



|                  |                                                                                                                          |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | 反芻動物の妊娠・着床期における研究の現状と課題                                                                                                  |
| Author(s)        | 唄, 花子; 櫻井, 敏博; 藤原, 浩 他                                                                                                   |
| Citation         | 日本畜産学会報, 84(3), 301-308<br><a href="https://doi.org/10.2508/chikusan.84.301">https://doi.org/10.2508/chikusan.84.301</a> |
| Issue Date       | 2013                                                                                                                     |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/68350">https://hdl.handle.net/2115/68350</a>                                        |
| Rights           | © 2013 公益社団法人 日本畜産学会                                                                                                     |
| Type             | journal article                                                                                                          |
| File Information | 84_301.pdf                                                                                                               |



## 反芻動物の妊娠・着床期における研究の現状と課題

唄 花子<sup>1,4</sup>・櫻井敏博<sup>1</sup>・藤原 浩<sup>2</sup>・出田篤司<sup>3</sup>・青柳敬人<sup>3</sup>・今川和彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科, 東京都文京区 113-8657

<sup>2</sup> 京都大学大学院医学研究科, 京都市左京区 606-8507

<sup>3</sup> 全農 ET (Embryo Transfer) 研究所, 北海道河東郡上士幌町 080-1407

<sup>4</sup> 日本学術振興会特別研究員 DC

(2013. 2. 15 受付, 2013. 3. 21 受理)

**要 約** 哺乳類の妊娠・着床期において, 受精卵の約半数は子宮へ着床する前に死滅してしまい, 妊娠は成立しない. この早期胚死滅により, 人工授精などの技術の向上にも関わらず, 肉用牛, 乳用牛とも受胎率は停滞/低下が続いている. 反芻動物の着床期には, 胚・栄養膜細胞からインターフェロン・タウ (IFNT) が子宮腔内へ分泌されることにより黄体退行が抑制され, さらに母体と胚の成長が同調し, 妊娠が成立する. IFNT を利用することで, 早期胚死滅を防ぎ, 受胎率向上が望めると期待されており, 研究が進められてきた. IFNT の発現制御に関与する因子は多数見つかっており, また, IFNT の子宮内投与等の応用研究も行われているが, 未だ実用化には至っていない. 今後は, 受胎率改善を目指すにあたり, *in vivo* の胚がどのような条件下で IFNT を適切に発現し得るか, すなわち栄養膜細胞において IFNT の発現をはじめ, その上流や周辺で起こるべき現象を広い視点で捉えることが必要であろう.

日本畜産学会報 84 (3), 301-308, 2013

ウシの妊娠期間は 285 日と長く, 単胎であるため通常良くとも 1 年に 1 産しかできない. 繁殖寿命は 10 歳前後とされており, 生涯に残せる産子数も 8 頭前後である. そこで, 優良な資質を持つ個体あるいは系統を効率よく生産するために人工授精などの生殖補助技術が利用されてきた. しかしながら, 人工授精による受胎率は, 肉用牛, 乳用牛ともに低下/停滞を続けており, 分娩間隔も延長し続けているのが現状である (家畜改良事業団 2013). 家畜動物の繁殖性は畜産業にとって重要な要素であるが, こうした繁殖性の低下は世界的な傾向となっている (Maas ら 2009). また, 胚移植においても, 形態的に充実した黄体をもつ母牛に対して高品質な胚を移植しているにもかかわらず受胎率は低いままである. 特に, 我が国における胚移植では, 約 8 割が凍結胚を使用しているが, 凍結胚の受胎率は新鮮胚と比べ特に低いと報告されており (Agca ら 1998), 受胎率向上が課題となっている.

ウシを含む反芻動物の着床期には, 胚・栄養膜細胞からインターフェロン・タウ (IFNT) というサイトカインが分泌される. Martal ら (1979) は, 妊娠 14 日から 16 日目のヒツジ胚の抽出物を子宮内投与すると, 黄体が維持されることを発見した. その後, 胚から培養液中に分泌されるペプチドを解析し, ovine trophoblast protein-1 (oTP-1) と名付けた (Godkin ら 1982). ウシでも同様

のペプチドの存在が明らかになり, bovine trophoblast protein-1 (bTP-1) と名付けられた (Bartol ら 1985).

Imakawa ら (1987) は, この因子がインターフェロン (IFN) であることが明らかにした. この IFN は, 胚・栄養膜細胞 (Trophoblast) 由来という意味でインターフェロン・“タウ” (IFNT) と名付けられた (Roberts ら 1992). この IFNT を利用して, 着床期の早期胚死滅を防ぎ, 受胎率の向上が望めると期待されており, 研究が進められてきた.

IFNT の発現制御に関与する転写因子は多数見つかっており, また, IFNT の子宮内投与も行われている. 実験に用いることができるウシの栄養膜細胞材料や, ウシの栄養膜細胞の遺伝子発現, 性質に関する情報も蓄積され始めてきた. しかしながら, 研究が進んでも未だ受胎率向上に至るまでの知見は得られていない. 本総説では, 現在までの IFNT に関連した研究を振り返るとともに, 問題点や今後の展開についても考察したい.

