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［全文の要約］ |
| Author(s) | 白水, 貴大 |
| Description | この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。<br>https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/ |
| 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/2115/65952 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Takahiro_Shirozu_summary.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# 学 位 論 文 の 要 約

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

### 第一章　序論

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。

### 第二章　妊娠子宮および胎盤組織における *MX* 遺伝子の発現動態

#### 目的

*MX* 遺伝子は，ウイルス感染時に産生される IFN-α などの I 型 IFN によって発現が誘導され，ウイルスの増殖を抑制する機能を持つ代表的な ISGs の一つである。ウシ *MX1* は，*MX1-a*，*MX1B* という選択的スプライシング変異体を持つが，両者を区別した発現解析の知見は少ない。また，妊娠 30 日以降の子宮内膜組織および胎盤組織における詳

細な発現動態も不明である。そこで本章では，妊娠 14-18 日 (着床前期)，25-40 日 (着床期)，50-70 日，80-100 日，130-150 日 (妊娠期)の 5 つのステージに分けてサンプリングを行い，それぞれの子宮 (内膜，小丘)および胎盤組織における *MX1-a*，*MX1B*，*MX2* 並びに *IFN-α* の qRT-PCR 解析と I 型 IFN 受容体 (*IFNAR1*, *IFNAR2*), IFN 制御因子 (*IRF3*, *IRF9*)の RT-PCR 解析を行った。

**結果および考察**

解析した全ての *MX* は，妊娠 14-18 日子宮組織において最も高い発現量を示し，着床期以降では低い発現量で推移した。IFN-τ の産生は着床前一過性であるが，妊娠期の全組織において，*IFN-α*，*IFNAR1*，*IFNAR2*，*IRF3*，*IRF9* の発現が検出されたことから，着床期以降の *MX* は IFN-α の IFNAR を介した JAK/STAT 経路による誘導であることが示唆された。組織間の比較では，*MX1-a*，*MX2* は内膜で高く，小丘，胎盤にかけて減少する傾向を示した。妊娠中では，胎子を受け入れるために母子間の免疫寛容が必要であることから，母子間が直接結合する小丘や胎盤では免疫応答が弱く，胎子と結合しない内膜でより強い免疫応答を示すと考察された。妊娠日数間の比較では，内膜における *MX1-a* は妊娠 80-100 日で高く，その後，減少傾向を示した。さらに，胎盤における *MX1-a*，*MX2* は，妊娠 130-150 日で高い発現量を示した。ウシ胎子は妊娠 80-120 日にかけて免疫能を獲得することから，胎子の免疫が未発達な時期では母体の自然免疫応答が活発に働き，胎子の免疫が発達するにつれて母体の免疫応答も弱くなる免疫調節機構が存在すると考察された。以上より，着床前ウシ子宮組織では，IFN-τ により *MX* が誘導されるが，着床期以降の子宮および胎盤組織では，免疫応答で産生される IFN-α により誘導されることが示された。

## 第三章　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

**目的**

第二章の研究で，主要な ISGs である *MX* は，着床期以降と比べて，IFN-τ 分泌期である妊娠 14-18 日において高い発現量を示した。IFN-τ は子宮内膜に存在する I 型 IFN 受容体に結合して ISGs を誘導する。しかし，発情周期ウシ子宮内膜における IFNAR の詳細な発現解析の知見は少なく，ヒト細胞レベルで IFNAR1 タンパク質の発現維持に関わるとされる *COPS5* に関する知見もない。ヒトでは，黄体維持機能はないものの IFN-ε が子宮で発現し，また，月経周期間の子宮内膜において *IFNAR1*，*IFNAR2*，*MX* の発現が変動する。以上より，ウシ子宮内膜において IFNAR の発現が発情周期間で変動し，それに随伴して子宮内膜の ISGs 誘導能も変化するという仮説を立てた。そこで本章では, 黄体所見から前期, 中期, 後期と 3 つの発情ステージに分けてサンプリングを行い，IFN-α または IFN-τ を高濃度含む子宮灌流液 (PUF)添加培地で培養した子宮組織における ISGs (*MX1-a*，*MX1B*，*MX2*，*ISG12*，*ISG15*，*IDO1*)の qRT-PCR 解析を行った。さらに, 発情ステージごとに子宮組織における *IFNAR1*, *IFNAR2*, *COPS5*, *IRF1*, *IRF2*, *IRF3*, *IRF9*，*STAT1* 並びに *STAT2* の qRT-PCR 解析および免疫染色による IFNAR1，IFNAR2 のタンパク質発現解析を行った。

**結果および考察**

PUF は IFN-α と同等に ISGs mRNA を誘導することを確認した。誘導能の高かった 12 時間培養において，各発情ステージ組織における PUF または IFN-α による ISGs 誘導能を比較した結果，抗ウイルス能を示す *MX1-a*，*ISG15* などの主要な ISGs は中期において高い発現量を示した。この発情ステージ特異的な ISGs 誘導能は，本実験で初めて示された。ISGs 転写因子を形成する *STAT1*，*STAT2*，*IRF9* や IFN シグナルを正に制御する *IRF1* などもステージ間で発現差がみられ，*STAT1*，*STAT2* は後期で低く，*IRF9*，*IRF1* は中期で高い発現量を示した。これらの発現変化により，中期子宮内膜は I 型 IFN に対して高い応答性を備えていると考えられた。一方，*IFNAR1*，*IFNAR2* は前期で高い発現

