



Title	ウシ胚由来因子インターフェロン α の子宮頸部への移行および生体防御への関与
Author(s)	國井, 宏樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14816号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14816
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88871
Type	doctoral thesis
File Information	Kunii_Hiroki.pdf



ウシ胚由来因子インターフェロン τ の
子宮頸部への移行および生体防御への関与

北海道大学 大学院農学院
生命フロンティアコース 博士後期課程

國井 宏樹

目次

第一章 序論.....	1
第二章 子宮頸部におけるインターフェロン τ 存在の証明とインターフェロン誘導性遺伝子の 発現誘導機構の解析	
緒言.....	6
材料および方法.....	8
結果.....	21
考察.....	30
第三章 子宮内膜および子宮頸部における I 型インターフェロンシグナル調節機構の比較	
緒言.....	32
材料および方法.....	34
結果.....	40
考察.....	57
第四章 インターフェロン τ が子宮頸部で担う役割の検証	
緒言.....	61
材料および方法.....	64
結果.....	72
考察.....	90
第五章 総括.....	95
謝辞.....	101
参考文献.....	102
付表.....	113
付図.....	116

第一章 序論

母体の妊娠認識機構とインターフェロン τ

哺乳類における妊娠とは、着床から胎盤形成、胎子成長、および分娩までの一連の流れを指す。妊娠の成立および継続には、プロゲステロン (P4) が必須である。妊娠初期の P4 は、卵巣にて排卵後に形成される黄体から産生されるため、黄体が退行すると P4 の産生量も低下する。従って、妊娠の成立および維持のために、母体は黄体退行を抑制しなければならない。

ヒトを含む霊長類では、胚から分泌される絨毛性ゴナドトロピン (CG) が直接黄体細胞に発現する黄体化ホルモン (LH)/CG 受容体に作用することで、P4 産生が続く。一方ブタでは、胚から産生されるエストロゲン (E2) が子宮内膜組織からの黄体退行因子プロスタグランジン F2 α の分泌方向を変えることで黄体維持因子として機能する[1]。このように、胚からのシグナルを受けて黄体が維持される一連の過程を妊娠認識と呼び、黄体の維持にはたらきかける物質を妊娠認識物質と呼ぶ。

ウシを含む反芻動物の場合、受精後の発生過程で子宮内に到達した胚は、透明帯脱出後から子宮内膜への接着にかけて、妊娠認識物質としてインターフェロン τ (IFNT) と呼ばれるサイトカインを分泌する[2]。胚からの IFNT は、伸長が始まる授精後 14 日から 18 日にかけて大量に分泌され、着床が完了した授精後 25 日には分泌が抑制される[3]。子宮内に分泌された IFNT は、子宮内膜における E2 受容体 1 (ESR1) およびオキシトシン受容体 (OTR) 発現を抑制し[4,5]、その結果、オキシトシンによる黄体退行因子プロスタグランジン F2 α のパルス状分泌を抑制する[6,7]。このような作用から、IFNT は反芻動物の妊娠成立に必須の因子である。

生体防御因子としての IFNT

インターフェロン (IFN) は、細胞がウイルス感染時に分泌する、抗ウイルス活性を有する生体防御因子であり、結合する受容体の種類に応じて I 型、II 型、および III 型に大別される。着床前胚の IFN 産生は、マウスにおける IFN α (IFNA) [8]、ブタにおける IFN γ (IFNG) [9]、およびウマにおける IFN δ [10]が知られている。しかし、これらの動物における IFN はいずれも黄体の維持には寄与しない。またマウスでは、I 型 IFN 受容体または IFN のシグナル伝達を介在する *Stat1* を欠損しても、繁殖能力に影響はない[11,12]。このことから、胚由来 IFN によるシグナルは、必ずしも全ての動物において妊娠に必須ではないと考えられている。

一方 IFNT は、反芻動物に固有の妊娠認識物質であると同時に、I 型 IFN として抗ウイルス活性も示す[13,14]。組換えヒツジ IFNT は、非腫瘍形成性ヒト表皮角化細胞でのヒトパピローマウイルス (HPV16) 活性を抑制する[13]。また、組換えウシ (rb) IFNT を、牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) に感染したウシ胎子筋肉 (BFM) 細胞に添加した場合、または BVDV 持続感染牛に皮下投与した場合、いずれの場合もそれぞれ BFM 細胞または血漿中における BVDV の力価は抑制されることが報告されている[14]。さらに、IFNT は受容体に結合後 I 型 IFN シグナルを活性化することで多くのインターフェロン誘導性遺伝子 (Interferon stimulated genes: ISGs) の発現を誘導する[15]。

これらのことから、反芻動物の IFNT は他種における胚由来 IFN とは異なり、妊娠認識物質としての機能と生体防御因子としての機能の双方を併せ持つと考えられる。しかし、着床前という時期においてのみ、ウイルスに感染していなくてもウシ胚が IFN を分泌する理由は不明である。さらに、IFNT が生体防御因子として果たす役割については明らかになっていない。

子宮頸部組織の生体防御機構

子宮頸管は、子宮と腔を隔てるように位置し、複数の横走突起が複雑な内腔構造を形成することから、構造的な特徴として外来異物を子宮内に侵入させない防御壁の機能を持つと考えられて

きた[16]。一方で、子宮頸管を含む子宮外生殖器は、他の組織と比較してウイルスが増殖しやすい組織であることが知られている。マウスでは、ジカウイルス (ZIKV) を腹腔内接種した場合継続的な ZIKV の増殖はみられないが[17,18]、腔内に感染させた場合では子宮外生殖器において継続的に ZIKV が増殖する[19]。ウシでも同様に、ウシヘルペスウイルス (BoHV) 4 はウシ子宮頸部粘膜上皮で増殖すること[20]、BoHV1 を筋肉内接種した場合、ウイルス増殖はみとめられないが、腔内接種の場合、投与後 8 から 9 日間にわたり腔内での BoHV1 増殖が継続することが報告されている[21]。また、子宮頸部および腔には、*Prevotella*、*Fusobacterium necrophorum*、*Escherichia coli*、および *Arcanobacterium pyogenes* などの細菌の存在が知られている[16]。これらの細菌は子宮内感染症の原因となることから、腔から子宮頸管を介して子宮内に感染する上行性感染に関与すると考えられる[22–26]。

このようなウイルスおよび細菌の上行性感染を防ぐため、子宮頸管は生理的な防御機構も持つ。マウスでは、発情に際し生殖器特異的に発現増加する IFN ϵ が *Chlamydia muridarum* の上行性感染防御に貢献する[27]。ウシ子宮頸部組織は、発情に際し抗菌タンパク質であるラクトフェリンおよびリゾチームを含む粘液を分泌する[28]。さらに、着床後には、免疫グロブリンを多く含む子宮頸管粘液栓を形成し、子宮内への細菌の侵入を防ぐ防御壁を形成することが、ウシ、ウマ、ヒツジ、サル、およびヒトにおいて知られている[29–33]。以上のように、子宮頸管は子宮内へのウイルスまたは細菌の進入を防ぐ関門として重要な役割を担う組織である。

P4 による母体免疫機能の脆弱性

機能黄体の存在により母体環境が P4 優勢になると、ウイルスおよび細菌に対する抵抗性が低下し、子宮頸部における生体防御機構が破綻する例が報告されている[34–38]。マウスガンマヘルペスウイルス (MHV68) を腹腔内接種した非妊娠および妊娠マウスの子宮頸部組織では、接種後 7 日目において、非妊娠マウスでは MHV68 の増殖がみとめられないが、妊娠マウスでは顕著にみとめられ、性ホルモンを投与した卵巣切除マウスでも同様の結果が再現されている

[34]。ウシでは、*A. pyogenes* および *E. coli* を子宮内投与した場合、血中 P4 濃度が低値の個体では子宮内感染はみられないが、機能黄体の存在により P4 濃度が高値となった個体では、供試牛全頭が子宮感染症を発症し[35]、ヒツジおよびブタでも同様の報告がなされている[36–38]。このような P4 による母体免疫力の低下は、I 型 IFN を含む炎症性サイトカインの発現を上方制御する NF- κ B の活性化を、P4 が抑制することで引き起こされと考えられている[39–41]。さらに、ZIKV を腔内接種した妊娠マウスの場合、母体血中へのウイルスの移行はみとめられず、感染した母体の生存に影響はみられない[19]。一方、着床開始期である胎齢 4.5 日で ZIKV を腔内接種した場合、胎齢 18.5 日での胎子質量は非接種の場合と比較して有意に低下し、このような胎子質量の低下は、着床後である胎齢 8.5 日で接種した場合はみとめられない[19]。このことは、上行性感染が母体よりむしろ胎子にとっての脅威であり、その脅威は特に着床前時期に懸念されることを示している。

これらのことを考慮すると、IFNT による黄体退行の抑制は、妊娠の維持に必須であるが、同時に着床前時期の上行性感染リスクを高めることが懸念される。従って着床前胚は、子宮内で無事に生存し続けるため根本的に必須な黄体の維持と、それゆえにリスクが高まる上行性感染からの防御という相反する要求を両立させる必要がある。先に述べたように、ウシの発情や着床後に関連した子宮頸管による生理的な防御機構はいくつか報告文献があるものの、P4 分泌の増加による免疫機能の脆弱化が懸念されるにも関わらず有効な防御手段が無い着床前における防御機構の存在は明らかになっていない。この時期に分泌される IFNT が生体防御因子として作用するのであれば、上行性感染を抑制し、IFNT は相反する要求を同時に満たすことができる可能性がある。しかし、胚から分泌された IFNT が子宮内感染防御の要である子宮頸部にまで移行する報告は国内外共に過去において無く、生体防御としての役割を果たす知見も存在しない。

免疫細胞による病原体の貪食

外来細菌およびウイルスの侵入を防御する上で、免疫細胞である好中球やマクロファージによる貪食は、病原体を含む外来異物に対して第一線に対抗する生体防御システムである。通常免疫細胞は血中を循環しているが、標的を感知するとその近傍まで遊走し、食作用により標的を取り込み分解する。このような免疫細胞の遊走および貪食は、子宮頸管においても知られており、特に交配後、異物として認識された精子に対してみられることが、ヒト、ウサギ、およびウシにおいて報告されている[42–44]。また、ヒト子宮頸部粘膜に存在する好中球およびマクロファージは、ヒト免疫不全ウイルスの膜タンパク質 gp120 を標識したビーズを貪食する[45]。これらのことから、子宮頸部における生体防御機構を議論する際は、免疫細胞による貪食についても着目する必要がある。しかし、着床前子宮頸部における免疫細胞の貪食能、ならびに IFNT の関与については全く議論されていない。

本研究の目的

以上の背景から本研究では、IFNT は子宮頸部へ移行し、上行性感染に対し生体防御として機能すると仮説を立て、これを立証するために IFNT の免疫学的機能を子宮のみならず子宮外の子宮頸部組織も含めて探索することを目的とした。第一章では、胚から分泌された IFNT が、子宮頸部に作用する機序について検討した。第二章では、IFNT の受容および I 型 IFN シグナルの伝達の観点で子宮頸部について解析し、妊娠認識の場である子宮内膜と比較した。第三章では、着床前子宮頸部での妊娠期特異的な遺伝子発現プロファイルの変化を解析することで、IFNT が子宮頸部で担う役割を検証した。

第二章 子宮頸部におけるインターフェロン τ 存在の証明とインターフェロン誘導性遺伝子の発現

誘導機構の解析

緒言

胚から分泌される IFNT は、妊娠認識物質として黄体の退行を抑制するだけでなく、子宮内膜組織において ISGs の発現を誘導する。子宮内に分泌された IFNT は、子宮内膜組織に存在する膜貫通型受容体である IFN-alpha receptor 1 (IFNAR1) および IFN-alpha receptor 2 (IFNAR2) に受容され、その結果各受容体の細胞内ドメインに相互作用した Tyrosine kinase 2 (TYK2) および Janus kinase 1 (JAK1) がリン酸化される[46]。その後、TYK2 および JAK1 は、リン酸化 Tyrosine 認識ドメインをもつ Signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 および STAT2 をリン酸化する[46]。リン酸化された STAT1 および STAT2 は、Interferon regulatory factor (IRF9) と三量体を形成する[43]。この三量体は、Interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3) と呼ばれる転写因子となり、Interferon stimulated response element (ISRE) 配列に結合することで ISGs 発現を誘導する[47]。この一連のシグナル伝達経路は、JAK-STAT 経路と呼ばれ、I 型 IFN を介した自然免疫応答を担う経路であるだけでなく、ウシ子宮内膜組織においても、IFNT が ISGs 発現を誘導する際の経路として活性化することが知られている[48,49] (付図)。

着床前特異的な ISGs の高発現は、子宮内膜組織に限らず、母体の各組織において報告されている。妊娠 15 日目のヒツジ黄体では、ISG15 の発現が遺伝子およびタンパク質レベルで非妊娠ヒツジと比較して有意に増加する[50]。また、妊娠 18 日目のウシ肝臓では、ISG15 および MX1 の発現が非妊娠ウシと比較して有意に増加することが報告されている[51]。その他、ヒツジ下垂体[52]、視床下部[52]、および骨髄[53]でも、妊娠 16 日目における ISG15 の発現誘導が報告されている。一方で、当研究室ではこれまでに、子宮内膜で報告されているような妊娠期特異的な ISG15、MX1、ならびに MX2 の高発現を子宮頸部および腔底部粘膜組織において見出した

[54]。これらの知見は、IFNT は子宮内膜組織に作用するだけでなく、子宮外組織にも移行することを示唆している。しかし、これまでに子宮外生殖器において IFNT を検出した例は無く、子宮外組織における ISGs 高発現の誘導因子は実験的に決定されていなかった。

以上のことから本章では、着床前胚によって産生された IFNT は子宮内に留まるのみではなく、子宮頸部にまで直接移行し、子宮頸部組織において ISGs 発現を誘導すると仮説を立てた。そこで、子宮頸部における IFNT の存在を証明すること、および I 型 IFN の主要なシグナル伝達経路である JAK-STAT 経路の活性化状態を明らかにすることを目的とした。

材料および方法

2-1. 供試動物およびサンプル採取

全ての動物実験は、「北海道大学における動物実験に関する指針」、「北海道立総合研究機構における動物実験に関する指針」、および「独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構における動物実験に関する指針」に基づいて行った。

2-1-1. 子宮頸部粘膜組織サンプルの採取

供試動物として、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター生物生産研究農場酪農生産研究施設および北海道立総合研究機構（酪農試験場）で飼育されているホルスタイン種搾乳牛を用いた。

人工授精を実施した供試牛において、授精後 14 日目、18 (± 1) 日目、25 (± 1) 日目において、子宮頸部粘膜組織サンプル (Cervical mucosal membrane: CMM) を採取した ($n = 16$)。採取したサンプルは、授精後 30 日目および 60 日目に実施された妊娠鑑定結果に基づいて、妊娠または非妊娠サンプルとした。採材にあたり、供試牛の外陰部を十分希釈したベンザルコニウム塩化物液オスバン®消毒液 10% (Nihon Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) で洗浄した後、アルコール綿で消毒した。次に、腔内を腔鏡により拡張しながら、サンプリング用機材を挿入し、外子宮口から 3 から 5 cm ほど奥の子宮頸管内腔の粘膜組織を目視で採取した (図 1A)。サンプリングツールは、市販のピックアップツールに LED ライトスコープを装備し、アタッチメント部位に、動物医療用の綿棒 P3S-100 (Japan Cotton Buds. Industry Ltd, Tokyo, Japan) を取り付けたものを用いた (図 1B)。採取した CMM サンプルは、スライドガラスに少量塗抹後、綿棒ごと 1.5 mL チューブ内に保管し、実験に使用するまで -80°C で保存した。

2-1-2. 採血

人工授精を実施していないホルスタイン種搾乳牛の頸静脈より採血を行なった。採取した末梢血は EDTA-2Na 真空採血管 (Terumo, Tokyo, Japan) に回収して氷冷し、直ちに実験に供した。

2-2. サンプル付着綿棒からの RNA 抽出

2-1-1 において採取した綿棒付着サンプルに、500 μ L の ISOGEN II (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を添加し、氷上で 5 分間静置した。その後、Econo Spin TM (Ajinomoto, Tokyo, Japan) を用いて、4°C で 12,000g、1 分間遠心し、綿棒に付着した CMM を ISOGEN II に溶解した。以降、ISOGEN II の定法に従って、RNA を抽出、精製した。得られた RNA 溶液の濃度は、NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) を用いて測定した。

2-3. ウシ末梢血白血球 (PBL) の分離

2-1-2 で採取した全血 5 mL に、等量の RBC Lysis Buffer (付表) を添加し、室温で 500g、20 分間遠心した。上清を除去し、同様の操作を 2 回繰り返した。その後、沈殿を L-グルタミン、フェノールレッド含有 RPMI-1640 (Wako, Tokyo, Japan) 500 μ L で懸濁し、室温で 15,000g、5 分間遠心した。上清を除去し、再度 RPMI-1640 で懸濁した後、細胞懸濁液の一部を 0.5%トリパンブルー染色液 (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) で染色し、血球計算板を用いて 1 mL あたりの細胞数をカウントした。その後、PBL の細胞数を 2×10^6 個/mL に調整し、48 ウェルプレート BioLite 48 well (Thermo Fisher Scientific) に、1 ウェルあたり 1×10^5 個となるよう播種した。

2-4. PBL と CMM 希釈液の共培養実験

2-1-1 において採取した、人工授精実施後 18 日目の妊娠または非妊娠ウシ由来 CMM に、200 μ L の PBS (-) (付表) を添加し、Econo Spin TM (Ajinomoto) を用いて、4°C で 12,000g、1 分

間遠心し、CMM 希釈液を作製した。得られた CMM 希釈液の濃度を、NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、280 nm における吸光度により測定した。次に、測定したタンパク質濃度に基づき、総タンパク質量が 1 ウェルあたり 20 μ g となるよう、2-3 で分注した PBL 懸濁液に添加し、やさしくピペッティングにより混和した。この際、陽性対照として、1,000 IU/mL の rbIFNT 添加区を、陰性対照として、白血球のみ、または CMM 希釈液のみを培養する区をそれぞれ設けた。その後、48 ウェルプレートで 38.5°C、5% CO₂ 濃度にて、6 時間インキュベートした。IFNT の感作濃度および感作時間は、PBL において十分に *ISG15* 発現が誘導されることが報告されている過去の知見[55]に従った。

2-5. PBL からの RNA 抽出

2-4 の培養後、48 ウェルプレートの内容物をそれぞれ 1.5 mL チューブに回収し、4°C で 15,000g、5 分間遠心し、上清を除去した。その後、ISOGEN II を 500 μ L 添加し、ISOGEN II (Nippon Gene) の定法に従って、Total RNA の抽出および精製を行った。

2-6. cDNA 合成および定量 PCR

2-2 および 2-5 で得られた RNA 溶液について、ゲノム DNA の除去および逆転写反応を、ReverTra Ase[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて、推奨プロトコルに従い行った。この際、反応チューブの加温または冷却の処理は、ASTEC Program Temp Control System PC-815 (Astec, Fukuoka, Japan) を用いた。その後、得られた cDNA 溶液を滅菌水で 5 倍希釈し、使用時まで -20°C で保存した。

次に、得られた cDNA を鋳型として、定量 PCR を行った。本章でターゲットとした遺伝子のプライマー配列は、表 1 に示す。PCR 反応系は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を 5 μ L、10 μ M の Forward プライマーおよび Reverse プライマーを 各 0.5 μ L、滅菌水を 2 μ L、

cDNA 希釈液を 2 μ L の総量 10 μ L とした。定量 PCR 反応は、LightCycler[®]96 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) により、以下の条件で行った。初期変性として 95°C で 30 秒を 1 サイクル、続いて 95°C で 10 秒、55°C で 15 秒、72°C で 30 秒を 45 サイクル、最後に、60°C で 20 秒、95°C で 20 秒をそれぞれ 1 サイクル行った。ターゲット遺伝子発現量は、*H2AFZ* を内部標準遺伝子とし、 $\Delta\Delta C_t$ 法により定量した[56]。

2-7. 抗 IFNT、抗 IFNA、抗 ISG15 抗体、および抗 IFNAR2 抗体の作製

株式会社フロンティア研究所 (<https://www.frontier-institute.com>) およびユーロフィンジェノミクス (<https://eurofinsgenomics.jp>) に依頼し、抗 IFNT、抗 IFNA、抗 IFNAR2、および抗 ISG15 ウサギポリクローナル抗体を作製した。それぞれの抗原認識部位は、表 2 に示す。納品された抗血清を、Spin column based Antibody Purification Kit (COSUMO BIO Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、推奨プロトコルに従って精製し、以降のウェスタンブロッティングおよび免疫染色に用いた。

2-8. ウェスタンブロッティングによるタンパク質発現解析

2-8-1. サンプル調製

2-1-1 で得た綿棒付着サンプルは、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai tesque) を 100 倍希釈した 200 μ L の PBS (–) に浸漬し、氷上で 5 分間静置した。その後、Econo Spin[™] (Ajinomoto) を用いて、4°C で 12,000g、1 分間遠心した。

ウェスタンブロッティングは、総タンパク質量を基準としたターゲットタンパク質の定量を行うため、電気泳動に向けた SDS 処理と同時に、総タンパク質の蛍光ラベリングを行った。サンプル調製には、EzLabel Fluoro Neo (ATTO, Tokyo, Japan) を用いた。最初に、付属のラベリング試薬 5

μL を 100 μL の 5 × サンプルバッファーに添加し、よく混合しマスターミックスとした。次に、調製したサンプル 20 μL と作製したマスターミックス 5 μL をよく混合し、95°C、3 分間インキュベートした。その後、付属のジチオスレイトール 1 μL を添加し、再度 95°C、3 分間インキュベートし、電気泳動まで遮光して静置した。以上の処理は、それぞれ 1 μg の rbIFNA (Novartis, Basel, Switzerland) および rbIFNT についても同様に行った。

2-8-2. SDS-PAGE

泳動装置 WSE 1150 Page Run Ace (ATTO) に、ポリアクリルアミドゲル e-PAGEL (ATTO) を装着し、泳動バッファー (付表) で装置内を満たした。その後、2-8-1 で調製したサンプルを 20 μL ずつアプライし、24 W で 30 分間泳動した。泳動終了後のゲルは、WUV-M20 (ATTO) を用いて紫外線で励起し、総タンパク質の蛍光を撮影した。

2-8-3. 転写

転写は、iBrot[®] Dry Blotting System (Thermo Fisher Scientific) および iBrot[®] Gel Transfer Stacks PVDF, Mini (Thermo Fisher Scientific) により、設定時間 4 分 50 秒にて行った。

2-8-4. ブロッキング

メンブレンのブロッキングは、PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal[®] (TOYOBO) を Milli-Q 水で 5 倍希釈し、室温で 30 分間振盪することによって行った。その後、TBST (付表) により、5 分間の振盪洗浄を 3 回行った。

2-8-5. 抗原抗体反応

各ターゲットタンパク質の一次抗体を、TBST または Can Get Signal[®] Immunoreaction Enhancer Solution 1 (TOYOBO) で希釈し、抗体希釈液を作製した。その後、メンブレンと抗体希釈液を室温で一晩反応させた。次に、TBST による 5 分間 3 回の洗浄を行った後、二次抗体希釈液として

Amersham ECL Anti-Rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody (from Donkey) (GE Healthcare UK Ltd., Amersham Place, England)、または Amersham ECL Anti-Mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody (from Sheep) (GE Healthcare UK Ltd.) を、TBST または Can Get Signal[®] Immunoreaction Enhancer Solution 2 (TOYOBO) で 25,000 倍に希釈し、この抗体希釈液とメンブレンを室温で 1 時間振盪した。その後、TBST により、10 分間の振盪洗浄を 3 回行った。各ターゲットタンパク質の、一次抗体情報の詳細は、表 3 にまとめた。

2-8-6. 化学発光とメンブレンの撮影

洗浄後のメンブレンをプラスチックラップに載せ、Immuno Star[®] LD (Wako) または EzWestLumi plus (ATTO) のワーキング溶液を 800 μ L 添加し、1 分間反応させた。その後、余分な反応液を除去し、LumiCube (Liponics, Inc., Tokyo, Japan) にて撮影した。

2-8-7. 画像処理

Lumicube で撮影したメンブレン画像は、JusTLC (Sweday, Lund, Sweden) を用いてバンドのシグナル強度を数値化した。同様に、2-8-2 で撮影した総タンパク質画像についても、レーンごとにシグナル強度の数値化を行った。定量は、まず総タンパク質画像の最左端のレーンのシグナル強度を 1 とした時の、各レーンの相対的なシグナル強度を求め、リファレンスバンド比とした。次に、この数値を用いて、各サンプルにおけるタンパク質の相対発現量を以下のように計算した。

タンパク質相対発現量 = (レーン i のバンドのシグナル強度) / (レーン i のリファレンスバンド比)

2-9. 免疫染色法によるタンパク質局在解析

2-9-1. 塗抹標本の作製

2-1-1 において採取した人工授精後 18 日目の妊娠および非妊娠ウシ由来 CMM サンプルを、スライドガラス CRE-14 BLUE20 (MATSUNAMI, Osaka, Japan) に薄く塗抹した。次に、サンプル塗抹部分に 4%PFA 溶液 (付表) を添加し、室温で 20 分間静置することで固定した。その後、PBS (-) による 5 分間の洗浄を 3 回行った。

2-9-2. 透過処理

固定済みの塗抹標本に、0.2%PBST (付表) を添加し、10 分間静置することで、透過処理を行った。その後、PBS (-) による 5 分間の洗浄を 3 回行った。

2-9-3. ブロッキング

透過処理後、塗抹標本に 1%BSA 溶液 (付表) を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。その後、PBS (-) による 5 分間の洗浄を 3 回行った。

2-9-4. 抗原抗体反応

一次抗体を、PBS (-) または Can Get Signal[®] immunostain Immunoreaction Enhancer Solution A (TOYOBO) で希釈し、抗体希釈液を作製した。共免疫染色の場合、2 種の一次抗体を同時に希釈した。その後、抗体希釈液を処置した塗抹標本を室温で一晩インキュベートした。この際、陰性対照として、PBS (-) のみを添加した区も設けた。次に、PBS (-) による 5 分間の洗浄を 3 回行った後、二次抗体希釈液として Alexa Fluor[™]568 donkey anti-rabbit IgG (H + L) (Thermo Fisher Scientific)、および Alexa Fluor[™]488 goat anti-mouse IgG (H + L) (Thermo Fisher Scientific) を、Can Get Signal[®] immunostain Immunoreaction Enhancer Solution B (TOYOBO) で 200 倍に希釈し、この抗体希釈液で塗抹標本を室温で 1 時間、遮光条件の下インキュベートした。ただし、共免疫染色の場合、両二次抗体を同時に添加した。その後、PBS (-) による 5 分間の洗浄を 3 回行った。本実験で用いた標的タンパク質の一次抗体情報の詳細は、表 4 にまとめた。