### 反芻動物の着床過程

哺乳類の妊娠において, 胚は受精後, 卵割を繰り返しながら成長していく. 胚盤胞期には, 胚の外側に位置し, 将来的には胎盤を形成する栄養膜細胞と, 内側に位置し, 将来的には胚子の体をつくる内部細胞塊に分化する. この胚

連絡者: 今川和彦 (fax : 03-5841-8180, e-mail : akaz@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

盤胞は孵化後、子宮内膜上皮細胞への接着・着床、浸潤、初期胎盤形成を経て、初めて個体形成を開始する。ウシの場合、排卵後1日で2細胞、3日で8細胞となり、3-3.5日には子宮へと到達する。受精卵は約8日目に孵化するが、接着することなく子宮腔内を遊走し、受精後13日頃まで直径2-3mmの球形を保つ。14日には3-4mmの卵形になり、伸長を始める。胚は一層の栄養膜細胞からなるチューブ様の構造をとり、妊娠18日頃には15cmから30cm程度の細長いフィラメント状になる。接着を開始する19-20日頃になると、栄養膜細胞は子宮腔内全体を覆うほど著しく増殖している（Chang 1952；Greenstainら1958）。この時期の接着はまだ緩く、子宮内部を生理食塩水等で灌流することにより、容易に胚を回収することができる。

反芻動物においては、黄体の維持に胚の存在が必要であると考えられてきた。ヒツジの妊娠12日目（ウシでは13日から14日目）以前に子宮内から胚を取り除くと黄体は退化し、発情が回帰するが、妊娠13日目以降に胚を除去しても黄体は維持される。また、12日目以前に胚移植を行うと妊娠は成立するが、13日目以降では成立しない。これらのことから、この時期は母体の妊娠認識期間と呼ばれている。この期間に、胚の伸長に伴い、胚・栄養膜細胞から分泌されるのがインターフェロン・タウ（IFNT）であり、妊娠認識物質として同定された（Martalら1979；Godkinら1982）。IFNTは、子宮内膜上皮細胞のレセプターに結合後、エストロゲンレセプター（ER）やオキシトシンレセプター（OXTR）に働き、黄体退化因子であるプロスタグランジンF2 $\alpha$ （PGF2 $\alpha$ ）のパルス状の分泌を弱めることにより黄体退行を抑制する。また、IFNTは黄体の維持に働く、子宮内膜性PGE2の発現を誘起することも知られている（Asselinら1997）。こうして卵巣黄体が維持され、妊娠維持に必要なホルモン、プロゲステロン（P4）の分泌が持続される。

胚・栄養膜細胞によるIFNTの産生は、栄養膜細胞に特異的であるのみならず、時期特異的である。孵化後すぐに産生が開始し、着床時にかけて増加するが、胚が子宮に接着を開始するとその産生は低下する（Bartolら1985；Farinら1990）。IFNTの作用は単に黄体を維持するだけではなく、胚子側からのIFNTの発現と、それに呼応する母体側・子宮内膜細胞との相互作用により胚は発達し、母親は胚を許容する準備が整い、着床が可能になる（Imakawaら2004）。例えば、IFNTはP4と協調して子宮内膜上皮細胞に働きかけ、子宮内膜や腺上皮細胞において、胚の生存や発達に必要な遺伝子発現を誘導することや、免疫細胞を誘導する役割を担うことも知られている（Asselinら2001；Nagaokaら2003；Imakawaら2005；Spencerら2008）。最近の知見では、Fordeら（2011）は妊娠および発情周期5日、7日、13日のウシ子宮内膜細胞において遺伝子発現変化は見られず、妊娠認識期間を

経た16日において多数の遺伝子発現変化が起こることを示した。またこうした遺伝子発現変化が、IFNT処置により誘導されることも示している（Fordeら2011）。こうしたことから、IFNTの発現を人為的に調節することができれば、着床期における早期胚死滅を防ぎ、受胎率向上を望めると期待されてきた。

## IFNTの活用への試み

IFNTの発見以降、妊娠認識物質であるIFNTを活用し、受胎率を改善しようという試みが続けられてきた。例えば、妊娠14日の伸長期初期の胚盤胞から得た栄養膜小胞を凍結胚とともに移植することで受胎率が向上したと報告されている（Heymanら1987）。同様に、体外受精胚においても栄養膜小胞との共移植により受胎率が向上したことが報告されている（Hashiyadaら2005）。こうした効果は、いずれも妊娠の比較的初期（26日から43日）には顕著に効果を示したが、妊娠の中期（38日から73日）あるいは最終的な分娩成績（280日から299日）には有意な差は認められていない（Hashiyadaら2005）。すなわち、これらは栄養膜小胞から分泌されるIFNTにより、初期に起こる妊娠認識が補強されたことを示している。一方、妊娠14日のウシおよび妊娠11日から13日のヒツジ胚から得た栄養膜小胞の共移植により、黄体が維持されたという報告がある（Heymanら1984）。また、より初期（7日から8日）のウシ栄養膜小胞を黄体側子宮内に投与することにより、約半数の投与牛において発情周期の延長が認められたことも報告されている（Nagaiら2009）。このことは、栄養膜小胞の共移植によるIFNTの補強により、妊娠認識から着床初期の受胎率が改善し得ること、またその後の妊娠継続には他の因子も関与することを示唆している。一方、大量生産が可能であり、より実用性が高いと考えられる体外受精胚由来の栄養膜小胞の共移植は、受胎成績や分娩成績には影響しないという報告もある（下司ら2010）。しかし、IFNT添加により、体外培養胚の発生率が向上したという報告もあり、IFNTの作用は黄体の退化のみならず、胚自身に良い影響を与えていることも示唆されている（Takahashiら2003）。さらに、胎子吸収をおこすCBA×DBA/2マウスの交配実験では、IFNTを腹腔内投与することにより、胎子吸収を防ぐ効果が見られたことも報告されている（Chaouatら1995）。

