIA, CD40, ECM1, ZC3H12A, TNFAIP3, APOL3, BIRC3, LTF
Positive regulation of chemotaxis	6.17E-07	IL6, CXCL8, CXCL3, CXCL2, CXCL5
Cytokine-mediated signaling pathway	1.13E-06	IL22RA1, NFKBIA, CD40, IL6, CSF2, CXCL8, MMP1, CXCL3, MMP9, CXCL2, CXCL5, BIRC3
Positive regulation of neutrophil chemotaxis	1.38E-06	CXCL8, CXCL3, CXCL2, CXCL5
Positive regulation of neutrophil migration	1.63E-06	CXCL8, CXCL3, CXCL2, CXCL5

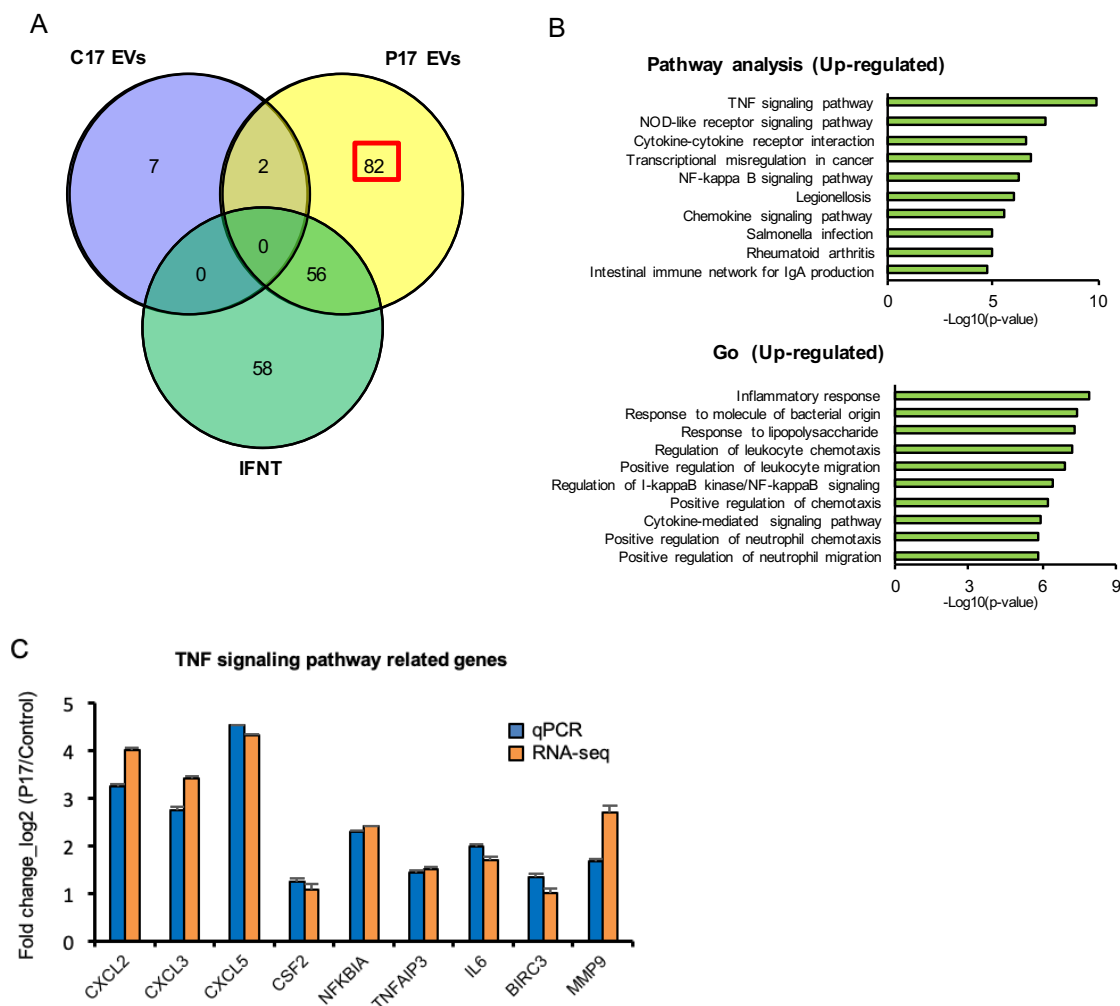


図 15. 妊娠 17 日のウシ EVs の EECs における IFNT 非依存的な作用

(A) ベン図は、EECs にて、無処置群と比べて、C17 及び P17 のウシ EVs と IFNT の処置によりそれぞれ相対発現量が 2 倍以上変化している DEGs を示す ($q < 0.05$ vs. Control)。このうち、82 個の転写産物 (赤長方形) が、P17 のウシ EVs 処置でのみ発現が上昇した。(B) P17 のウシ EVs 処置でのみ EECs で発現が上昇した 82 個の転写産物をエンリッチシグナル伝達経路解析と GO 解析に供し、これら DEGs の機能性を分類した。(C) P17 のウシ EVs 処置または無処置によりそれぞれ培養された EECs における TNF シグナル伝達経路関連因子 *CXCL2*、*CXCL3*、*CXCL5*、*CSF2*、*NFKBIA*、*TNFAIP3*、*IL6*、*BIRC3*、*MMP9* の倍率変化を RNA-seq 解析とリアルタイム RT-PCR 解析で示した ($n=3$)。

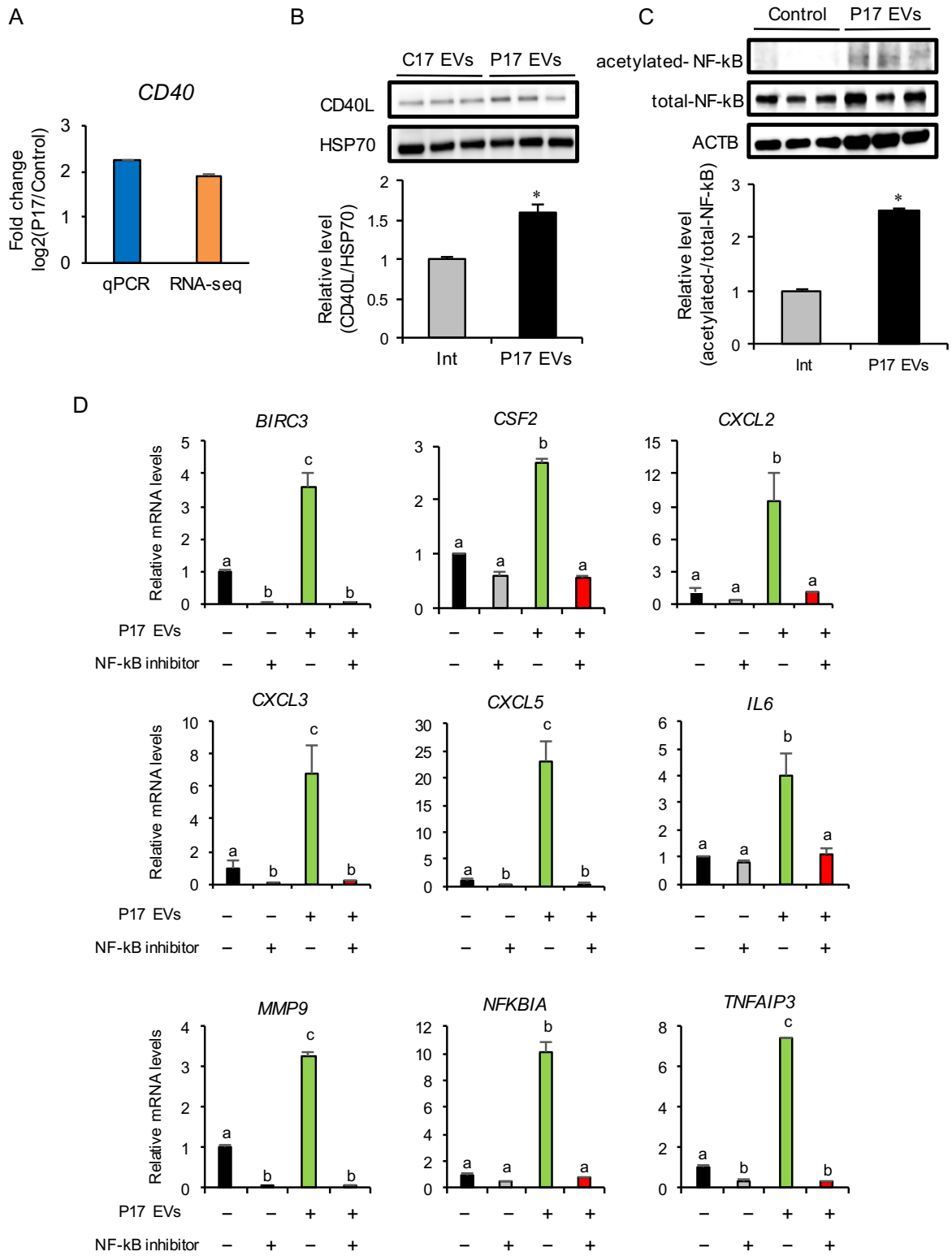


図 16. ウシ EVs 内 CD40L の EECs における NF- κ B の活性化に対する作用

(A) P17 のウシ EVs (10 μ g) の処置または無処置でそれぞれ 48 時間培養された EECs における CD40 の倍率変化を RNA-seq 解析とリアルタイム RT-PCR 解析で示した (n=3)。 (B) ウェスタンブロット解析にて、C17 及び P17 のウシ EVs における CD40L タンパク質の発現を調べた (n=3)。3 つの異なる実験結果より代表的なデータを示した。棒グラフは、HSP70 タンパク質の発現量で補正された CD40L タンパク質の発現量を示す ($p < 0.05$ vs. C17 EVs)。 (C) ウェスタンブロット解析にて、P17 のウシ EVs 処置または無処置によりそれぞれ培養された EECs におけるトータル NF- κ B タンパク質とアセチル化した NF- κ B タンパク質の発現を調べた (n=3)。3 つの異なる実験結果より代表的なデータを示した。棒グラフは、トータル NF- κ B タンパク質の発現量で補正されたアセチル化した NF- κ B タンパク質の発現量を示す ($p < 0.05$ vs. control)。 (D) EECs の NF- κ B シグナル経路を介した TNF 関連因子に対する EVs の作用を検証した。EECs は、無処置、P17 のウシ EVs (10 μ g) 処置のみ、またはこれに加えて TCPA1 (20 nM, NF- κ B インヒビター) の処置とともに 48 時間培養された。その後、リアルタイム RT-PCR 解析を用いて、TNF 関連因子の EECs における mRNA 量を求め、無処置の値を 1 とした相対値で示した (n=3)。グラフは、平均値 \pm 標準誤差で示し、アルファベットの違いは TNF 関連因子の発現量の差を示す ($p < 0.05$)。