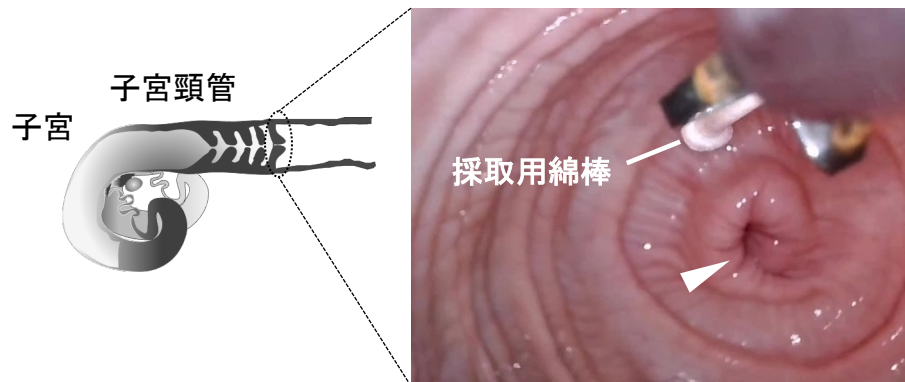
2-9-5. 蛍光顕微鏡による観察

抗原抗体反応後の塗抹標本に、Fluoro-KEEPER Antifade Reagent, Non-Hardening Type with DAPI (Nacalai tesque) を添加し、カバーガラスを被せ、封入および核染色を行った。その後、蛍光顕微鏡 (Leica, Wetzlar, Germany) を用いて、ターゲットタンパク質の蛍光シグナルを観察した。

2-10. 統計解析

全ての統計解析は、統計解析ソフト R (version 4.1.1) を用いて行った。二群間の有意差検定は、等分散を仮定しない t -検定により行い、 $p < 0.05$ の場合に有意差が、 $p < 0.1$ の場合に傾向があるとした。また、二群以上の群を同時に検定する場合は、等分散を仮定しない t -検定を実施し、Benjamini-Hochberg 法により False discovery rate を調整した。

A



B

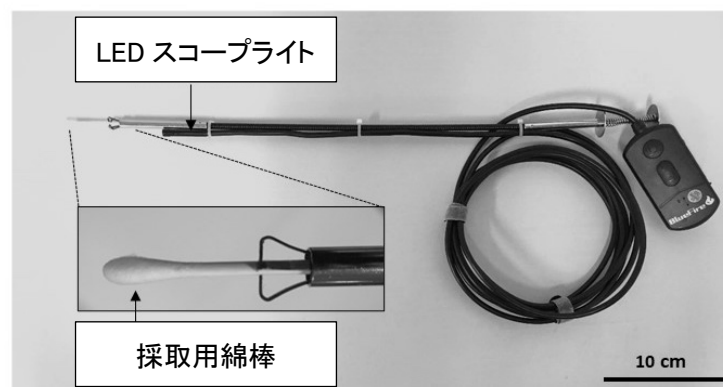


図 1. CMM 採取用機材と採取部位

A: CMM 採取箇所の詳細。採取用綿棒を矢じりで示した外子宮口内に 3 から 5 cm 挿入することで CMM を採取した。

B: サンプルングに使用した機材。

表 1. プライマー配列情報

Gene symbol		Sequence (5'-3')	Accession No.	Product length (bp)
<i>ISG15</i>	F	TGAGGGACTCCATGACGGTA	NM_174366.1	72
	R	GCTGGAAAGCAGGCACATTG		
<i>IRF9</i>	F	CAGTTCCCAGGAGTGTGCTG	NM_001024506.1	125
	R	TATATCGCCCAGGCCTTGAA		
<i>STAT1</i>	F	ACTACTCCAGGCCAAAGGAAG	NM_001077900.1	123
	R	CATGCCACTCTTCTGTGTTCA		
<i>STAT2</i>	F	GGATGTTTCGACAGCACTTGG	NM_001205689.1	90
	R	AGCATATTAGCCATGGCAGC		
<i>H2AFZ</i>	F	AGAGCCGGTTTGCAGTTCCCG	NM_174809.2	116
	R	TACTCCAGGATGGCTGCGCTGT		

F: Forward, R: Reverse

表 2. 作製抗体の抗原認識部位

Protein symbol	Accession No.	Sequence (N-C)
IFNT	NP_001015511.3	GPVMGEKDSD
IFNA	NP_001017411.1	TQEEGLRGAPLLKE
ISG15	NP_776791.1	FEGRPMDDEHPLEE
IFNAR2	NP_776978.1	LFRPRRESESESA

表 3. ウェスタンブロッティングに用いた抗体および希釈条件

標的タンパク質	抗体情報	一次抗体 希釈倍率
IFNT	作製抗体 (表 2)	1,000 倍
IFNA	作製抗体 (表 2)	1,000 倍
ISG15	作製抗体 (表 2)	500 倍
リン酸化 STAT1	Phospho-Stat1 (Ser727) (D3B7) Rabbit mAb, (Cell Signaling Technology, MA, USA)	2,000 倍
ACTB	Beta Actin Polyclonal ANTIBODY, 20536-1- AP, (Proteintech, Illinois, USA)	5,000 倍

表 4. 免疫染色に用いた一次抗体および希釈条件

標的タンパク質	抗体情報	一次抗体 希釈倍率
IFNT	作製抗体 (表 2)	200 倍
KRT8	Anti-Keratin 8, Mouse-Mono (C-43), (Exbio Praha a.s., Vestec, Czech Republic)	200 倍

結果

2-1. 抗 IFNT および IFNA 抗体の特異性の評価

作製した抗 IFNT 抗体、抗 IFNA 抗体の検出特異性を評価するため、rbIFNT および rbIFNA に対するウェスタンブロッティングを行った。抗 IFNT 抗体は、rbIFNA を検出せず、rbIFNT のみ検出した (図 2A)。一方で、抗 IFNA 抗体は、rbIFNT を検出せず、rbIFNA のみ検出した。このことから、作製した抗 IFNT 抗体および抗 IFNA 抗体は、それぞれ IFNT および IFNA を特異的に検出できることを確認した。また、人工授精後 18 日目に採取した非妊娠および妊娠ウシ由来の濃縮子宮灌流液に対して、抗 IFNT 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行ったところ、妊娠ウシ由来サンプルにおいてのみ 25 kDa 付近に IFNT のバンドを検出した (図 2B)。

2-2. CMM における IFNT の直接検出

特異性を確認した抗 IFNT 抗体を用いて、ウェスタンブロッティングにより CMM における IFNT の検出を行った。非妊娠ウシ由来 CMM において IFNT のバンドは検出されなかった一方、妊娠ウシ由来 CMM においては、25 kDa 付近に目的のバンドが検出された (図 3A)。また、妊娠 14 日、18 日、および 25 日に採取した CMM サンプルを用いて、IFNT の継時的な動態を解析したところ、妊娠 14 日および 25 日においては IFNT のバンドは検出されず、妊娠 18 日においてのみシグナルが検出された (図 3B)。

2-3. CMM における IFNT および KRT8 の局在解析

IFNT と上皮細胞マーカーである KRT8 の局在を共免疫染色により解析した。人工授精後 18 日目に採取した CMM 塗抹標本では、妊娠の成否にかかわらず、全ての細胞が KRT8 陽性であった (図 4)。共免疫染色の結果、IFNT のシグナルは、非妊娠ウシ由来の CMM サンプルでは

みとめられなかったのに対し、妊娠ウシ由来の CMM サンプルでは、顕著に検出された。また、妊娠ウシ CMM における IFNT のシグナルは、KRT8 のシグナルとの共局在がみとめられた (図 4)。

2-4. CMM における I 型 IFN 活性の評価

CMM が I 型 IFN 活性を持つかどうかを評価するため、CMM 希釈液を添加して培養したウシ PBL における *ISG15* 誘導能を解析した。まず、ウシ PBL において、IFNT 刺激により *ISG15* 発現が誘導されることを確認した (図 5A)。次に、PBL に対し非妊娠または妊娠ウシ由来 CMM を添加して培養したところ、妊娠ウシ由来 CMM 希釈液を添加した場合、非妊娠ウシ由来 CMM 希釈液を添加した場合の PBL と比較して有意に高い *ISG15* 発現がみとめられた (図 5B)。これに対して、CMM 希釈液のみからは、*ISG15* 発現は検出されなかった。

2-5. CMM における I 型 IFN シグナル活性化動態の解析

I 型 IFN シグナル関連因子である *STAT1*、*STAT2*、*IRF9*、および代表的な ISGs である *ISG15* の遺伝子発現動態を、人工授精後 14 日目、18 日目、および 25 日目に採取した妊娠または非妊娠ウシ由来 CMM サンプルにおいて定量 PCR により解析した。妊娠ウシでは、*STAT1*、*STAT2*、および *IRF9* の発現は、人工授精後 14 日目および 25 日目と比較して 18 日目において有意に高かった ($p < 0.05$)。同様に、*ISG15* 発現は高い傾向がみとめられた (図 6)。また 18 日目において、*STAT1*、*IRF9*、および *ISG15* は非妊娠ウシ由来 CMM と比較して、妊娠ウシにおいて有意に高い発現がみとめられた ($p < 0.05$) (図 6)。次に、タンパク質レベルで I 型 IFN シグナルの活性化状態を明らかにするため、リン酸化 *STAT1* および *ISG15* のタンパク質発現をウェスタンブロッティングにより解析した。リン酸化 *STAT1* および *ISG15* タンパク質は、非妊娠ウシ由来 CMM サンプルと比較して、妊娠ウシ由来 CMM サンプルにおいて、顕著に高い発現がみとめられた

(図 7A)。また、妊娠ウシ CMM における継時的なタンパク質発現動態は、リン酸化 STAT1 および ISG15 いずれでも、妊娠 14 日目にはシグナルが検出されず、妊娠 18 日目で顕著なバンドがみとめられた。リン酸化 STAT1 は、妊娠 25 日目でもバンドがみとめられた (図 7B)。

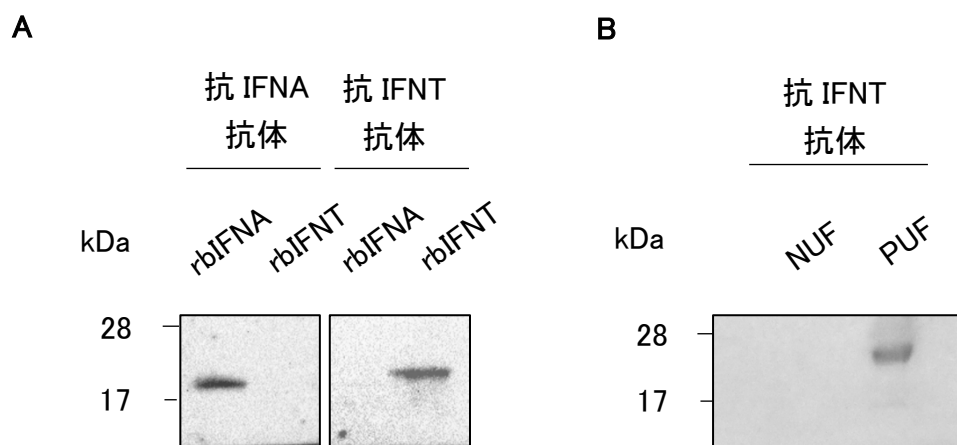


図 2. 抗 IFNT および IFNA 抗体の特異性評価

A: rbIFNT および IFNA を、作製した抗 IFNT および IFNA 抗体により検出した。

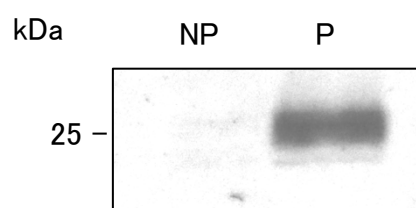
B: 妊娠および非妊娠 18 日に採取した子宮灌流液をサンプルとし、作製した抗 IFNT 抗体を用いて検出した。

NUF: 非妊娠ウシ子宮灌流液

PUF: 妊娠ウシ子宮灌流液

A

IFNT



B

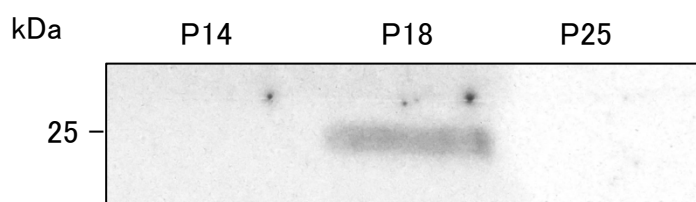


図 3. 作製した抗 IFNT 抗体による CMM における IFNT の検出

A: 人工授精後 18 日目に採取した非妊娠および妊娠ウシ CMM における IFNT の検出 (各 $n = 3$)。

B: 人工授精後 14, 18, 25 日目に採取した妊娠ウシ CMM における IFNT の検出 (各 $n = 3$)

NP: 非妊娠ウシ, P: 妊娠ウシ

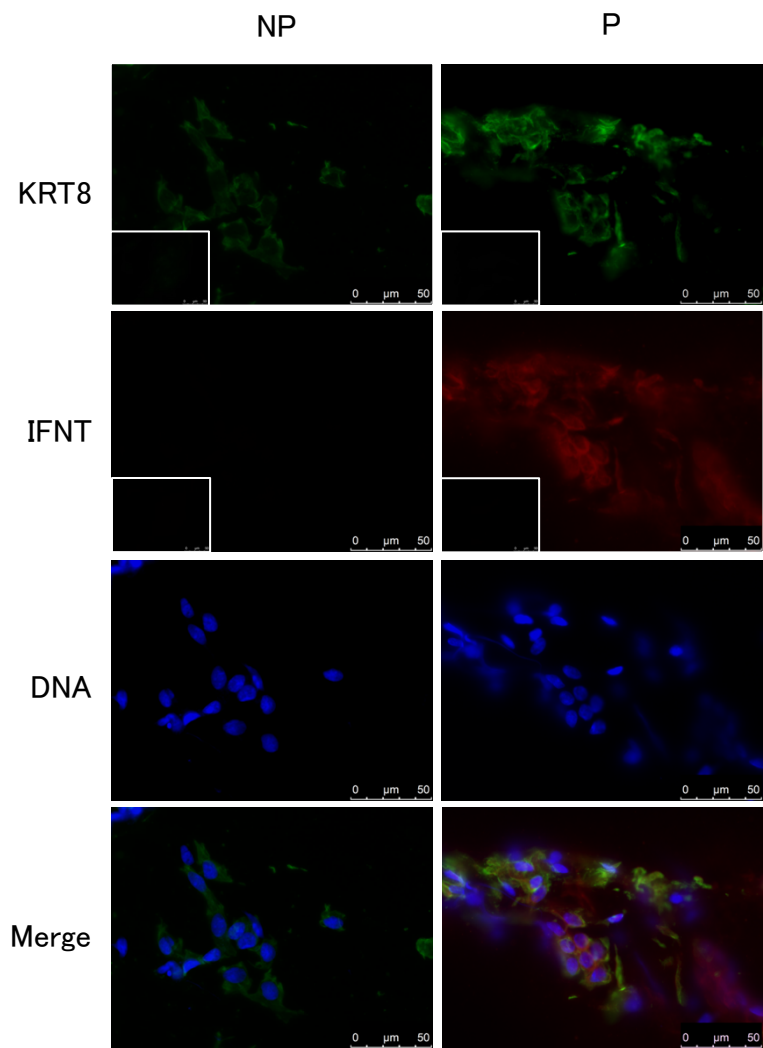


図 4. 非妊娠および妊娠 18 日目 CMM 塗抹標本における IFNT と KRT8 の局在

KRT8 および IFNT 画像内の左下部は、ネガティブコントロールの画像を示す。

NP: 非妊娠ウシ, P: 妊娠ウシ

スケールバー: 50 μm

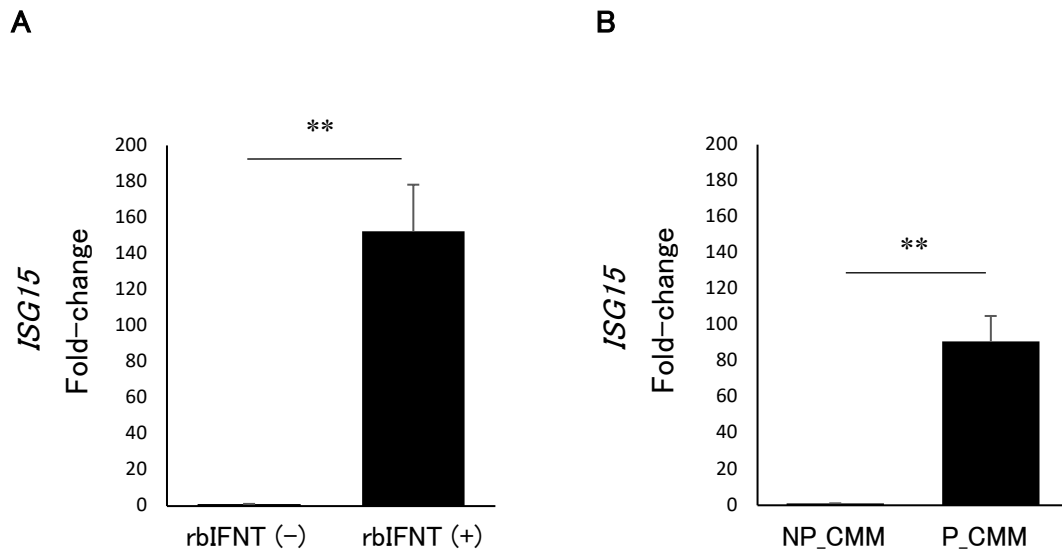


図 5. 組換えウシ IFNT、妊娠、非妊娠ウシ CMM で処理した PBL における *ISG15* 発現誘導

A: 組換えウシ IFNT 無添加区 PBL における *ISG15* 発現量を 1 とした場合の、添加区 PBL における *ISG15* 相対発現量の平均値を表す (各 $n = 3$)。

B: 非妊娠ウシ由来 CMM 希釈液添加区 PBL における *ISG15* 発現量を 1 とした場合の、添加区 PBL における *ISG15* 相対発現量の平均値を表す (各 $n = 3$)。

rbIFNT: 組換えウシ IFNT

NP_CMM: 人工授精後 18 日目に採取した非妊娠ウシ CMM 希釈液を添加培養した PBL

P_CMM: 人工授精後 18 日目に採取した妊娠ウシ CMM 希釈液を添加培養した PBL

エラーバー: 標準誤差

** $p < 0.01$

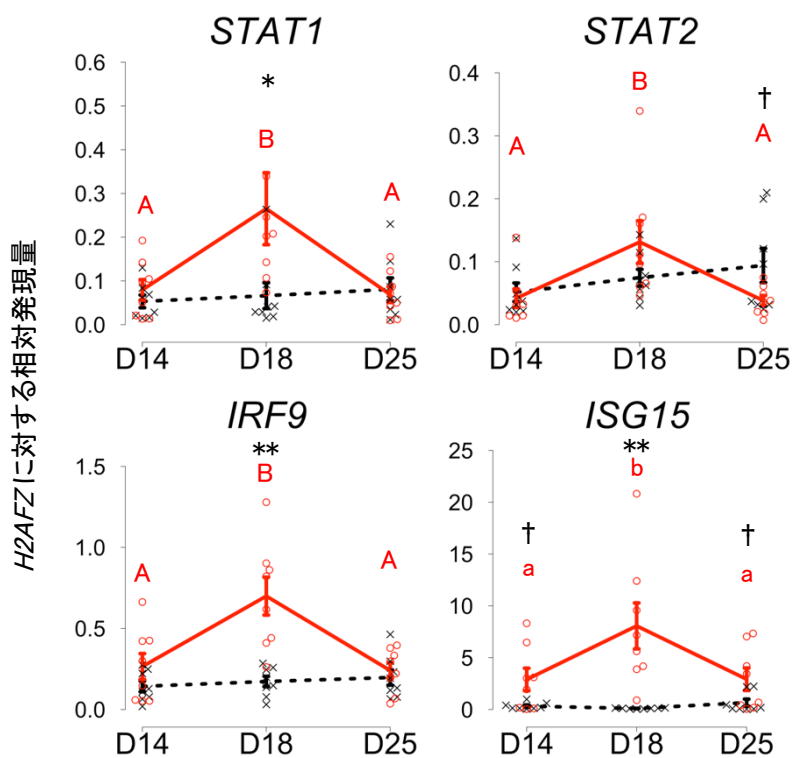


図 6. 妊娠および非妊娠ウシ CMM における I 型 IFN シグナル関連因子の遺伝子発現動態

D14、D18、および D25 は、それぞれ人工授精後の日数を表す。プロットは各個体における遺伝子発現量を示し、赤 (○) が妊娠 (n = 8)、黒 (×) が非妊娠 (n = 8) を表す。

エラーバー: 標準誤差

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: 非妊娠および妊娠間に有意差あり。

† $p < 0.1$: 非妊娠および妊娠間に傾向あり。

A, B: 妊娠個体における D14、D18、および D25 間に有意差あり。

a, b: 妊娠個体における D14、D18、および D25 間に傾向あり。

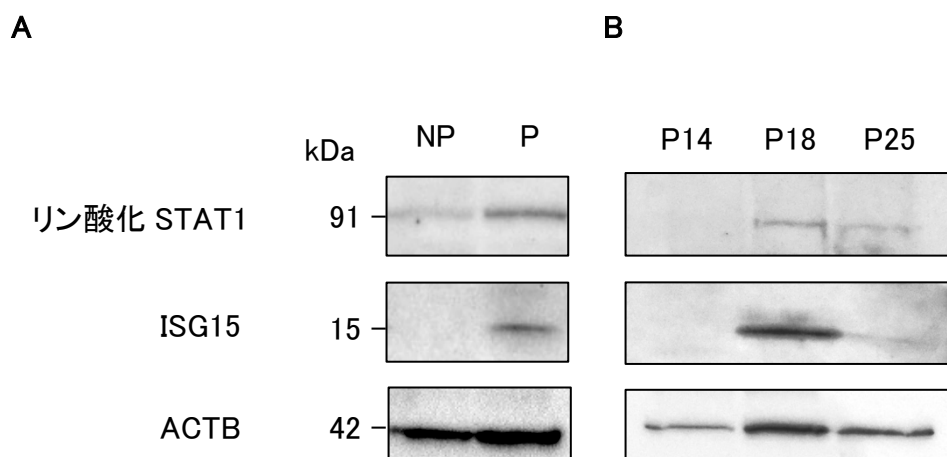


図 7. 妊娠および非妊娠ウシ CMM における I 型 IFN シグナル活性化状態の解析

A: 人工授精後 18 日目に採取した非妊娠および妊娠ウシ CMM におけるリン酸化 STAT1、ISG15 タンパク質の検出 (各 n = 3)。

B: 人工授精後 14、18、および 25 日目に採取した妊娠ウシ CMM におけるリン酸化 STAT1、ISG15 タンパク質の検出 (各 n = 3)。

NP: 非妊娠ウシ

P: 妊娠ウシ

考察

本章では、これまで子宮内でのみ存在が確認されていた IFNT が、着床前特異的に子宮頸部にも存在することを初めて明らかにした。また、CMM における JAK-STAT 経路の活性化状態および ISG15 の発現動態について解析し、子宮頸部組織における着床前 ISGs 高発現は、子宮頸部に存在する IFNT による I 型 IFN シグナルによって誘導されていることを明らかにした。

ウシ IFNA と IFNT のアミノ酸配列の相同性はおよそ 50%であり[57]、ウシ IFNT の質量は 22-24 kDa であることが報告されている[58]。本研究で作製した抗 IFNT 抗体は、非妊娠ウシ由来の子宮灌流液ではバンドを検出せず、妊娠ウシ由来子宮灌流液でのみ 25 kDa 付近に検出した (図 2B) ことから、得られたバンドは IFNT として妥当である。一方で、本研究で作製した抗 IFNT 抗体は、21 kDa 付近の rbIFNT を検出したが、rbIFNA を検出しなかった (図 2A)。ウシ IFNT では、アスパラギン 78 における N-結合型糖鎖修飾が報告されており[59]、糖鎖修飾がない場合 22 kDa 付近にバンドが検出される[58]。また、組換え体は生体での糖鎖修飾を受けない。以上から、作製した抗 IFNT 抗体は、ウシ IFNT を特異的に検出可能であると考えられる。

本研究では、特異抗体を用いた検出系および CMM 希釈液と PBL の共培養実験から、着床前子宮頸部には、I 型 IFN 活性を有する IFNT が、妊娠 18 日付近にもっとも多く存在することが示された。また、子宮頸部に存在する IFNT は、上皮細胞マーカーである KRT8 と共局在していたことから、子宮頸部へ移行した IFNT は、子宮頸部上皮細胞に発現する IFNAR1 および IFNAR2 に結合した状態であると考えられる。さらに、IFNAR1 および IFNAR2 の下流である JAK-STAT 経路関連因子および ISG15 の遺伝子およびタンパク質レベルでの継時的な発現動態は、いずれも妊娠 18 日目をピークとしていた。一方で、ウシ胚における IFNT タンパク質発現は、人工授精後 14 日目ごろから顕著に増加し、着床直前期である人工授精後 17-19 日目でピークに達し、着床後である人工授精後 25 日目には顕著に低下する[3,60]。本結果より、CMM における IFNT の存在量の変動、および JAK-STAT 経路の活性化状態は、胚による IFNT の分泌動

態と継時的な挙動が一致していた。このことから、胚から分泌された IFNT は、直ちに子宮頸部へ移行し、直接子宮頸部組織にも作用を及ぼすことが考えられる。

以上の結果から、胚由来因子 IFNT は、子宮内に作用するだけでなく、子宮外組織である子宮頸部にも移行し、子宮頸部組織において JAK-STAT 経路を介して ISGs 発現を誘導することが示された。このことは、IFNT の免疫学的役割を議論する際には、これまでのように子宮内のみに焦点を当てるだけでは十分でなく、解析範囲を子宮頸部組織にまで拡張して議論する必要があることを強く示唆している。

第三章 子宮内膜および子宮頸部における I 型インターフェロンシグナル調節機構の比較

緒言

第二章では、胚から分泌された IFNT は、子宮内だけでなく子宮頸部にまで移行していることが示された。次に、IFNT の子宮頸部への移行と存在の意義を検討するため、子宮頸部組織における IFNT への反応程度を解析する必要がある。しかし、ウシ子宮頸部組織における IFNT に対する感受性および応答性に関する研究報告は皆無であることから、すでに研究知見のある子宮内膜組織と比較しながら評価する必要がある。

IFNT が下流のシグナルを伝達するためには、その受容体である IFNAR1 および IFNAR2 (IFNARs) との結合が必要である。ヒツジ子宮では、IFNARs の mRNA とタンパク質が、妊娠または非妊娠いずれにおいても子宮内膜の内腔上皮 (LE)、腺上皮 (GE) に強く発現することが知られている[61]。当研究室の過去の研究でも、非妊娠ウシ子宮内膜において、IFNARs は発情周期を通して LE および GE で発現し、黄体期後期にかけて減衰していくことを報告した[62]。これらのことから、IFNARs の発現動態は、子宮内膜と子宮頸部という組織の違い、および妊娠の成否という要因によってダイナミックに変化する可能性が考えられる。しかし、ウシ子宮頸部における IFNARs の発現動態について、詳細な知見は皆無である。

I 型 IFN シグナルの伝達は、種々の負の制御因子によって適切に調節されている。Suppressor of cytokine signaling (SOCS) タンパク質は、I 型 IFN シグナルの負の制御因子として知られており、*SOCS1* を欠損したマウス胚性線維芽細胞では、I 型 IFN に反応して STAT1 のリン酸化と ISGs 発現が延長される[63]。また、IRF2 は、ISGF 結合サイトである ISRE に競合的に作用することにより、I 型 IFN シグナルを下方制御することが知られている[64]。このように、種々の因子が I 型 IFN シグナル伝達の各フェーズにおいてシグナル伝達を下方制御するよう機能するが、反芻動物においては、ウシ[65]およびヒツジ[66]子宮内膜において、*SOCS1*、*SOCS2*、および *SOCS3*