以上の報告は、IFNTの発現が着床初期の妊娠認識、妊娠成立に必須であることを示しており、今後どのように受胎率向上のための技術の実用化に結び付けることができるかが課題である。そのためには、栄養膜小胞の移植によるIFNT補強の効果、すなわちIFNTが子宮内膜や胚自身に対してどのように作用しているのかを明らかにする必要がある。また、当研究室では、着床期のウシ胚で発現している遺伝子を網羅的に解析し、多くのIFNTパラログのうち、IFNT1（ENSBTAG00000034285）およびIFNTc1

(ENSBTAG00000022303) の 2 種類の mRNA が発現していることを見出した。現在行われている IFNT の子宮内投与は、精製された一種類の IFNT のみが使用されているが、これら 2 種類の IFNT の機能の差異や、*in vivo* での発現のバランス（発現時期や発現量）なども考慮が必要かも知れない（図 1）。

### IFNT の発現制御機構

当研究室では、15 年に渡り、早期胚死滅の防止、家畜動物の受胎率向上を目指して、IFNT 遺伝子の発現制御機構を解明すべく研究を続けてきた。現在までに、IFNT 遺伝子発現に関わる因子として CDX2, ETS2, JUN などの転写因子（Ezashi ら 1998 ; Yamaguchi ら 1999 ; Imakawa ら 2006）やコアクチベーター CREBBP（Xu ら 2003）, p300（Das ら 2008）が見つかった。

我々の研究室で特に解析を進めてきたのが CDX2 であり、マウスの初期胚発生過程において良く研究されている。CDX2 は胚の最初の分化である栄養膜細胞と内部細胞塊の決定に関わることで知られ、*Cdx2* 遺伝子ノックアウトマウスは着床せずに致死になる（Strumpf ら 2005）。我々は、CDX2 はヒツジの胚発生期においても栄養膜細胞に局在し、また、ETS や JUN との共発現により、IFNT 遺伝子の転写活性を上昇させることを明らかにした（Imakawa ら 2006）。さらに、CDX2 の発現と高アセチル化により、非栄養膜細胞であるウシ腎臓由来細胞（Mardin-Darby bovine kidney cells, MDBK cells）に内在性 IFNT の遺伝子発現を誘導することができた。これは栄養膜細胞特異的とされる IFNT を非栄養膜細胞において発現させることができた初の報告であり、栄養膜細胞因子 CDX2 が IFNT 遺伝子の細胞特異的な発現制御の大部分を担うことが示唆された（Sakurai ら 2009）。

### ウシ栄養膜細胞における遺伝子発現

我々は、ウシの栄養膜細胞において、どのような遺伝子が発現しているか詳細に同定されていないことに着目した。IFNT 遺伝子の発現制御機構を解明するためには、IFNT と同様にウシ栄養膜細胞に特異的に発現する因子を同定し、IFNT の発現制御への関与を検討する必要があると考えた。そこで、IFNT を産生しているウシ栄養膜細胞 CT-1 と IFNT を産生していない非栄養膜細胞株 MDBK（ウシ腎臓）の遺伝子発現を cDNA マイクロアレイ法により比較した。その結果、CT-1 細胞で高発現している転写因子、GATA3 を見出した（Bai ら 2009）。転写因子 GATA ファミリーは、GATA1-GATA6 からなり、GATA1-3 は主に血液細胞で、GATA4-6 は主に心臓や内胚葉由来組織において重要な役割を果たすことで知られる。我々は、GATA2, GATA3 が IFNT の栄養膜細胞特異的な発現に関与することを示すことができた。同時期にもマウスの着床期の初期胚盤胞において GATA3 が栄養膜細胞に局在し、

細胞分化や遺伝子発現制御に関与するということが報告された（Home ら 2009 ; Ray ら 2009）。転写因子 GATA は反芻動物に特有のものではなかったが、これらは非常に興味深い知見であった。なぜなら転写因子 *Gata2*, *Gata3* の遺伝子欠損マウスはそれぞれ造血機能や中枢神経の形成異常により胎生 10.5 日、11.5 日頃に致死に至る（Tsai ら 1994 ; Pandolfi ら 1995）。また、これらは胎盤特異的遺伝子発現の低下をひき起こすが（Ma ら 1997）、胚の栄養膜細胞への分化や着床時に異常は認められず、初期の栄養膜細胞の機能には関与しないかのように考えられてきた。転写因子 GATA は因子間で発現や機能の重複が見られるため、遺伝子欠損マウスにおいても他の因子が機能を補ったことが考えられる（Ma ら 1997）。実際に Ferreira ら（2007）は、*Gata1* の遺伝子欠損マウスにおいて GATA2, GATA3 を GATA1 と同様に発現させることによりレスキューすることができることを報告している。