第3節 考察

本研究では、ウシ子宮腔内 EVs が、胚着床時において、IFNT とは別の経路を介し、子宮内膜に対して、作用していることを示した。妊娠 17 日のウシ EVs が、IFNT 非依存的に EECs の 82 個の転写産物の発現を誘導し、その中の多数は「TNF シグナル伝達経路」および「炎症反応」と関連していた。また、EECs では、妊娠 17 日のウシ EVs の処置により、TNF 受容体スーパーファミリーの CD40 発現が、IFNT 非依存的に上昇した。妊娠 17 日のウシ EVs には、非妊娠の EVs に比べて、CD40 と結合する CD40 リガンドタンパク質が多く存在していた。さらに、妊娠 17 日のウシ EVs の処置による EECs の TNF シグナル伝達経路関連因子の遺伝子発現の上昇が、NF- κ B インヒビターにより抑制された。これら結果により、子宮腔に存在する妊娠 17 日のウシ EVs は、EECs において、IFNT 非依存的に CD40L/CD40/NF- κ B 経路を介した炎症反応を引き起こすことが示唆された。

第 2 章にて、妊娠 17、20、22 日の IFNT を含むウシ EVs が、EECs において、IFN 応答因子 *ISG15*、*MX1*、*MX2*、*STAT1*、*STAT2* の遺伝子発現を誘導していることを示した⁴²⁾。本研究では、さらに、胚から放出された EVs の子宮内膜に対する作用を検証するため、非妊娠及び妊娠 17 日のウシ EVs と妊娠 15 日のウシ胚をそれぞれ処置した子宮内膜の DEGs を比較した^{53,54)}。その結果、41 個の DEGs が、妊娠 17 日のウシ EVs 処置群と妊娠 15 日のウシ胚処理群との間で共通しており、その中の多数は「インターフェロンシグナル伝達」および「I 型インターフェロンに対する細胞応答」と関連していた。この結果は、第 1 章及び第 2 章の IFNT を含む EVs を処置した EECs において IFN 応答因子の遺伝子発現が上昇することと一致しており、胚着床周辺期に、IFNT を含む胚から放出された EVs が、子宮内膜に作用するとの可能性を支持している。

RNA-seq 解析により、非妊娠 EVs を処置した EECs で、合計 9164 個の転写産物が同定された。その中で、未処置群と比較し、8 個の因子 *MMP2*、*CPNE8*、*KRT17*、*COL1A2*、*MAGE4B*、*COL1A1*、*CXCL5*、*LY6E* の発現が上昇し、11 個の因子 *PLAC8*、*RTKN2*、*LIMD1*、*MIR2309*、*PHOSPHO1*、*HSD3B1*、*CTHRC1*、*TNFAIP2*、*FRMD4A*、*SLCO2A1*、*TRRAP* の発現が、減少していた。一方で、非妊娠 EVs 処置群と未処置群とのペアプロット比較は、DEGs の相関係数を 0.99 と示し、非妊娠 EVs の EECs への作用は、非

常に限定的である。しかしながら、変動する因子数は少ないながら、これら DEGs の中に、胚着床に適した子宮内環境を調整している可能性のある因子が見られる。例えば、PLAC8 は、免疫、分化、増殖など、さまざまな生理的機能に関与し、IFNT により、その発現が誘導されることが報告されている^{57,58)}。一方、本研究では、EECs における PLAC8 の発現は、非妊娠の EVs により抑制されていた。これらの結果は、子宮内膜または伸長した胚から放出された EVs が、オートクリンまたはパラクリンに、細胞間のコミュニケーションに関与していることを示している。

ヒツジ IFNT、人工授精 (AI) により作出されたウシ胚、体外受精・胚移植 (IVF-ET) により作出されたウシ胚を、それぞれウシ子宮内膜組織片に処置し、そこから得られた転写産物を比較することで、IFNT 非依存的に変動する DEGs が同定された^{53,54)}。これら DEGs を本研究にて同定した IFNT 非依存的に変動する 82 個の DEGs と比較したところ、BIRC3 と ECM1 のみが、共通の転写産物として見つかった。それぞれの実験で、培養時間、妊娠期間等の条件が異なっていたことが、共通する因子数が少なかった理由として推察される。異なる研究から得られた実験結果を比較する場合は、双方の実験条件をできるだけ合わせることで、より精度の高い新知見が得られると考えられる。

CD40 は単球、樹状細胞、B 細胞など、様々な免疫細胞の細胞表面で発現している。また、CD40L が CD40 に結合することで、細胞内 NF- κ B 経路シグナル伝達が活性化し、免疫および炎症反応が起こることが報告されている^{59,60)}。本研究では、妊娠 17 日のウシ EVs と妊娠 17 日のウシ EVs が処置された EECs にて、それぞれ CD40L とその受容体 CD40 が見つかった。また、妊娠 17 日のウシ EVs は、EECs の NF- κ B の活性化を誘導していることが明らかになった。さらに、NF- κ B インヒビターにより、妊娠 17 日の EVs の処置による TNF シグナル伝達経路関連因子の発現上昇が抑制された。加えて、我々は、妊娠 20 日の子宮内ウシ EVs と比較し、妊娠 17 日の子宮内ウシ EVs の処置により、EECs にて CD40 の遺伝子発現が上昇することを見出している⁶¹⁾。これらの結果は、CD40L を含む妊娠 17 日のウシ EVs が、EECs や免疫細胞の表面に存在する CD40 に結合することで、細胞内の NF- κ B 経路を活性化し、炎症反応を誘発している可能性を示している。

哺乳類では、妊娠初期の段階で、着床成立に向け、子宮内膜内で炎症促進と抗炎症反応のバランスが保たれている⁶²⁾。本研究にて、妊娠 17 日のウシ EVs が、EECs にて、IFNT とは別の経路を介して

「TNF シグナル伝達経路」と「炎症反応」を誘発したことを示した。胚は、子宮内膜とのコミュニケーションにおいて、炎症反応を誘発するサイトカインを放出することが報告されている^{63,64}。これら炎症反応を誘発するサイトカインは、他のサイトカインやケモカインの発現を増強し、さらに、発現が増強したこれら因子が、マクロファージや樹状細胞などの免疫細胞を炎症部位に誘導する⁶⁵。これら免疫細胞は、子宮腔内の NK 細胞の分化を促す因子を分泌するとともに、子宮内膜細胞を刺激することで、胚が子宮内膜に着床するための接着分子を生成する。実際に、ヒトでは、脱落膜化を誘発するための適切な炎症反応が起こることで、着床が成立する⁶⁶。今回の実験結果やこれら知見から、妊娠 17 日のウシ子宮内 EVs が、IFNT 非依存的に子宮内膜の炎症反応を起こすことで、子宮内膜の受容能の調節と胚着床を誘導していることが示唆された。

結論として、本研究は、ウシ子宮腔内 EVs が、胚着床時において、IFNT 非依存的にも子宮内膜に対して、作用していることを明らかにした。

第4節 小括

本章では、胚着床過程におけるウシ EVs の IFNT とは別の経路を介した EECs への作用について、in silico 解析と in vitro 試験にて検討を行い、以下の新知見を得た（本研究結果は、*Reproduction*, 159, 503-511, 2020⁶⁷⁾ に報告した）。

- (1) EECs では、非妊娠のウシ EVs の処置により、未処置群と比べて、8 個の因子の遺伝子発現が上昇し、11 個の因子の遺伝子発現が減少した。しかしながら、非妊娠 EVs 処置と未処置との間では、EECs の遺伝子発現にほとんど違いがなかった。
- (2) 妊娠 17 日のウシ EVs 処置群と妊娠 15 日のウシ胚処理群との間で 41 個の DEGs が共通していた。その中の多数は「インターフェロンシグナル伝達」および「I 型インターフェロンに対する細胞応答」と関連していた。
- (3) 妊娠 17 日のウシ EVs が、IFNT とは別の経路を介して EECs の 82 個の転写産物の発現を誘導し、その中の多数は「TNF シグナル伝達経路」および「炎症反応」と関連していた。
- (4) EECs では、妊娠 17 日のウシ EVs の処置により、TNF 受容体スーパーファミリーの CD40 発現が、IFNT 非依存的に上昇した。妊娠 17 日のウシ EVs には、非妊娠のウシ EVs に比べ、CD40 と結合する CD40 リガンドタンパク質が多く存在した。
- (5) 妊娠 17 日のウシ EVs は、EECs の NF- κ B の活性化を誘導した。さらに、ウシ EVs の処置による TNF シグナル伝達経路関連因子の遺伝子発現の上昇は、NF- κ B インヒビターにより抑制された。

第4章 ウシ子宮内 EVs の miRNA の胚着床時における役割

ここまでの総括すると、着床周辺期の反芻動物の子宮腔内には EVs が存在し、それらが子宮内膜に作用していることを見出した。さらに、ウシ子宮内 EVs は、IFNT とは独立した経路を介しても、子宮内膜に対して作用していることを明らかにした。しかしながら、胚着床期において、EVs 内のどの因子が、子宮内膜に対して作用しているのかは不明である。特に、EVs 中の miRNA は、生体内において様々な現象に関与していることが報告されており⁶⁸⁾、胚着床を促進する上でも、重要な役割を担っていることが考えられる。そこで、本章では、胚着床前の妊娠 17 日と胚着床直後の 20 日のウシ EVs を用いて、胚着床期における EVs 中の因子、特に miRNA の子宮内膜に対する作用について検証した。

第1節 実験材料及び実験方法

1-1. ウシ子宮灌流液の回収

第2章、第1節、1-1、第3章、第1節、1-1 と同様の方法で、妊娠 17、20 日のウシ子宮灌流液を回収した。

1-2. ウシ子宮灌流液からの EVs の単離

第2章、第1節、1-2、第3章、第1節、1-2 と同様の方法で、妊娠 17、20 日のウシ子宮灌流液から EVs を単離した。

1-3. 透過型電子顕微鏡

第1章、第1節、1-3、第2章、第1節、1-3、第3章、第1節、1-3 と同様の方法で、PBS に懸濁したウシ EVs を透過型電子顕微鏡にて撮影した。

1-4. ナノ粒子解析法

第1章、第1節、1-4、第2章、第1節、1-4、第3章、第1節、1-4と同様の方法で、ウシ子宮灌流液から単離し、PBS中に懸濁したEVs ($2-6 \times 10^8$ 個/ml) を、ナノ粒子解析し、各可視粒子を追跡ビデオで30秒間録画した。その後、Stokes-Einstein方程式を用いて、サンプル中の粒子のサイズ分布と数(濃度)を決定した。

1-5. EECsの培養条件

ウシEECsの単離及び培養は第2章、第1節、1-6、第3章、第1節、1-5と同様の方法で行った。

in vitro試験では、EECsを、IA型コラーゲンを塗布した12穴プレート (5×10^4 個/well) に播種し、妊娠17、20日のウシEVsをそれぞれ単独処置 (10 μ g/well) し、無血清DMEM/F12培養液で48時間培養した。また、miRNAをEECsに導入するために、プロトコールに従い、合成bta-miR-98 (45 pmol/well、mirVana miRNA Mimic、MC10426、Thermo Fisher Scientific) または対照群として非標的コントロールmiRNA (45 pmol/well、mirVana miRNA Mimic、4464059、Thermo Fisher Scientific) を、LipofectamineTM RNAiMAX 試薬 (3 μ l/well、Thermo Fisher Scientific) を用いて、EECsに導入した。培養後、細胞を回収し、その後の解析を行った。

1-6. RNA配列決定、データ、遺伝子オントロジー、および経路分析

第3章、第1節、1-6と同様の方法で、妊娠17、20日のウシEVsを添加したEECsの全転写産物を調べるために、RNA-seq解析を行った。一次配列データは、DDBJ配列リードアーカイブに保存した(DRR174788-DRR174793)。