が妊娠および IFNT により誘導されることが報告されているのみである。従って、子宮内膜および子宮頸部組織における IFNT に対する応答性について、制御因子の介在も考慮しながら比較する必要がある。

以上のことから本章では、子宮頸部組織の IFNT 受容性および応答性を、子宮内膜組織と比較しながら評価することを目的とし、妊娠ウシ由来子宮内膜および子宮頸部組織における IFNT 存在量と I 型 IFN シグナルの活性化状態、および IFNARs 発現動態を比較解析した。また、IFNT 感作を行った子宮内膜および子宮頸部組織または上皮細胞を用いて、両組織の IFNT 応答性の差異を詳細に検討した。

材料および方法

3-1. 供試動物およびサンプル採取

3-1-1. 非妊娠ウシ子宮内膜および子宮頸部組織の採取

株式会社北海道畜産公社道央事業所早来工場早来食肉流通センターおよびニチロ畜産株式会社名寄工場より、非妊娠ウシ由来の雌性生殖器を購入し、子宮小丘間内膜および子宮頸部組織を採取した（各 $n = 5$ ）。この際、3-1-2 で採取した人工授精後 20 日目の組織に対応させるため、卵巣における黄体所見を観察し[67]、黄体期後期と判定した雌性生殖器のみを採材対象とした。

3-1-2. 妊娠ウシ子宮内膜および子宮頸部粘膜組織の採取

供試動物として、農研機構畜産研究部門で飼養されている黒毛和種雌牛を用いた（ $n = 3$ ）。これらの実験牛に人工授精を実施後、20 日目に屠殺し、雌性生殖器を摘出した。その後、子宮角を切開し、伸長胚が確認された個体を実験に供した。サンプルは、子宮内膜および子宮頸部組織の上皮部分を綿棒で塗擦して採取した。いずれのサンプルも、直ちに液体窒素内に保管し、その後 -80°C で保存した。

3-2. 子宮内膜組織および子宮頸部組織片の培養

3-1-1 により採取したウシ雌性生殖器のうち、子宮内膜および子宮頸部組織に炎症がみられないものを実験に供した。卵巣所見および発情粘液の有無から発情ステージを判定し、黄体期後期のウシ雌性生殖器から子宮小丘間内膜組織および子宮頸部組織を採取した。採取した組織片は 3 mm 四方に細切し、4 ウェルディッシュに 2 片ずつ置き、5%FBS 含有の D-MEM (High Glucose)

with L-Glutamine, Phenol Red and Sodium Pyruvate (Wako, Osaka, Japan) (附表) を 500 μ L 添加し、38.5 °C、5%CO₂ 条件下で 1 時間前培養した。

3-3. 子宮内膜組織および子宮頸部組織からの初代上皮細胞の培養

3-2 と同様に組織片を採取し、内腔面（上皮側）を下に 60 mm ディッシュ に接触させて 20 分間静置した。組織片のディッシュへの接着を確認した後、5%FBS 含有 D-MEM を 2 mL 添加し、38.5 °C、5%CO₂ 条件下で培養した。以降、2 日に 1 回培地交換を行い、組織片周辺における細胞の遊走が確認できた後、組織片を除去した。この後も同様の条件で培養を続け、細胞が 80%コンフルエントまで増殖したところで継代した。

3-4. 培養細胞の継代

細胞を培養しているディッシュから培地を除去し、PBS (-)で洗浄後、TripLE™ Express (Thermo Scientific) を培地の半量添加し、38.5°C、5%CO₂ 条件下で、15 分間静置した。その後、直ちに TripLE と等量の 5%FBS 含有 DMEM を添加し、やさしく懸濁後、1.5 mL チューブに回収し、室温で 1,000g、3 分間遠心した。上清を除去した後、1 mL の 5%FBS 含有 DMEM を添加し、上皮細胞の懸濁液を得た。その後、懸濁液の一部をトリパンブルー溶液 (Nacalai tesque) で染色し、血球計算板を用いて 1 mL あたりの細胞数をカウントした。カウント数に応じ、細胞数が 1×10^5 個/mL となるよう 5%FBS 含有 DMEM を添加しやさしく懸濁した後、60 mm ディッシュに 2 mL 分注し、38.5°C、5%CO₂ 条件下で培養した。以上の操作を繰り返し、継代 5 回以内の上皮細胞を実験に供した。

3-5. rbIFNT 感作実験

3-2 で前培養した子宮内膜組織および子宮頸部組織片の培地を除去し、新たに無添加 DMEM を添加し、rbIFNT を無添加、または 1,000 IU/mL の濃度で添加した実験区を設けた。また、3-4 で継代した子宮内膜および子宮頸部組織由来上皮細胞は、4 well ディッシュに播種した後、38.5°C、5%CO₂ 条件下で培養した。細胞が 80%コンフルエントまで増殖したところで、培地を除去し、PBS (-) で洗浄した。新たに 500 μ L の無添加 DMEM を添加し、rbIFNT を無添加、100、500、および 1,000 IU/mL の濃度で添加した実験区を設けた。その後、組織および上皮細胞いずれも 38.5°C、5%CO₂ 条件で、過去の知見[68]から IFN が十分に作用し、ISGs を誘導する時間として 12 時間培養した。

3-6. 培養組織および細胞からの RNA 抽出

培養組織は、3-2 で回収した組織片をバイオマッシャー III (Nippi, Tokyo, Japan) を用いて破碎した。得られた破碎液を試料とし、ISOGEN II の定法に従い RNA を抽出・精製した。また、培養細胞は、培地を除去後 PBS (-) で洗浄後、ISOGEN II を添加し、RNA 抽出を行った。

3-7. cDNA 合成および定量 PCR

2-6 と同様の方法で行った。本実験で使用したプライマーは、表 5 に示す。

3-8. ウェスタンブロッティング

2-8 と同様の方法で行った。本実験で使用した一次抗体情報は、表 6 に示す。

3-9. 統計解析

二群間の有意差検定は、等分散を仮定しない t -検定により行い、 $p < 0.05$ の場合に有意差が、 $p < 0.1$ の場合に傾向があると判断した。IFNT 添加濃度ごとの遺伝子発現誘導実験では、Dunnett 法により IFNT 無添加区と各添加区との間で多重比較を行い、 $p < 0.05$ の場合に有意差が、 $p < 0.1$ の場合に傾向があると判断した。さらに、IFNT 添加濃度および遺伝子発現量をそれぞれ説明変数と目的変数とした単回帰モデルを作成後、回帰係数 = 0 を帰無仮説とした t -検定を行い、 $p < 0.05$ の場合に遺伝子発現の変化が濃度依存的であると判断した。また、組織の違いおよび妊娠の成否が IFNARs 遺伝子発現に与える影響は、二元配置分散分析により解析した。二変数間の相関分析は、正規性が仮定できないため Spearman の順位相関係数を算出し、無相関検定により、 $p < 0.05$ の場合に有意な相関があると判断した。

表 5. プライマー配列情報

Gene symbol		Sequence (5'-3')	Accession No.	Product length (bp)
<i>ISG15</i>	F	TGAGGGACTCCATGACGGTA	NM_174366.1	72
	R	GCTGGAAAGCAGGCACATTG		
<i>IFNAR1</i>	F	GCGAAGAGTTTCCGCAACAG	NM_174552.2	275
	R	TCCAAGGCAGGTCCAATGAC		
<i>IFNAR2</i>	F	TCGTATGTTGCGCCTGTTCT	NM_174553.2	231
	R	GTCCGTCGTGTTTACCCACA		
<i>IFIT1</i>	F	CCCCCTCTTCTGCTTTCCTG	XM_015460598	160
	R	TGCACAGCACGTTCCAAATG		
<i>MX1</i>	F	GCCAACTAGTCAGCACTACATTGTC	NM_173940.2	139
	R	GCTCTTGGACTIONCATATCTTCAC		
<i>IRF2</i>	F	GGAGCGTTGAAGGCAAACAG	NM_001205793.1	150
	R	AGGAGCTGTTGTAAGGCACC		
<i>ESR1</i>	F	TTGCTGACCAACCTTGCAGA	XM_014476936	118
	R	GCCAGGCACATTCCAAAAGG		
<i>SOCS1</i>	F	CTCGTACCTCCTACCTCTTCATGTT	XM_002697964.5	92
	R	ACAGCAGAAAAATAAAGCCAGAGA		
<i>SOCS2</i>	F	TGCAAGGATAAGCGGACAGG	NM_177523.2	101
	R	AGATGCTGCAGAGGTGGTGCT		
<i>SOCS3</i>	F	GCCACTCTCCAACATCTCTGT	NM_174466.2	97
	R	TCCAGGAACTCCCGAATGG		
<i>H2AFZ</i>	F	AGAGCCGGTTTGCAGTTCCCG	NM_174809.2	116
	R	TACTCCAGGATGGCTGCGCTGT		

F: Forward, R: Reverse

表 6. ウェスタンブロッティングに用いた抗体および希釈条件

標的タンパク質	抗体情報	一次抗体 希釈倍率
IFNT	作製抗体(表 2)	1,000 倍
リン酸化 STAT1	Phospho-Stat1 (Ser727) (D3B7) Rabbit mAb, (Cell Signaling Technology, MA, USA)	2,000 倍
ISG15	作製抗体(表 2)	500 倍
IFNAR1	IFN α / β R α (H-11): sc-7391, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)	1,000 倍
IFNAR2	作製抗体 (表 2)	1,000 倍
ACTB	Beta Actin Polyclonal ANTIBODY, 20536-1-AP, (Proteintech, Illinois, USA)	5,000 倍

結果

3-1. 妊娠ウシ子宮内膜および子宮頸部組織における IFNT 存在量、リン酸化 STAT1 発現量の比較

ウェスタンブロッティングにより、子宮内膜組織および子宮頸部組織に存在する IFNT の存在量を比較した。人工授精後 20 日の妊娠ウシ子宮内膜組織および子宮頸部組織には IFNT が存在しており、その存在量は、子宮頸部組織と比較して、子宮内膜組織でより顕著であった (図 8)。一方で、I 型 IFN シグナルの活性化状態と相関のあるリン酸化 STAT1 は、いずれの組織においても同程度発現しており、妊娠ウシ子宮内膜および子宮頸部組織との間で有意な差はみとめられなかった (図 9)。

3-2. 子宮内膜および子宮頸部上皮細胞における IFNT 感作濃度ごとの *ISG15* 発現解析

IFNT を 0 (コントロール区)、100、500、および 1,000 IU/mL の濃度で、12 時間感作した子宮内膜上皮細胞および子宮頸部上皮細胞において、*ISG15* 発現を解析した。子宮内膜上皮細胞 (図 10A) および子宮頸部上皮細胞 (図 10B) いずれにおいても、*ISG15* 発現は IFNT 添加濃度依存的な増加がみとめられた (子宮内膜上皮細胞: $p < 0.01$, 子宮頸部上皮細胞: $p < 0.001$)。

3-3. 子宮内膜および子宮頸部組織における IFNARs 発現の比較

子宮頸部における IFNARs 発現を、子宮内膜組織と比較検証した。妊娠 20 日目における遺伝子発現は、*IFNAR1* では、子宮内膜組織と子宮頸部組織の間に有意な差はみとめられなかったが、*IFNAR2* は、子宮内膜組織と比較して、子宮頸部組織において有意に高かった ($p < 0.05$) (図 11A)。また、ウェスタンブロッティングの結果、IFNAR1 および IFNAR2 いずれにおいても、子宮内膜組織と比較して子宮頸部組織においてより明確なバンドが検出された (図 11B)。次に、

IFNARs の遺伝子発現を黄体期後期の非妊娠ウシ由来子宮内膜および子宮頸部組織も含めて解析した。二元配置分散分析の結果、*IFNAR1* は組織の違い、妊娠の成否、および交互作用に有意な差はみとめられなかった (図 12A) が、*IFNAR2* は、組織の違いに有意差 ($p < 0.05$)、妊娠の成否に傾向 ($p < 0.1$) がみとめられ、交互作用には有意差がみとめられなかった (図 12B)。

3-4. IFNT による子宮内膜および子宮頸部上皮細胞の *ISG15* 相対発現量の比較

3-2 で解析した、IFNT 添加濃度ごとの子宮内膜上皮細胞および子宮頸部上皮細胞における *ISG15* 発現データから、各組織におけるコントロール区に対する *ISG15* の相対発現量を算出し、100、500、1,000 IU/mL の IFNT 添加濃度それぞれにおいて比較したところ、全ての IFNT 添加濃度区において、子宮内膜上皮細胞と比較して、子宮頸部上皮細胞で有意に高かった ($p < 0.05$) (図 13)。

3-5. IFNT 感作子宮内膜および子宮頸部組織における ISGs 相対発現量の比較

1,000 IU/mL、12 時間で IFNT 感作を行った子宮内膜および子宮頸部組織において、代表的な ISGs である *ISG15*、*IFIT1*、および *MX1* 発現量を定量し、3-4 と同様に相対発現量を算出したところ、*ISG15*、*IFIT1*、および *MX1* いずれにおいても、子宮内膜組織と比較して、子宮頸部組織における発現変化量が有意に大きかった ($p < 0.05$) (図 14)。

3-6. 子宮内膜および子宮頸部上皮細胞における IFNT 感作濃度ごとの *IRF2* および *ESR1* 発現解析

IFNT に発現誘導された *IRF2* は、*ESR1* の発現を抑制することで、黄体退行の抑制に貢献する。このような母体の妊娠認識に関与する経路について組織間で比較するため、IFNT を 0 (コントロール区)、100、500、および 1,000 IU/mL の濃度で、12 時間感作した子宮内膜上皮細胞および子宮頸部上皮細胞において、*IRF2* および *ESR1* 発現を解析した。*IRF2* 発現は、子宮内膜上皮細胞 (図 15A) および子宮頸部上皮細胞 (図 15B) のいずれでも、IFNT 添加濃度依存的な増加がみとめられた (子宮内膜上皮細胞: $p < 0.001$, 子宮頸部上皮細胞: $p < 0.05$)。子宮内膜上皮細胞では、コントロール区と比較して 1,000 IU/mL の IFNT 添加区で、*IRF2* 発現量が増加する傾向がみとめられた ($p < 0.1$)。また、子宮頸部上皮細胞では、コントロール区と 500 IU/mL または 1,000 IU/mL の IFNT 添加区との間で、有意差がみとめられた ($p < 0.01$)。一方で、*ESR1* 発現は、両組織上皮細胞いずれでも、IFNT 感作による濃度依存的な発現変化はみとめられなかった (図 16)。次に、IFNT 濃度を変化させた場合の *IRF2* と *ESR1* 発現量の関連性を両細胞間で比較解析するために、各サンプルにおける両遺伝子のコントロールに対する発現量を二次元平面にプロットし、相関関係を解析した。子宮内膜上皮細胞においては、*IRF2* と *ESR1* 発現の間に、負の相関がみとめられた (図 17A)。一方で、子宮頸部上皮細胞では、両遺伝子の発現量に相関はみられなかった (図 17B)。

3-7. 妊娠および非妊娠ウシ CMM における SOCS ファミリーの発現解析

妊娠および非妊娠ウシ子宮内膜および子宮頸部組織において、I 型 IFN シグナルの制御因子である *SOCS1*、*SOCS2*、および *SOCS3* の遺伝子発現量を定量比較した。いずれも非妊娠ウシおよび妊娠ウシの間に有意な発現量の差はみとめられなかった (図 18)。

3-8. 妊娠ウシ子宮内膜および子宮頸部組織における SOCS ファミリーの発現解析

妊娠 20 日目のウシ子宮内膜および子宮頸部組織における *SOCS1*、*SOCS2*、および *SOCS3* の遺伝子発現は、いずれの個体も子宮内膜組織と比較して、子宮頸部組織において発現量は低い値を示した (図 19)。

3-9. 子宮頸部上皮細胞における IFNT 添加濃度ごとの SOCS ファミリーの発現解析

子宮頸部上皮細胞における IFNT に対する *SOCS1*、*SOCS2*、および *SOCS3* 発現の応答性を解析するため、0 (コントロール区)、100、500、1,000 IU/mL の濃度の IFNT で 12 時間感作し、それぞれの遺伝子の発現を解析した。*SOCS1* は、コントロール区と比較して 1,000 IU/mL の IFNT 感作区において、有意に発現が増加し ($p < 0.05$)、その変化は濃度依存的であった ($p < 0.01$) (図 20)。一方で、*SOCS2* および *SOCS3* については、いずれも IFNT 感作による濃度依存的な発現変化はみとめられなかった (図 20)。

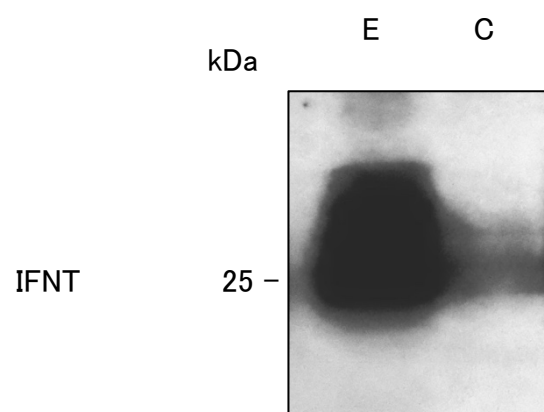


図 8. 着床前ウシ子宮内膜および子宮頸部における IFNT の存在量の比較

妊娠 20 日目子宮内膜および子宮頸部から採取した粘膜組織における IFNT の検出 (n = 3)。

E: 子宮内膜

C: 子宮頸部

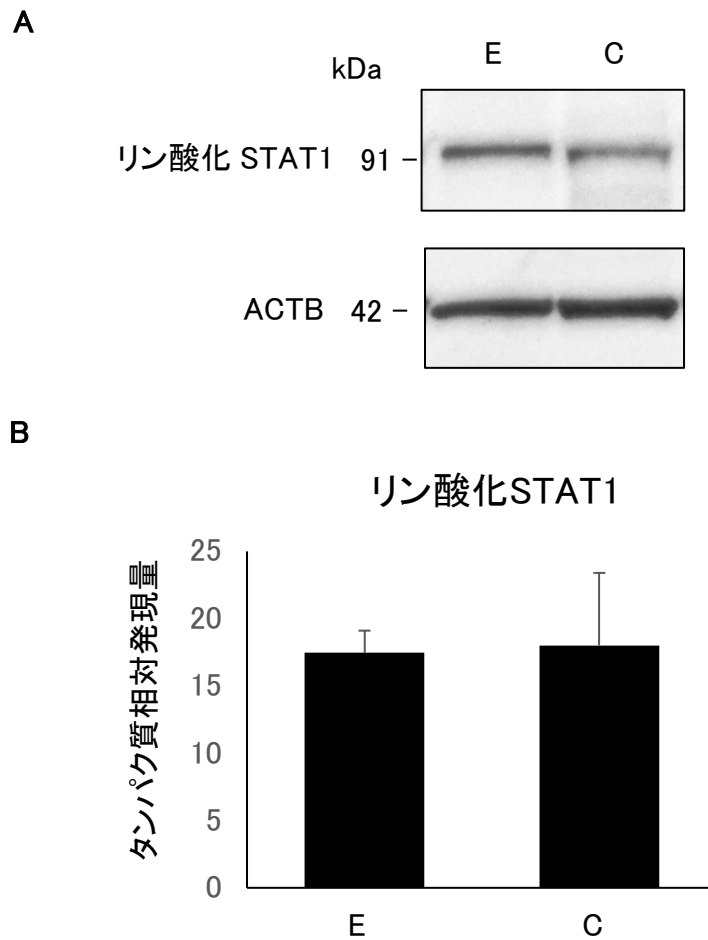


図 9. 着床前ウシ子宮内膜および子宮頸部における I 型 IFN シグナル活性化状態の比較

A: 妊娠 20 日目子宮内膜および子宮頸部から採取した粘膜組織におけるリン酸化 STAT1 発現 (n = 3)。

B: 総タンパク質量により補正した子宮内膜および子宮頸部におけるリン酸化 STAT1 発現量の平均値を表す。

E: 子宮内膜組織

C: 子宮頸部組織

エラーバー: 標準誤差

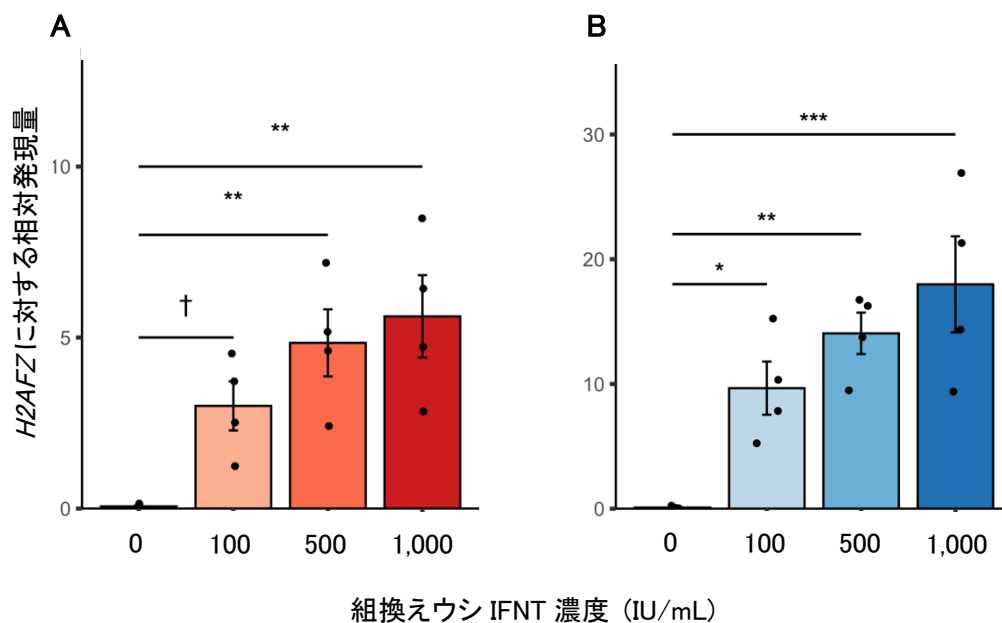


図 10. 子宮内膜および子宮頸部上皮細胞における IFNT 感作濃度ごとの *ISG15* 発現

A: 子宮内膜上皮細胞における *ISG15* 発現誘導 (各 n = 4)。

B: 子宮頸部上皮細胞における *ISG15* 発現誘導 (各 n = 4)。

プロットは、各サンプルにおける *ISG15* の *H2AFZ* に対する相対発現量を示す。

棒グラフは左から、組換えウシ IFNT 0、100、500、および 1,000 IU/mL の濃度で細胞を感作した場合の *ISG15* 発現量の平均値を表す。

エラーバー: 標準誤差

† $p < 0.1$, * $p < 0.05$

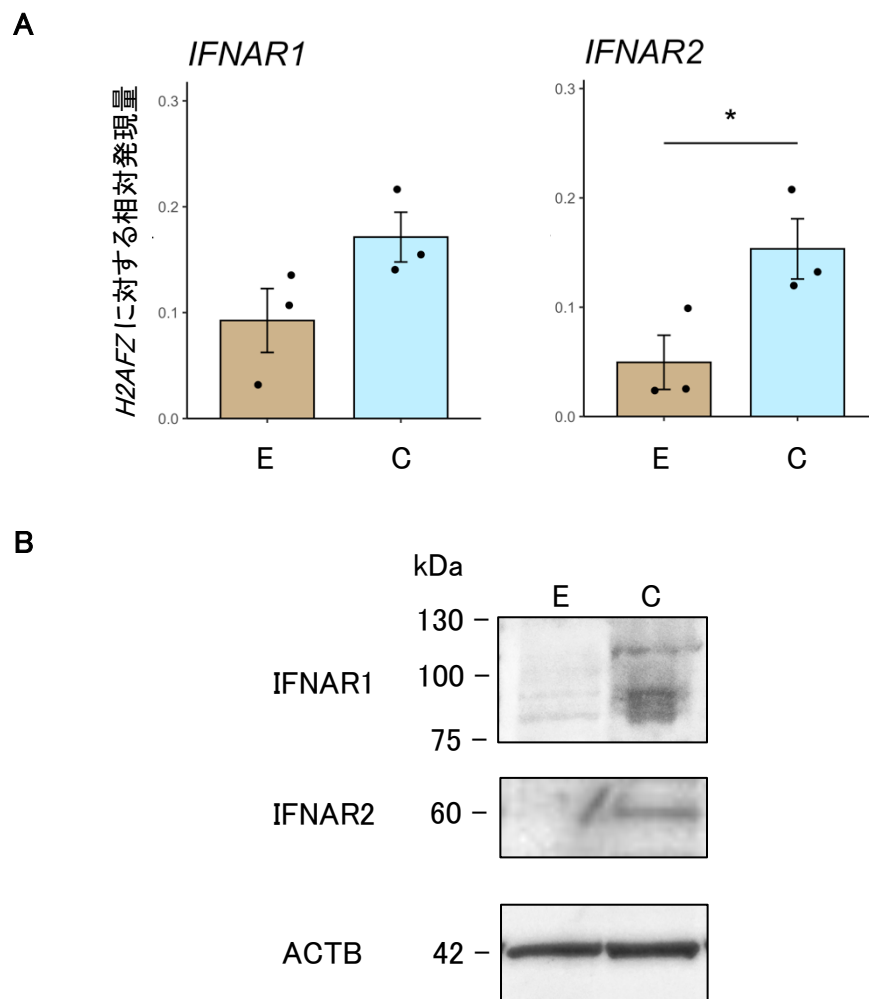


図 11. 着床前ウシ子宮内膜および子宮頸部組織における IFNT 受容体発現レベルの比較

妊娠 20 日目子宮内膜および子宮頸部から採取した粘膜組織における *IFNAR1* および *IFNAR2* 遺伝子発現 (A) およびタンパク質発現 (B) (各 n = 3)。

E: 子宮内膜組織

C: 子宮頸部組織

エラーバー: 標準誤差

* $p < 0.05$

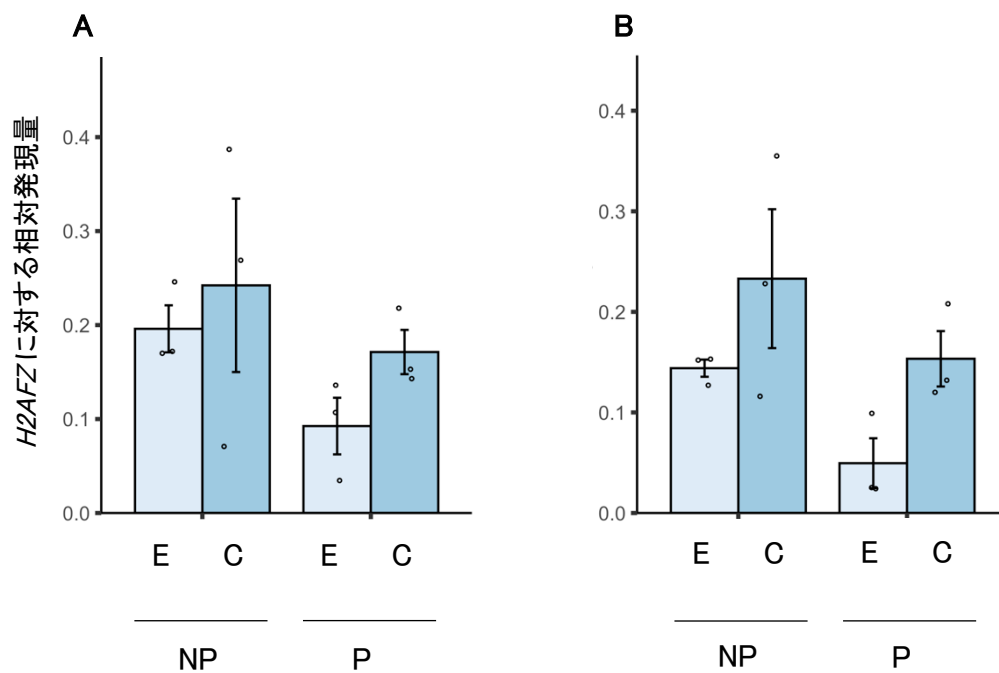


図 12. 妊娠の成否および組織の違いが *IFNAR1* および *IFNAR2* 発現に及ぼす影響

非妊娠ウシ黄体期後期、または妊娠 20 日目ウシから採取した子宮内膜および子宮頸部組織における *IFNAR1* (A) および *IFNAR2* (B) 発現 (各 $n = 3$)。

