HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | 妊娠認識および胎盤形成時のウシ子宮におけるI型IFNシグナル調節機構に関する研究［論文内容及び審査の要旨］ |
| Author(s) | 白水, 貴大 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(農学) |
| Dissertation Number | 甲第12705号 |
| Issue Date | 2017-03-23 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/65950 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/ |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Takahiro_Shirozu_abstract.pdf, 論文内容の要旨 |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博　士（農学）　　氏名　　白水　貴大

## 学 位 論 文 題 名

**妊娠認識および胎盤形成時のウシ子宮における I 型 IFN シグナル調節機構に関する研究**

ウシなどの反芻動物は，着床前特異的に胚から分泌されるインターフェロンタウ (IFN-τ)が子宮に作用することにより着床が成立する妊娠認識機構を持つ。この時期は，人工授精，受精卵移植後の早期胚死滅が起こる時期でもあり，その機構解明によって，近年低下している受胎率改善への一助になることが期待される。IFN-τ は I 型 IFN に属し，着床前子宮内膜では，IFNAR1 と IFNAR2 のヘテロ二量体から構成される I 型 IFN 受容体 (IFNAR)を介した JAK/STAT 経路により IFN 誘導性遺伝子群 (ISGs)が誘導される。ISGs は，主に自然免疫応答で誘導され，抗ウイルス活性を示すことで知られるが，着床前子宮に果たす機能については不明である。本研究では，子宮における IFN 受容体の発現動態および局在解析や，発現抑制を行うことで，IFN-τ のシグナル伝達機構を明らかにすることを目的とした。

**(1) 妊娠子宮および胎盤組織における *MX* 遺伝子の発現動態**

*MX* 遺伝子は，ウイルス感染時に IFN-α により発現が誘導され，抗ウイルス能を示す代表的な ISGs の一つである。本章では，妊娠 14-18 日 (着床前期)，25-40 日 (着床期)，50-70 日，80-100 日および 130-160 日 (妊娠期)の各ステージの子宮 (内膜，小丘)および胎盤組織における *MX* および *IFN-α* の発現量解析と IFNAR，IFN 制御因子の発現解析を行った。本章での研究により，*MX* 遺伝子は，着床期以降と比べ着床前期子宮組織において最も高い発現量を示すことが明らかとなった。また，妊娠期の全組織において，*MX*，*IFN-α*，*IFNAR*，IFN 制御因子が発現していたことから，着床期以降では，IFN-α の IFNAR を介した JAK/STAT 経路が働くことが示唆された。

**(2) 黄体期子宮組織における I 型 IFN 応答性および I 型 IFN シグナル関連遺伝子の発現動態**

IFN-τ は子宮内膜上の IFNAR を介してシグナルを伝達するが，発情周期変動に伴うウシ子宮内膜の IFNAR の詳細な発現動態および IFN 応答性の知見はない。そこで本章では，IFN-α，または IFN-τ を高濃度含む濃縮子宮灌流液 (PUF)を添加した培地で培養した黄体前期，中期，後期の子宮組織における ISGs の発現量の解析を行った。さらに，I 型 IFN シグナル関連遺伝子の発現量および，免疫染色による IFNAR のタンパク質局在解析を解析した。PUF または IFN-α により，*MX1-a*，*ISG15* などの主要な ISGs は中期において強く誘導された。この子宮組織における黄体時期特異的な ISGs 誘導能は本研究により初めて明らかにな

った。併せて，IFN 制御因子の発現は中期で高く，*IFNAR* は前期で最も高く，後期にかけて減少傾向を示した。免疫染色による IFNAR のシグナルも前期から中期で強く，後期で弱い傾向を示した。本章の研究により，ウシ子宮内膜における IFNAR や IFN シグナル関連遺伝子の発現変動が黄体時期特異的な ISGs 誘導能をもたらし，胚からの IFN-τ 分泌に合わせた妊娠認識に備える受容応答の存在が示唆された。

**(3) IFNAR 発現抑制が I 型 IFN シグナル関連遺伝子発現およびアポトーシスに及ぼす影響**

IFN-τ を含む IFN はアポトーシスとよばれる細胞死を誘導する。ヒトやマウスでは，ISGs のアポトーシスへの関与，アポトーシスの着床期子宮組織リモデリングへの関与が示唆されているが，ウシでの知見は乏しい。本章では，ウシ子宮上皮細胞を用いて IFNAR 発現抑制が IFN-τ のシグナル伝達に及ぼす影響を検証した。まず，RNA 干渉法による IFNAR の発現抑制が IFN-τ 添加後の ISGs，I 型 IFN シグナル関連遺伝子，着床関連遺伝子，細胞死関連遺伝子などの発現誘導能に影響を及ぼすか否かを発現定量解析により検証した。さらに，DNA ラダー解析によりアポトーシスを評価した。RNA 干渉は IFNAR1 および IFNAR2 の発現を特異的に抑制し，IFN-τ 添加後の ISGs および IFN シグナル関連遺伝子の発現誘導も抑制した。この抑制効果は IFNAR2 よりも IFNAR1 の発現抑制で高いことから，ウシ子宮上皮細胞における IFN-τ によるシグナル伝達は IFNAR1 の発現が重要であることが示唆された。細胞死関連遺伝子も IFN-τ 添加後に増加し，IFNAR 発現抑制により抑制された。JAK/STAT 経路阻害剤の添加区では DNA の断片化が軽度であったものの，IFN-τ 誘導性の明瞭な DNA ラダーは検出されなかった。本実験で IFN-τ による誘導を受けた *CASP4* は DNA の断片化が軽度で炎症性サイトカインの放出を伴うピロトーシスとよばれる細胞死を誘導することが報告されている。これより，IFN-τ の IFNAR を介した JAK/STAT 経路がアポトーシスおよびピロトーシス誘導に関与する可能性が示唆された。着床関連遺伝子も IFN-τ 添加後に増加し，IFNAR 両サブユニット発現抑制区では IFN-τ による有意な誘導を受けなかった。これより，本実験で解析した着床関連遺伝子，*TGF-β1*，*TGF-β2*，*PLAC8* が IFN-τ の IFNAR を介したシグナルで直接，誘導されることが示唆された。以上より，着床前ウシ子宮内膜における IFN-τ シグナルは，IFNAR1 サブユニットの発現が重要であり，ISGs の発現および炎症性サイトカインの放出を伴うピロトーシスの誘導により，細菌やウイルスなどの感染症から子宮および胚を守るための免疫応答としての役割を果たすこと並びにアポトーシスの誘導により，着床期子宮組織リモデリングとしての役割を担う可能性が示唆された。

本研究により，ウシ子宮内膜は着床前特異的な妊娠認識時の IFN-τ に対する応答に向けて I 型 IFN 受容体や IFN シグナル関連遺伝子の発現が変動し，黄体時期特異的な ISGs 誘導能をもたらすことが明らかとなった。さらに，ウシ子宮上皮細胞における IFNAR1 依存的な IFN-τ シグナル伝達機構の存在および IFN-τ 誘導性細胞死が着床成立に向けた免疫応答や子宮組織リモデリングに関与することが初めて明らかとなった。