1-7. miRNA配列決定

プロトコールに従い、SeraMir Exosome RNA増幅キット (System Biosciences) を用いて、妊娠17、20日のウシEVsからRNAを抽出した。その後、TailoMix Gel-Free miRNA Sample Preparation Kit (SeqMatic) を用いて、miRNAライブラリーを作成した。Illumina HiSeq 2500にて、50 bp シングルエンドリードの条件でシーケンスし、RNA配列を決定した。得られたリードをBowtieによって基準配列

にアラインメントした、さらに、featureCounts を用いて、既知の miRNA データベース (miRBase22.1) に、アラインメントされたリードの分類を行った。さらに、edgeR を用いて、遺伝子発現レベルの定量結果を RPKM (reads per kilobase of exon per million) 正規化により算出した。一次配列データは、DDBJ 配列リードアーカイブに保存した (DRR174798-DRR174799)。

1-8. リアルタイム RT-PCR 解析

プロトコールに従い、ISOGEN (Nippon Gene) を用いて、EECs からトータル RNA を抽出した。抽出したトータル RNA (100 ng) を用いて、第 1 章、第 1 節、1-8、第 2 章、第 1 節、1-7、第 3 章、第 1 節、1-7 と同様の方法、条件にて解析した。また、*ACTB*、*GAPDH* は第 1 章、第 1 節、1-8、第 2 章、第 1 節、1-7、第 3 章、第 1 節、1-7 と、*CD40*、*CSF2*、*IL6*、*NFKBIA* は第 3 章、第 1 節、1-7 と同様のプライマーを用いた。*ARRB1*、*CASP4*、*CFB*、*CTSC*、*CYBA*、*GBP4*、*IER3*、*IFI27*、*IKBKE*、*IL1RN*、*LGALS9*、*LTF*、*MX2*、*NCR3*、*PSMC6*、*RSAD2*、*TNFAIP3*、のプライマー配列は以下に示す通りである。

<i>ARRB1</i>	S	5'-ACGCGGGTGTTC AAGAAGG-3'
	AS	5'-ATACTCCGGATCCACAAGAACC-3'
<i>CASP4</i>	S	5'-TCCTTGGAATGAAGCAGCTG-3'
	AS	5'-CACGTGCAGCAAATTTCCAC-3'
<i>CFB</i>	S	5'-AACGGCCATCTGTGATGATG-3'
	AS	5'-AGTAGGTGACACGGTCTTCAAG-3'
<i>CTSC</i>	S	5'-ATACCTCGGAGAACGTGAACG-3'
	AS	5'-CAGTCCAAGACTTCTGAATGGC-3'
<i>CYBA</i>	S	5'-TCAGTTCACCCAGTGGTACC-3'
	AS	5'-TTCTGTCCACACCTCTCCATG-3'
<i>GBP4</i>	S	5'-AAGATGAGTACCTGGAGAGTGC-3'
	AS	5'-CTTGCAGGACGGTCAAAGAC-3'

<i>IER3</i>	S	5'-TCCCGAGATCTTCACCTTCG-3'
	AS	5'-GGTTCGGTTCCTCGACTGG-3'
<i>IFI27</i>	S	5'-GAATCACTGCCTCCTCCTTG-3'
	AS	5'-CCCACCAAGAGTTTGGATGA-3'
<i>IKBKE</i>	S	5'-GGCAGATTACAGCACAGCTAAG-3'
	AS	5'-AGCATCTCCACGAACCAGTG-3'
<i>ILIRN</i>	S	5'-TCCACGGTTACCTAATCTGTC-3'
	AS	5'-CAGCAACTAATTGGTTATTCCTC-3'
<i>LGALS9</i>	S	5'-AGGTACAGAGCTCAGAGTTCAG-3'
	AS	5'-TTCTGGAAGCTGATGGAGGAC-3'
<i>LTF</i>	S	5'-GGAAGCAGATGCCCTGAACT-3'
	AS	5'-AGGTACCCTTCGGTTGGTCT-3'
<i>MX2</i>	S	5'-CAGAGACGCCTCAGTCGAAG-3'
	AS	5'-GAGACGTTTGCTGGTTTCCATG-3'
<i>NCR3</i>	S	5'-AGAGCTCCAACCTCAGCTTATC-3'
	AS	5'-TGGATTGGGATGGATTGGAAGG-3'
<i>PSMC6</i>	S	5'-GGCAGATTGTGGGTGAAGTAC-3'
	AS	5'-GCAACTCTTGTTTCCTGGCTTC-3'
<i>RSAD2</i>	S	5'-GTGGTTCCAGAAGTACGGTGA-3'
	AS	5'-CTTCTTTCCTTGACCACGGC-3'
<i>TNFAIP3</i>	S	5'-TTGCAACATCCTCAGAAGGC-3'
	AS	5'-AAATCCCACCCACCTTCAGAG-3'

1-9. ウェスタンブロット解析

第1章、第1節、1-9、第2章、第1節、1-8、第3章、第1節、1-8と同様の方法で EVs 及び EECs からタンパク質を抽出し、サンプルを調製した。1次抗体には、抗 CD63 抗体 (第1章、第1節、1-9、第2章、第1節、1-8、第3章、第1節、1-8と同様)、抗 HSP70 抗体 (第1章、第1節、1-9、第2章、第1節、1-8、第3章、第1節、1-8と同様)、抗 ACTB 抗体 (第2章、第1節、1-8、第3章、第1節、1-8と同様)、抗 CTSC 抗体 (1:2000, ab182904, Abcam)、抗 IL6 抗体 (1:2000, ab193853, Abcam) を用いた。得たバンドをデンストメトリーにより数値化し、目的バンド値を、ACTB 値で補正することにより、各サンプル間のタンパク質量の比を求めた。

1-10. 統計処理

リアルタイム RT-PCR 解析の結果を平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差検定には、t-検定を用いて、危険率 5% ($p < 0.05$) をもって統計学的に有意差があるものと判定した。

第2節 実験結果

2-1. ウシ子宮灌流液における EVs の同定

妊娠 17、20 日のウシ子宮灌流液から EVs を単離し、EVs マーカータンパク質 CD63、HSP70 の発現を調べたところ、全サンプルで陽性であった (図 17 A)。また、直径 50-150 nm の EVs 像が検出された (図 17 B)。これらの結果から、妊娠 17、20 日のウシ子宮腔に EVs が存在することが確認できた。

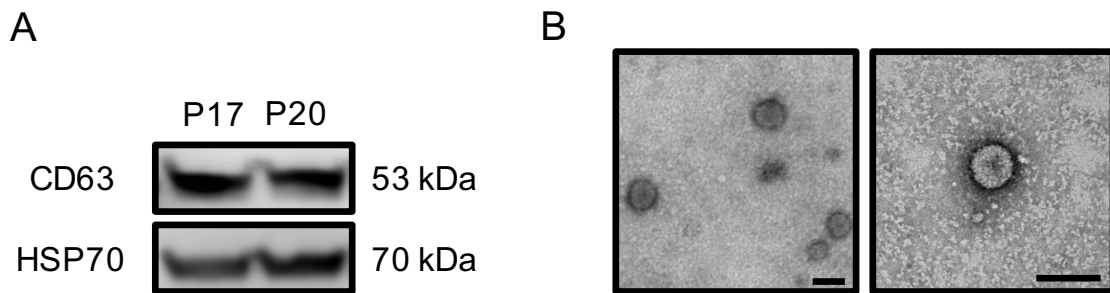


図 17. 妊娠 17、20 日のウシ子宮灌流液から単離された EVs の特徴

(A) ウェスタンブロット解析にて、P17、P20 のウシ子宮灌流液から単離した EVs における EVs マーカータンパク質 CD63、HSP70 の発現を調べた (n=3)。3 つの異なる実験より代表的なデータを示した。
(B) 透過型電子顕微鏡により子宮灌流液中の EVs 像を確認した。スケールバーは 200 nm を示す。

2-2. 胚着床前後の EVs を処置した EECs における転写産物の網羅的比較

妊娠 17、20 日ウシ EVs を、EECs へ処置し 48 時間培養後、EECs の全転写産物を RNA-seq で解析した。その結果、妊娠 20 日の EVs を処置した EECs で、妊娠 17 日の EVs を処置した細胞と比べて、有意に発現量が上昇した DEGs を 67 個、減少した DEGs を 112 個、それぞれ同定した ($q < 0.05$) (図 18 A)。妊娠 20 日の EVs 処置により、EECs で発現量が上昇した 67 個の DEGs をエンリッチシグナル伝達経路解析と GO 解析に供したところ、最も関連性の高いシグナル伝達経路および生物学的機能として、それぞれ「コラーゲン原線維等の多量体構造の集合」と「タンパク質ヘテロ三量体化」が同定された (図 18 B)。次に、妊娠 20 日の EVs 処置により、EECs で発現量が減少した 112 個の DEGs をエンリッチシグナル伝達経路解析と GO 解析に供したところ、最も関連性の高いシグナル伝達経路お

よび生物学的機能として、それぞれ「免疫系」と「免疫応答」が同定された (図 18 B)。これらの解析結果の中で、「免疫系」が最も有意に変化していることを示した。詳細を表 3 と表 4 にまとめた。さらに、表 4 の「免疫系」に関連する因子として抽出された 21 個の因子について、リアルタイム RT-PCR 解析で調べた。21 個の転写産物のうち、*NCR3* 以外の 20 個の因子 *ARRB1*、*CASP4*、*CD40*、*CFB*、*CSF2*、*CTSC*、*CYBA*、*GBP4*、*IER3*、*IFI27*、*IKBKE*、*IL1RN*、*IL6*、*LGALS9*、*LTF*、*MX2*、*NFKBIA*、*PSMC6*、*RSAD2*、*TNFAIP3* の遺伝子発現は、RNA-seq 解析の結果と同様に、妊娠 20 日の EVs を処置することで、減少することが確認できた (図 18 C)。

表 3. EECs における P17 と P20 の EVs により誘導される GO とその関連因子

GO_BP Term	P-value	Genes
Down-regulation		
immune response	5.82E-08	CSF2, BOLA, CXCL5, CXCL3, CXCL2, CXCL8, CD40, TNFAIP3
inflammatory response	5.15E-07	NFKBIZ, CYBA, CASP4, CXCL5, PTGS2, CXCL3, CXCL2, CXCL8, CD40, PTGFR, ECM1
regulation of cell proliferation	1.27E-06	CDCA7, CXCL5, PTGS2, CXCL3, CXCL2, EGLN3, NFKBIA, CXCL8, CD40
antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	1.90E-06	BOLA
response to lipopolysaccharide	3.32E-05	CXCL5, CXCL3, CXCL2, NFKBIA, CXCL8, CD40
chemokine-mediated signaling pathway	3.02E-04	CXCL5, CXCL3, CXCL2, CXCL8
positive regulation of neutrophil chemotaxis	3.47E-04	CXCL3, CXCL2, CXCL8
cell chemotaxis	3.91E-04	CXCL5, CXCL3, CXCL2, SAA3
apoptotic process	7.77E-04	BCL2L15, CDCA7, CASP4, ARRB1, HMOX1, BCAP29, EGLN3, ZC3H12A
proteolysis	0.00186	PLAT, ECE1, CASP4, CFB, MMP9, LTF, MMP1
Up-regulation		
protein heterotrimerization	5.20E-06	COL6A2, COL1A2, COL6A1, COL1A1
cellular response to amino acid stimulus	2.91E-05	COL3A1, COL1A2, COL6A1, COL1A1, MMP2
cytoskeleton organization	0.00345	TUBB2B, FTIM2, TUBB6, TUBB3
collagen fibril organization	0.0061	COL3A1, COL1A2, COL1A1
regulation of blood pressure	0.00832	ACTA2, PTGS1, COL1A2
microtubule-based process	0.00929	TUBB2B, TUBB6, TUBB3
angiogenesis	0.01698	CTGF, TGFB1, PLCD1, MMP2
positive regulation of integrin-mediated signaling pathway	0.02009	LIMS2, FLNA
intramembranous ossification	0.02009	COL1A1, MMP2
cell proliferation	0.0209	HRAS, TGFB1, FURIN, MIF