NP: 非妊娠

P: 妊娠

E: 子宮内膜組織

C: 子宮頸部組織

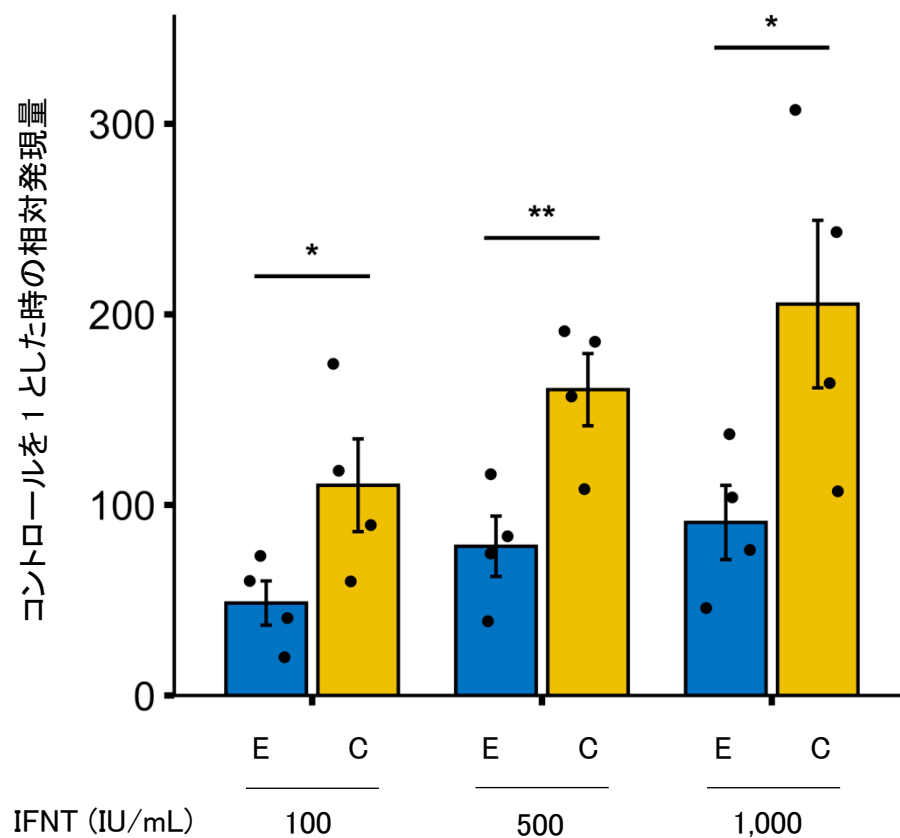


図 13. IFNT による子宮内膜および子宮頸部上皮細胞の *ISG15* 相対発現量の比較

プロットは、各細胞のコントロール区における *ISG15* 発現量を 1 とした場合の、各 IFNT 添加濃度における *ISG15* の相対発現量を示し、棒グラフはその平均値を表す (各 $n = 4$)。

E: 子宮内膜上皮細胞

C: 子宮頸部上皮細胞

エラーバー: 標準誤差

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

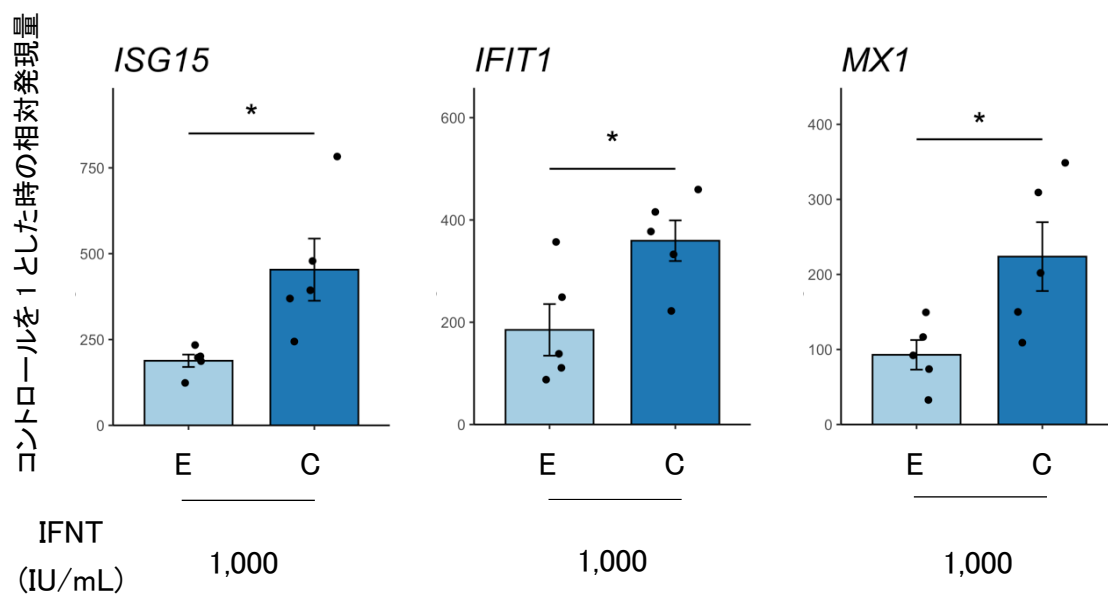


図 14. IFNT による子宮内膜および子宮頸部組織における ISGs 誘導能の比較

プロットは、各組織コントロール区における *ISG15*、*IFIT1*、および *MX1* 発現量を 1 とした場合の、IFNT 添加区における各遺伝子の相対発現量を示し、棒グラフはその平均値を表す (各 $n = 5$)。エラーバー: 標準誤差

* $p < 0.05$

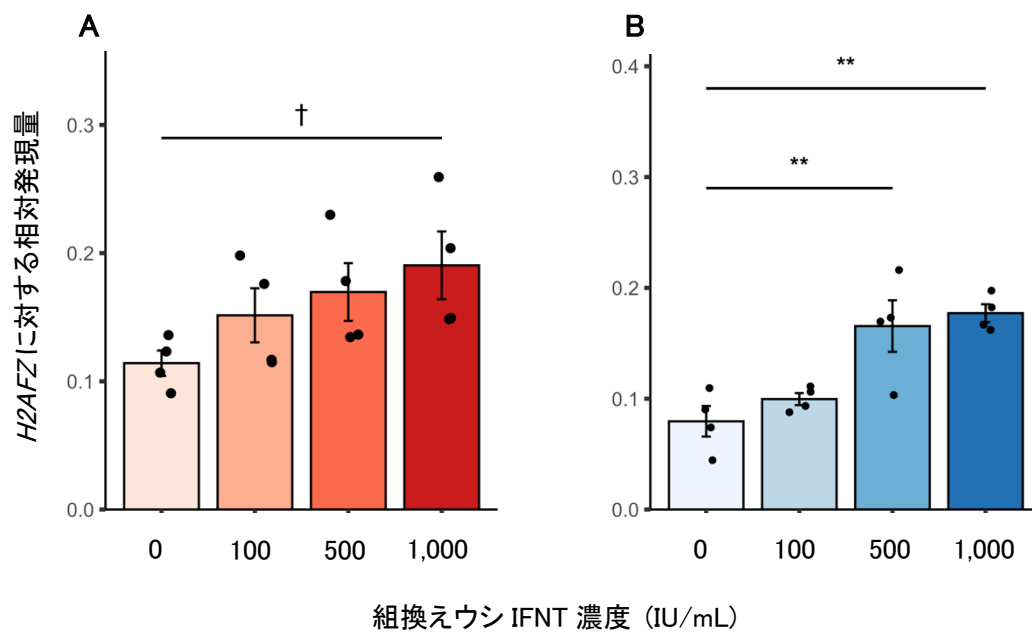


図 15. 子宮内膜および子宮頸部上皮細胞における IFNT 感作濃度ごとの *IRF2* 発現

A: 子宮内膜上皮細胞における *IRF2* 発現誘導 (n = 4)。

B: 子宮頸部上皮細胞における *IRF2* 発現誘導 (n = 4)。

プロットは、各サンプルにおける *IRF2* の *H2AFZ* に対する相対発現量を示す。棒グラフは左から、ウシ組換え IFNT 0、100、500、および 1,000 IU/mL の濃度で細胞を感作した場合の *IRF2* 発現量の平均値を表す。

エラーバー: 標準誤差

† $p < 0.1$, ** $p < 0.01$

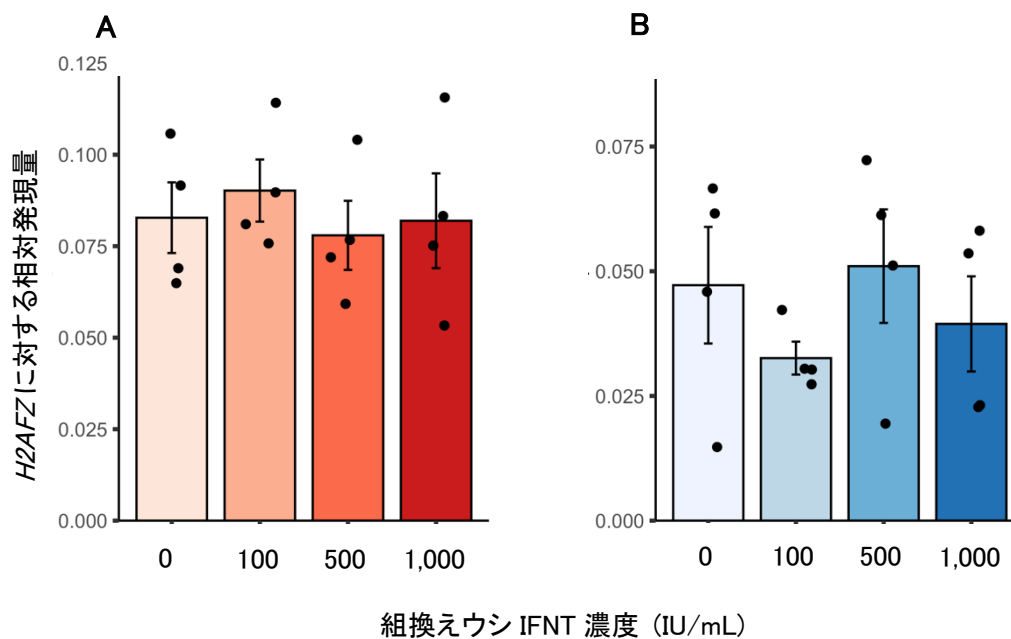


図 16. 子宮内膜および子宮頸部上皮細胞における IFNT 感作濃度ごとの *ESR1* 発現

A: 子宮内膜上皮細胞における *ESR1* 発現誘導 (n = 4)。

B: 子宮頸部上皮細胞における *ESR1* 発現誘導 (n = 4)。

プロットは、各サンプルにおける *ESR1* の *H2AFZ* に対する相対発現量を示す。棒グラフは左から、ウシ組換え IFNT 0、100、500 および 1,000 IU/mL の濃度で細胞を感作した場合の *ESR1* 発現量の平均値を表す。

エラーバー: 標準誤差

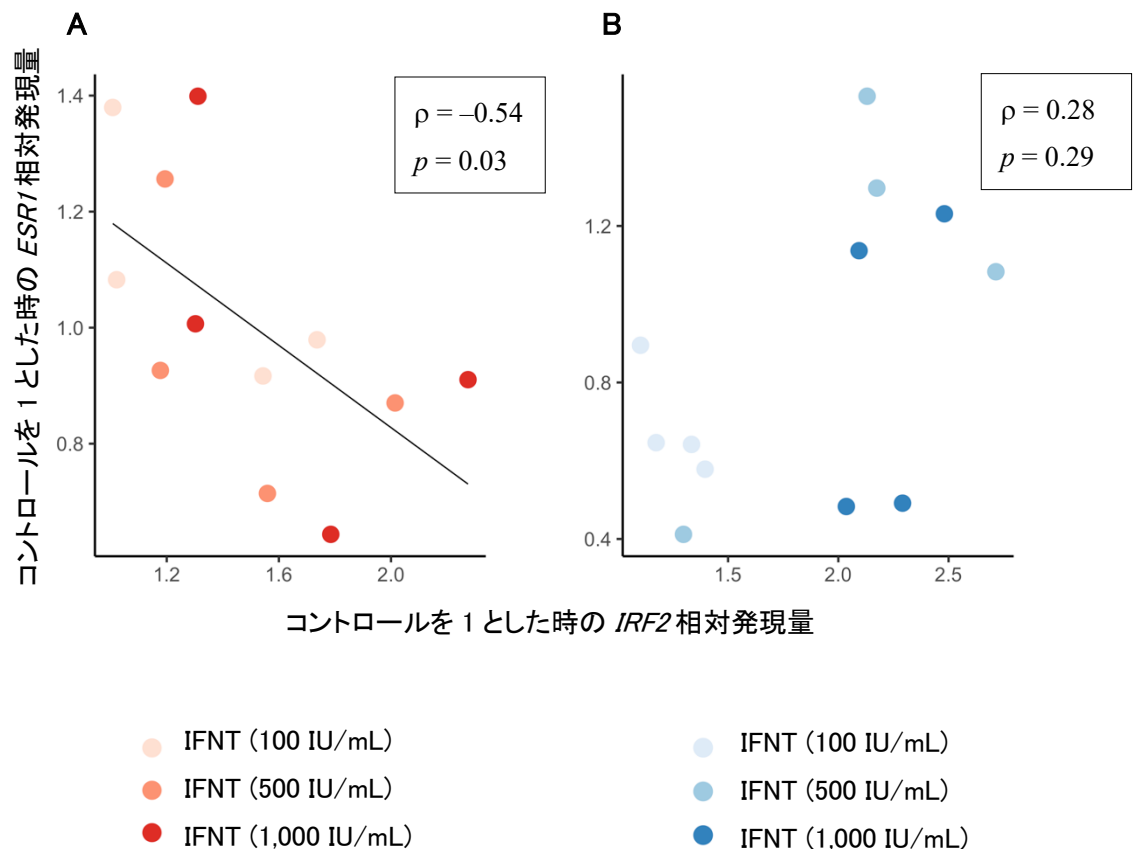


図 17. IFNT による子宮内膜および子宮頸部上皮細胞における *IRF2* および *ESR1* 発現の相関

プロットは、子宮内膜上皮細胞 (A) または、子宮頸部上皮細胞 (B) における各サンプルの *IRF2* および *ESR1* 発現量を表す。グラフ内の直線は、回帰直線を表す。

ρ : スピアマンの順位相関係数

p : 有意確率

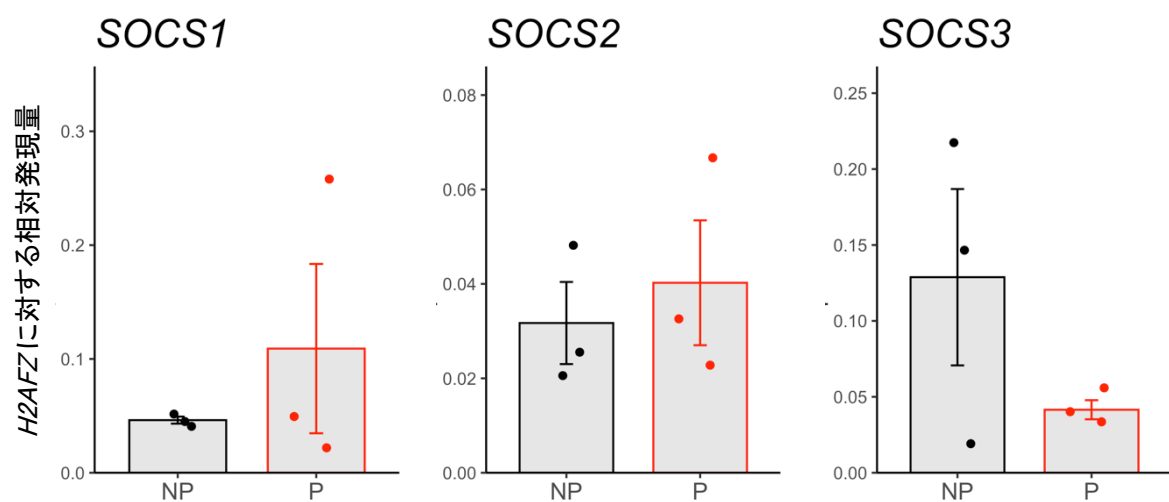


図 18. 人工授精後 18 日目に採取した妊娠および非妊娠ウシ CMM における

SOCS ファミリー遺伝子発現

プロットは、各サンプルにおける *SOCS1*、*SOCS2*、および *SOCS3* の *H2AFZ* に対する相対発現量を示し、棒グラフはその平均値を表す (各 $n = 3$)。

NP: 非妊娠

P: 妊娠

エラーバー: 標準誤差

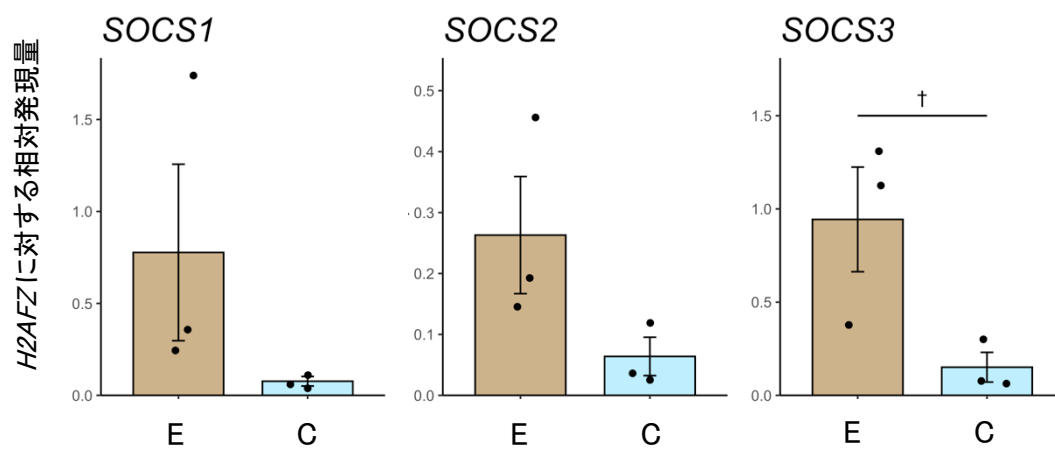


図 19. 着床前ウシ子宮内膜および子宮頸部における SOCS ファミリー発現の比較

妊娠 20 日目子宮内膜および子宮頸部から採取した粘膜組織における *SOCS1*、*SOCS2*、および *SOCS3* 発現 (各 $n = 3$)。

E: 子宮内膜組織

C: 子宮頸部組織

エラーバー: 標準誤差

† $p < 0.1$

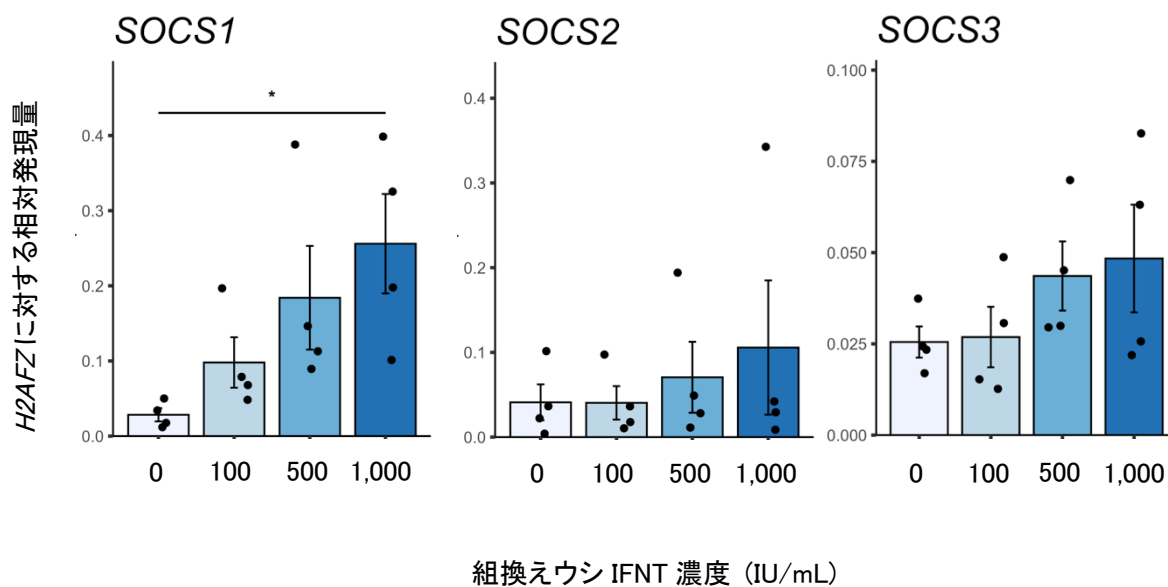


図 20. 子宮頸部上皮細胞における
IFNT 感作濃度ごとの SOCS ファミリー遺伝子発現

プロットは、各サンプルにおける *SOCS1*、*SOCS2*、および *SOCS3* の *H2AFZ* に対する相対発現量を示す (n = 4)。棒グラフは左から、ウシ組換え IFNT 0、100、500、および 1,000 IU/mL の濃度で細胞を感作した場合の *SOCS3* 発現量の平均値を表す。エラーバー: 標準誤差

考察

第三章では、IFNT の受容および I 型 IFN シグナル伝達の観点から子宮頸部組織について解析し、妊娠認識の場である子宮内膜組織と比較した。これらの結果について、両組織における IFNT の存在量の違いと対応させながら、以下に考察する。

妊娠 20 日のウシにおける IFNT の存在量は、子宮頸部組織と比較して、子宮内膜組織においてより顕著であった (図 8)。IFNT が子宮腔内に存在する胚から分泌されることを考慮すると、子宮頸部よりも子宮腔内の方がより豊富に IFNT が存在することになるため、本解析結果は妥当である。従って、IFNT は積極的に子宮外へ移行しているというよりは、自然な濃度勾配の結果、子宮頸部にも移行すると考えられる。また、IFNT 感作実験の結果、子宮内膜上皮細胞および子宮頸部上皮細胞いずれでも、濃度依存的に *ISG15* 発現が増加した (図 10)。このことから、両組織とも IFNT に対する応答性は、IFNT 濃度に依存して増加すると考えられる。一方で、I 型 IFN シグナルの活性化の指標となるリン酸化 STAT1 のタンパク質発現は、妊娠ウシ子宮内膜および子宮頸部組織間で同程度であった (図 9)。以上のことから、子宮頸部組織は、子宮内膜組織と比較して IFNT 存在量が少量であるにも関わらず、子宮内膜組織と同等の I 型 IFN シグナルを誘導する機構があると考えられた。

子宮内膜および子宮頸部組織における I 型 IFN シグナルの誘導機構を比較するために、まず IFNT の受容体である IFNAR1 および IFNAR2 の発現動態を比較解析した。IFNAR2 発現は、遺伝子およびタンパク質レベルで、子宮内膜組織と比較して子宮頸部組織において顕著に高かった (図 11)。また、非妊娠ウシ黄体期後期の子宮内膜および子宮頸部組織を含めた解析において、*IFNAR2* 発現は組織の違いおよび妊娠の成否の影響を受け、妊娠ウシ子宮内膜組織での発現レベルが他の 3 群と比較して低い値を示した (図 12B)。このことから IFNAR2 は、着床前子宮頸部において発現が誘導されるというよりは、むしろ着床前子宮内膜組織特異的に転写および翻訳が減少すると考えられる。この挙動は、過去に当研究室で同様の実験区により行われた、

ESR1 の発現動態と一致した[浅岡修論, 2020]。ブタ子宮内膜組織では、*IFNAR2* 発現が E2 により誘導され、*ESR1* アンタゴニストの添加で抑制されることが報告されている[69]。このことから、ウシでも *IFNAR2* 発現は E2 が発現誘導する *ESR1* により制御されている可能性がある。本研究では、*in vitro* で E2 処置下での *ESR1* および *IFNAR2* 発現の解析は行っていないが、*IFNAR2* 発現が妊娠子宮内膜組織で低い要因として、その上流因子 *ESR1* の減少が考えられる。

IFNT に発現誘導された *IRF2* は、*ESR1* 発現を抑制することが報告されており、その結果黄体退行が抑制され、母体の妊娠認識が成立すると考えられている[70,71]。本研究では、子宮内膜および子宮頸部上皮細胞いずれでも、IFNT 濃度依存的に *IRF2* 発現は増加した一方、*ESR1* 発現は、いずれの細胞でも IFNT 濃度依存的な変化はみとめられなかった (図 15, 16)。Spencer ら[71] は、発情周期 11 日目のヒツジ子宮に組換え IFNT を継時的に投与し、IFNT による *ESR1* 発現抑制は投与後 48 時間以降に顕著にみられること、対照群のヒツジ子宮は投与後 48 時間から 96 時間にかけて *ESR1* 発現が増加することを報告している。本研究で行った *in vitro* の実験系では、IFNT 感作時間は過去の知見[62]から IFNT が十分に作用し、ISGs を誘導する時間として 12 時間に設定したが、IFNT による子宮内膜上皮細胞での *ESR1* 発現抑制を *in vitro* で再現するには、感作時間の延長や E2 の共添加が必要かもしれない。しかし、個別値に着目し *IRF2* と *ESR1* のコントロールに対する相対発現量をプロットすると、子宮内膜上皮細胞では負の相関がみられた (図 17A)。これは Spencer ら[71]の報告した、子宮内膜組織での IFNT による *IRF2* を介した *ESR1* 発現抑制の結果と一致する。一方で、子宮頸部上皮細胞では、*IRF2* と *ESR1* のコントロールに対する相対発現量に相関関係はみとめられなかった (図 17 B)。このように、子宮頸部上皮細胞では、*IRF2* と *ESR1* の発現量に子宮内膜上皮細胞でみられるような負の相関はみとめられないことから、IFNT に誘導された *IRF2* による *ESR1* 発現の抑制は、子宮内膜組織に限定的にみられる現象であることが示唆された。以上のことから、子宮頸部に移行した IFNT は妊娠認識物質として機能しないからこそ、妊娠子宮内膜組織でみられる *ESR1* 発現抑制を回避することができ、結果的に着床前 *IFNAR2* 発現の維持に繋がると考えられた。