量を示し，免疫染色では管腔上皮や腺上皮組織でシグナルが強く検出され，発情ステージ間で比較すると後期で弱い傾向を示した。*COPS5* も前期で高い発現量を示し，*IFNAR1* の発現と相関がみられた。このことから，ウシ子宮内膜では，IFNAR が前期から中期にかけて強く発現することで妊娠時に分泌される IFN-τ に応答しやすい環境を作り，非妊娠の場合，中期から後期にかけて分解されると考察された。以上より，発情周期ウシ子宮内膜における I 型 IFN 受容体や IFN シグナル関連遺伝子の発現変動が発情ステージ特異的な ISGs 誘導能をもたらすことが示された。

## 第四章　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

### 目的

第三章の研究で，子宮組織は胚が存在時に IFN-τ が分泌される時期である中期において，IFN-τ に対する高い応答性を示したことから，着床前子宮では，IFN-τ の IFNAR を介した ISGs 発現シグナルが重要であると考えられる。過去の知見から IFN-τ を含む IFN はアポトーシスを誘導することが報告されている。また，ヒトやマウスでは，ISGs のアポトーシスへの関与およびアポトーシスの着床期組織リモデリングにおける重要性が示唆されている。しかし，着床前ウシ子宮で IFN-τ により誘導される ISGs がアポトーシスに関与するかは不明である。一方，IFNAR は IFNAR1 と IFNAR2 のサブユニットから構成され，ヒトやマウスでは，サブユニット特異的な機能やシグナル伝達機構の存在が示唆されているが，ウシではまだ解析されていない。そこで本章では，ウシ子宮上皮細胞における I 型 IFN 受容体サブユニット特異的な発現抑制が抗ウイルス能を示す ISGs，I 型 IFN シグナル，アポトーシス，着床などに関連する遺伝子の発現およびアポトーシスに及ぼす影響を解析した。実験方法は，まず RNA 干渉によるウシ子宮上皮細胞における *IFNAR1*，*IFNAR2* の発現抑制効果を qRT-PCR，ウエスタンブロット法で解

析した。次に，IFNAR 発現抑制が IFN-τ の ISGs を含む遺伝子誘導能へ及ぼす影響の検証として，抗ウイルス能を示す ISGs (*MX1-a*，*MX2*，*ISG15*)，I 型 IFN シグナル関連遺伝子 (*IFNAR1*，*IFNAR2*，*COPS5*，*IRF1*，*IRF2*，*IRF3*，*IRF9*，*STAT1*，*STAT2*)，着床関連遺伝子 (*TGF-β1*，*TGF-β2*，*PLAC8*)，細胞死関連遺伝子 (*CASP3*，*CASP4*，*CASP7*，*BAX*，*BCL2*)の qRT-PCR 解析を行った。アポトーシスについては，DNA 断片化解析を行い，JAK/STAT 阻害剤 (AZD 1480)による影響も調べた。

**結果および考察**

RNA 干渉は IFNAR1 および IFNAR2 の発現を mRNA およびタンパク質レベルで特異的に抑制した。この IFNAR の発現抑制は IFN-τ 添加後の ISGs の誘導を抑制した。また，ISGs の転写因子である *IRF9*，*STAT1*，*STAT2*，IFN シグナル調節因子である *IRF1*，*IRF2*，I 型 IFN 転写因子である *IRF3* などの IFN シグナル関連遺伝子も IFN-τ 添加後の発現誘導が抑制された。これらの発現は IFNAR2 よりも IFNAR1 発現抑制下で強く抑制されていた。これらの結果から，ウシ子宮上皮細胞における IFN-τ による ISGs 誘導や IFN シグナル調節などにおいて，IFNAR1 が重要であることが示唆された。アポトーシス関連遺伝子である *CASP3*, *CASP7* 発現量や *BAX*/*BCL2* 発現比, 炎症性サイトカインの放出を伴う細胞死, ピロトーシスに関連する遺伝子である *CASP4* 発現量は IFN-τ 添加後に増加した。この発現増加は，IFNAR 発現抑制および JAK/STAT 経路阻害剤により抑制された。IFN-τ 誘導性の明瞭な DNA 断片化は検出されなかったものの, IFNAR 発現抑制区および阻害剤添加区では軽度な断片化が検出された。これらのことから, 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。着床期の子宮内膜組織リモデリングに関わる *TGF-β1*, *TGF-β2* 並びに *PLAC8* 発現量も IFN-τ 添加後に増加し, IFNAR 両サブユニット発現抑制区で IFN-τ による有意な発現誘導がみられなかったことから上記 3 遺伝子が IFNAR を介した IFN-τ シグナルで直接, 制御を受けることが示唆された。TGF-β1 および PLAC8 についてもアポ

トーシスを誘導することが示唆されている。以上のことから, 着床前期ウシ子宮に特異的な IFN-τ シグナルには, I 型 IFN 受容体の IFNAR1 サブユニットの発現が重要であり, 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と着床期子宮組織リモデリングとしての役割を同時に担う可能性が示唆された。

本研究により, ウシ子宮内膜における IFN-τ シグナルは着床前期に特異的であること, 妊娠認識時の IFN-τ に対する応答に向けて子宮内膜における 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, 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期における免疫応答や子宮組織リモデリングに関与することが明らかとなった。