表 4. EECs における P17 と P20 の EVs により誘導されるエンリッチングシグナル伝達経路と関連因子

Enrichment pathway	P-value	Genes
Down-regulation		
Immune System	4.01E-24	CD40, IL1RN, CSF2, RSAD2, MX2, TNFAIP3, CYBA, ARRB1, NFKBIA, IL6, NCR3, PSMC6, IFI27, CASP4, LGALS9, IKBKE, GBP4, CTSC, CFB, LTF, IER3
Cytokine Signaling in Immune system	6.19E-12	CD40, IL1RN, IL6, PSMC6, CSF2, RSAD2, IFI27, MX2, ARRB1, LGALS9, GBP4
Innate Immune System	5.15E-08	NFKBIA, PSMC6, CSF2, CASP4, TNFAIP3, ARRB1, IKBKE, CFB, IER3
Signaling by Interleukins	2.31E-06	IL1RN, IL6, PSMC6, CSF2, ARRB1, LGALS9
Adaptive Immune System	8.26E-06	NFKBIA, CD40, NCR3, PSMC6, CYBA, CTSC, IER3
Fc epsilon receptor (FCER1) signaling	4.59E-05	NFKBIA, PSMC6, CSF2, ARRB1, IER3
Signaling by NGF	8.52E-05	NFKBIA, PSMC6, CSF2, ARRB1, IER3
MAPK1/MAPK3 signaling	1.05E-04	IL6, PSMC6, CSF2, ARRB1
Interleukin-2 signaling	1.24E-04	PSMC6, CSF2, ARRB1, LGALS9
MAPK family signaling cascades	1.97E-04	IL6, PSMC6, CSF2, ARRB1
Up-regulation		
Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures	1.01E-06	COL1A1, COL3A1, COL1A2, COL6A2, COL6A1
Collagen biosynthesis and modifying enzymes	2.19E-06	COL1A1, COL3A1, COL1A2, COL6A2, COL6A1
Extracellular matrix organization	4.61E-06	COL1A1, COL3A1, COL1A2, SPARC, MMP2, COL6A2, COL6A1, FURIN
Collagen formation	9.67E-06	COL1A1, COL3A1, COL1A2, COL6A2, COL6A1
Scavenging by Class A Receptors	3.35E-05	COL1A1, COL3A1, COL1A2
Post-chaperonin tubulin folding pathway	5.29E-05	TUBB2B, TUBB6, TUBB3
Formation of tubulin folding intermediates by CCT/TriC	7.84E-05	TUBB2B, TUBB6, TUBB3
Prefoldin mediated transfer of substrate to CCT/TriC	9.92E-05	TUBB2B, TUBB6, TUBB3
Cooperation of Prefoldin and TriC/CCT in actin and tubulin folding	1.66E-04	TUBB2B, TUBB6, TUBB3
Metabolism of proteins	2.09E-04	DYNC1H1, TUBB2B, RPS28, TUBB6, TUBB3, MMP2, UBC, MLEC, FURIN, TGFB1, ADAMTS12, RENBP

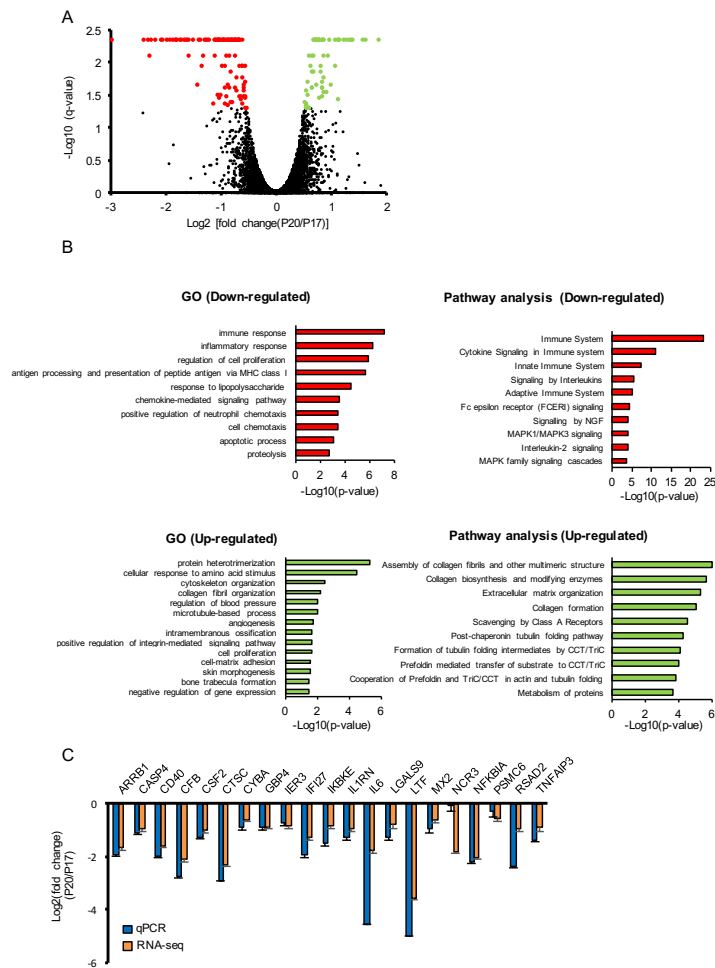


図 18. 着床前後のウシ EVs の処置による EECs における転写産物の発現変化

EECs は、P17 及び P20 のウシ EVs (10 μ g) の処置とともに 48 時間培養され、その後、これら細胞の転写産物を RNA-seq にて解析した。データは、3 つの異なる *in vitro* 実験から得られた。(A) ボルケーノプロットは、RNA-seq 解析によって得られた 179 個の DEGs を示す。このうち、67 個の転写産物は、P20 のウシ EVs を処置した EECs で P17 のウシ EVs を処置した EECs と比べて、発現が 2 倍以上上昇し (緑点)、112 個の転写産物は P20 のウシ EVs を処置した EECs で、P17 のウシ EVs を処置した EECs と比べて、発現が 2 倍以上減少した (赤点)。(B) P20 のウシ EVs を処置した EECs で P17 のウシ EVs を処置した EECs と比べて発現が上昇または減少していた転写産物をエンリッチングシグナル伝達経路解析と GO 解析に供し、これら DEGs の機能性を分類した。(C) P17 及び P20 のウシ EVs 処置によりそれぞれ培養された EECs における免疫関連因子の倍率変化を RNA-seq 解析とリアルタイム RT-PCR 解析で示した (n=3)。

2-3. EECs の免疫関連因子の発現低下に関連する miRNA の同定

妊娠着床期の EVs 内に含まれる miRNA が、子宮内の遺伝子発現に関与していることが報告されている⁶⁹⁾。そこで、EVs 内の因子として miRNA に着目し、EVs 内の miRNA が、免疫システムを抑制的に調整するかどうかを検証した。ウシ EVs の処置により、EECs で発現が減少した 21 個の免疫関連因子を、miRNA を推測するデータベース miRTarBase に供し、関連する miRNA の候補として、5 個の miRNA、miR-942、miR-146a、miR-98、miR-4670、miR-6837 を同定した。分析の詳細を表 5 にまとめた。さらに、妊娠 17、20 日のウシ EVs 内の全 miRNA を miRNA-seq 解析に供し、妊娠 17、20 日のウシ EVs から、それぞれ 141 個 (青円) および 219 個 (黄円) の miRNA を検出した (図 19 A)。さらに、miRTarBase によって同定された 5 個の候補 miRNA もベン図として示した (緑円)。この中から、共通する因子を探索したところ、免疫システムに関与する miRNA として、miR-98 のみが実際に EVs 中に存在していた。さらに、妊娠 17 日のウシ EVs に比べて、妊娠 20 日のウシ EVs 内で、24 個の miRNA の発現が 2 倍以上減少し、bta-miR-98 を含む 61 個の miRNA の発現が 2 倍以上増加していた (図 19 B)。また、リアルタイム RT-PCR 解析でも、bta-miR-98 の発現量が、妊娠 17 日のウシ EVs に比べて、妊娠 20 日の EVs で高かった (図 19 C)。

表 5. EECs のにおける免疫関連因子の発現を抑制する可能性のある EVs 内の 5 つの miRNA 候補

Predicted miRNAs	P-value	Genes
miR-942	5.18E-05	NFKBIA, IFI27, GBP4, LTF
miR-146a	5.18E-05	IL6, RSAD2, IFI27, MX2
miR-98	0.00110773	IL6, ARRB1, CTSC, CFB, IER3
miR-4670	0.003891864	MX2, TNFAIP3
miR-6837	0.004603998	TNFAIP3, LTF

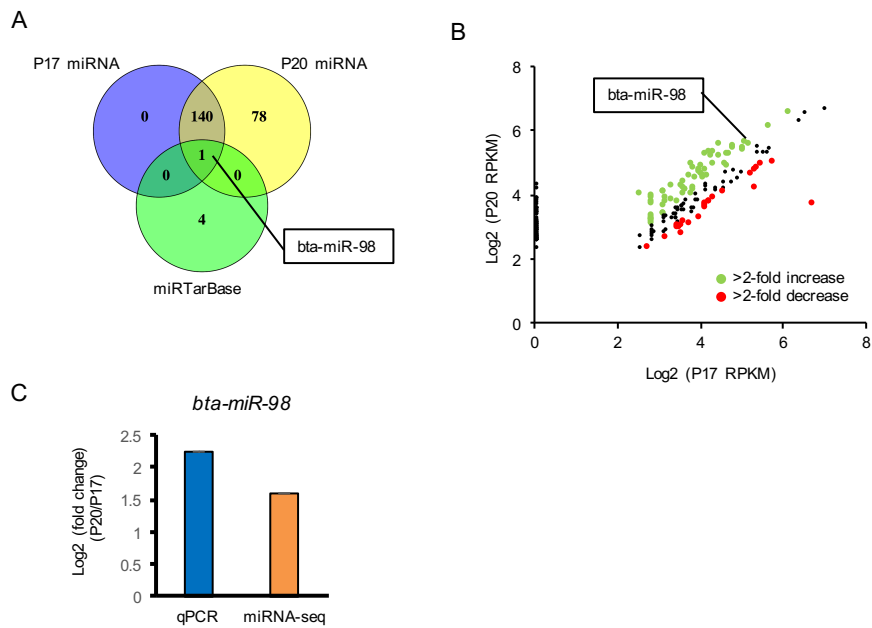


図 19. 母体免疫系の抑制に必要な EVs 内の miRNA、*bta-miR-98* の同定

(A) ベン図は、P17 及び P20 の EVs における miRNA-seq で同定された miRNA の数と免疫系関連因子に対する miRTarBase で同定された miRNA の数を示した。(B) ペアプロット比較は、P20 と P17 の EVs 内の miRNA の発現量を示した。(C) P17 と P20 のウシ EVs における *bta-miR-98* の倍率変化を RNA-seq 解析とリアルタイム RT-PCR 解析で示した (n=3)。

