

論文の内容の要旨

論文題目：反芻動物の着床期における細胞外分泌小胞の役割

氏名：中村圭吾

## 緒言

哺乳類の妊娠の成立には、胚の子宮内膜への着床が必須である。胚着床に異常が生じると、胚は生存することができず死滅してしまう。それゆえ、受胎率の改善に向け、この胚の接着機構の解明はもっとも重要である。胚着床に至るまでに胚と子宮内膜の間では、緊密なコミュニケーションが行われており、主にプロゲステロン (P4) をはじめとするホルモンやインターフェロントウ (IFNT) などのサイトカインが、液性因子としてこの役割を担っているものと考えられてきた。一方で、近年、細胞間のコミュニケーションツールとして、これら液性因子に加えて、細胞外分泌小胞 (EVs) と呼ばれる小胞顆粒が、注目されている。実際に、EVs は、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。しかしながら、胚着床期の子宮内における EVs の存在やその役割については明らかになっていない。

これまで、胚・栄養膜細胞 (CT-1) と子宮内膜・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。このモデルは、子宮内膜上皮細胞と胚を構成する栄養膜細胞の共培養に加えて、反芻動物の妊娠着床期の子宮内を灌流した液 (子宮灌流液) を添加することで、着床期における子宮内因子の発現動態を再現できる。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、この子宮灌流液中のどの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。

そこで、本研究ではヒツジとウシをモデルとして用い、反芻動物の胚の着床過程における EVs の関与とその役割について明らかにすることを目的とし、次の4点について解析を行った。

## 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

まず初めに、ヒツジを用いて、着床周辺期の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。結果、非妊娠及び妊娠17日のヒツジの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。さらに、*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。

これらの結果から、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、さらに妊娠、非妊娠ヒツジ 15、17 日の子宮灌流液から 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、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、胚着床期の子宮灌流液中の EVs に存在し、この IFNT を含む 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 ウシ子宮灌流液中に含まれる EVs の同定とその役割

次に、ウシを用いて、子宮腔内 EVs の同定と胚着床期における EVs の子宮内膜への作用について解析した。妊娠ウシ 17、20、22 日 (胚着床=19.5 日) の子宮灌流液から 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。加えて、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 は、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。

## 第 3 章 ウシ子宮内 EVs の作用と IFNT 非依存的な役割

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、本章では、胚着床期における 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 EVs の処置により、未処置群と比べて発現量が 2.0 倍以上変化した発現変動遺伝子 (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、*in silico* 解析を行ったところ、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 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 EVs には、非妊娠のウシ 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。最後に、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は、NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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。

#### 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、本章では、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。着床直後の妊娠 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。中でも、「免疫系」に関連する因子が最も大きく変動した。さらに、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。

## 総括

申請者は、本研究にて、胚から産生・分泌された EVs が、胚着床期の反芻動物の子宮内に存在し、さらに、胚着床期における EVs が、子宮内膜に対して作用していることを明らかにした。この結果は、胚着床期において、子宮内 EVs が、IFNT に加えて、子宮内膜の受容能を調節することで、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。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 の生殖分野での診断や生殖補助医療への応用に繋がるのが期待される。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。特に、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可能であると考えられた。