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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博　士（農学）　　氏名　　白水　貴大

審査担当者　主　査　教　授　高橋　昌志
副　査　教　授　小林　泰男
副　査　准教授　小池　聡
副　査　准教授　川原　学
副　査　助　授　唄　花子

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

本論文は 5 章からなり、図 22，表 6，文献 166 および付表を含む項数 116 の和文論文であり、別に参考論文 1 報が添えられている。

ウシなどの反芻動物は，着床期特異的に胚から分泌される固有のインターフェロンタウ(IFN-τ)が子宮に作用することで妊娠認識・着床が成立する。しかし、その伝達機構には未解明な部分が多い。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

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)の子宮 (内膜，小丘)および胎盤組織における *MX* および IFN-τ と同じく I 型 IFN に属する *IFN-α* の発現量解析並びに IFNAR1 と IFNAR2 のヘテロ二量体から構成される I 型 IFN 受容体 (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前期, 中期, 後期の子宮組織における IFN 誘導性遺伝子 (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，発情周期別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発情期特異的な 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，アポトーシスの着床期子宮組織改編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。RNA 干渉法による IFNAR の発現抑制後, IFN-τ を添加した細胞における ISGs, I 型 IFN シグナル，着床，細胞死などに関連する遺伝子の発現量を解析した。さらに, DNA 断片化解析を行った。RNA 干渉は IFNAR 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，IFN-τ シグナル伝達における IFNAR1 の重要性が示唆された。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。さらに，JAK/STAT 経路阻害剤は DNA の断片化を阻害した。また，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に関わる *CASP4* も IFN-τ による誘導を受けた。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は IFN-τ により直接, 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, 着床期子宮組織改編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, 発情ステージ特異的な 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。

よって、審査員一同は、白水貴大が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。