IFNAR1 は、遺伝子発現レベルでは両組織間に有意な発現量の差はみとめられなかった (図 11A)。同様に、非妊娠ウシ黄体期後期の子宮内膜および子宮頸部組織を含めた遺伝子発現レベルの解析においても、妊娠の成否、および組織の違いの発現量への影響はみとめられなかった (図 12)。これに対して、妊娠ウシにおけるタンパク質レベルの比較では、子宮頸部組織と比較して子宮内膜組織において顕著な発現減少がみられた (図 11B)。これらのことから、IFNAR1 は、転写の抑制よりも、タンパク質の分解が子宮内膜組織特異的に起きている可能性がある。これまでに、ヒトリンパ腫由来 Daudi 細胞を IFNA で処理すると、IFNAR1 タンパク質発現が 2 時間以内に 80%減少すること[72]、IFNA が IFNAR1 と Homolog of Slimb (HOS) F-box タンパク質の相互作用を誘導することで IFNAR1 をユビキチン化して分解すること[73]、および IFNAR1 の HOS 認識部位のアミノ酸配列がウシでも保存されていること[73]が報告されていることから、IFNT 自身も IFNAR1 タンパク質の分解に作用している可能性がある。I 型 IFN シグナルの過剰な活性化は自己免疫疾患につながる事が報告されており、適切な制御が必須である[74,75]。従って、子宮頸部と比較して IFNT 濃度が相対的に高い子宮腔内では、IFNAR1 タンパク質の分解が I 型 IFN シグナルの過剰な上方制御の抑制に寄与するのかもしれない。結果として IFNAR1 および IFNAR2 発現は、妊娠ウシにおいて子宮内膜組織と比較して子宮頸部組織で高くなり、そのため子宮頸部組織は比較的少量の IFNT から、IFNT が豊富に存在する子宮内膜組織と同程度の I 型 IFN シグナルを誘導できると考えられた。

次に、子宮内膜および子宮頸部由来の培養上皮細胞または培養組織を用いて、IFNT に対する応答性を比較した。子宮内膜および子宮頸部上皮細胞を用いた 100、500、および 1,000 IU/mL の IFNT 感作区における、コントロールに対する *ISG15* 相対発現量は、全ての IFNT 添加濃度で、子宮頸部上皮細胞において有意な発現増加がみとめられた ($p < 0.05$) (図 13)。同様に、組織ごとの対照群に対する *ISG15*、*IFIT1*、および *MX1* の発現は、いずれの遺伝子も子宮内膜組織と比較して、子宮頸部組織において有意に高かった ($p < 0.05$) (図 14)。このことから、子宮頸部組織は、その性質として IFNT に対する応答性が子宮内膜よりも高いと考えられた。そこで、I

型 IFN シグナルの負の制御因子である SOCS ファミリーに着目した。Carvalho ら[65] は、着床前子宮内膜組織において、非妊娠ウシ子宮内膜組織と比較して *SOCS1*、*SOCS2*、および *SOCS3* が高発現すること、これは子宮内膜上皮細胞における IFNT 感作により再現できることを報告している。一方で本研究では、CMM における *SOCS1*、*SOCS2*、および *SOCS3* 発現は、いずれも妊娠による有意な発現変化はみとめられなかった (図 18)。また、妊娠ウシ子宮内膜および子宮頸部組織では、*SOCS1*、*SOCS2*、および *SOCS3* いずれも、全ての個体で子宮頸部組織において子宮内膜組織よりも発現量が低い値を示し、特に *SOCS3* 発現は子宮頸部組織において低い傾向がみとめられた ($p < 0.1$) (図 19)。これらのことから、子宮頸部組織では、子宮内膜組織で報告されている妊娠期特異的な SOCS 発現が誘導されず、このことが生体において比較的少量の IFNT から子宮内膜組織と同程度の I 型 IFN シグナルを誘導できる要因の一つであると考えられた。また、IFNT 感作を行った子宮頸部上皮細胞では *SOCS1* の発現増加がみとめられたが、*SOCS2* および *SOCS3* の発現増加はみとめられなかった (図 20)。このことから、子宮頸部上皮細胞は、子宮内膜組織で報告されている *SOCS1*、*SOCS2*、および *SOCS3* の IFNT による包括的な発現誘導はみられないと考えられた。以上から、妊娠期特異的な SOCS 発現は、子宮内膜組織と比較して子宮頸部組織で低下しており、このことが子宮内膜および子宮頸部組織における応答性の差異に関与することが示唆された。

本章の結果により、子宮において IFNT は妊娠認識物質として機能するために *ESR1* 発現を抑制し、その結果 *IFNAR2* 発現の低下を招くと考えられた。一方、子宮頸部ではこのような機構がみられないため IFNT の受容体発現が維持されることが示唆された。また子宮頸部組織は、子宮内膜組織と比較して IFNT に対する応答性に優れており、子宮頸部に移行してきた少量の IFNT から、IFNT が豊富に存在する子宮内膜組織に匹敵する I 型 IFN シグナルを誘導できることが示された。これらの結果は、着床前子宮頸部組織における I 型 IFN シグナル誘導の重要性を示唆しており、子宮頸部に移行した IFNT が I 型 IFN シグナルを介して役割を有している可能性を支持するといえる。

第四章 インターフェロン α が子宮頸部で担う役割の検証

緒言

第三章では、妊娠認識に直接関与しない子宮頸部は、子宮と比較して IFNT に対する感受性が高く、子宮内より少量の IFNT から子宮と同等の I 型 IFN シグナルを誘導可能な機構があることが示唆された。このことから、IFNT は子宮頸部において I 型 IFN シグナルのアップレギュレーターとして役割を担う可能性が考えられる。しかし、子宮頸部に移行した IFNT が有する I 型 IFN シグナルを介した役割は明らかになっていない。

第二章において、子宮頸部における IFNT の存在、それに伴う I 型 IFN シグナルの活性化が、着床直前期に限られていることが示された。着床直前期では、血中 P4 濃度が非妊娠ウシと比較して顕著に増加し始める[76]。母体環境が P4 優勢となると、生殖器感染症に罹患しやすくなることが知られている[77]。従って、血中 P4 濃度が高値で維持される妊娠母体は、細菌およびウイルスが腔から子宮頸管経由で子宮内に感染する上行性感染のリスクが高まると考えられる。一方で、ウシの着床前子宮内膜組織における網羅的な遺伝子発現解析結果から、妊娠により *ISG15*、*IFIT1*、および *MX1* のようなウイルスに対する抵抗性を示す因子、ならびに *IFIH6*、*ZBP1*、および RIG-I 様受容体である *DDX58*、*IFIH1* などのウイルスを認識し下流シグナルを活性化する因子の発現が多数誘導されることが知られている[78,79]。このような外来ウイルスに対抗する因子の遺伝子発現は、ウイルスの上行性感染に対応する防御手段として有効であると考えられる。しかし、着床前子宮頸部組織における遺伝子発現プロファイルの変化に関する網羅的解析はこれまでに行われていない。

ウイルス増殖の抑制に I 型 IFN シグナルの活性化が重要であることはよく知られている。一方で、IFN の負の側面として細菌感染に対する脆弱性が指摘されている[80,81]。例えば、ZIKV を I 型 IFN 受容体欠損マウスに腔内接種した場合、野生型マウスではみとめられない全身性のウイ

ルス増殖が引き起こされる[19]。しかし、*C. muridarum* を I 型 IFN 受容体欠損マウスに腔内投与した場合、野生型マウスと比較して、*C. muridarum* の増殖および感染期間が有意に減少する[82]。このように I 型 IFN は、ウイルスに対する生体防御としては有益だが、細菌に対しては不利に機能してしまう場合がある。さらに IFN および I 型 IFN シグナルは、生体防御の第一線として役割を担うマクロファージの貪食能を抑制することが知られている。*Ifnar1* 欠損マウスでは、網膜におけるマクロファージの活性化が著しく促進される[83]。ニワトリでは、IFNG の添加量依存的にマクロファージの貪食能が低下する[84]。さらに、IFNT もヒト THP-1 マクロファージの貪食能を抑制することが報告されている[85]。これらのことから、IFNT が存在する子宮頸部における生体防御は、特に細菌に対しては脆弱になる可能性がある。しかし、上行性感染にはウイルスのみでなく細菌も関与することから、IFNT が子宮頸部で生体防御として機能することを考える場合、細菌感染に対する防御機構も含めて解析する必要がある。

好中球やマクロファージによる貪食作用の促進に寄与する現象として、補体系の活性化があげられる。補体系は、C3 転換酵素による C3 の活性化（補体活性化経路）と膜侵襲複合体の形成（後期経路）に大別され、補体活性化経路には複数の経路が知られている。このうち古典経路では、まず C1 により C4（遺伝子名: *C4A*）が C4a と C4b に切断され、C4b が病原体と共有結合する[86]。次に、C4b と結合した C2 が、再び C1 により C2a と C2b に切断され、病原体膜上に存在する C4b と C2a は、C4b2a 複合体を形成する[87]。C4b2a は C3 転換酵素となり、183 kDa の C3 を、11 kDa の C3a と 172 kDa の C3b に切断し活性化する[87]。C3b は、病原体に接着することで、免疫細胞の貪食を促進するオプソニン効果を持つ[88]。また、C3a も C3a 受容体と結合することで、腹膜において貪食活性を増加させることが報告されている[89]。さらに、IFNG 刺激後のマクロファージ貪食能は、補体によるオプソニン化を受けていない標的細胞と比較して、オプソニン化された標的細胞で増加する[89]。このことは、IFN の作用によるマクロファージ貪食能の低下が、補体の存在下では増強することを示唆している。しかし、子宮頸部組織において補体が存在する

知見は無く、IFNT が子宮頸部に存在することが、細菌の上行性感染に対してどのように影響するかも明らかになっていない。

一般に補体は、肝臓で産生され血中を循環しており、C3 活性化から膜侵襲複合体の形成まで全て血中でみられる現象である。一方で近年、ヒト T 細胞および正常角化上皮細胞内において C3 の発現が報告された[91,92]。これらの報告ではさらに、細胞内に発現するシステインプロテアーゼ Cathepsin (CTS) L が C3 転換酵素となり、細胞内 C3 の活性化に寄与することが示されている。これらのことから、ウシ子宮頸部上皮細胞も C3 を発現し、CTSL により C3 が活性化される可能性がある。しかし、これまでにウシ子宮頸部上皮細胞における補体および CTSL の発現動態に関する報告は無い。

本章では IFNT が子宮頸部組織において果たす機能を探索することを目的とした。このため最初に、非妊娠および妊娠ウシ由来 CMM における網羅的な遺伝子発現解析を行い、発現変動遺伝子情報を用いて妊娠期特異的に誘導される生物学的プロセスおよびパスウェイを探索した。次に、その結果に基づき、子宮頸部上皮細胞における補体の発現と、IFNT による活性化に関して検討した。具体的には、補体活性化経路関連因子について、IFNT による発現誘導の有無を評価し、特に補体系の中心である C3 のタンパク質発現を子宮内膜および子宮頸部上皮細胞において比較解析した。最後に、新規 C3 転換酵素である CTSL に着目し、生体における CTSL の発現および IFNT による発現誘導を評価した。

材料および方法

4-1. 供試動物

4-1-1. CMM の採取

供試動物として、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター生物生産研究農場酪農生産研究施設および北海道立総合研究機構（酪農試験場）で飼育されているホルスタイン種搾乳牛（ $n = 16$ ）を用いた。CMM の採取は、2-1-1 と同様に行った。

4-1-2. 非妊娠ウシ子宮内膜および子宮頸部組織の採取

株式会社北海道畜産公社道央事業所早来工場早来食肉流通センターおよびニチロ畜産株式会社名寄工場より、非妊娠ウシ由来の雌性生殖器を購入した。組織の採取は、3-1-1 と同様に行った。

4-1-3. 妊娠ウシ子宮内膜および子宮頸部粘膜組織の採取

供試動物として、農研機構畜産研究部門で飼養されている黒毛和種雌牛を用いた。サンプル採取は、3-1-2 と同様に行った。

4-2. 網羅的遺伝子発現解析のための RNA 抽出

RNA 抽出および精製には、NucleoSpin[®] RNA (Takara Bio Inc, Shiga, Japan) を用いた。4-1-1 において採取した、妊娠または非妊娠ウシ由来 CMM が付着した綿棒（各 $n = 5$ ）に、350 μL の Lysis Buffer RA1 (Takara) を添加し、氷上で 20 分間静置した。その後、綿棒と Lysis Buffer RA1 を付属の NucleoSpin Filters をセットしたチューブに添加し、4°C で 11,000g、1 分間遠心した。以降の操作は、推奨プロトコル通りに実施し、RNA を抽出および精製した。その後、RNA の濃度お

よび純度を NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific) により測定し、濃度 50 ng/μL 以上、吸光度 260/280 値が 1.8 - 2.0、および 260/230 値が 1.5 以上のサンプルをシーケンスに供した。

4-3. バイオインフォマティクス

4-3-1. シーケンスライブラリーの作成と RNA シーケンス

4-2 で得られた RNA は、NEBNext[®] Poly (A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) を用いて mRNA のみ選択的に抽出し、NEB Next Direction Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina[®] (New England Biolabs Inc.) によりシーケンスライブラリーを調製した。その後、NovaSeq 6000 Sequencing System (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いて、ライブラリー調製したサンプルの塩基配列を取得した。

4-3-2. データプロセッシング

取得した塩基配列におけるアダプター配列の除去およびクオリティコントロールには fastp[93]を用いた。次に、クオリティコントロールをパスしたリードについて、ウシリファレンスゲノム Bos_taurus_UMD_3.1.1 に対するマッピングを STAR (ver. 2.7.8a) [94]を用いて行った。その後、RSEM (ver. 1.3.3) によりリードカウントを行い、サンプルごとに全遺伝子のカウント数を算出した。また、カウントデータを遺伝子長および総リード数で補正した TPM (Transcripts per million) を算出し、遺伝子発現量の比較に用いた。

4-3-3. 発現変動遺伝子の抽出

発現変動遺伝子解析は、非妊娠ウシに対する妊娠ウシ由来サンプルの二群間比較として、edgeR (3.30.3) [95]により行った。本解析では、 $\log_2$ fold-change ≥ 1 または ≤ -1 、かつ adjusted p value < 0.05 を満たす遺伝子を発現変動遺伝子と定義した。

4-3-4. Interferome 解析

Interferome データベース (<http://www.interferome.org/>) を参照して、発現変動遺伝子が IFN により誘導される既知の遺伝子であるか評価した。全ての発現変動遺伝子について、IFN α 、IFN β (IFNB)、および IFN γ (IFNG) で刺激した任意のヒト細胞の網羅的遺伝子発現データセット群において、対照群と比較して 2 倍以上発現増加した遺伝子かどうかを評価した。

4-3-5. エンリッチメント解析

4-3-3 で得られた発現変動遺伝子を入力として、Gene Ontology (GO) および KEGG パスウェイに基づくエンリッチメント解析を Cluster profiler[96]を用いて実施した。

4-4. 子宮内膜組織および子宮頸部組織片の培養

子宮内膜組織および子宮頸部組織片の採取および培養は、3-2 と同様に行った。

4-5. 子宮内膜組織および子宮頸部組織からの初代上皮細胞の培養および継代

子宮内膜組織および子宮頸部組織からの初代上皮細胞の培養と継代は、それぞれ 3-3 および 3-4 と同様に行った。

4-6. rbIFNT 感作実験

組織および細胞に対する IFNT 感作は、3-5 と同様に行った。

4-7. JAK-STAT 経路阻害および IFNT 添加実験

3-4と同様に準備した子宮内膜組織および子宮頸部組織由来上皮細胞に対し、無添加区、JAK 阻害剤 AZD 1480 (AdooQ BioScience, Irvine, CA, USA) 添加区、rbIFNT (1,000 IU/mL) 添加区、ならびに AZD 1480 および rbIFNT 添加区の 4 区を設けた。その後、38.5°C、5%CO₂ 条件で、12 時間培養した。

4-8. RNA 抽出、cDNA 合成、および PCR

培養細胞からの RNA 抽出、精製、cDNA 合成、および定量 PCR は、3-6 および 2-6 と同様の方法で行った。PCR は、GoTaq® Green Master Mix (Promega, Wisconsin, USA) を 5 µL、10 µM の Forward プライマーおよび Reverse プライマーを 各 0.5 µL、滅菌水を 2 µL、cDNA 希釈液を 2 µL の総量 10 µL とした。PCR 反応は、Life ECO ver. 3.0 (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) により、以下の条件で行った。初期変性として 95°C で 2 分を 1 サイクル、続いて 95°C で 10 秒、55°C で 15 秒、72°C で 30 秒を 30 サイクル行った。本章でターゲットとした遺伝子のプライマー配列は、表 7 に示す。

4-9. ウェスタンブロッティング

2-8 と同様の方法で行った。細胞ライセートは、4 ウェルで培養した子宮頸部上皮細胞を 500 µL の CelLytic™ M (Sigma, Missouri, USA) バッファーに溶解して作製した。各ターゲットタンパク質の、一次抗体および二次抗体情報の詳細は、表 8 にまとめた。

4-10. 培養細胞の免疫染色

4 ウェルディッシュに培養した子宮内膜および子宮頸部上皮細胞から、培地を除去し、PBS (-) で洗浄した。次に、4%PFA 溶液を添加し、室温で 20 分間静置することで固定した。その後、PBS

(-) による 5 分間の洗浄を 3 回行った。以降、2-9-2 と同様の方法で行った。各ターゲットタンパク質の、一次抗体および二次抗体情報の詳細は、表 9 にまとめた。

4-11. 統計解析

二群間の有意差検定は、等分散を仮定しない t -検定により行い、 $p < 0.05$ の場合有意差が、 $p < 0.1$ の場合傾向があると判断した。また、IFNT と JAK 阻害剤の添加実験については、等分散を仮定しない t -検定を実施し、Benjamini-Hochberg 法により False discovery rate を調整した。*CTSL* の IFNT 添加濃度ごとの発現誘導実験では、Dunnett 法により IFNT 無添加区と各添加区との間で有意差検定を行い、 $p < 0.05$ の場合有意差が、 $p < 0.1$ の場合傾向があると判断した。また、3-9 と同様に単回帰モデルを作成し、回帰係数 = 0 を帰無仮説とした t -検定を行い、 $p < 0.05$ の場合に遺伝子発現の変化が濃度依存的であると判断した。

表 7. プライマー配列情報

Gene symbol		Sequence (5'-3')	Accession No.	Product length (bp)
<i>DDX58</i>	F	GAGCACTGGTGGATGCCTTA	XM_024996055.1	164
	R	GCTGTCTCTGTTGGTTCGGA		
<i>IFIH1</i>	F	CCTTGTTGATGGGCAGAGGT	KY781164.1	74
	R	ACGGCAATATACTGCTCCACA		
<i>ZBP1</i>	F	GTTCCACAGAGCGGGAGAG	XM_005214953.4	179
	R	TCTGGGTTGACTTCCTTCGC		
<i>IFI16</i>	F	ACATCCCACTGAGGCACATC	XM_002685877.4	129
	R	ATCGTGGGCCAGTAAAGACT		
<i>C2</i>	F	CACCCATGCTAGGCCCATCT	NM_001034492.1	127
	R	ATGAGCGGGAATGCTCACTT		
<i>C3</i>	F	CTCACCCGTGTTCCGATCAA	NM_001040469.2	157
	R	CCACCATGTCACTGCCTGAT		
<i>C4A</i>	F	CACAGGGAAATGCAGGGAGG	NM_001166485.1	166
	R	CCCCCAAGAAGGTGTTTGCT		
<i>CTSL</i>	F	TGCTTCGATTCCTCCATCCG	NM_001083686.2	100
	R	CGTGGCACTAAAAGCCCAAC		
<i>H2AFZ</i>	F	AGAGCCGGTTTGCAGTTCCCG	NM_174809.2	116
	R	TACTCCAGGATGGCTGCGCTGT		

F: Forward, R: Reverse

表 8. ウェスタンブロッティングに用いた抗体および希釈条件

標的タンパク質	抗体情報	一次抗体 希釈倍率
DDX58	Rig-I (D33H10) Rabbit mAb #4200, (Cell Signaling Technology, MA, USA)	1,000 倍
CTSL	Polyclonal Antibody to Cathepsin L, PAA306Bo01, (Cloud-Clone Corp., Wuhan, China)	2,000 倍
C3	Complement C3 Polyclonal Antibody, BS-2934R, (Bioss, MA, USA)	1,000 倍
ACTB	Beta Actin Polyclonal ANTIBODY, 20536-1-AP, (Proteintech, Illinois, USA)	5,000 倍

表 9. 免疫染色に用いた一次抗体および希釈条件

標的タンパク質	抗体情報	一次抗体 希釈倍率
CTSL	Polyclonal Antibody to Cathepsin L, PAA306Bo01, (Cloud-Clone Corp., Wuhan, China)	200 倍
C3	Complement C3 Polyclonal Antibody, BS-2934R, (Bioss, MA, USA)	200 倍

結果

4-1. 非妊娠および妊娠ウシ CMM における発現変動遺伝子の抽出と機能解析

人工授精後 17 または 18 日目に採取した CMM サンプルについて、非妊娠および妊娠ウシ間における発現変動遺伝子として 278 遺伝子が抽出された。まず、発現変動遺伝子が IFN により誘導される既知の遺伝子であるか評価するために、Interferome 解析を実施した結果、180 遺伝子 (64.7%) が、IFN により発現が誘導される遺伝子であり、I 型 IFN である IFNA および IFNB により誘導される遺伝子は、それぞれ 138 個および 127 個であった (図 21)。次に、発現変動遺伝子についてエンリッチメント解析を実施した。有意に濃縮されている GO term として、免疫応答関連 (Immune response, Immune system process, Complement activation, classical pathway など) および生体防御関連 (Defense response, Interspecies interaction between organisms, Response to external stimulus, Negative regulation of viral life cycle, Complement activation, classical pathway など) が抽出された ($p < 0.05$) (図 22)。次に、KEGG データベース (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) を参照して発現変動遺伝子が有意に濃縮されているパスウェイを解析した結果、各種ウイルス感染時の応答経路 (Influenza A, Herpes simplex virus 1 infection, Cytosolic DNA-sensing pathway, RIG-I like receptor signaling pathway など) および、生体防御関連経路 (Complement and coagulation cascades, Phagosome, Antigen processing and presentation など) が抽出された ($p < 0.05$) (図 23)。

4-2. IFNT 感作子宮内膜および子宮頸部組織でのウイルスセンサー遺伝子相対発現量の比較

1,000 IU/mL、12 時間の IFNT 感作を行った子宮内膜および子宮頸部組織において、ウイルスセンサーである *DDX58*、*IFIH1*、*IFI16*、および *ZBP1* の遺伝子発現量を定量し、コントロール群に対する相対発現量を組織別に算出した。*DDX58* および *IFIH1* は、子宮内膜組織と比較して、

子宮頸部組織において相対発現量が大きい傾向がみとめられた ($p < 0.1$) (図 24)。一方で、*ZBP1* および *IFI16* は、両組織での相対発現量に有意な差はみとめられなかった。

4-3. 妊娠ウシ子宮内膜および子宮頸部組織における DDX58 発現量の比較

着床前時期でのウイルスセンサー因子の発現量を子宮内膜および子宮頸部組織で比較するために、両組織の DDX58 タンパク質発現量を定量した。妊娠ウシ着床前子宮内膜および子宮頸部組織における DDX58 発現は、両組織間で有意な差はみとめられなかった (図 25)。

4-4. CMM における補体の発現動態解析

妊娠期特異的な補体関連因子の発現変化を解析するため、非妊娠ウシおよび妊娠ウシにおける補体因子の遺伝子発現を TPM から算出した。妊娠ウシ CMM では、非妊娠ウシ CMM と比較して *C2* 発現が有意に増加し ($p < 0.05$)、*CIQA* および *CIQB* 発現は、増加する傾向がみとめられた ($p < 0.1$) (図 26)。一方で、*CIQC*、*C3* および *C4A* は、非妊娠ウシ CMM との間に有意な差はみとめられなかった。

4-5. 子宮内膜および子宮頸部上皮細胞における C3 発現の解析

細胞内での C3 発現状態を明らかにするために、子宮内膜上皮細胞および子宮頸部上皮細胞において、C3 発現を遺伝子およびタンパク質レベルで解析した。C3 発現は、子宮頸部上皮細胞においてバンドが確認された一方、子宮内膜上皮細胞では顕著に弱かった (図 27)。次に、免疫染色により、子宮内膜上皮細胞および子宮頸部上皮細胞における C3 タンパク質の局在を解析した。子宮頸部上皮細胞では、C3 は細胞質に局在した (図 28)。一方で子宮内膜上皮細胞において、C3 は子宮頸部上皮細胞と同様に細胞質に局在したものの、シグナルは弱かった (図 28)。

4-6. 妊娠ウシ子宮内膜および子宮頸部組織における C3 発現の解析

妊娠ウシ子宮内膜および子宮頸部組織において、C3 遺伝子発現を比較したところ、両組織間の発現量に有意な差はみとめられなかったが、いずれの個体においても子宮頸部組織での発現量は、子宮内膜組織の発現量よりも高い値を示した (図 29)。

4-7. IFNT 感作による子宮頸部上皮細胞の C3 活性化状態の解析

IFNT の C3 活性化への関与を検討するため、IFNT を 0 (コントロール区)、100、500、および 1,000 IU/mL の濃度で、12 時間感作した子宮頸部上皮細胞において、C3 の活性化状態を解析した。コントロール区では、183 kDa 付近に C3 のバンドが得られ、IFNT 添加濃度が 1,000 IU/mL のとき C3 のバンドは検出されなかった (図 30)。一方で、活性型断片である C3a を表す 10 kDa 付近のバンドは、IFNT 添加濃度が 500 および 1,000 IU/mL のときのみみとめられた。

4-8. IFNT による子宮頸部上皮細胞での C2 および C4A の発現誘導解析

IFNT が I 型 IFN シグナルを介して補体活性化の古典経路に関与するか検討するため、IFNT を 1,000 IU/mL の濃度で、12 時間感作させた子宮頸部上皮細胞において、C2 および C4A 発現を解析した。C2 は、IFNT により有意に発現増加し、この発現増加は JAK 阻害剤の共添加により打ち消された ($p < 0.05$) (図 31)。一方で C4A 発現は、IFNT による発現増加と阻害剤の作用に、有意差はみとめられなかった (図 31)。

4-9. CMM における CTSL 発現動態の解析

CTSL は、細胞内 C3 の転換酵素として知られている。着床前時期における *CTSL* 発現を解析したところ、妊娠ウシ CMM における *CTSL* 遺伝子発現は、非妊娠ウシと比較して増加する傾向がみとめられた ($p < 0.1$) (図 32A)。また、ウェスタンブロッティングにより CTSL タンパク質発現解析を行ったところ、非妊娠ウシおよび妊娠ウシいずれにおいても、38 kDa 付近に弱い CTSL のバンドを検出した。一方で、30 kDa 付近の活性型 CTSL は、妊娠ウシ CMM において、非妊娠ウシ CMM よりも顕著なバンドが検出された (図 32B)。

4-10. IFNT 感作子宮頸部細胞における CTSL 発現の誘導解析

IFNT を 0 (コントロール)、100、500 および 1,000 IU/mL の濃度で 12 時間感作した子宮頸部上皮細胞において *CTSL* 発現を解析した。*CTSL* 発現は、コントロール区と 500 IU/mL または 1,000 IU/mL の IFNT 添加区との間に、それぞれ傾向 ($p < 0.1$) と有意差 ($p < 0.05$) がみとめられ、IFNT 感作による濃度依存的な発現増加がみとめられた ($p < 0.01$) (図 33)。最後に、免疫染色により、1,000 IU/mL の IFNT で感作した子宮頸部上皮細胞における CTSL タンパク質の局在を解析した結果、IFNT 感作の有無に関わらず、CTSL の細胞質内局在がみとめられた (図 34)。