2-4. bta-miR-98 の EECs の免疫関連因子への作用

bta-miR-98 が、妊娠 20 日の EVs と同様に EECs の免疫関連因子の発現に対して、抑制的に作用するかを検証した。合成 bta-miR-98 を EECs に導入し、24 時間または 48 時間培養した。対照群と比較し、合成 bta-miR-98 を導入した EECs で bta-miR-98 の発現が上昇した (図 20 A)。表 5 より、5 個の免疫関連因子 *IL6*、*ARRB1*、*CTSC*、*CFB*、*IER3* の発現が、bta-miR-98 により抑制的に調節されることが推定された。そこで、合成 bta-miR-98 の EECs でのこれら 5 個の因子に対する作用を調べたところ、対照群と比べ、合成 bta-miR-98 導入は、*CTSC* と *IL6* の発現を減少させた (図 20 B)。さらに、合成 bta-miR-98 の処置により、*CTSC* と *IL6* のタンパク質発現も減少した (図 20 C)。最後に、妊娠 20 日の EVs 処置により発現が減少した他の免疫関連因子に対する bta-miR-98 の作用も検証した。その結果、対照群と比べ、合成 bta-miR-98 処置は、*CASP4* と *IKBKE* の発現を減少させた (図 20 D)。

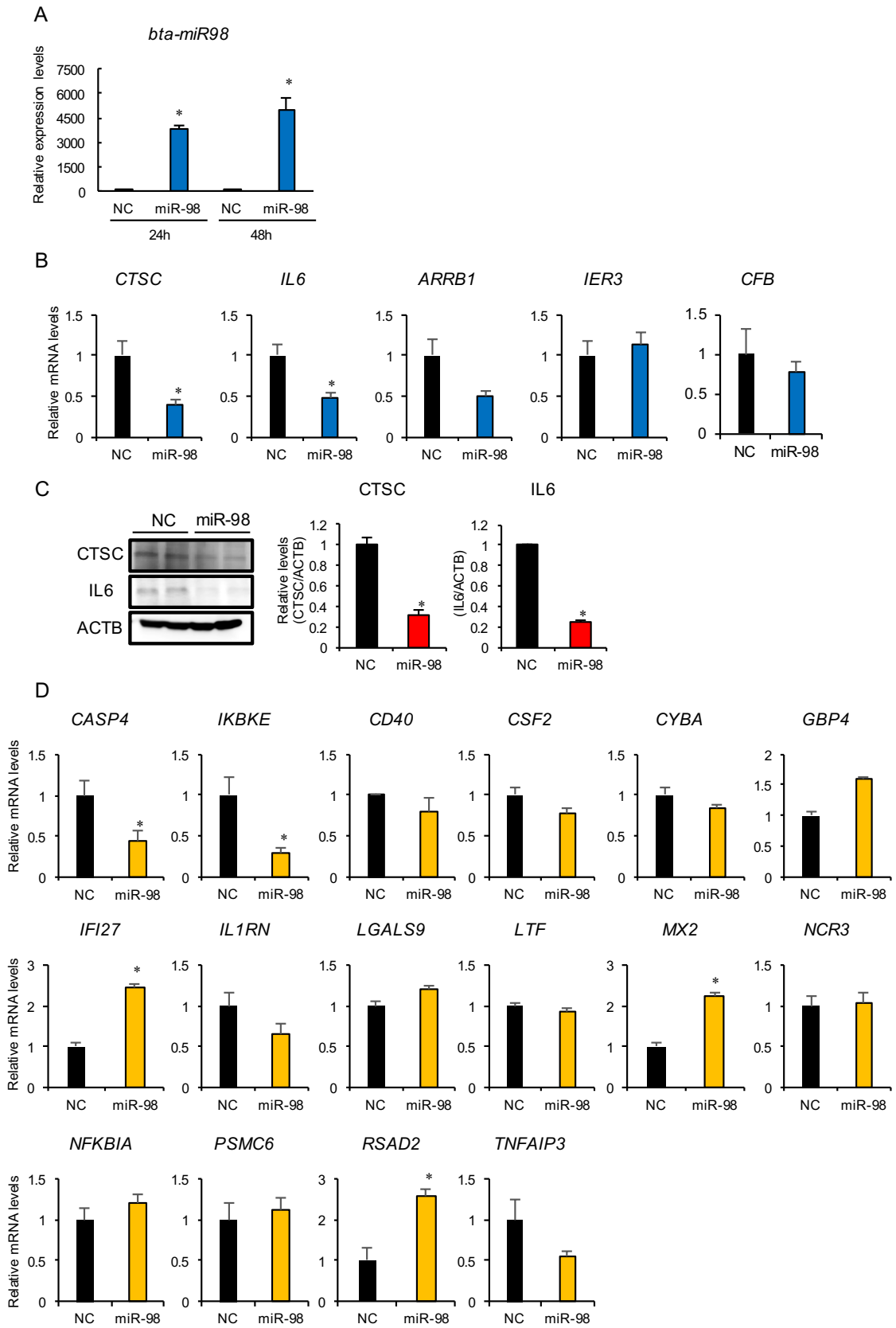


図 20. bta-miR-98 の EECs における免疫関連因子に対する作用

合成 miR-98 を EECs に対して導入し、24 時間または 48 時間培養した。(A) リアルタイム RT-PCR 解析により、EECs において導入した miR-98 の発現を調べた。U6 を内在性コントロールとして使用した ($p < 0.01$ vs. negative control (NC))。 (B) リアルタイム RT-PCR 解析により、EECs における miR-98 による潜在的な標的免疫関連因子の発現を調べた ($p < 0.05$ vs. NC)。 (C) ウェスタンブロット解析にて、EECs における CTSC と IL6 タンパク質の発現を調べた ($n=3$)。3 つの異なる実験結果より代表的なデータを示した。棒グラフは、ACTB タンパク質の発現量でそれぞれ補正された CTSC と IL6 タンパク質の発現量を示す ($p < 0.05$ vs. NC)。 (D) EECs の免疫関連因子に対する合成 miR-98 の作用を検証した。リアルタイム RT-PCR 解析を用いて、免疫関連因子の EECs における mRNA 量を求め、無処置の値を 1 とした相対値で示した ($n=3$)。グラフは、平均値 \pm 標準誤差で示した ($p < 0.05$ vs. NC)。

第3節 考察

本研究にて、子宮腔ウシ EVs 内の miRNA が、子宮内膜における母性免疫を抑制している可能性が示された。RNA-seq 解析により、胚着床前の妊娠 17 日と胚着床後の 20 日ウシ EVs をそれぞれ処置した EECs の全転写産物を網羅的に解析したところ、妊娠 20 日の EVs を処置した EECs では、妊娠 17 日の EVs を処置した細胞と比べて、「コラーゲン原線維等の多量体構造の集合」と「免疫系」に関連する遺伝子発現が、それぞれ上昇または減少していた。このうち、妊娠 20 日のウシ EVs の処置により、「免疫系」に関連する因子が、最も大きく変動した。さらに、miRNA-seq 解析および *in silico* 解析により、EVs 内の bta-miR-98 が、着床周辺期の母体免疫の抑制に関わる主要な因子の一つとして同定された。bta-miR-98 が、EECs の免疫システムを抑制するか、免疫関連因子の発現を指標に検討したところ、妊娠 20 日のウシ EVs により発現が抑制された 21 個の免疫関連因子のうち 4 個の因子 CTSC、IL6、CASP4、IKBKE の発現が低下した。これらの結果より、胚着床時における子宮内 EVs には、bta-miR-98 が含まれ、さらにウシ EVs 内の bta-miR-98 が、子宮内膜の一部の免疫関連因子の発現を抑制的に調節していることが明らかとなった。このことは、子宮内 EVs、特に EVs 内の miRNA が胚着床及びその後の胎盤形成を成立させるために、母体免疫を調節していることを示唆している。

miRNA-seq 解析および *in silico* 解析にて、胚着床時に母体免疫の抑制に関与する候補因子として、EVs 内の bta-miR-98 が同定された。さらに、合成 bta-miR-98 を EECs に導入したところ、CTSC、IL6、CASP4、IKBKE などの免疫関連因子の発現が低下した。ラットにて、miR-98 が、着床前に、子宮細胞のアポトーシスを制御することで、胚の子宮内膜への着床を誘導していることが報告されている⁷⁰⁾。さらに、第2章にて、妊娠 20 日のウシ EVs が、EECs のアポトーシス関連因子の発現を抑制することを示した。これらの結果は、妊娠 20 日のウシ EVs 内に含まれる bta-miR-98 が、胚の子宮内膜への着床にむけ、母体免疫やアポトーシスを調整している可能性を示唆している。

EVs は、小胞内に、数百、数千以上の miRNA を含む核酸を内包しており、分泌元となる細胞から標的細胞まで遊走、取り込まれた後、これら内包物を標的細胞内で機能させることができる⁹⁾。また、胚や子宮内膜により分泌された EVs 内に含まれる miRNA が、子宮内膜の接着因子や遊走に関連する

遺伝子発現を調節していることが報告されている⁷¹⁾。さらに、EVsに含まれる miRNA は、胚と子宮内膜との相互作用を通じ、着床、炎症、再構成、増殖、血管新生などの代謝経路に関与していることも明らかになっている^{48,72)}。本研究において、胚着床期のウシ EVs 内に 219 個の miRNA が存在し、そのうち 85 個は、胚着床前後の EVs 内で発現が異なっていた。これらの結果は、bta-miR-98 だけでなく、EVs 内のその他の miRNA もまた、相互補完的に作用することで、胚や子宮内膜の発現変化を制御し、妊娠の成立に必要な子宮内環境を構築していることを示唆している。

胎児は父方由来の遺伝子を持ち、胎盤は父方遺伝子を優先的に発現するため、本来であれば母体にとって異物であり、母体免疫系によって排除されてしまう。そのため、哺乳類では、胚の発達やその後の妊娠の維持には、母体にとって遺伝子の半分が非自己である胎児に対する免疫寛容が必要となる。胚着床時、子宮内 EVs が、子宮側の局所的な免疫寛容を誘導するために、母体免疫に関連するタンパク質や miRNA などの特異的な因子を母体側に輸送していることが報告されている⁷³⁾。また、EVs に含まれる免疫作用を抑制する HLA-G が、母体の免疫寛容を介して、胚発生を促進しているとの報告もある⁷⁴⁾。第 1 章および第 2 章にて、IFNT が、ヒツジおよびウシ子宮内 EVs にも含まれることを明らかにした。IFNT の作用の一つとして、胚着床時に、胚を母体免疫から守るために、免疫細胞を誘導する役割が報告されている⁷⁵⁾。これらをまとめると、IFNT を含む EVs が、胚着床時に、子宮内膜だけでなく、子宮内の免疫細胞の免疫機能も抑制していることが示唆される。

