

審査の結果の要旨

氏名 中村 圭吾

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。胚着床に至るまでに胚と子宮内膜との間では、緊密なコミュニケーションが行われており、近年、細胞間のコミュニケーションツールとして、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。しかし、胚着床期の子宮内における EVs 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栄養膜細胞に、反芻動物の子宮灌流液を添加することで、着床期の子宮内環境を再現できる。これは、ヒツジやウシ子宮灌流液が、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、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、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、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。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。*in silico* 解析にて、これら 267 個のタンパク質の中から、CAPG、AKR1B1 を含む 172 個の EVs 関連タンパク質を同定し、さらに、CAPG と AKR1B1 は胚組織で特異的に、かつ、多量に発現していた。子宮灌流液及び胚に存在する CAPG、AKR1B1 は、妊娠 15、17 日の子宮内 EVs にも存在した。胚由来の妊娠認識物質 IFNT も、胚着床期の子宮灌流液中の EVs に存在し、この EVs は、EECs の IFN 応答因子の遺伝子発現を上昇させた。これらの結果から、胚由来の 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 EVs 中のタンパク質を網羅的に解析し、合計 596 個のタンパク質を同定した。さらに、ヒツジと同様に、胚由来の IFNT が、胚着床期の子宮内ウシ EVs にも含まれていた。この 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た。また、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の遺伝子発現を上昇させた。さらに、妊娠 20、22 日のウシ子宮内 EVs は、EECs の接着因子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、胚由来の EVs が存在し、これら EVs は、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 にて、妊娠 17 日の EVs の処置により、未処置群と比べて、140 個の遺伝子が発現変動していた。さらに、このウシ 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 リガンドタンパク質が多く存在した。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、妊娠 17 日のウシ EVs は、EECs で、IFNT 非依存的に炎症反応に関与していることが明らかとなった。

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、「免疫系」に関連する遺伝子の発現が減少した。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。

本研究にて、申請者は、胚由来の EVs が、反芻動物の胚着床期の子宮内に存在し、さらに、この 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。これらの結果は、子宮内 EVs が、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、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ことを期待される。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。