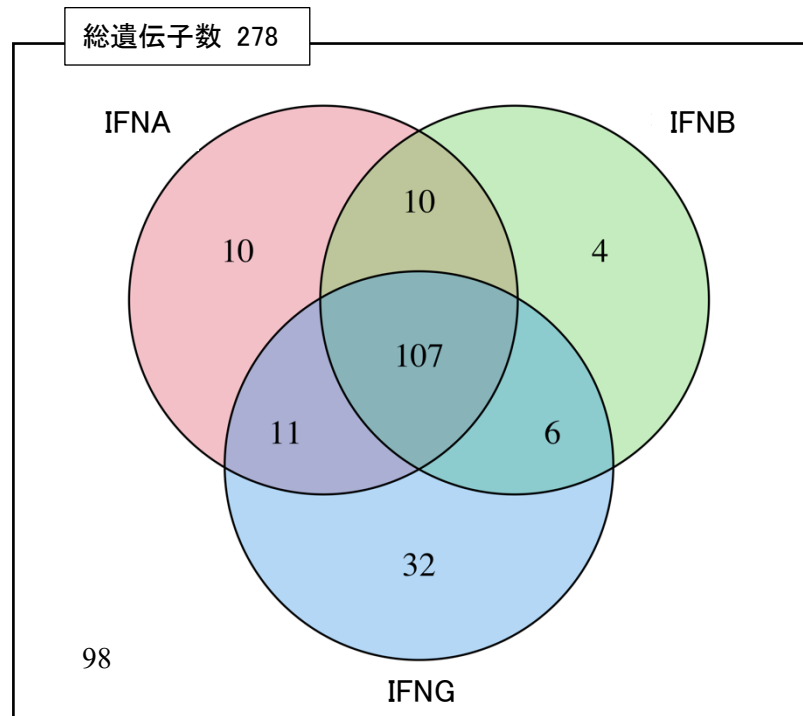


図 21. 発現変動遺伝子の IFN 誘導解析

発現変動遺伝子のうち、I 型および II 型 IFN により発現が誘導されることが知られている遺伝子を Interferome データベースから探索した。ベン図は、IFNA、IFNB、および IFNG により発現誘導される遺伝子それぞれの集合を、数字はその集合に含まれる遺伝子数を表す。

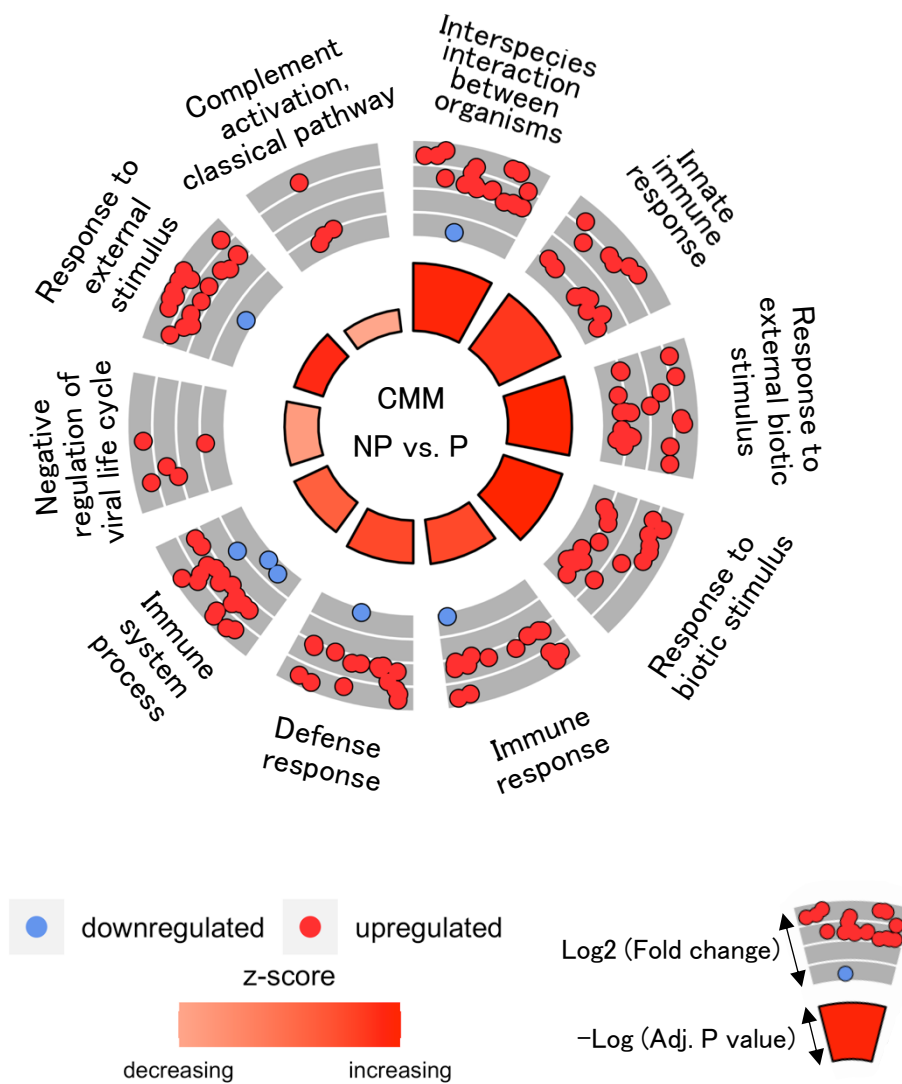


図 22. 非妊娠および妊娠ウシ CMM における発現変動遺伝子の関与が推定される機能の一覧

z-score は、各 GO term に含まれる発現増加遺伝子数と発現減少遺伝子数の差分を両者の合計の平方根で割った値を示す。

NP: 非妊娠ウシ, P: 妊娠ウシ

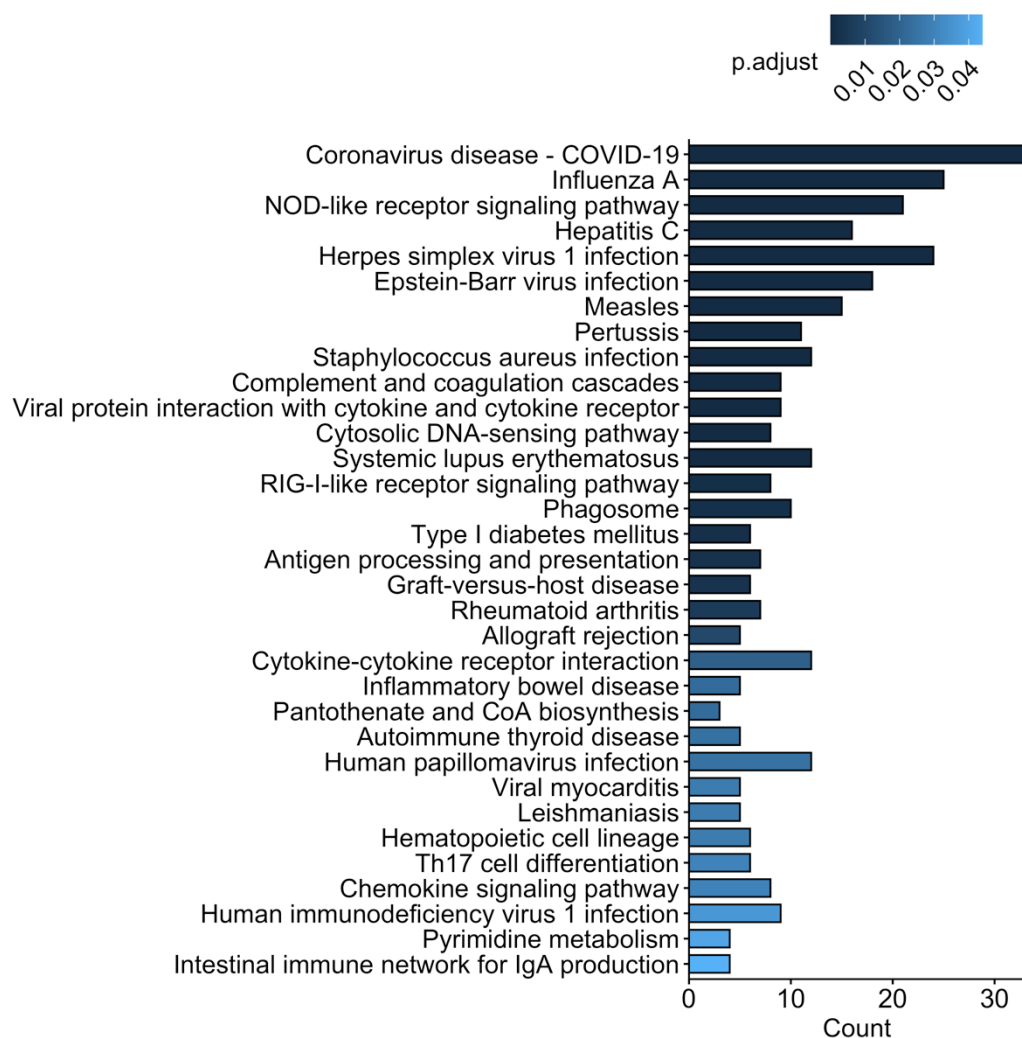


図 23. 非妊娠および妊娠ウシ CMM における発現変動遺伝子の関与が推定される

パスウェイの一覧

発現変動遺伝子の関与が推定されるパスウェイを、補正した p 値が小さい順に示した。

p.adjust: 補正した p 値, Count: 各パスウェイに該当する遺伝子数

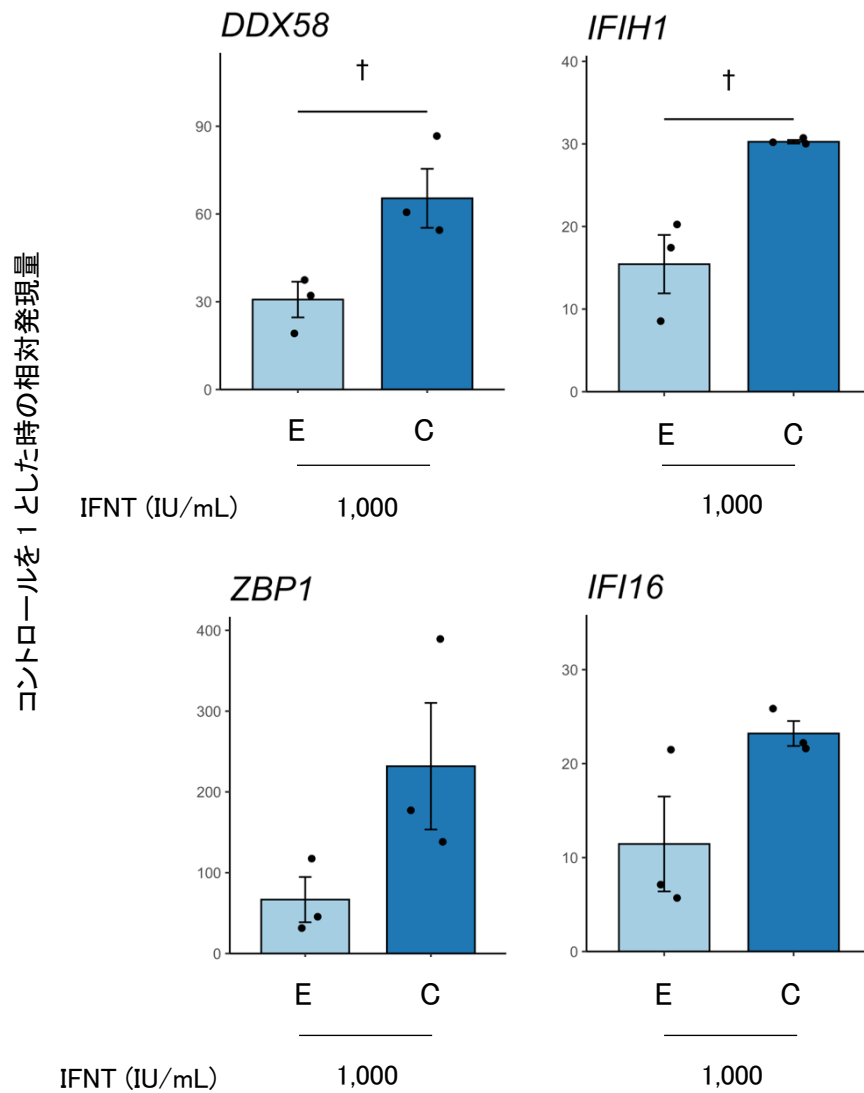


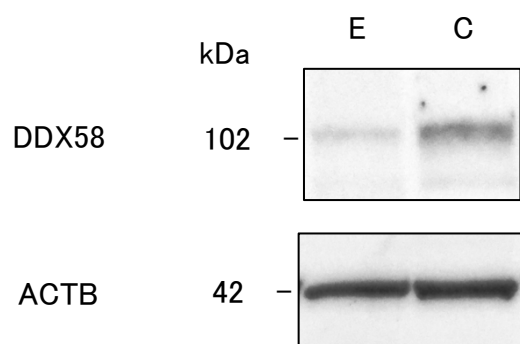
図 24. IFNT による子宮内膜および子宮頸部組織におけるウイルスセンサー発現誘導能の比較

プロットは、各組織コントロール区における *DDX58*、*IFIH1*、*ZBP1* および *IFI16* 発現量を1とした場合の、IFNT 添加区における各遺伝子の相対発現量を示し、棒グラフはその平均値を表す (各 $n = 3$)。

E: 子宮内膜組織, C: 子宮頸部組織

エラーバー: 標準誤差, † $p < 0.1$

A



B

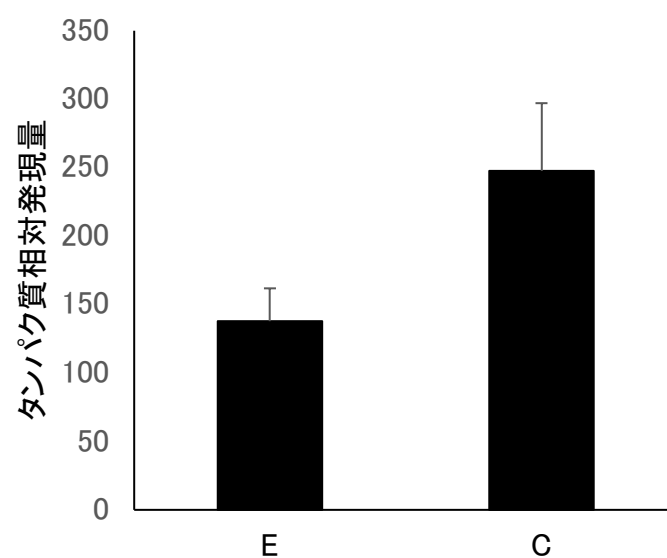


図 25. 着床前ウシ子宮内膜および子宮頸部における DDX58 発現の比較

A: 妊娠 20 日子宮内膜および子宮頸部から採取した粘膜組織における DDX58 発現 (各 n = 3)。

B: 総タンパク質量により補正した子宮内膜および子宮頸部における DDX58 発現量の平均値を表す。

E: 子宮内膜組織, C: 子宮頸部組織

エラーバー: 標準誤差

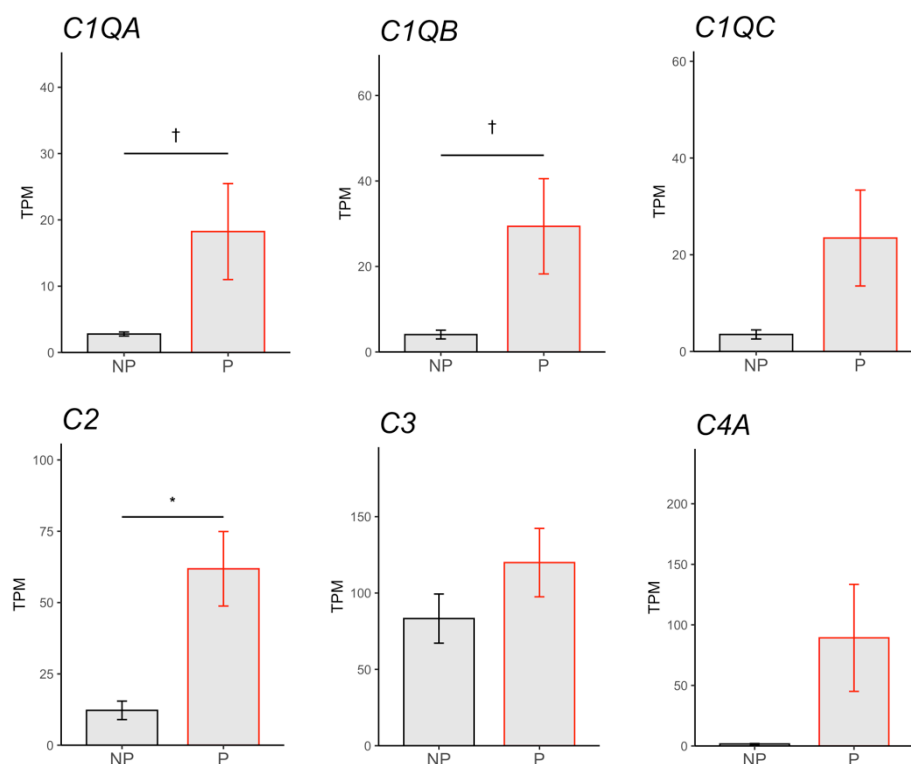


図 26. 非妊娠および妊娠ウシ CMM における補体因子の遺伝子発現解析

棒グラフは、非妊娠または妊娠ウシ CMM における補体因子発現量の平均値を表す (各 $n = 5$)。

NP: 非妊娠ウシ, P: 妊娠ウシ

TPM: transcripts per million

エラーバー: 標準誤差

† $p < 0.1$, * $p < 0.05$

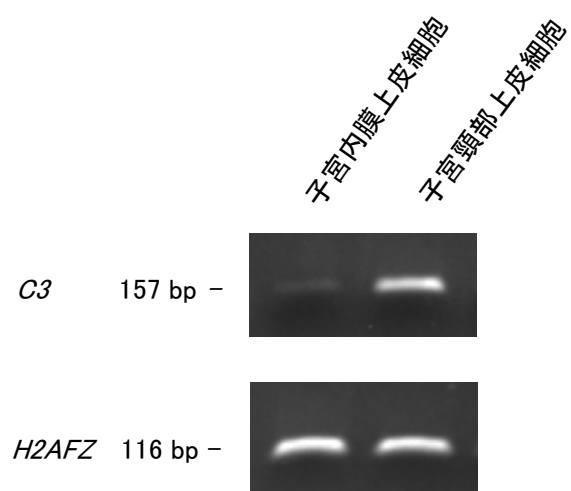


図 27. 子宮内膜および子宮頸部上皮細胞における *C3* 発現

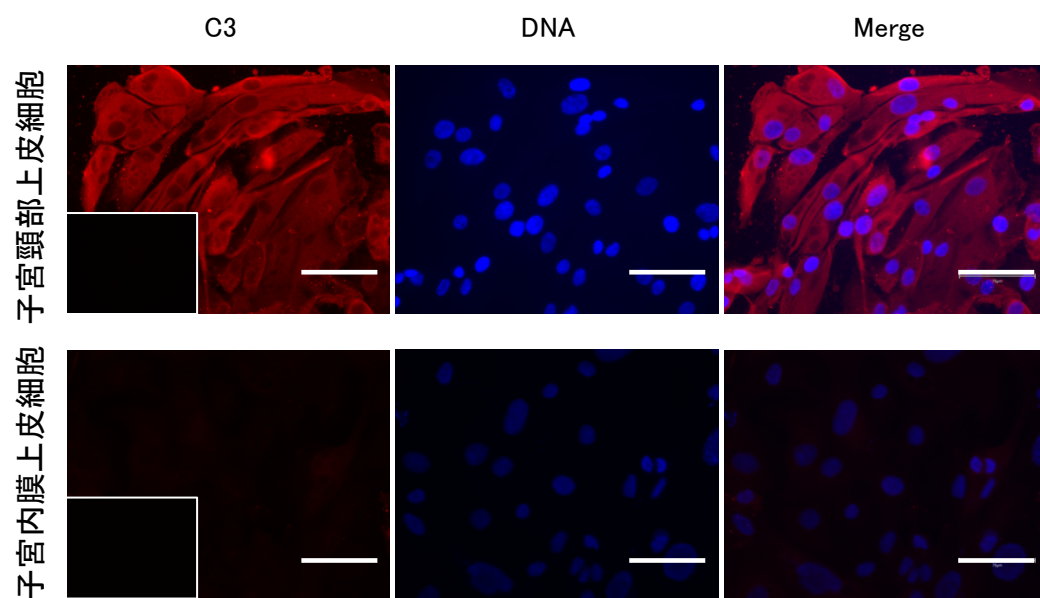


図 28. 子宮内膜および子宮頸部上皮細胞における C3 発現と局在

画像の左下はネガティブコントロールを示す。スケールバー: 75 μ m

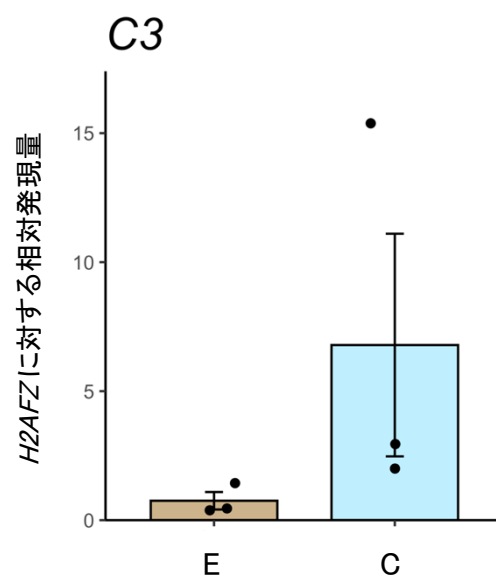


図 29. 着床前ウシ子宮内膜および子宮頸部における C3 発現の比較

妊娠 20 日目子宮内膜および子宮頸部から採取した粘膜組織における C3 発現 (各 n = 3)。

E: 子宮内膜組織

C: 子宮頸部組織

エラーバー: 標準誤差

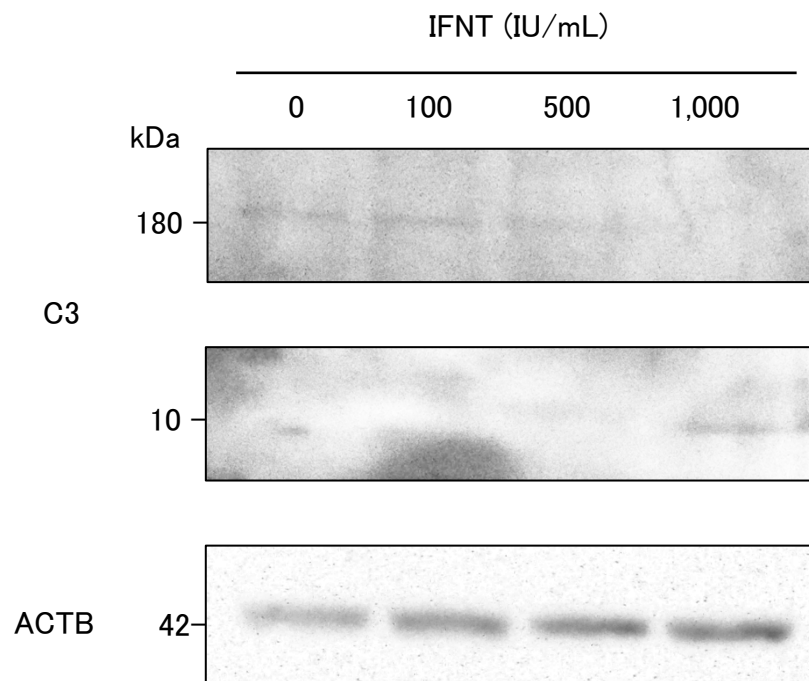


図 30. IFNT 感作による子宮頸部上皮細胞の C3 活性化状態の解析

ウシ組換え IFNT 0、100、500 および 1,000 IU/mL の濃度で細胞を感作した場合の C3 (183 kDa) およびその活性化断片 C3a (10 kDa) のバンドを示す。

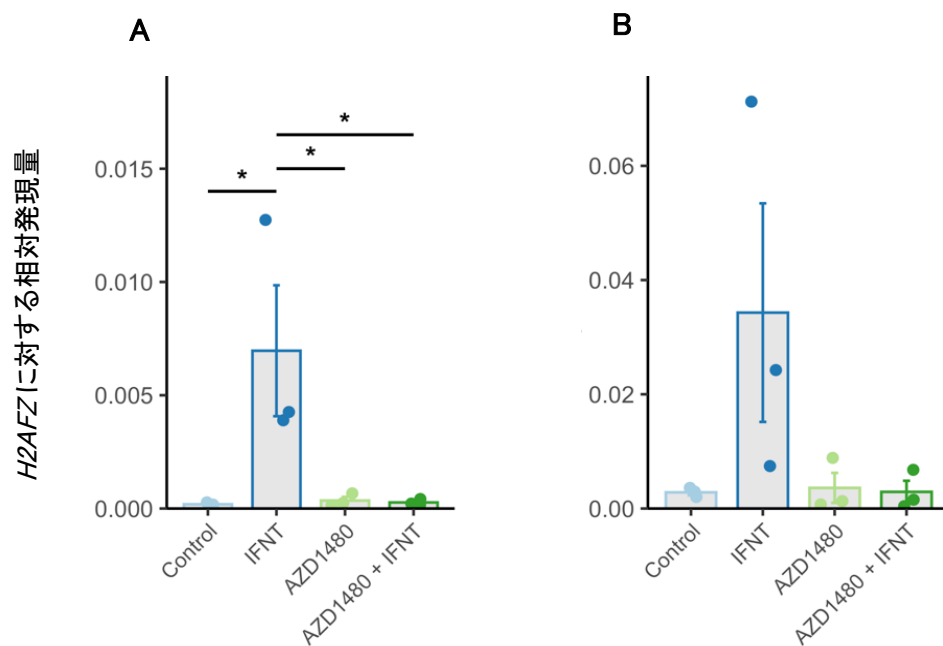


図 31. 子宮頸部上皮細胞における IFNT による *C2* (A) および *C4A* (B) 発現誘導と JAK 阻害の影響

プロットは、各サンプルにおける補体因子の *H2AFZ* に対する相対発現量を示す (各 $n = 3$)。棒グラフは左から、コントロール区、IFNT 添加区、AZD1480 (JAK 阻害剤) 添加区、および IFNT と AZD1480 添加区の補体発現量の平均値を表す。