我々はまた、同じ GATA ファミリーに属する GATA1 が反芻動物の着床後の胚で発現が増加していること、GATA2 の発現は GATA1 により抑制的に制御されることを示し、因子間での発現制御の可能性を示唆した（Bai ら 2012）。栄養膜細胞における GATA1 の発現については、反芻動物、他の動物とも報告がない新知見であり、反芻動物の栄養膜細胞においては、GATA1, GATA2, GATA3 が共発現しているという事実から、これらはより複雑に相互作用しながら機能すると考えられる。これら因子の機能について、特に IFNT のように反芻動物に特異的な遺伝子発現や、胎盤の形成に関与するか否かなどを検討していく必要がある。

### 栄養膜細胞の遺伝子発現環境

我々は IFNT 遺伝子発現制御機構の解明を目指した研究を行うにあたり、CDX2 や GATA2, GATA3 に着目してきた。マウス栄養膜細胞の知見では、CDX2 と GATA3 は独立して下流の栄養膜細胞特異的因子群の誘導を担う（Home ら 2009）。これらの因子によって誘導される数多くの栄養膜細胞因子により、栄養膜細胞の環境が整うだろう。残念ながら、反芻動物においてはこうした網羅的な解析は行われていない。しかしながら我々は、IFNT の遺伝子発現解析において CDX2 や GATA2, GATA3 を非栄養膜細胞（ウシ耳由来線維芽 EF 細胞）に導入することで栄養膜細胞特異的な IFNT 遺伝子の転写活性を誘導することができることを示した（Bai ら 2009 ; Sakurai ら 2010）。これは、反芻動物の胚において CDX2 や GATA2, GATA3 の発現が非栄養膜細胞の IFNT 遺伝子発現環境を誘導していることを示唆している。さらに、GATA2, GATA3 は反芻動物に特異的な因子である IFNT だけでなく、哺乳類に共通した因子である *CDX2*, *PL-1* などの遺伝子発現制御に関与するという結果も得ている（Bai ら 2011）。



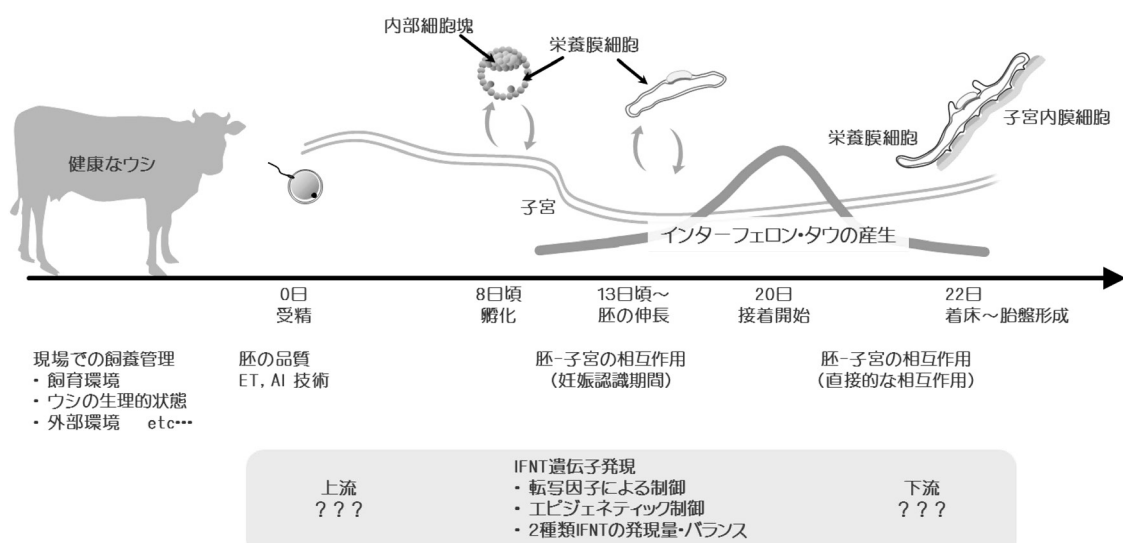
このように、CDX2 や GATA3 をはじめ、反芻動物の栄養膜細胞において発現し IFNT の発現制御に関与する因子は、マウスの栄養膜細胞においても重要な役割を担っている。これは、動物種によって着床の様式や胎盤の形態、妊娠認識の機序などが異なっているにも関わらず、栄養膜細胞で機能する因子群は保存されていることを示している。すなわち、IFNT の発現制御そのものの解明はもちろん重要であるが、さらに上流および下流において、栄養膜細胞特異的な因子群がどのように働くかを明らかにすることができれば、哺乳類に共通の現象あるいは反芻動物に特異的な現象を捉えることができるかもしれない。妊娠成立には個々の遺伝子発現調節はもちろん、多くの栄養膜細胞因子群が正常に発現・機能することが重要である。それら因子が着床期においてどのように機能するか、またそれが哺乳動物共通あるいは反芻動物特異的な現象であるかを見分けながら研究を行う必要がある（図 1）。