結論として、本研究は、胚着床時における子宮内の EVs が bta-miR-98 を含み、さらに子宮内膜の免疫作用を抑制的に調節していることを明らかにした。

第4節 小括

本章では、胚着床前後のウシ EVs と胚着床との関連性について、*in silico* 解析と *in vitro* 試験にて検討を行い、以下の新知見を得た (本研究結果は、*Scientific Reports*, 9, 20330, 2019⁶¹⁾ に報告した)。

- (1) 胚着床後の妊娠 20 日のウシ EVs を処置した EECs では、胚着床前の妊娠 17 日のウシ EVs を処置した EECs と比べて、21 個の免疫関連因子の遺伝子発現が低下した。
- (2) miRNA-seq 解析および *in silico* 解析により、妊娠 20 日のウシ EVs 内の miRNA、bta-miR-98 が、着床周辺期の母体免疫の抑制に関わる主要な因子の 1 つとして同定された。
- (3) 合成 bta-miR-98 を EECs に導入したところ、妊娠 20 日のウシ EVs の処置により発現が抑制した 21 個の免疫関連因子のうち、4 個の因子 CTSC、IL6、CASP4、IKBKE の遺伝子とタンパク質発現が低下した。

総括

本研究は、反芻動物の胚着床機構を解明することを目的として、子宮灌流液に含まれる着床の成立に重要な因子の探索を行い、以下の新知見を得た。

第1章では、着床周辺期のヒツジ子宮灌流液中のタンパク質を網羅的に精査し、胚着床に重要な因子を探索した。非妊娠及び妊娠17日のヒツジ子宮灌流液に含まれるタンパク質を比較し、妊娠17日で特異的に増加するタンパク質を267個検出した。in silico解析にて、これら267個のタンパク質の中から、13個の分泌タンパク質とCAPG、AKR1B1、BCL2L15、CA2、IDH2、EEF2、MSN、EZRを含む172個のEVs関連タンパク質を、それぞれ同定した。中でも、CAPGとAKR1B1が胚組織で特異的に、かつ多量に発現していた。この結果から、子宮灌流液中の胚由来のEVsが、胚着床には重要だと仮定し、非妊娠、妊娠15、17日のヒツジ子宮灌流液からEVsを単離し、EECsへの作用を培養系にて検証した。子宮灌流液及び胚に存在するCAPG、AKR1B1が、ヒツジEVs中に含まれているか確認したところ、CAPGおよびAKR1B1は妊娠15、17日の子宮内EVsに存在した。さらに、胚から産生・分泌される妊娠認識物質IFNTも、ヒツジ胚着床期の子宮灌流液中のEVsに存在し、このIFNTを含むヒツジEVsは、EECsにおけるIFN応答因子*STAT1*、*STAT2*、*MX1*、*MX2*、*BST2*、*ISG15*の遺伝子発現を上昇させた。これらの結果から、胚着床周辺期において、胚から放出されたIFNTを含むEVsが、子宮内膜に作用していることが明らかになった。

第2章では、ウシの子宮腔内のEVsを同定し、ウシEVsの胚着床期における子宮内膜への作用について解析した。妊娠17、20、22日(胚着床=19.5日)のウシ子宮灌流液からEVsを単離した。胚着床周辺期のEVs中のタンパク質を網羅的に解析し、妊娠17、20、22日のウシEVsの中から、合計596個のタンパク質を同定した。そのうち172個は、サンプル間で相対発現量が1.5倍以上変化していた。さらに、ヒツジと同様に、胚から産生・分泌されるIFNTが、胚着床期の子宮内ウシEVsにも含まれていた。IFNTを含むウシEVsは、EECsのIFN応答因子*MX1*、*MX2*、*STAT1*、*STAT2*、*ISG15*の遺伝子発現を誘導した。さらに、妊娠17日の子宮内ウシEVsは、EECsにおいてアポトーシス関連因子*BAX*、*CASP3*、*TNFA*、*TP53*の遺伝子発現を上昇させた。また、妊娠20、22日のウシ子宮内EVsが、EECsの

接着因子 *VCAMI* の遺伝子発現を上昇させた。これら結果により、胚着床期のウシ子宮内には、胚から産生・分泌された IFNT を含む EVs が存在し、この子宮内ウシ EVs は、胚着床に向けて、EECs のアポトーシス因子や接着因子の発現を調節していることが明らかとなった。

IFNT は、母体の妊娠認識や着床過程に重要な因子であるが、これだけでは子宮内の胚-子宮間の複雑なコミュニケーションは説明できない。そこで、第 3 章では、胚着床期におけるウシ EVs の子宮内膜に対する IFNT 非依存的な作用について検証した。EECs において、非妊娠および妊娠 17 日のウシ EVs の処置により、未処置群と比べて発現量が 2.0 倍以上変化した DEGs は、非妊娠の EVs で 9 個、妊娠 17 日の EVs で 140 個だった。さらに、妊娠 17 日のウシ EVs 処置群と妊娠 15 日のウシ胚処理群との間で 41 個の DEGs が共通しており、これら DEGs のうち、多くは、「インターフェロンシグナル伝達」と「I 型インターフェロンに対する細胞応答」に関連していた。このことは、第 2 章の胚から放出された IFNT を含むウシ EVs が、子宮内膜に作用していた結果と一致する。また、妊娠 17 日のウシ EVs は、IFNT とは別の経路を介して EECs の 82 個の転写産物の発現を誘導し、その中の多数は「TNF シグナル伝達経路」および「炎症反応」と関連していた。さらに、EECs では、妊娠 17 日のウシ EVs の処置により、TNF 受容体スーパーファミリーの CD40 の遺伝子発現が、IFNT 非依存的に上昇した。加えて、妊娠 17 日のウシ EVs には、非妊娠の EVs と比べて、CD40 と結合する CD40 リガンドタンパク質が多く存在していた。また、妊娠 17 日のウシ EVs の処置による EECs の TNF シグナル伝達経路関連因子の遺伝子発現の上昇は、NF- κ B インヒビターにより抑制された。これら結果により、子宮腔に存在する妊娠 17 日のウシ EVs は、EECs において、IFNT 非依存的な CD40L/CD40/NF- κ B 経路を介した炎症反応に関与していることが明らかとなった。実際に、ヒトでは、脱落膜化を誘発するための適切な炎症反応が起こることで、着床が成立する。今回の実験結果やこの知見から、妊娠 17 日のウシ子宮内 EVs が、IFNT 非依存的に子宮内膜の炎症反応を起こすことで、子宮内膜の受容能の調節と胚着床を誘導していることが示唆された。

ここまでをまとめると、着床周辺期の反芻動物の子宮腔内には EVs が存在し、それらが子宮内膜に作用していることを見出した。さらに、ウシ子宮内 EVs は、IFNT とは独立した経路を介しても、子宮内膜に対して作用していることを明らかにした。しかし、胚着床期において、EVs 内のどの因子が、

子宮内膜に対して作用しているのかは不明である。特に、EVs の持つ生理機能の最も重要な機能として miRNA を介した生体機能調節が知られており、胚着床を促進する上でも、重要な役割を担っていることが考えられる。そこで、第 4 章では、胚着床期におけるウシ EVs 中の因子、とりわけ miRNA の子宮内膜に対する作用について検証した。妊娠 20 日のウシ EVs を処置した EECs では、妊娠 17 日の EVs を処置した細胞と比べて、「コラーゲン原線維等の多量体構造の集合」と「免疫系」に関連する遺伝子の発現が、それぞれ上昇または減少していた。このうち、「免疫系」に関連する因子が最も大きく変動した。さらに、ウシ EVs 内の miRNA、bta-miR-98 が、着床周辺期の母体免疫の抑制に関わる主要な因子の一つとして同定された。合成 bta-miR-98 は、EECs にて、免疫関連因子 CTSC、IL6、CASP4、IKBKE の発現を低下させた。これら結果により、胚着床時における子宮内 EVs には、bta-miR-98 が含まれ、さらに EVs 内の bta-miR-98 が、子宮内膜の免疫関連因子の発現を抑制的に調節していることが明らかとなった。哺乳類では、妊娠初期の段階で、着床成立に向け、子宮内膜内で炎症促進と抗炎症反応のバランスが保たれている。これまでの結果と合わせると、子宮内の免疫反応を調節し胚着床及び胎盤形成を成立させるために、ウシ子宮内 EVs のうち、いくつかの EVs は、IFNT 非依存的に子宮内膜の炎症反応を引き起こす一方、bta-miR-98 を含む子宮内 EVs は、母体の免疫機能を抑制していることが示唆された。

結論として、申請者は、本研究を通じ、反芻動物の着床期における EVs の役割を明らかにした (図 21)。また、この一連の EVs に関する成果は、子宮腔に存在する EVs が、着床過程において、IFNT と協調しながら、胚と子宮内膜とのコミュニケーションに関与する一方、IFNT 非依存的にも、これら細胞の相互作用に関わっていることを示唆している。さらに、EVs は、妊娠着床期において、哺乳類における妊娠の成立と継続にとって、不可欠な存在である P4 とも相互作用していることが明らかとなっている^{76,77)}。また、子宮内には、着床の成立に向け、重要なプレイヤーとして、数多くの免疫細胞が存在する。EVs と免疫細胞との関係においては、実際に、ヒトの研究において、EVs が活性化した免疫細胞にアポトーシスを誘導することが示されている⁴³⁾。さらに、今回の申請者の成果にて、EVs の母体免疫への作用が明らかになった。今回の成果は、EVs の子宮内膜細胞に対する作用ではあったが、同様に、胚着床期において、EVs が子宮腔に存在する免疫細胞に対しても、免疫機能を抑制して

いることが示唆される。このように、子宮内 EVs は、着床時に、P4 や IFNT などの妊娠に必須と言われてきた因子や免疫細胞と協調しながら、着床過程の制御に関与していることが考えられ、これら着床のメカニズムを解明するためには、子宮内の EVs の生成機序、内包物および役割を含めた子宮内環境を正確に把握する必要がある。

また、これら知見は、胚着床期のメカニズムの解明だけでなく、将来的には、EVs の生殖分野での妊娠診断や生殖補助医療への応用に繋がることが期待される。実際に、2018 年には、世界中でウシ胚やヒツジ胚がそれぞれ 1,129,041 頭と 17,868 頭に、移植されており⁷⁸⁾、胚移植産業は急速に拡大している。EVs を活用した生殖分野での応用例として、例えば、胚盤胞から培地液中に放出された EVs を、高品質な胚盤胞を選択するためのバイオマーカーとして活用することが考えられる。さらに、人工授精や胚移植後の血液中の EVs をバイオマーカーとして利用することで、動物への負担を小さくし、妊娠診断を行うことが可能となる。また、臨床への応用の可能性としては、妊娠促進剤の開発もありうる。IFNT が発見されて以来、ウシやヒツジなど反芻動物において、妊娠率向上のために人為的に IFNT を胚移植時に子宮内に投与する試験が繰り返されてきた。しかしながら、IFNT の投与によって受胎率の向上が見られていないことから、母体の妊娠認識には IFNT のみが重要なのか疑問視されてきた。こうした過去の知見に対して、今回私が明らかにした子宮内 EVs に関する成果が、混迷を極めている妊娠率向上に向けた研究に一石を投じるものであると期待する。もちろん、EVs を用いた妊娠促進剤の開発は、胚発生や胚の着床を促進する EVs 内の特定の因子 (群) を探索し、その特異的な因子 (群) を人為的に EVs 中に取り込み、さらに、その人工 EVs を適切なタイミングで子宮腔に供給する必要があることから、前述のバイオマーカーの開発より、技術的なハードルは高く、さらなる研究が必要である。しかしながら、EVs を用いた妊娠促進剤の開発は、潜在的な価値が高く、これを生産現場でも使用できるように確立できれば、我が国の受胎率低下に歯止めをかけることができる。