エラーバー: 標準誤差

* $p < 0.05$

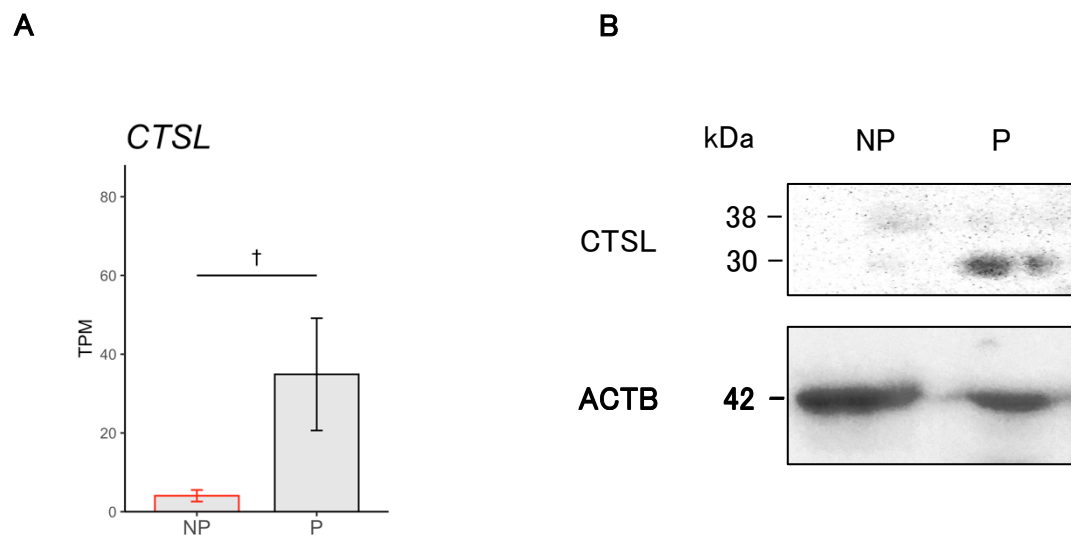


図 32. 非妊娠および妊娠ウシ CMM における CTSL 遺伝子およびタンパク質発現解析

A: 棒グラフは、非妊娠または妊娠ウシ CMM における *CTSL* 発現量の平均値を表す (各 $n = 5$)。

TPM: transcripts per million

エラーバー: 標準誤差, $\dagger p < 0.1$

B: 非妊娠または妊娠ウシ CMM における CTSL 発現を示す。

NP: 非妊娠ウシ

P: 妊娠ウシ

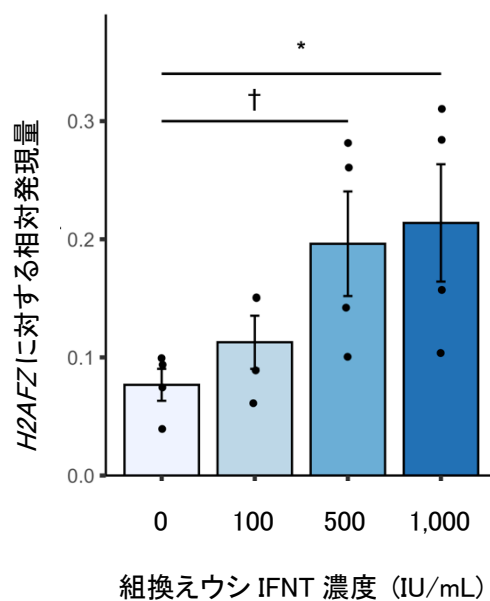


図 33. 子宮内膜および子宮頸部上皮細胞における IFNT 感作濃度ごとの *CTSL* 発現

プロットは、各サンプルにおける *CTSL* の *H2AFZ* に対する相対発現量を示す (各 $n = 4$)。棒グラフは左から、ウシ組換え IFNT 0、100、500、および 1,000 IU/mL の濃度で細胞を感作した場合の *CTSL* 発現量の平均値を表す。

エラーバー: 標準誤差

* $p < 0.05$, † $p < 0.1$

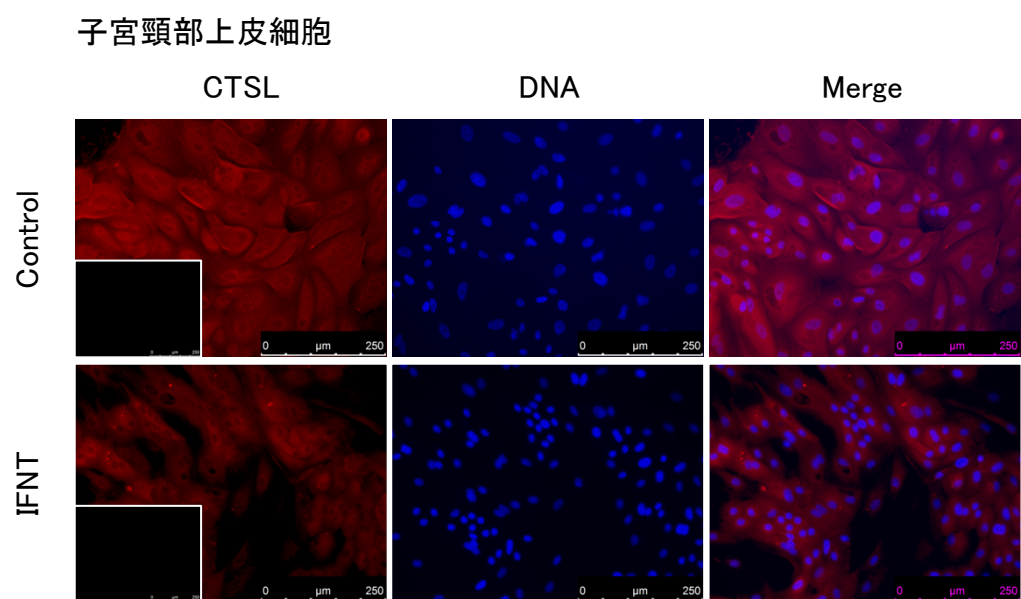


図 34. IFNT 感作子宮頸部上皮細胞における CTSL の発現と局在

画像左下はネガティブコントロールを示す。スケールバー: 250 μm

考察

本章では、子宮頸部組織における IFNT の免疫学的役割について調べることを目的とし、まず妊娠および非妊娠ウシ由来 CMM における網羅的遺伝子発現解析を実施した。次に、免疫細胞の貪食作用を促進する補体活性化に関連する因子について、子宮頸部上皮細胞における発現、ならびに IFNT による発現誘導の有無を評価した。

網羅的遺伝子発現解析では、278 の遺伝子が発現変動遺伝子として抽出された。これらの遺伝子を、IFN により発現誘導される既知の遺伝子であるか調べる Interferome 解析に供したところ、64.7%が IFN により発現が誘導されることが明らかになった (図 21)。このことから、ウシ子宮頸部における妊娠期特異的な遺伝子発現プロファイル変化の大部分に、IFN が関与すると推測された。実際、発現変動遺伝子群に含まれる遺伝子を機能的な側面から整理した場合、エンリッチメント解析では妊娠ウシ CMM において、各種ウイルスに対する抵抗性に関連する機能およびパスウェイが多数上方制御されていることから裏付けられた (図 22, 23)。これらのことから、妊娠ウシ子宮頸部組織では、ウイルス認識およびウイルスに対する抵抗性に関わる遺伝子発現プロファイルの変化が IFNT を介して制御されていることが示唆された。

これまでに、妊娠 18 日目におけるウシ子宮内膜組織、伸長期胚と共培養した子宮内膜上皮細胞、および IFNT 感作した子宮内膜上皮細胞において網羅的な遺伝子発現解析が行なわれており、本研究での子宮頸部組織における解析と類似した発現変動遺伝子が抽出されている [15,78,79,97-99]。このことから、子宮頸部に存在する IFNT は、子宮頸部上皮細胞にも、子宮内膜上皮細胞と同様に I 型 IFN シグナルの活性化に作用していると考えられる。

次に、同様の条件で IFNT 感作した子宮内膜組織と子宮頸部組織で、外来ウイルスのセンサー因子である *DDX58*、*IFIH1*、*IFI16*、および *ZBP1* の発現を解析した結果、*DDX58* および *IFIH1* は、子宮頸部組織において子宮内膜組織と比較して相対発現量が高い傾向がみとめられた (図 24)。この結果は、第三章における *ISG15*、*IFIT1*、および *MX1* の発現動態と一致していた。ま

た、妊娠ウシ子宮頸部組織における DDX58 発現は、子宮内膜における発現量に相当した (図 25)。以上より、妊娠ウシ子宮頸部組織は、子宮内と同様の強さでウイルスに対する抵抗性を持つことが示唆された。

本研究では、細菌の上行性感染に対抗する因子として先行研究を参考に補体系に着目することとした[88,90]。RNA シーケンスにより得られた発現変動遺伝子におけるエンリッチメント解析では、ウシ着床前 CMM において、補体活性化に関連する機能 (Complement activation, classical pathway) およびパスウェイ (Complement and coagulation cascades) の活性化が推定された (図 22, 23)。また、補体活性化に関わる因子の TPM 値を非妊娠ウシおよび妊娠ウシ CMM で比較したところ、C3 は、他の補体因子とは異なり、非妊娠ウシにおいて妊娠ウシと同等に発現していた (図 26)。このことから、C3 は CMM に含まれる細胞に妊娠の成否にかかわらず発現していることが示唆された。

次に、子宮頸部上皮細胞において C3 発現を解析したところ、RT-PCR により C3 のバンドが得られ (図 27)、免疫染色により C3 のシグナルが子宮頸部上皮細胞の細胞質に発現することが明らかになった (図 28)。このことから、子宮頸部上皮細胞は、細胞内で C3 を恒常的に発現することが示された。一方で、子宮内膜上皮細胞における C3 発現は、子宮頸部上皮細胞と比較して、遺伝子 (図 27) およびタンパク質 (図 28) レベルで顕著に低く、妊娠ウシ子宮内膜組織および子宮頸部組織における遺伝子発現レベルの比較でも、実験に供した 3 個体全てにおいて子宮内膜組織で子宮頸部組織と比較して低い値を示した (図 29)。

以上のことから、C3 は子宮内膜組織よりも子宮頸部組織に豊富に発現していることが示唆された。さらに、IFNT を 0、100、500、および 1,000 IU/mL の濃度で、12 時間感作した子宮頸部上皮細胞では IFNT の添加濃度の増加に伴い C3 のバンド強度が減少し、反対に活性型断片の C3a のバンド強度が増加した (図 30)。このことから、IFNT は子宮頸部上皮細胞に発現する C3 の活性化に寄与することが示唆された。I 型 IFN による細胞内 C3 の活性化は、本研究が初めて示した現象である。以上のことから、子宮頸部に移行した IFNT は、子宮頸部上皮細胞に豊富に

発現する C3 の活性化を誘導し、マクロファージの貪食能を高める役割を果たす可能性が示された。

IFNT が C3 活性化を誘導する機序を明らかにするためには、IFNT と既知の C3 転換酵素との関係を解析する必要がある。そこで本実験では、IFNT が古典経路を上方制御し C3 を活性化する、または新規 C3 転換酵素である CTSL 発現を細胞内で誘導し C3 を活性化する二通りの仮説を検討した。古典経路について、本実験では C3 以外の古典経路に関与する補体の遺伝子発現は、妊娠ウシ由来 CMM で、非妊娠ウシと比較して概ね発現増加した (図 26)。このことから、着床前 CMM では妊娠期特異的に古典経路が上方制御されている可能性が考えられる。そこで、子宮頸部上皮細胞で、古典経路として C3 活性化に関与する C2 および C4A 発現と IFNT による誘導の有無を解析したところ、いずれも子宮頸部上皮細胞に発現しており、特に C2 発現は IFNT 添加により増加し、JAK 阻害剤の共添加により抑制された (図 31A)。一方で C4A は、IFNT による発現増加と阻害剤の作用に、有意差はみとめられなかったものの、IFNT と JAK 阻害剤の影響がうかがわれた (図 31B)。細胞内における C4A の発現は、ヒト腎臓[100]、および糸球体上皮細胞[101]において報告されており、いずれも IFNG により発現が誘導されることが報告されている[102]。これまで、I 型 IFN による補体因子発現誘導の報告はないが、Interferome に登録された網羅的な遺伝子発現解析結果を参照すると、複数のデータセットにおいて I 型 IFN が C2 および C4A 発現を誘導することがわかった。これらのことから、子宮頸部に移行した IFNT は、子宮頸部上皮細胞に作用して、補体活性化の古典経路を上方制御する可能性は考えられる。

しかし、子宮頸部上皮細胞での C2 および C4A は、いずれも *H2AFZ* に対する相対発現量が低いことから、実際に IFNT が生体子宮頸部において古典経路のトリガーとなり、C3 活性化に寄与するかについては、さらなる検証が必要である。また、C3 転換酵素 C4b2a が細胞内で生成される報告はなく、仮に細胞外で生成されたとしても、子宮頸部上皮細胞内に存在する C3 にどうアクセスするのか検討しなければならない。IFNT が古典経路を介して C3 活性化に寄与するなら

ば、今後、IFNT 感作した子宮頸部上皮細胞、および妊娠ウシ CMM において、C4 活性化による切断産物である C4a の産生量が、それぞれ IFNT 無添加条件で培養した子宮頸部上皮細胞および非妊娠ウシ CMM と比較して増加するか評価する必要がある。

次に、子宮頸部上皮細胞における CTSL による C3 活性化について議論する。妊娠ウシ CMM では、非妊娠ウシと比較して CTSL 発現に増加傾向がみとめられ、活性型 CTSL の産生量が増加した (図 32)。また、IFNT 感作した子宮頸部上皮細胞において、CTSL 発現は IFNT 濃度依存的に増加した (図 33)。これらのことから、妊娠ウシ子宮頸部組織における活性型 CTSL 産生の増加は、子宮頸部に移行した IFNT により誘導されたと考えられた。加えて、免疫染色の結果では、子宮頸部上皮細胞における CTSL および C3 は、共に細胞質に局在した (図 34)。従って、子宮頸部上皮細胞内で発現する CTSL が、同様に細胞質に局在する C3 活性化に寄与する可能性は高い。今後、IFNT に誘導された CTSL がマクロファージの貪食作用を促進することをより決定的に証明するために、IFNT で刺激した子宮頸部上皮細胞とマクロファージを共培養し、CTSL 阻害剤の存在下でファゴサイトーシスアッセイを行う *in vitro* の検証を行う必要がある。

本章では、IFNT が I 型 IFN シグナルを通して子宮頸部で果たす役割を探索することを目的に CMM における網羅的な遺伝子発現解析を行い、妊娠により免疫応答および生体防御に関与する因子の発現が増加することが示された。また、子宮頸部上皮細胞における顕著な C3 の高発現および IFNT による C3 活性化が見出され、この活性化には CTSL の介在が示唆された。これらのことから、着床前胚は IFNT の分泌により、ウイルスおよび細菌いずれに対しても対応できる環境を子宮頸部組織に作りだすと考えられる。

子宮内膜上皮細胞における C3 発現は、子宮頸部上皮細胞と比較して小さかった。IFNT はウシ子宮内膜上皮細胞においてマクロファージ遊走阻止因子 MIF 分泌を促進する[103]。また、CD68 陽性マクロファージは着床前子宮管腔上皮には局在せず、子宮頸部の管腔上皮に局在する [浅岡修論, 2020]。これらのことから、子宮内膜組織ではマクロファージによる貪食は起きにくく、IFNT はこれまで知られているように黄体退行の抑制にはたらくと考えられる。一方、IFNT は

子宮頸部組織上皮細胞に発現する C3 を活性化し、母体免疫細胞による貪食を促進することで、胚の生存を脅かす外来病原体に対する予防線として機能すると考えられる。IFNT の子宮頸部への移行と子宮頸部組織における顕著な C3 発現は、子宮と子宮頸部で免疫細胞の挙動を相反する形に制御している可能性を示しており、このことが胚自身の生存に有益にはたらく合目的なシステムの構築に寄与しているのかもしれない。

一方で、着床前子宮頸部における C3 活性化が、胚の生存にどの程度必要であるのかはさらなる議論の余地がある。上行性感染の防御に子宮頸管が重要な役割を担うとは言え、子宮頸部における C3 が活性化しなければ必ず上行性感染を引き起こすという知見はこれまでにない。従って、IFNT による子宮頸部における C3 活性化は、現段階では必ずしも妊娠の維持に必須ではなく、外界からの脅威に対するリスク回避としての副次的な機能に留まると考えられる。他方、子宮頸部は他組織と比較してウイルスが増殖しやすく、着床前時期は P4 優勢で母体免疫力が低下するにも関わらず、着床後形成される子宮頸管粘液栓による防御手段が確立していない。このような、組織および時期特異的な易感染性の増加は、反芻動物のみに限られた現象ではない。着床前時期における胚由来因子の子宮頸部への移行、ならびに子宮頸部上皮細胞における顕著な C3 発現は、本研究がウシにおいて初めて示した現象であり、今後胚由来 IFN の子宮外組織への移行、ならびに子宮頸部における C3 の活性化が哺乳類において普遍的にみられるか検討する必要がある。

第五章 総括

ウシを含む反芻動物の着床前胚は、種に固有の妊娠認識物質として IFNT と呼ばれるサイトカインを分泌し、黄体の維持に貢献する。一方で、IFNT はウイルス感染に応答する IFNA や IFNB のように I 型 IFN シグナルを活性化するが、妊娠認識の際に IFNT が I 型 IFN として果たす役割は不明であった。機能黄体が存続すると、血中 P4 濃度の増加により母体の免疫力が低下し、着床前時期に腔から子宮内へ向けた細菌およびウイルスの上行性感感染リスクの増加が懸念される。従って、着床前胚は IFNT の分泌により、自身の生存に必須である母体黄体の維持を実現する一方で、自身の生存を脅かす上行性感感染のリスクを増加させることになる。そこで、IFNT の I 型 IFN としての作用が上行性感感染の抑制に貢献するならば、機能黄体の維持と上行性感感染からの防御を両立することができるため、合理的な仕組みである。しかし、胚から分泌された IFNT が上行性感感染防御の要である子宮頸部にまで移行するという報告はこれまでに皆無であり、生体防御としての役割を果たす知見も存在しない。そこで本研究では、IFNT の免疫学的役割を証明することを目的とし、胚から分泌された IFNT が子宮内に留まらず子宮頸部にも移行すること、ならびに IFNT が子宮頸部で生体防御としての役割を有することで上行性感感染に対抗することを仮説として検証した。本章では、本研究の第二章から第四章の内容を総括する。

第二章 子宮頸部におけるインターフェロン α 存在の証明とインターフェロン誘導性遺伝子の発現誘導機構の解析

目的

IFNT は胚から分泌された後、子宮内膜に作用して ISGs 発現を誘導する。このような着床前特異的な ISGs 発現誘導は、これまでに子宮外の生体サンプルである CMM においても明らかになっていた。しかし、IFNT が子宮外組織に存在することを示した報告はなく、CMM における ISGs 発現誘導の機序は不明である。そこで本章では、着床前子宮頸部における ISGs 高発現の機序を明らかにすることを目的とし、IFNT は子宮内に留まるのみではなく、子宮頸部にまで移行し、子宮頸部組織に作用することで ISGs 発現を誘導すると仮説を立てた。この仮説を検証するために、子宮頸部における IFNT の検出を試み、I 型 IFN の主要なシグナル伝達経路である JAK-STAT 経路の活性化状態について検証した。

結果

IFNT の特異抗体を作製し、非妊娠および妊娠ウシ CMM においてウェスタンブロッティングを行ったところ、妊娠ウシ CMM において明瞭な IFNT のバンドがみとめられた。また、妊娠 14、18、および 25 日目における CMM では、IFNT 産生のピークに当たる 18 日目において IFNT 特異的バンドが検出された。このことから、IFNT は子宮頸部にも移行し、その移行は着床直前の妊娠 18 日目近辺に限られていることが示唆された。次に、妊娠および非妊娠 14、18、および 25 日目のウシ CMM において、JAK-STAT 経路関連因子である *STAT1*、*STAT2*、*IRF9*、および *ISG15* の遺伝子発現動態を解析したところ、いずれの遺伝子についても、非妊娠 18 日目と比較して妊娠 18 日目において有意 ($p < 0.05$) に発現が増加し、継時的には妊娠 18 日目を発現のピークとする挙動がみられた。ウェスタンブロッティングによるタンパク質レベルの解析では、JAK-STAT 経路の活性化状態を反映するリン酸化 *STAT1* および *ISG15* の発現が、非妊娠ウシ CMM と比較して妊娠 18 日目 CMM において顕著であった。以上のことから、本研究では胚から分泌された IFNT は子宮内に留まるのではなく、子宮頸部に移行することが初めて示された。また、移行した IFNT は、子宮頸部組織において JAK-STAT 経路を介し ISGs 発現を誘導することが明らかになった。

第三章 子宮内膜および子宮頸部における I 型インターフェロンシグナル調節機構の比較

目的

第二章では、胚から分泌された IFNT は、子宮内のみならず子宮頸部にまで移行していることが示唆された。次に、IFNT の子宮頸部への移行がどのような意義を持つか議論を進めるにあたり、まず子宮頸部組織における IFNT への反応程度を解析する必要がある。そこで第三章では、子宮頸部組織の IFNT に対する応答性を、子宮内膜組織と比較しながら評価することを目的とし、妊娠ウシ由来子宮内膜および子宮頸部組織における IFNT 存在量と I 型 IFN シグナルの活性化状態、および IFNARs 発現を比較解析した。また、IFNT 感作を行った子宮内膜および子宮頸部組織または上皮細胞を用いて、両組織の IFNT 応答性の差異を検討した。

結果

妊娠 20 日目のウシから採取した子宮内膜および子宮頸部組織では、子宮頸部組織と比較して子宮内膜組織で IFNT が顕著に多く検出された。一方で、I 型 IFN シグナルの活性化状態と関連のあるリン酸化 STAT1 の発現は、両組織において同程度発現していた。このことから、子宮頸部組織は、子宮内膜組織と比較して IFNT 存在量が少ないにも関わらず、子宮内膜組織に匹敵する I 型 IFN シグナルを誘導する機構があると考えられた。そこで、着床前の両組織において、IFNAR1 および IFNAR2 発現を解析したところ、いずれも子宮頸部組織において子宮内膜組織よりも顕著に発現していた。また、非妊娠ウシ由来の子宮内膜および子宮頸部組織または上皮細胞における rbIFNT 感作実験の結果、子宮頸部は組織および細胞いずれでも、IFNT に対する応答性が子宮内膜と比較して高いことが示唆された。さらに、I 型 IFN シグナルの抑制因子である

SOCS1、*SOCS2*、および *SOCS3* の IFNT による発現増加は、子宮頸部上皮細胞では *SOCS1* においてのみみとめられ、*SOCS2* および *SOCS3* ではみとめられなかった。このことから子宮頸部組織では、子宮内膜組織で報告されている IFNT による顕著な SOCS 発現が誘導されず、子宮頸部組織と子宮内膜組織における IFNT 応答性の違いを反映していると考えられた。これらの結果は、着床前子宮頸部組織において I 型 IFN シグナルが誘導されることの重要性を示唆しており、子宮頸部に移行した IFNT が I 型 IFN シグナルを介して機能を果たす可能性を支持するものといえる。

第四章 インターフェロン α が子宮頸部で担う役割の検証

目的

第三章では、妊娠認識に直接関与しない子宮頸部は、子宮と比較して IFNT に対する感受性が高い組織であり、子宮内より少量の IFNT から子宮内に匹敵する I 型 IFN シグナルを誘導する機構があることが示唆された。このことから、IFNT は子宮頸部において、I 型 IFN シグナルのアップレギュレーターとして役割を担う可能性が考えられる。しかし、着床前の子宮頸部組織に着目して遺伝子発現プロファイルを明らかにした知見はない。そこで、非妊娠および妊娠ウシ CMM で網羅的な遺伝子発現解析を実施し、子宮頸部に存在する IFNT の免疫学的役割について分析した。また、IFN の負の側面として、マクロファージの貪食能を低下させるはたらきがあることから、細菌による上行性感染に対する脆弱性が懸念される。一方で、補体によるオプソニン化を受けた標的細胞に対しては、IFN 刺激によりむしろ貪食能が促進することも知られている。従って、子宮頸部における細菌感染に対しては IFN と補体双方の機能が重要と推察された。しかし、子宮頸部組織において補体が存在する知見は無く、IFNT が子宮頸部に存在することが、細菌の上

行性感染に対してどのように影響するかも明らかになっていない。そこで、IFNT と補体の関連性に着目し、子宮頸部上皮細胞における補体の発現、ならびに補体活性化への IFNT の関与について検討した。

結果

非妊娠および妊娠ウシ CMM における網羅的な遺伝子発現解析の結果、両群間での発現変動遺伝子は 278 個であり、そのうち 64.7%が IFN により誘導される既知の因子であった。このことから、妊娠による CMM 遺伝子発現プロファイルの変化に I 型 IFN シグナルが大きく関与することが示唆された。また、エンリッチメント解析の結果、免疫応答関連および生体防御関連の GO ターム、ならびに各種ウイルス感染時の応答経路および生体防御関連経路のパスウェイが抽出された。そこで、IFNT による外来ウイルスセンサーのコントロールに対する相対発現量を子宮内膜組織および子宮頸部組織で比較したところ、*DDX58* および *IFIH1* は子宮内膜組織と比較して子宮頸部組織で高い傾向がみとめられ、妊娠ウシでの子宮頸部組織における *DDX58* タンパク質発現は、子宮内膜組織での発現量に匹敵した。これらのことから、着床前子宮頸部はウイルスの上行性感染を防御することが示唆された。さらに、補体活性化の中心因子 C3 は、子宮頸部上皮細胞で恒常的に発現し、IFNT により活性化されることが示唆された。C3 活性化の機序を明らかにすべく、細胞内 C3 の転換酵素として知られる *CTSL* に着目した。*CTSL* は、妊娠ウシ CMM において活性化しており、*in vitro* において *CTSL* 遺伝子発現は IFNT 感作により増加した。このことから、妊娠による C3 活性化に IFNT が関与する可能性が示唆された。従って、胚は IFNT の分泌と子宮頸部上皮細胞に発現する C3 の活用により、子宮頸部組織において着床前時期の上行性感染を防御可能とすることが示唆された。

結論

本研究により、胚から分泌された IFNT は子宮内に留まらず、子宮頸部まで移行し、子宮頸部組織にも作用することが明確に示された。また、ウシ着床前時期の子宮頸部組織は IFNT に対する感受性および応答性に優れていることが示され、IFNT 存在量が顕著に異なるにも関わらず子宮頸部組織の I 型 IFN 活性化状態は、子宮内膜組織に匹敵することが明らかとなった。さらに、子宮頸部組織に移行した IFNT はウイルス感染に対抗する因子の発現増加、ならびに子宮頸部上皮細胞に発現する C3 の活性化に関与することが示された。以上から、IFNT は妊娠認識物質であるだけでなく、着床前子宮頸部で生体防御因子として機能しており、胚は IFNT の分泌により、自身の生存を脅かす上行性感染リスクを低減させることが示唆された。

謝辞

本研究の遂行にあたり、指導教員である北海道大学大学院 国際食資源学院および農学研究院 基盤研究部門 畜産科学分野 遺伝繁殖学研究室 高橋昌志教授には、私が学部生の頃から今日まで、懇切丁寧かつ熱心なご指導をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。また、同研究室で主査を引き受けてくださった川原 学准教授、副査を務めてくださった唄 花子助教にも、日頃より熱心なご指導をいただきましたことを深くお礼申し上げます。また、北海道大学大学院 農学研究院 基盤研究部門 畜産科学分野 畜牧体系学研究室 上田宏一郎教授には、副査として懇切丁寧に指導をしてくださっただけでなく、私が学部生の頃に、実習および実験の際、親身に指導してくださりましたことも併せて、心からお礼申し上げます。また、採材に協力いただいた地方独立行政法人 北海道総合研究機構 酪農試験場の窪 友瑛博士、妊娠ウシ子宮組織を提供してくださった独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 細江美佐博士、林 憲吾博士、および作本亮介博士、ならびに組換え IFNT を提供してくださった岡山大学 大学院環境生命科学研究科 動物生殖生理学ユニット 木村康二教授に、心から感謝の意を表します。また、度重なる採材に快く対応してくださった北海道大学北方生物圏フィールド科学センターのスタッフの皆様、日々ウシの管理をしてくださった畜牧体系学研究室の学生の皆様のご協力がなければ、本研究は決して遂行できませんでした。心から感謝を申し上げます。また、これまでに卒業された先輩、同期、および後輩の方々にも本研究を遂行する上で大変お世話になりました。特に、同期の小松雅也君は、学士から博士までの6年間、分野は違えど共に研究に励み、時に厳しい研究生生活を同じ立場で一緒に乗り越えてくれる友人でいてくれたことに、大変感謝しています。その他、ここには書ききれない先輩、同期、および後輩の方々に、改めて感謝いたします。最後に、ときに厳しく、ときに優しく支援してくださった両親に、心から感謝いたします。

参考文献

- [1] Bazer FW, Thatcher WW. Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F2 α by the uterine endometrium. *Prostaglandins* 1977; 14:397–401.
- [2] Imakawa K, Anthony RV, Kazemi M, Marotti KR, Polites HG, Roberts RM. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophoctoderm. *Nature* 1987; 330:377–379.
- [3] Ealy AD, Yang QE. REVIEW ARTICLE: Control of interferon-tau expression during early pregnancy in ruminants. *Am. J Reprod Immunol* 2009; 61:95–106.
- [4] Vallet JL, Lamming GE. Ovine conceptus secretory proteins and bovine recombinant interferon alpha (1)-1 decrease endometrial oxytocin receptor concentrations in cyclic and progesterone-treated ovariectomized ewes. *J Endocrinol* 1991; 131:475–482.
- [5] Spencer TE, Bazer FW. Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. *Endocrinology* 1996; 137:1144–1147.
- [6] Banu SK, Lee J, Stephen SD, Nithy TK, Arosh JA. Interferon tau regulates PGF2 α release from the ovine endometrial epithelial cells via activation of novel JAK/EGFR/ERK/EGR-1 pathways. *Mol Endocrinol* 2010; 24:2315–2330.
- [7] Danet-Desnoyers G, Wetzels C, Thatcher WW. Natural and recombinant bovine interferon tau regulate basal and oxytocin-induced secretion of prostaglandins F2 α and E2 by epithelial cells and stromal cells in the endometrium. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6:193–202.
- [8] Cross JC, Farin CE, Sharif SF, Roberts RM. Characterization of the antiviral activity constitutively produced by murine conceptuses: Absence of placental mrnas for interferon alpha and beta. *Mol Reprod Dev* 1990; 26:122–128.