### 着床期研究モデルとしての反芻動物

大動物の研究を行う上で問題となるのが、マウス等とは違い飼育や繁殖、遺伝子改変が困難であり、実験試料が十分に得にくいこと、データも蓄積されているとはいえないことである。実際に IFNT の発現制御機構に関する研究においても、国内外を問わず、実験材料として主にヒト由来の細胞株（ヒト絨毛性がん細胞 JEG3 または JAR）を用いた実験系で行われてきた。発現制御機構に関する候補因子もマウスの栄養膜細胞からの知見により絞り込んでいた。しかしながら、こうした中でウシの栄養膜細胞として、BT-1 細胞（Shimada ら 2001）、CT-1 細胞（Talbot ら 2000）、F3 細胞（Hambruch ら 2010）など実験に用い

ることができる細胞も樹立されてきた。また、ウシの胚における網羅的遺伝子発現解析も行われ、情報も増えてきている（Ozawa ら 2012）。これらの材料や情報を活用することで、ウシの栄養膜細胞における遺伝子発現や性質への理解が進み、反芻動物の着床期研究は今後ますます発展していくことが期待できる。

現在、妊娠・着床過程の研究は主にマウスを用いて行われている。これらは飼育や繁殖、遺伝子改変が容易であり、データも蓄積されている点で非常に優れているためである。特に、遺伝子欠損マウスを用いた研究により、胚発生において重要な多くの転写因子や、エピジェネティック制御が明らかとなった（Rossant と Cross 2001；Hemberger 2007）。しかしながら、マウスの胚は孵化後すぐに子宮への着床が始まり、子宮内膜へと深く浸潤する。すなわち、栄養膜細胞と子宮内膜細胞は伝達因子による細胞どうしのコミュニケーションや、浸潤による直接的な相互作用が始まる。そのため、その間に起こる個々の現象を捉えることは難しい。一方、先に述べたように、反芻動物の着床は、ゆっくりと進行する。これは個々の現象を捉えるのに適している。また、浸潤の度合いが比較的緩やかであり、着床後も灌流により胚と子宮とを分けて取り出すことができる。さらに、IFNT は栄養膜細胞発達の指標ともなり得る。こうしたことから、反芻動物は着床研究を行う上で優れたモデルとなり得る。近年、妊娠・着床過程の研究が進み、新しい知見が蓄積されている中で、受胎・妊娠率が向上していないことから、もしかするとマウスでは見落としている現象があるのかも知れない。様々な要因が重複して成立していく着床現象の解明には、あらゆる視点や方向から研究を行うことが必要である。反芻動物を活用する



**Figure 1** Environment for the establishment of pregnancy in ruminants. Mammalian pregnancy including domestic animals is established various conditions while complexly intertwined. These are each important, it must be regarded as a series of flow.

ことで妊娠初期の個々の現象を捉え、妊娠・着床過程に起こる現象を明らかにするきっかけが掴めるのではないだろうか。

### IFNT 以外の可能性

前項までは、妊娠認識物質としての IFNT の知見について述べてきた。ここでは、妊娠認識における IFNT 以外の可能性についてもふれておきたい。

ヒトの着床においては、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (Human chorionic gonadotropin ; hCG) が黄体の維持に不可欠である。しかしながら、hCG だけを投与しても長期間の黄体維持はできないことも知られている。黄体の維持が hCG のみによって行われているということは疑問視されてきたが、他に液性因子は同定されず、その機構は明らかになっていない。藤原は、胚-子宮間相互作用に hCG のみならず免疫細胞も関与しているという仮説をたて、妊娠初期の末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell ; PBMCs) が黄体機能を賦活化することを明らかにした (藤原 1998)。また、出田らは、受精卵・胚移植 (Embryo transfer, ET) を行う 3 日前にウシ PBMCs を子宮内投与することにより、受胎率を向上させることに成功している (Ideta ら 2010a)。先に述べたように IFNT 処置では妊娠中期 (38 日から 73 日) には効果が見られなくなったのに対し、PBMCs 投与では妊娠 60 日の時点で対照群の 59.7% に対して 76.7% と有意に受胎率の向上が見られた。また、この PBMCs 処置後の子宮に ET を行うと胚の伸長が増加したということも報告している (Ideta ら 2010b)。これらのことは、我々ヒトにおいても、また家畜動物においても、胚-母体間の相互作用は今まで考えられていたよりはるかに早い時期に起こっていることを示している。これらの知見を踏まえると、着床期の超初期においては哺乳類に共通した妊娠認識機構が働き、徐々に hCG や IFNT による動物種に特異的な妊娠認識機構が働いていくと考えられる。また、ET を行う 3 日前の処置が妊娠中期の段階の受胎率にまで影響することは非常に興味深い。これは妊娠認識期のみならず、それ以前にも目を向けなければならないことを示している。

### 今後の展望

IFNT による胚や子宮環境への作用、IFNT 遺伝子の発現制御機構の解明に向けた研究は進んではいるが、未だ受胎率向上技術として実用化するには至っていない。しかしながら、これらの知見から妊娠認識期における IFNT の発現が着床期の胚と子宮、そして妊娠の成立に必須であることは確かである。

哺乳類の妊娠は様々な要因が複雑に絡み合いながら成立する。受胎率向上のためには、解決すべき問題が多く存在する。ここで述べただけでも、① IFNT の子宮内膜や胚自身に対しての作用 ②発現している 2 種類の IFNT (IFNT1