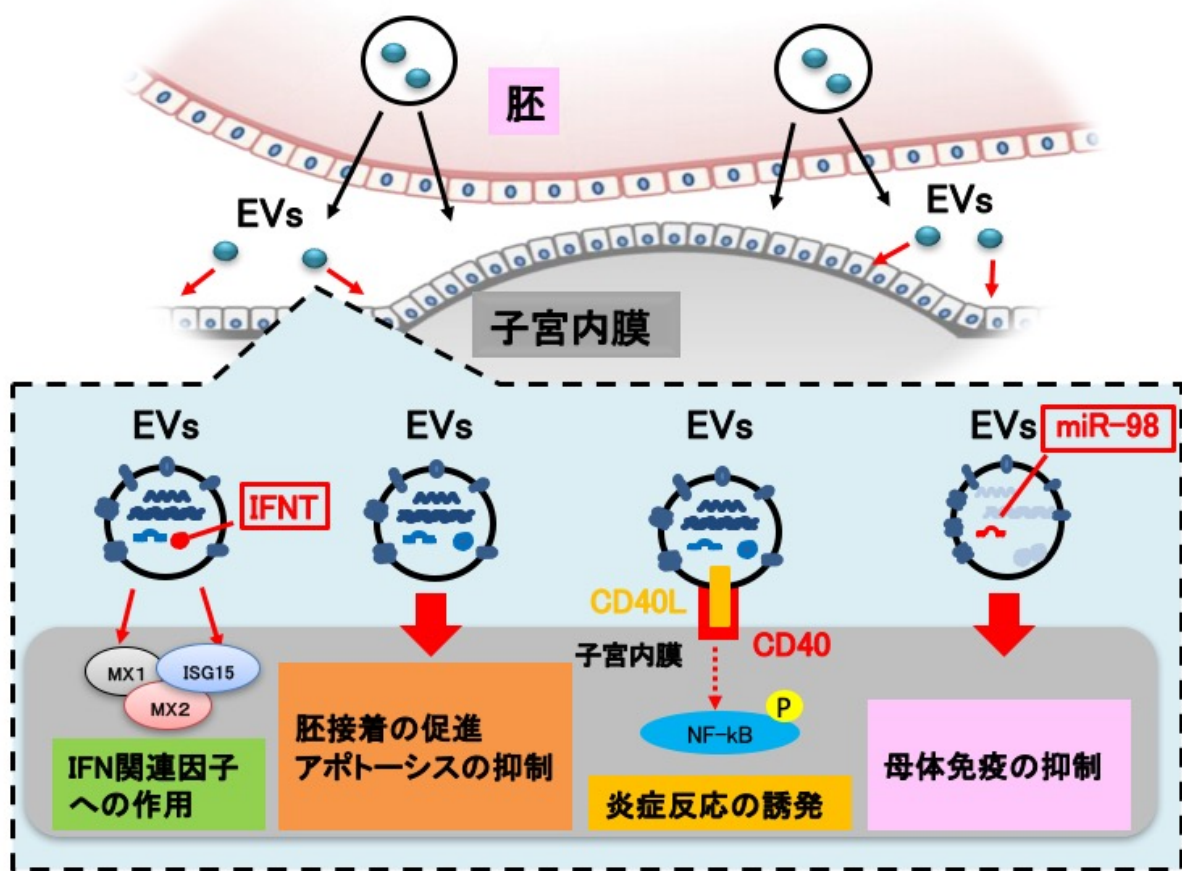


図 21. 母体と胚との間のコミュニケーションにおける EVs の役割

謝辞

本稿を終わるに当たり、本研究の遂行に際し、始終御指導、御鞭撻を賜り、また本論文の御高閲を賜りました堀 正敏教授と東海大学・総合農学研究所の今川 和彦教授（所長）に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行並びに論文作成に際し、始終、直接御指導、御鞭撻を頂きました宮城大学・動物遺伝育種学教室の須田 義人教授、東京薬科大学・薬理学教室の草間 和哉助教、東京大学・獣医薬理学教室の三原 大輝助教、北京農業大学の白 汝嵐博士に深く感謝致します。本研究の遂行に際し、EVs像の撮影においてご指導、ご協力をいただきました生物プロセス工学教室の大下 誠一教授に、深く感謝いたします。ヒツジ子宮灌流液とウシ子宮灌流液をそれぞれ提供して頂きました、The University of Tennessee の James D. Godkin 先生（ヒツジ子宮灌流液）と全農 ET センターの青柳敬人先生と出田篤志先生（ウシ子宮灌流液）に深く感謝いたします。また、ウシ胚・栄養膜細胞とウシ子宮内膜・上皮細胞をそれぞれ提供して頂きました、The University of Florida の Alan Ealy 先生（ウシ胚・栄養膜細胞）と岡山大学・動物生殖生理学教室の木村 康二教授（ウシ子宮内膜・上皮細胞）に深く感謝いたします。様々な面で親身に相談に乗っていただきました、獣医薬理学教室、村田 三知様、元獣医繁殖育種学教室、立川 君子様に深く感謝いたします。また、御世話になりました獣医繁殖育種学教室、獣医薬理学教室の皆様に深く感謝致します。

最後に、本研究を陰ながら支えて下さいました両親、祖父母、親戚一同、上司、同僚、友人の皆様に対してここに改めて感謝の意を表します。

引用文献

1. 家畜改良事業団. 受胎調査成績. 家畜改良事業団ホームページ Available from URL: <http://liaj.or.jp/giken/hanshoku/jyutai.html> [Cited 18 May 2021]
2. Chang MC. Development of bovine blastocyst with a note on implantation. *Anat Rec* **113**,143-161 (1952)
3. Greenstain JS, Murray RW, Foley RC. Observations on the morphogenesis and histochemistry of the bovine preattachment placenta between 16 and 33 days of gestation. *Anat Rec* **132**, 321-341 (1958)
4. Imakawa K, Anthony RV, Kazemi M, Marotti KR, Polites HG, Roberts RM. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. *Nature* **330**, 377-379 (1987)
5. Gnatek GG, Smith LD, Duby RT, Godkin JD. Maternal recognition of pregnancy in the goat: effects of conceptus removal on interestrus intervals and characterization of conceptus protein production during early pregnancy. *Biol Reprod* **41**, 655-663 (1989)
6. Klemann SW, Li JZ, Imakawa K, Cross JC, Francis H, Roberts RM. The production, purification, and bioactivity of recombinant bovine trophoblast protein-1 (bovine trophoblast interferon). *Mol Endocrinol* **10**, 1506-1514 (1990)
7. Nagaoka K, Nojima H, Watanabe F, Chang KT, Christenson RK, Sakai S, Imakawa K. Regulation of blastocyst migration, apposition, and initial adhesion by a chemokine, interferon gamma-inducible protein 10 kDa (IP-10), during early gestation. *J Biol Chem* **278**, 29048-29056 (2003)
8. Imakawa K, Nagaoka K, Nojima H, Hara Y, Christenson RK. Changes in immune cell distribution and IL-10 production are regulated through endometrial IP-10 expression in the goat uterus. *Am J Reprod Immunol* **53**, 54-64 (2005)
9. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* **7**, 1535750 (2018)

10. Sakurai T, Bai H, Bai R, Arai M, Iwazawa M, Zhang J, Konno T, Godkin JD, Okuda K, Imakawa K. Coculture system that mimics in vivo attachment processes in bovine trophoblast cells. *Biol Reprod* **87**, 60 (2012)
11. Bai R, Bai H, Kuse M, Ideta A, Aoyagi Y, Fujiwara H, Okuda K, Imakawa K, Sakurai T. Involvement of VCAM1 in the bovine conceptus adhesion to the uterine endometrium. *Reproduction* **148**, 119-127 (2014)
12. Guillomot M, Flechon JE, Wintenberger-Torres S. Conceptus attachment in the ewe: an ultrastructural study. *Placenta* **2**, 169-182 (1981)
13. Nakamura K, Kusama K, Bai R, Sakurai T, Isuzugawa K, Godkin JD, Suda Y, Imakawa K. Induction of IFNT-Stimulated Genes by Conceptus-Derived Exosomes during the Attachment Period. *PLoS One* **11**, e0158278 (2016)
14. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**, 44-57 (2009)
15. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* **37**, 1-13 (2009)
16. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, Samuel M, Pathan M, Jois M, Chilamkurti N, et al. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol* **428**, 688-692 (2016)
17. Koch JM, Ramadoss J, Magness RR. Proteomic profile of uterine luminal fluid from early pregnant ewes. *J Proteome Res* **9**, 3878-3885 (2010)
18. Forde N, Bazer FW, Spencer TE, Lonergan P. 'Conceptualizing' the Endometrium: Identification of Conceptus-Derived Proteins During Early Pregnancy in Cattle. *Biol Reprod* **92**, 156 (2015)
19. Burns G, Brooks K, Wildung M, Navakanitworakul R, Christenson LK, Spencer TE. Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus. *PLoS ONE* **9**, e90913 (2014)
20. Ruiz-González I, Xu J, Wang X, Burghardt RC, Dunlap KA, Bazer FW. Exosomes, endogenous retroviruses and toll-like receptors: Pregnancy recognition in ewes. *Reproduction* **149**, 281-291 (2015)

21. Yamakoshi S, Bai R, Chaen T, Ideta A, Aoyagi Y, Sakurai T, Konno T, Imakawa K. Expression of mesenchymal-related genes by the bovine trophectoderm following conceptus attachment to the endometrial epithelium. *Reproduction* **143**, 377-387 (2012)
22. Guan X. Cancer Metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B* **5**, 402-418 (2015)
23. Dong J, Xu J, Wang X, Jin B. Influence of the interaction between long noncoding RNAs and hypoxia on tumorigenesis. *Tumour Biol* **37**, 1379-1385 (2015)
24. Jeong W, Bazer FW, Song G, Kim J. Expression of hypoxia-inducible factor-1 by trophectoderm cells in response to hypoxia and epidermal growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* **469**, 176-182 (2016)
25. Milane L, Singh A, Mattheolabakis G, Suresh M, Amiji MM. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *J Control Release* **219**, 278-294 (2015)
26. Kharaziha P, Ceder S, Li Q, Panaretakis T. Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle. *Biochim Biophys Acta* **1826**, 103-111 (2012)
27. Soung YH, Nguyen T, Cao H, Lee J, Chung J. Emerging roles of exosomes in cancer invasion and metastasis. *BMB Rep* **49**, 18-25 (2016)
28. Kang S, Kim MJ, An H, Kim BG, Choi YP, Kang KS, Gao MQ, Park H, Na HJ, Kim HK, et al. Proteomic molecular portrait of interface zone in breast cancer. *J Proteome Res* **9**, 5638-5645 (2010)
29. Xu SG, Yan PJ, Shao ZM. Differential proteomic analysis of a highly metastatic variant of human breast cancer cells using two-dimensional differential gel electrophoresis. *J Cancer Res Clin Oncol* **136**, 1545-1556 (2010)
30. Voisin SN, Krakovska O, Matta A, DeSouza LV, Romaschin AD, Colgan TJ, Siu KW. Identification of novel molecular targets for endometrial cancer using a drill-down LC-MS/MS approach with iTRAQ. *PLoS One* **6**, e16352 (2011)
31. Sun HQ, Kwiatkowska K, Wooten DC, Yin HL. Effects of CapG overexpression on agonist-induced motility and second messenger generation. *J Cell Biol* **129**, 147-156 (1995)