- [9] Cross JC, Michael Roberts R. Porcine conceptuses secrete an interferon during the preattachment period of early pregnancy. *Biol Reprod* 1989; 40:1109–1118.
- [10] Cochet M, Vaiman D, Lefèvre F. Novel interferon delta genes in mammals: Cloning of one gene from the sheep, two genes expressed by the horse conceptus and discovery of related sequences in several taxa by genomic database screening. *Gene* 2009; 433:88–99.
- [11] Müller U, Steinhoff U, Reis LFL, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 1994; 264:1918–1921.
- [12] Meraz MA, White JM, Sheehan KCF, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D, Carver-Moore K, DuBois RN, et al. Targeted disruption of the stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK–STAT signaling pathway. *Cell* 1996; 84:431–442.
- [13] Johnson JA, Hochkeppel HK, Gangemi JD. IFN- τ exhibits potent suppression of human papillomavirus E6/E7 oncoprotein expression. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19:1107–1116.
- [14] Kohara J, Nishikura Y, Konnai S, Tajima M, Onuma M. Effects of interferon- τ on cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Jpn J Vet Res* 2012; 60 (2–3):63–70.
- [15] Mathew DJ, Sánchez JM, Passaro C, Charpigny G, Behura SK, Spencer TE, Lonergan P. Interferon tau-dependent and independent effects of the bovine conceptus on the endometrial transcriptome. *Biol Reprod* 2019; 100:365–380.
- [16] Sheldon IM, Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci* 2004; 82–83:295–306.
- [17] Lazear HM, Govero J, Smith AM, Platt DJ, Fernandez E, Miner JJ, Diamond MS. A mouse model of Zika virus pathogenesis. *Cell Host Microbe* 2016; 19:720–730.
- [18] Dowall SD, Graham VA, Rayner E, Atkinson B, Hall G, Watson RJ, Bosworth A, Bonney LC, Kitchen S, Hewson R. A Susceptible mouse model for Zika virus infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10:e0004658.

- [19] Yockey LJ, Varela L, Rakib T, Khoury-Hanold W, Fink SL, Stutz B, Szigeti-Buck K, Van den Pol A, Lindenbach BD, Horvath TL, Iwasaki A. Vaginal exposure to Zika virus during pregnancy leads to fetal brain infection. *Cell* 2016; 166:1247-1256.e4.
- [20] Yang B, Li Y, Bogado Pascottini O, Xie J, Wei R, Opsomer G, Nauwynck H. Primary replication and invasion of the bovine gammaherpesvirus BoHV-4 in the genital mucosae. *Vet Res* 2017; 48.
- [21] Kit S, Kit M, McConnell S. Intramuscular and intravaginal vaccination of pregnant cows with thymidine kinase-negative, temperature-resistant infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpes virus 1). *Vaccine* 1986; 4:55–61.
- [22] Bicalho MLS, Santin T, Rodrigues MX, Marques CE, Lima SF, Bicalho RC. Dynamics of the microbiota found in the vaginas of dairy cows during the transition period: Associations with uterine diseases and reproductive outcome. *J Dairy Sci* 2017; 100:3043–3058.
- [23] Moore SG, Ericsson AC, Pooch SE, Melendez P, Lucy MC. Hot topic: 16S rRNA gene sequencing reveals the microbiome of the virgin and pregnant bovine uterus. *J Dairy Sci* 2017; 100:4953–4960.
- [24] Karstrup CC, Klitgaard K, Jensen TK, Agerholm JS, Pedersen HG. Presence of bacteria in the endometrium and placentomes of pregnant cows. *Theriogenology* 2017; 99:41–47.
- [25] Lúcio ÉC, Barros MR, Mota RA, de Cássia Carvalho Maia R, Pinheiro JW. Identification of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* virulence genes in cervical mucus from cows. *Braz J Microbiol* 2019; 50:1133–1137.
- [26] Dadarwal D, Palmer C, Griebel P. Mucosal immunity of the postpartum bovine genital tract. *Theriogenology* 2017; 104:62–71.
- [27] Fung KY, Mangan NE, Cumming H, Horvat JC, Mayall JR, Stifter SA, Weerd ND, Roisman LC, Rossjohn J, Robertson SA, Schjenken JE, Parker B, et al. Interferon- ϵ protects the female reproductive tract from viral and bacterial infection. *Science* 2013; 339:1088–1092.

- [28] Rao KSPB, Roberts TK, Masson PL, Heremans JF. Lactoferrin, a major soluble protein of bovine oestrous cervical mucus. *Reproduction* 1973; 32:89–92.
- [29] Lee D-C, Hassan SS, Romero R, Tarca AL, Bhatti G, Gervasi MT, Caruso JA, Stemmer PM, Kim CJ, Hansen LK, Becher N, Uldbjerg N. Protein profiling underscores immunological functions of uterine cervical mucus plug in human pregnancy. *J Proteomics* 2011; 74:817–828.
- [30] Hein M, Helmig RB, Schönheyder HC, Ganz T, Uldbjerg N. An in vitro study of antibacterial properties of the cervical mucus plug in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185:586–592.
- [31] Loux SC, Scoggin KE, Troedsson MHT, Squires EL, Ball BA. Characterization of the cervical mucus plug in mares. *Reproduction* 2017; 153:197–210.
- [32] Hein M, Petersen AC, Helmig RB, Uldbjerg N, Reinholdt J. Immunoglobulin levels and phagocytes in the cervical mucus plug at term of pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005; 84:734–742.
- [33] Lacroix G, Gouyer V, Gottrand F, Desseyn J-L. The Cervicovaginal mucus barrier. *Int J Mol Sci* 2020; 21:8266.
- [34] Racicot K, Cardenas I, Wünsche V, Aldo P, Guller S, Means RE, Romero R, Mor G. Viral infection of the pregnant cervix predisposes to ascending bacterial infection. *J Immunol* 2013; 191:934–941.
- [35] Del Vecchio RP, Matsas DJ, Fortin S, Sponenberg DP, Lewis GS. Spontaneous uterine infections are associated with elevated prostaglandin F₂ α metabolite concentrations in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 1994; 41:413–421.
- [36] Ramadan AA, Johnson GL, Lewis GS. Regulation of uterine immune function during the estrous cycle and in response to infectious bacteria in sheep. *J Anim Sci* 1997; 75:1621.
- [37] Seals RC, Wulster-Radcliffe MC, Lewis GS. Uterine Response to Infectious bacteria in estrous cyclic ewes. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49:269–278.
- [38] Wulster-Radcliffe MC, Seals RC, Lewis GS. Progesterone increases susceptibility of gilts to uterine infections after intrauterine inoculation with infectious bacteria. *J Anim Sci* 2003; 81:1242–1252.

- [39] Su L, Sun Y, Ma F, Lü P, Huang H, Zhou J. Progesterone inhibits Toll-like receptor 4-mediated innate immune response in macrophages by suppressing NF- κ B activation and enhancing SOCS1 expression. *Immunol Lett* 2009; 125:151–155.
- [40] Sun Y, Cai J, Ma F, Lü P, Huang H, Zhou J. miR-155 mediates suppressive effect of progesterone on TLR3, TLR4-triggered immune response. *Immunol Lett* 2012; 146:25–30.
- [41] Hall OJ, Klein SL. Progesterone-based compounds affect immune responses and susceptibility to infections at diverse mucosal sites. *Mucosal Immunol* 2017; 10:1097–1107.
- [42] Oren-Benaroya R, Kipnis J, Eisenbach M. Phagocytosis of human post-capacitated spermatozoa by macrophages. *Hum Reprod* 2007; 22:2947–2955.
- [43] Bedford JM. Effect of environment on phagocytosis of rabbit spermatozoa. *Reproduction* 1965; 9:249–256.
- [44] Mattner PE. Phagocytosis of spermatozoa by leucocytes in bovine cervical mucus in vitro. *Reproduction* 1969; 20:133–134.
- [45] Sips M, Krykbaeva M, Diefenbach TJ, Ghebremichael M, Bowman BA, Dugast A-S, Boesch AW, Streeck H, Kwon DS, Ackerman ME, Suscovich TJ, Brouckaert P, et al. Fc receptor-mediated phagocytosis in tissues as a potent mechanism for preventive and therapeutic HIV vaccine strategies. *Mucosal Immunol* 2016; 9:1584–1595.
- [46] Uzé G, Lutfalla G, Mogensen KE. α and β interferons and their receptor and their friends and relations. *J Interferon Cytokine Res* 1995; 15:3–26.
- [47] William M. Schneider, Meike Dittmann Chevillotte, Charles M. Rice. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* 2014; 32:513–545.
- [48] Li J, Roberts RM. Interferon-tau and interferon-alpha interact with the same receptors in bovine endometrium. Use of a readily iodinated form of recombinant interferon-tau for binding studies. *J Biol Chem* 1994; 269:13544–13550.

- [49] Binelli M, Subramaniam P, Diaz T, Johnson GA, Hansen TR, Badinga L, Thatcher WW. Bovine Interferon- τ stimulates the janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway in bovine endometrial epithelial cells. *Biol Reprod* 2001; 64:654–665
- [50] Oliveira JF, Henkes LE, Ashley RL, Purcell SH, Smirnova NP, Veeramachaneni DNR, Anthony RV, Hansen TR. Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN-tau release from the uterine vein. *Endocrinology* 2008; 149:1252–1259.
- [51] Meyerholz MM, Mense K, Knaack H, Sandra O, Schmicke M. Pregnancy-induced ISG-15 and MX-1 gene expression is detected in the liver of holstein–friesian heifers during late peri-implantation period. *Reprod Domest Anim* 2016; 51:175–177.
- [52] Alak I, Hitit M, Kose M, Kaya MS, Ucar EH, Atli Z, Atli MO. Relative abundance and localization of interferon-stimulated gene 15 mRNA transcript in intra- and extra-uterine tissues during the early stages of pregnancy in sheep. *Anim Reprod Sci* 2020; 216:106347.
- [53] Yang L, Liu B, Yan X, Zhang L, Gao F, Liu Z. Expression of ISG15 in bone marrow during early pregnancy in ewes. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2017; 23:767–772.
- [54] Kunii H, Koyama K, Ito T, Suzuki T, Balboula AZ, Shirozu T, Bai H, Nagano M, Kawahara M, Takahashi M. Hot topic: Pregnancy-induced expression of interferon-stimulated genes in the cervical and vaginal mucosal membranes. *J Dairy Sci* 2018; 101:8396–8400.
- [55] Talukder MAS, Balboula AZ, Shirozu T, Kim SW, Kunii H, Suzuki T, Ito T, Kimura K, Takahashi M. Activation of lysosomal cathepsins in pregnant bovine leukocytes. *Reproduction* 2018; 155:515–528.
- [56] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001; 25:402–408.

- [57] Roberts RM, Leaman DW, Cross JC. Role of interferons in maternal recognition of pregnancy in ruminants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; 200:7–18.
- [58] Helmer SD, Hansen PJ, Thatcher WW. Differential glycosylation of the components of the bovine trophoblast protein-1 complex. *Molec Cell Endocr* 1988; 58:103–107.
- [59] Bazer FW, Spencer TE, Ott TL. Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37:412–420.
- [60] Farin CE, Imakawa K, Hansen TR, McDonnell JJ, Murphy CN, Farin PW, Roberts RM. Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. *Biol Reprod* 1990; 43:210–218.
- [61] Rosenfeld CS, Han C-S, Alexenko AP, Spencer TE, Roberts RM. Expression of interferon receptor subunits, IFNAR1 and IFNAR2, in the ovine uterus. *Biol Reprod* 2002; 67:847–853.
- [62] Shirozu T, Iwano H, Ogiso T, Suzuki T, Balboula AZ, Bai H, Kawahara M, Kimura K, Takahashi H, Rulan B, Kim S, Yanagawa Y, et al. Estrous cycle stage-dependent manner of type I interferon-stimulated genes induction in the bovine endometrium. *J Reprod Dev* 2017; 63:211–220.
- [63] Fenner JE, Starr R, Cornish AL, Zhang J, Metcalf D, Schreiber RD, Sheehan K, Hilton DJ, Alexander WS, Hertzog PJ. Suppressor of cytokine signaling 1 regulates the immune response to infection by a unique inhibition of type I interferon activity. *Nat Immunol* 2006; 7:33–39.
- [64] Harada H, Fujita T, Miyamoto M, Kimura Y, Maruyama M, Furia A, Miyata T, Taniguchi T. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* 1989; 58:729–739.
- [65] Carvalho AV, Reinaud P, Forde N, Healey GD, Eozenou C, Giraud-Delville C, Mansouri-Attia N, Gall L, Richard C, Lonergan P, Sheldon IM, Lea RG, et al. SOCS genes expression during physiological and perturbed implantation in bovine endometrium. *Reproduction* 2014; 148:545–557.
- [66] Sandra O, Bataillon I, Roux P, Martal J, Charpigny G, Reinaud P, Bolifraud P, Germain G, Al-Gubory KH. Suppressor of cytokine signalling (SOCS) genes are expressed in the endometrium and

- regulated by conceptus signals during early pregnancy in the ewe. *J Mol Endocrinol* 2005; 34:637–644.
- [67] Ireland JJ, Murphee RL, Coulson PB. Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *J Dairy Sci* 1980; 63:155–160.
- [68] Shirozu T, Iwano H, Ogiso T, Suzuki T, Balboula AZ, Bai H, Kawahara M, Kimura K, Takahashi H, Rulan B, Kim S, Yanagawa Y, et al. Estrous cycle stage-dependent manner of type I interferon-stimulated genes induction in the bovine endometrium. *J Reprod Dev* 2017; 63:211–220.
- [69] Jang H, Choi Y, Yoo I, Han J, Kim M, Ka H. Characterization of interferon α and β receptor IFNAR1 and IFNAR2 expression and regulation in the uterine endometrium during the estrous cycle and pregnancy in pigs. *Theriogenology* 2017; 88:166–173.
- [70] Fleming J, Choi Y, Johnson GA, Spencer TE, Bazer FW. Cloning of the ovine estrogen receptor- α promoter and functional regulation by ovine Interferon- τ . *endocrinology* 2001; 142:2879–2887.
- [71] Spencer TE, Ott TL, Bazer FW. Expression of interferon regulatory factors one and two in the ovine endometrium: Effects of pregnancy and ovine interferon tau. *Biol Reprod* 1998; 58:1154–1162.
- [72] Constantinescu SN, Croze E, Wang C, Murti A, Basu L, Mullersman JE, Pfeffer LM. Role of interferon alpha/beta receptor chain 1 in the structure and transmembrane signaling of the interferon alpha/beta receptor complex. *PNAS* 1994; 91:9602–9606.
- [73] Suresh Kumar KG, Tang W, Ravindranath AK, Clark WA, Croze E, Fuchs SY. SCFHOS ubiquitin ligase mediates the ligand-induced down-regulation of the interferon- α receptor. *EMBO J* 2003; 22:5480–5490.
- [74] Niewold TB. Type I interferon in human autoimmunity. *Front. immunol* 2014; 5:306.
- [75] Crow MK, Olferviev M, Kirou KA. Type I interferons in autoimmune disease. *Annu Rev Pathol* 2019; 14:369–393.

- [76] Shirasuna K, Matsumoto H, Kobayashi E, Nitta A, Haneda S, Matsui M, Kawashima C, Kida K, Shimizu T, Miyamoto A. Upregulation of interferon-stimulated genes and interleukin-10 in peripheral blood immune cells during early pregnancy in dairy cows. *J Reprod Dev* 2012; 58:84–90.
- [77] Lewis GS. Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:117.
- [78] 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, et al. Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: How soon does the cow know she is pregnant? *Biol Reprod* 2011; 85:144–156.
- [79] Moraes JGN, Behura SK, Geary TW, Hansen PJ, Neibergs HL, Spencer TE. Uterine influences on conceptus development in fertility-classified animals. *PNAS* 2018; 115:E1749–E1758.
- [80] Decker T, Müller M, Stockinger S. The Yin and Yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:675–687.
- [81] Trinchieri G. Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med* 2010; 207:2053–2063.
- [82] Nagarajan UM, Prantner D, Sikes JD, Andrews CW, Goodwin AM, Nagarajan S, Darville T. Type I interferon signaling exacerbates chlamydia muridarum genital infection in a murine model. *Infect Immun* 2008; 76:4642–4648.
- [83] Lückoff A, Caramoy A, Scholz R, Prinz M, Kalinke U, Langmann T. Interferon-beta signaling in retinal mononuclear phagocytes attenuates pathological neovascularization. *EMBO Mol Med* 2016; 8:670–678.
- [84] Yuan Y, Liu S, Zhao Y, Lian L, Lian Z. Interferon- γ acts as a regulator in the trade-off between phagocytosis and production performance in dwarf chickens. *J Anim Sci Biotechnol* 2018; 9:40.

- [85] Hara K, Shirasuna K, Usui F, Karasawa T, Mizushima Y, Kimura H, Kawashima A, Ohkuchi A, Matsuyama S, Kimura K, Takahashi M. Interferon-tau attenuates uptake of nanoparticles and secretion of interleukin-1 β in macrophages. *PLoS One* 2014; 9:e113974.
- [86] Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ. Fourth component of human complement: description of a three polypeptide chain structure. *J Exp Med* 1974; 140:1324–1335.
- [87] Müller-Eberhard HJ, Polley MJ, Calcott MA. Formation and functional significance of a molecular complex derived from the second and the fourth component of human complement. *J Exp Med* 1967; 125:359–380.
- [88] Shin HS, Smith MR, Wood WB Jr. Heat labile opsonins to pneumococcus: II. Involvement of C3 and C5. *J Exp Med* 1969; 130:1229–1241.
- [89] Wu K-Y, Zhang T, Zhao G-X, Ma N, Zhao S-J, Wang N, Wang J-X, Li Z-F, Zhou W, Li K. The C3a/C3aR axis mediates anti-inflammatory activity and protects against uropathogenic E coli–induced kidney injury in mice. *Kidney Int* 2019; 96:612–627.
- [90] Wang Z, Zhou S, Sun C, Lei T, Peng J, Li W, Ding P, Lu J, Zhao Y. Interferon- γ inhibits nonopsonized phagocytosis of macrophages via an mTORC1-c/EBP β Pathway. *J Innate Immun* 2015; 7:165–176.
- [91] Liszewski MK, Kolev M, Le Friec G, Leung M, Bertram PG, Fara AF, Subias M, Pickering MC, Drouet C, Meri S, Arstila TP, Pekkarinen PT, et al. Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunity* 2013; 39:1143–1157.
- [92] Mommert S, Doenni L, Szudybill P, Zoeller C, Beyer FH, Werfel T. C3a and its receptor C3aR are detectable in normal human epidermal keratinocytes and are differentially regulated via TLR3 and LL37. *J Innate Immun* 2021; 13:164–178.
- [93] Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 2018; 34:i884–i890.

- [94] Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 2013; 29:15–21.
- [95] Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010; 26:139–140.
- [96] Yu G, Wang L, Han Y, He Q. clusterProfiler: An R Package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS J Integr Biol* 2012; 16:284–287.
- [97] Mamo S, Mehta JP, Forde N, McGettigan P, Lonergan P. Conceptus-endometrium crosstalk during maternal recognition of pregnancy in cattle. *Biol Reprod* 2012; 87:6, 1–9.
- [98] Sánchez JM, Mathew DJ, Behura SK, Passaro C, Charpigny G, Butler ST, Spencer TE, Lonergan P. Bovine endometrium responds differentially to age-matched short and long conceptuses. *Biol Reprod* 2019; 101:26–39.
- [99] Passaro C, Tutt D, Mathew DJ, Sanchez JM, Browne JA, Boe-Hansen GB, Fair T, Lonergan P. Blastocyst-induced changes in the bovine endometrial transcriptome. *Reproduction* 2018; 156:219–229.
- [100] Feucht HE, Zwirner J, Bevec D, Lang M, Felber E, Riethmüller G, Weiss EH. Biosynthesis of complement C4 messenger RNA in normal human kidney. *Nephron* 1989; 53:338–342.
- [101] Zhou W, Duncan Campbell R, Martin J, Sacks SH. Interferon- γ regulation of C4 gene expression in cultured human glomerular epithelial cells. *Eur J Immunol* 1993; 23:2477–2481.
- [102] Gerritsma JSJ, Gerritsen AF, De Ley M, van Es LA, Daha MR. Interferon- γ induces biosynthesis of complement components C2, C4 and factor H by human proximal tubular epithelial cells. *Cytokine* 1997; 9:276–283.
- [103] Wang B, Goff AK. Interferon- τ stimulates secretion of macrophage migration inhibitory factor from bovine endometrial epithelial cells. *Biol Reprod* 2003; 69:1690–1696.

付表

RBC Lysis Buffer (10×)

試薬	容量
NH ₄ Cl	8.26 g
NaHCO ₃	1.19 g
EDTA ₂ Na	0.0378 g
MilliQ water	100 mL

pH 7.4 に調製後滅菌し、4°C で保存した。使用時は 10 倍希釈した。

PBS (-)

試薬	容量
KCl	0.10 g
KH ₂ PO ₄	0.10 g
NA ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	1.45 g
NaCl	4.00 g
MilliQ water	500 mL

滅菌後、4°C で保存した。

泳動バッファー (10×)

試薬	容量
Tris	30.3 g
Glycine	144 g
SDS	10 g
MilliQ water	1000 mL

室温で保存し、使用時は 10 倍に希釈した。

TBST (pH 7.4)

試薬	容量
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Tris	3 g
MilliQ water	1000 mL

pH 7.4 に調製後、1 mL の Tween 20 を添加し、室温で保存した。

4% PFA

試薬	容量
PFA	0.2 g
PBS (-)	5 mL

作製後、4°C で保存した。

0.2% PBST

試薬	容量
Triton X-100	20 μ L
PBS (-)	10 mL

作製後、4°C で保存した。

1% BSA 溶液

試薬	容量
BSA	0.1 g
PBST	10 mL

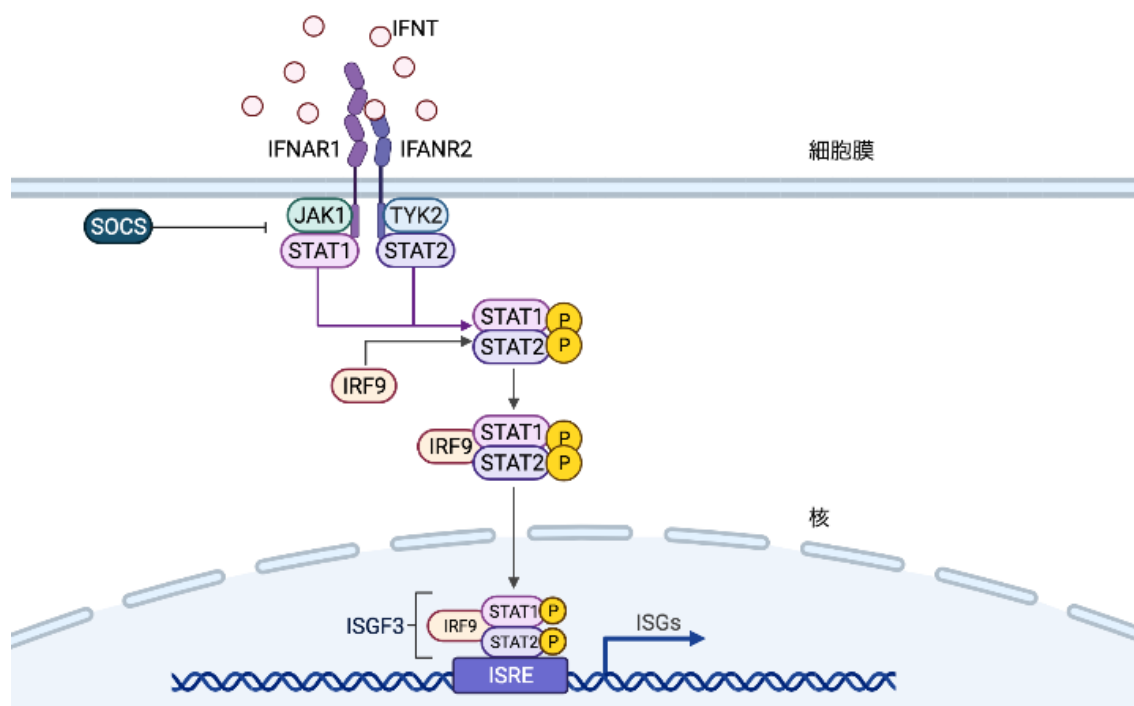
作製後、4°C で保存した。

5% FBS 含有 DMEM

試薬	容量
ペニシリン G カリウム	0.06 g
ストレプトマイシン硫酸塩	0.1 g
DMEM	475 mL
非働化済み FBS	25 mL

クリーンベンチ内で濾過滅菌後、4°C で保存した。

付図 JAK-STAT 経路による I 型 IFN シグナル伝達



BioRender (<https://biorender.com/>) により作成