と IFNTc1) の機能の差異や、*in vivo* での発現のバランス ③栄養膜細胞因子の遺伝子発現や機能、胎盤形成への関与 ④ IFNT 発現の上流および下流で必要なシグナル ⑤哺乳動物での共通項と反芻動物特異的な現象の区別 などの検討課題があげられる。

我々は、IFNT 研究を行う上で IFNT が発現すること自体が重要だと考えるあまり、その周辺で起きていることについての精査が足りなかったかも知れない。実際に *in vivo* の胚子で IFNT の適切な発現がどのような条件で達成されるのか、環境温度や生理的状态、飼養管理等はどのように行われるべきか、ウシ個体にとってどのような状態のもと IFNT 産生が達成されることが望ましいのか、家畜動物の受胎率向上を目指すためには、*in vitro* と *in vivo* が結び付けられる様に研究を行う必要がある。大学での基礎研究や、研究機関による応用研究、現場での飼養管理、それぞれにより得られる情報が一連の流れとして捉えられたとき、受胎率向上が見えるかもしれない (図 1)。

### 謝 辞

本研究はミズーリ州立大学 RM Roberts 博士のもとで開始された。本邦における研究の初期には、橋爪一善先生、高橋 透先生、高橋ひとみ先生や高橋昌志先生らの研究協力のもとにすすめられた。現在は、岡山大学・奥田 潔先生らとの共同研究が進行している。また、本研究に携わった当研究室の山口浩史、勝村桃子、松田二子 (名古屋大学)、野島 久、永岡謙太郎 (東京農工大学)、徐寧淳、金民洙らに感謝する。

### 文 献

- Agca Y, Monson RL, Northey DL, Peschel DE, Schaefer DM, Rutledge JJ. 1998. Normal calves from transfer of biopsied, sexed and vitrified IVP bovine embryos. *Theriogenology* **50**, 129-145.
- Asselin E, Johnson GA, Spencer TE, Bazer FW. 2001. Monocyte chemotactic protein-1 and -2 messenger ribonucleic acids in the ovine uterus: regulation by pregnancy, progesterone, and interferon-tau. *Biology of Reproduction* **64**, 992-1000.
- Asselin E, Lacroix D, Fortier MA. 1997. IFN-tau increases PGE2 production and COX-2 gene expression in the bovine endometrium in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology* **132**, 117-126.
- Bai H, Sakurai T, Kim MS, Muroi Y, Ideta A, Aoyagi Y, Nakajima H, Takahashi M, Nagaoka K, Imakawa K. 2009. Involvement of GATA transcription factors in the regulation of endogenous bovine interferon-tau gene transcription. *Molecular Reproduction and Development* **76**, 1143-1152.
- Bai H, Sakurai T, Konno T, Ideta A, Aoyagi Y, Godkin JD, Imakawa K. 2012. Expression of GATA1 in the ovine conceptus and endometrium during the peri-attachment period. *Molecular Reproduction and Development* **79**, 64-73.