32. De Corte V, Van Impe K, Bruyneel E, Boucherie C, Mareel M, Vandekerckhove J, Gettemans J. Increased importin-beta-dependent nuclear import of the actin modulating protein CapG promotes cell invasion. *J Cell Sci* **117**, 5283-5292 (2004)
33. Zablocki GJ, Ruzycski PA, Overturf MA, Palla S, Reddy GB, Petrash JM. Aldose reductase-mediated induction of epithelium-to-mesenchymal transition (EMT) in lens. *Chem Biol Interact* **191**, 351-356 (2011)
34. Tammali R, Reddy AB, Srivastava SK, Ramana KV. Inhibition of aldose reductase prevents angiogenesis in vitro and in vivo. *Angiogenesis* **14**, 209-221 (2011)
35. Bazer FW, Ying W, Wang X, Dunlap KA, Zhou B, Johnson GA, Wu G. The many faces of interferon tau. *Amino Acids* **47**, 449-460 (2015)
36. Yankey SJ, Hicks BA, Carnahan KG, Assiri AM, Sinor SJ, Kodali K, Stellflug JN, Ott TL. Expression of the antiviral protein Mx in peripheral blood mononuclear cells of pregnant and bred, non-pregnant ewes. *J Endocrinol* **170**, R7-11 (2001)
37. Shirasuna K, Matsumoto H, Matsuyama S, Kimura K, Bollwein H, Miyamoto A. Possible role of interferon tau on the bovine corpus luteum and neutrophils during the early pregnancy. *Reproduction* **150**, 217-225 (2015)
38. Oliveira JF, Henkes LE, Ashley RL, Purcell SH, Smirnova NP, Veeramachaneni DN, Anthony RV, Hansen TR. Expression of interferon (IFN) -stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN-tau release from the uterine vein. *Endocrinology* **149**, 1252-1259 (2008)
39. Romero JJ, Antoniazzi AQ, Nett TM, Ashley RL, Webb BT, Smirnova NP, Bott RC, Bruemmer JE, Bazer FW, Anthony RV, et al. Temporal Release, Paracrine and Endocrine Actions of Ovine Conceptus-Derived Interferon-Tau During Early Pregnancy. *Biol Reprod* **93**, 146 (2015)
40. Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* **17**, 879-887 (2005)
41. Berrone E, Corona C, Mazza M, Costassa EV, Faro ML, Properzi F, Guglielmetti C, Maurella C, Caramelli

- M, Deregibus MC, et al. Detection of cellular prion protein in exosome derived from ovine plasma. *J Gen Virol* **96**, 3698-3702 (2015)
42. Kusama K, Nakamura K, Bai R, Nagaoka K, Sakurai T, Imakawa K. Intrauterine exosomes are required for bovine conceptus implantation. *Biochem Biophys Res Commun* **495**, 1370-1375 (2018)
43. Stenqvist AC, Nagaeva O, Baranov V, Mincheva-Nilsson L. Exosomes secreted by human placenta carry functional Fas ligand and TRAIL molecules and convey apoptosis in activated immune cells, suggesting exosome-mediated immune privilege of the fetus. *J Immunol* **191**, 5515-5523 (2013)
44. Bai R, Kusama K, Sakurai T, Bai H, Wang C, Zhang J, Kuse M, Ideta A, Aoyagi Y, Okuda K, et al. The Role of Endometrial Selectins and Their Ligands on Bovine Conceptus Attachment to the Uterine Epithelium During Peri-Implantation Period. *Biol Reprod* **93**, 46 (2015)
45. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-354 (1997)
46. Haider S, Knofler M. Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta* **30**, 111-123 (2009)
47. Harada T, Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Makrydimas G, Sofikitis N, Paschopoulos M, Paraskevaidis E, Terakawa N. Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Update* **10**, 29-38 (2004)
48. Bidarimath M, Khalaj K, Kridli RT, Kan FW, Koti M, Tayade C. Extracellular vesicle mediated intercellular communication at the porcine maternal-fetal interface: a new paradigm for conceptus-endometrial cross-talk. *Sci Rep* **7**, 40476 (2017)
49. Malla B, Zaugg K, Vassella E, Aebbersold DM, Dal Pra A. Exosomes and exosomal microRNAs in prostate cancer radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **98**, 982-995 (2017)
50. Chen L, Yang W, Guo Y, Chen W, Zheng P, Zeng J, Tong W. Exosomal lncRNA GAS5 regulates the apoptosis of macrophages and vascular endothelial cells in atherosclerosis. *PLoS One* **12**, e0185406 (2017)
51. Prakobphol A, Genbacev O, Gormley M, Kapidzic M, Fisher SJ. A role for the L-selectin adhesion system in mediating cytotrophoblast emigration from the placenta. *Dev Biol* **298**, 107-117 (2006)
52. Konac E, Alp E, Onen HI, Korucuoglu U, Biri AA, Menevse S. Endometrial mRNA expression of matrix

- metalloproteinases, their tissue inhibitors and cell adhesion molecules in unexplained infertility and implantation failure patients. *Reprod Biomed online* **19**, 391-397 (2009)
53. Mathew DJ, Sánchez JM, Passaro C, Charpigny G, Behura SK, Spencer TE, Lonergan P. Interferon tau-dependent and independent effects of the bovine conceptus on the endometrial transcriptome. *Biol Reprod* **100**, 365-380 (2019)
 54. Sánchez JM, Mathew DJ, Behura SK, Passaro C, Charpigny G, Butler ST, Spencer TE, Lonergan P. Bovine endometrium responds differentially to age-matched short and long conceptuses. *Biol Reprod* **101**, 26-39 (2019)
 55. Kusama K, Bai R, Nakamura K, Okada S, Yasuda J, Imakawa K. Endometrial factors similarly induced by IFNT2 and IFNTc1 through transcription factor FOXS1. *PLoS ONE* **12**, e0171858 (2017)
 56. Hostager BS, Bishop GA. CD40-mediated activation of the NF- κ B2 pathway. *Front Immunol* **4**, 376 (2013)
 57. Mansouri-Attia N, Aubert J, Reinaud P, Giraud-Delville C, Taghouti G, Galio L, Everts RE, Degrelle S, Richard C, Hue I, et al. Gene expression profiles of bovine caruncular and intercaruncular endometrium at implantation. *Physiological Genomics* **39**, 14-27 (2009)
 58. Cheng Z, Chauhan L, Barry AT, Abudureyimu A, Oguejiofor CF, Chen X, Wathes DC. Acute bovine viral diarrhea virus infection inhibits expression of interferon tau-stimulated genes in bovine endometrium. *Biol Reprod* **96**, 1142-1153 (2017)
 59. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* **391**, 591-594 (1998)
 60. Qian Y, Zhao Z, Jiang Z, Li X. Role of NF kappa B activator Act1 in CD40-mediated signaling in epithelial cells. *PNAS* **99**, 9386-9391 (2002)
 61. Nakamura K, Kusama K, Ideta A, Kimura K, Hori M, Imakawa K. Effects of miR-98 in intrauterine extracellular vesicles on maternal immune regulation during the peri-implantation period in cattle. *Sci. Rep* **9**, 1-10 (2019)
 62. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at

- the implantation site. *Ann N Y Acad Sci* **1221**, 80-87 (2011)
63. Kelly RW, King AE, Critchley HO. Cytokine control in human endometrium. *Reproduction* **121**, 3-19 (2001)
 64. Mathew DJ, Lucy MC, D Geisert R. Interleukins, interferons, and establishment of pregnancy in pigs. *Reproduction* **151**, 111-122 (2016)
 65. Granot I, Gnainsky Y, Dekel N. Endometrial inflammation and effect on implantation improvement and pregnancy outcome. *Reproduction* **144**, 661-668 (2012)
 66. Gnainsky Y, Granot I, Aldo PB, Barash A, Or Y, Schechtman E, Mor G, Dekel N. Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implantation. *Fertil Steril* **94**, 2030-2036 (2010)
 67. Nakamura K, Kusama K, Ideta A, Imakawa K, Hori M. IFNT-independent effects of intrauterine extracellular vesicles (EVs) in cattle. *Reproduction* **159**, 503-511 (2020)
 68. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**, 654-659 (2007)
 69. Liang J, Wang S, Wang Z. Role of microRNAs in embryo implantation. *Reprod Biol Endocrinol* **15**, 90 (2017)
 70. Xia HF, Jin XH, Cao ZF, Shi T, Ma X. MiR-98 is involved in rat embryo implantation by targeting Bcl-xl. *FEBS Lett* **588**, 574-583 (2014)
 71. Kurian NK, Modi D. Extracellular vesicle mediated embryo-endometrial cross talk during implantation and in pregnancy. *J Assist Reprod Genet* **36**, 189-198 (2018)
 72. Ng YH, Rome S, Jalabert A, Forterre A, Singh H, Hincks CL, Salamonsen LA. Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PLoS One* **8**, e58502 (2013)
 73. Giacomini E, Alleva E, Fornelli G, Quartucci A, Privitera L, Vanni VS, Viganò P. Embryonic extracellular vesicles as informers to the immune cells at the maternal-fetal interface. *Clin Exp Immunol* **198**, 15-23 (2019)
 74. Kshirsagar SK, Alam SM, Jasti S, Hodes H, Nauser T, Gilliam M, Billstrand C, Hunt JS, Petroff MG.

- Immunomodulatory molecules are released from the first trimester and term placenta via exosomes. *Placenta* **33**, 982-990 (2012)
75. Nagaoka K, Sakai A, Nojima H, Suda Y, Yokomizo Y, Imakawa K, Sakai S, Christenson RK. A chemokine, interferon (IFN) -gamma-inducible protein 10 kDa, is stimulated by IFN-tau and recruits immune cells in the ovine endometrium. *Biol Reprod* **68**, 1413-1421 (2003)
76. Greening DW, Nguyen HP, Elgass K, Simpson RJ, Salamonsen LA. Human Endometrial Exosomes Contain Hormone-Specific Cargo Modulating Trophoblast Adhesive Capacity: Insights into Endometrial-Embryo Interactions. *Biol Reprod* **38**, (2016)
77. Burns GW, Brooks KE, O'Neil EV, hagen DE, Behura SK, Spencer TE. Progesterone effects on extracellular vesicles in the sheep uterus. *Biol Reprod* **98**, 612-622 (2018)
78. Viana J. 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter* **36** (2019)