- Bai H, Sakurai T, Someya Y, Konno T, Ideta A, Aoyagi Y, Imakawa K. 2011. Regulation of trophoblast-specific factors by GATA2 and GATA3 in bovine trophoblast CT-1 cells. *Journal of Reproduction and Development* **57**, 518-525.
- Bartol FF, Roberts RM, Bazer FW, Lewis GS, Godkin JD, Thatcher WW. 1985. Characterization of proteins produced in vitro by periatachment bovine conceptuses. *Biology of Reproduction* **32**, 681-693.
- Chang MC. 1952. Development of bovine blastocyst with a note on implantation. *Anatomical Record* **113**, 143-161.
- Chaouat G, Assal Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliott JF, Mosmann T, Wegmann TG. 1995. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA × DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau. *Journal of Immunology* **154**, 4261-4268.
- Das P, Ezashi T, Gupta R, Roberts RM. 2008. Combinatorial roles of protein kinase A, Ets2, and 3',5'-cyclic-adenosine monophosphate response element-binding protein-binding protein/p300 in the transcriptional control of interferon-tau expression in a trophoblast cell line. *Molecular Endocrinology* **22**, 331-343.
- Ezashi T, Ealy AD, Ostrowski MC, Roberts RM. 1998. Control of interferon-tau gene expression by Ets-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 7882-7887.
- Farin CE, Imakawa K, Hansen TR, McDonnell JJ, Murphy CN, Farin PW, Roberts RM. 1990. Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. *Biology of Reproduction* **43**, 210-218.
- Ferreira R, Wai A, Shimizu R, Gillemans N, Rottier R, von Lindern M, Ohneda K, Grosveld F, Yamamoto M, Philipsen S. 2007. Dynamic regulation of Gata factor levels is more important than their identity. *Blood* **109**, 5481-5490.
- Forde N, Carter F, Spencer TE, Bazer FW, Sandra O, Mansouri-Attia N, Okumu LA, McGettigan PA, Mehta JP, McBride R, O'Gaora P, Roche JF, Lonergan P. 2011. Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant? *Biology of Reproduction* **85**, 144-156.
- 藤原 浩. 1998. ヒト黄体細胞分化抗原の同定とその黄体機能調節における意義. 日本産科婦人科学会雑誌 **50**, 500-510.
- 下司雅也, 橋谷田豊, 小川増弘. 2010. ウシ体外受精胚由来栄養膜小胞と胚との共移植が受胎率に及ぼす影響. 日本農業研究所研究報告『農業研究』 **23**, 231-244.
- Godkin JD, Bazer FW, Moffat J, Sessions F, Roberts RM. 1982. Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at day 13-21. *Journal of Reproduction and Fertility* **65**, 141-150.
- Greenstain JS, Murray RW, Foley RC. 1958. Observations on the morphogenesis and histochemistry of the bovine preattachment placenta between 16 and 33 days of gestation. *Anatomical Record* **132**, 321-341.
- Hambruch N, Haeger JD, Dilly M, Pfarrer C. 2010. EGF stimulates proliferation in the bovine placental trophoblast cell line F3 via Ras and MAPK. *Placenta* **31**, 67-74.
- Hashiyada Y, Okada M, Imai K. 2005. Transition of the pregnancy rate of bisected bovine embryos after co-transfer with trophoblastic vesicles prepared from in vivo-cultured in vitro-fertilized embryos. *Journal of Reproduction and Development* **51**, 749-756.
- Hemberger M. 2007. Epigenetic landscape required for placental development. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**, 2422-2436.
- Heyman Y, Camous S, Fèvre J, Méziou W, Martal J. 1984. Maintenance of the corpus luteum after uterine transfer of trophoblastic vesicles to cyclic cows and ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* **70**, 533-540.
- Heyman Y, Chesné P, Chupin D, Ménézo Y. 1987. Improvement of survival rate of frozen cattle blastocysts after transfer with trophoblastic vesicles. *Theriogenology* **27**, 477-484.
- Home P, Ray S, Dutta D, Bronshteyn I, Larson M, Paul S. 2009. GATA3 is selectively expressed in the trophectoderm of peri-implantation embryo and directly regulates Cdx2 gene expression. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 28729-28737.
- Ideta A, Hayama K, Nakamura Y, Sakurai T, Tsuchiya K, Tanaka S, Yamaguchi T, Fujiwara H, Imakawa K, Aoyagi Y. 2010b. Intrauterine administration of peripheral blood mononuclear cells enhances early development of the pre-implantation bovine embryo. *Molecular Reproduction and Development* **77**, 954-962.
- Ideta A, Sakai S, Nakamura Y, Urakawa M, Hayama K, Tsuchiya K, Fujiwara H, Aoyagi Y. 2010a. Administration of peripheral blood mononuclear cells into the uterine horn to improve pregnancy rate following bovine embryo transfer. *Animal Reproduction Science* **117**, 18-23.
- Imakawa K, Anthony RV, Kazemi M, Marotti KR, Polites HG, Roberts RM. 1987. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. *Nature* **330**, 377-379.
- Imakawa K, Chang KT, Christenson RK. 2004. Pre-implantation conceptus and maternal uterine communications: molecular events leading to successful implantation. *Journal of Reproduction and Development* **50**, 155-169.
- Imakawa K, Kim MS, Matsuda-Minehata F, Ishida S, Iizuka M, Suzuki M, Chang K-T, Echternkamp SE, Christenson RK. 2006. Regulation of the ovine interferon-tau gene by a trophoblast-specific transcription factor, Cdx2. *Molecular Reproduction and Development* **73**, 559-567.
- Imakawa K, Nagaoka K, Nojima H, Hara Y, Christenson RK. 2005. Changes in immune cell distribution and IL-10 production are regulated through endometrial IP-10 expression in the goat uterus. *American journal of Reproductive Immunology* **53**, 54-64.
- 家畜改良事業団. 2013. 受胎調査成績. 家畜改良事業団ホームページ. [homepage on the Internet]. 家畜改良事業団, 東京, 日本; [cited 18 March 2013]. Available from URL : <http://liaj.or.jp/giken/gijutsubu/seieki/jyutai.htm>

- Ma GT, Roth ME, Groskopf JC, Tsai FY, Orkin SH, Grosveld F, Engel JD, Linzer DIH. 1997. GATA-2 and GATA-3 regulate trophoblast-specific gene expression in vivo. *Development* **124**, 907-914.
- Maas JA, Garnsworthy PC, Flint AP. 2009. Modelling responses to nutritional, endocrine and genetic strategies to increase fertility in the UK dairy herd. *Veterinary Journal* **180**, 356-362.
- Martal J, Lacroix MC, Loudes C, Saunier M Wintenberger-Torres S. 1979. Trophoblastin, an antiluteolytic protein in early pregnancy in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility* **56**, 63-73.
- Nagai K, Sata R, Takahashi H, Okano A, Kawashima C, Miyamoto A, Geshi M. 2009. Production of trophoblastic vesicles derived from Day 7 and 8 blastocysts of in vitro origin and the effect of intrauterine transfer on the interestrous intervals in Japanese black heifers. *Journal of Reproduction and Development* **55**, 454-459.
- Nagaoka K, Sakai A, Nojima H, Suda Y, Yokomizo Y, Imakawa K, Sakai S, Christenson RK. 2003. A chemokine, interferon (IFN)-gamma-inducible protein 10 kDa, is stimulated by IFN-tau and recruits immune cells in the ovine endometrium. *Biology of Reproduction* **68**, 1413-1421.
- Ozawa M, Sakatani M, Yao J, Shanker S, Yu F, Yamashita R, Wakabayashi S, Nakai K, Dobbs KB, Sudano MJ, Farmerie WG, Hansen PJ. 2012. Global gene expression of the inner cell mass and trophectoderm of the bovine blastocyst. *BMC Developmental Biology* **6**, 12-33.
- Pandolfi PP, Roth ME, Karis A, Leonard MW, Dzierzak E, Grosveld FG, Engel JD, Lindenbaum MH. 1995. Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nature Genetics* **11**, 40-44.
- Ray S, Dutta D, Rumi MA, Kent LN, Soares MJ, Paul S. 2009. Context-dependent function of regulatory elements and a switch in chromatin occupancy between GATA3 and GATA2 regulate Gata2 transcription during trophoblast differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 4978-4988.
- Roberts RM, Cross JC, Leaman DW. 1992. Interferons as hormones of pregnancy. *Endocrine Reviews* **13**, 432-452.
- Rossant J, Cross JC. 2001. Placental development : lessons from mouse mutants. *Nature reviews. Genetics* **2**, 538-548.
- Sakurai T, Bai H, Konno T, Ideta A, Aoyagi Y, Godkin JD, Imakawa K. 2010. Function of a transcription factor CDX2 beyond its trophectoderm lineage specification. *Endocrinology* **151**, 5873-5881.
- Sakurai T, Sakamoto A, Muroi Y, Bai H, Nagaoka K, Tamura K, Takahashi T, Hashizume K, Sakatani M, Takahashi M, Godkin JD, Imakawa K. 2009. Induction of endogenous interferon tau gene transcription by CDX2 and high acetylation in bovine nontrophoblast cells. *Biology of Reproduction* **80**, 1223-1231.
- Shimada A, Nakano H, Takahashi T, Imai K, Hashizume K. 2001. Isolation and characterization of a bovine blastocyst-derived trophoblastic cell line, BT-1 : development of a culture system in the absence of feeder cell. *Placenta* **22**, 652-662.
- Spencer TE, Sandra O, Wolf E. 2008. Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants : insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction* **135**, 165-179.
- Strumpf D, Mao1 CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, Rossant J. 2005. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* **132**, 2093-2102.
- Takahashi M, Takahashi H, Hamano S, Watanabe S, Inumaru S, Geshi M, Okuda K, Yokomizo Y, Okano A. 2003. Possible role of interferon-tau on in vitro development of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Development* **49**, 297-305.
- Talbot NC, Caperna TJ, Edwards JL, Garrett W, Wells KD, Ealy AD. 2000. Bovine blastocyst-derived trophectoderm and endoderm cell cultures : interferon tau and transferrin expression as respective in vitro markers. *Biology of Reproduction* **62**, 235-247.
- Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH. 1994. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* **371**, 221-226.
- Xu N, Takahashi Y, Matsuda F, Sakai S, Christenson RK, Imakawa K. 2003. Coactivator CBP in the regulation of conceptus IFN tau gene transcription. *Molecular Reproduction and Development* **65**, 23-29.
- Yamaguchi H, Ikeda Y, Moreno JI, Katsumura M, Miyazawa T, Takahashi E, Imakawa K, Sakai S, Christenson RK. 1999. Identification of a functional transcriptional factor AP1 site in the sheep interferon tau gene that mediates a response to PMA in JEG3 cells. *Biochemical Journal* **340**, 767-773.



## Research and issues for pregnancy improvements during the peri-implantation period in ruminants

Hanako BAI<sup>1,4</sup>, Toshihiro SAKURAI<sup>1</sup>, Hiroshi FUJIWARA<sup>2</sup>, Atsushi IDETA<sup>3</sup>,  
Yoshito AOYAGI<sup>3</sup> and Kazuhiko IMAKAWA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Animal Breeding and Reproduction, Veterinary Medical Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan

<sup>2</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo, Kyoto 606-8507, Japan

<sup>3</sup> Zen-noh ET Center, Kamishihoro, Hokkaido 080-1407, Japan

<sup>4</sup> Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science

**Corresponding : Kazuhiko IMAKAWA (fax : +81 (0) 3-5841-8180, e-mail : akaz@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)**

Even after successful fertilization in the mammalian species, nearly 50% of pregnancies fail, 70~80% of which are lost during the peri-implantation period. It is thought that early embryonic loss results from a lack or shortage of pregnancy recognition. In ruminants, interferon tau (IFNT), an anti-luteolytic substance produced by the embryonic trophectoderm, is a major signal for the maternal recognition of pregnancy. For over 10 years, we have been studying molecular mechanisms associated with *IFNT* gene transcription for its effective regulation, resulting in the identification many regulatory factors. In addition, intrauterine administration of IFNT has been performed for the means to improve pregnancy rate. However, no effective therapy with IFNT is yet known to exist. For these reasons, future research needs to be directed toward the identification of what conditions that allows the conceptus to express IFNT as well as other factors properly in vivo. More importantly, these findings should be placed into the practical use in which the treatment developed actually improves pregnancy rates.

*Nihon Chikusan Gakkaiho 84 (3), 301-308, 2013*

**Key words :** cow, interferon tau (IFNT), pregnancy.