

主論文の要約

Mechanism of endometrial regeneration in cattle

(ウシにおける子宮内膜再生機序に関する研究)

名古屋大学大学院生命農学研究科

生命技術科学専攻

生物生産技術科学講座

動物生産科学研究室

舘林 亮輝

2021年3月

【第1章：序論】

世界の飢餓人口は2014年より年々増加しており、この状況を改善するためには、効率的な食料供給のシステムと食料生産技術の開発が必要である。畜産物は栄養価が高く必須アミノ酸の重要な供給源である。そのため、ウシは牛肉と牛乳を生産する重要な家畜であり、今後これらの畜産物消費の増大がFAOにより推定されている。この畜産物需要の増大に対応するためには、牛肉や牛乳の生産性を向上させる必要がある一方で、現在、ウシの分娩間隔は延長し、生産性は低下する傾向にある。今後、効率的なウシの畜産物生産に向けて、この分娩間隔を短縮させることは重要な課題の一つになっている。

子宮は、胚の着床と胚、胎子の成長に欠かせない臓器である。ウシにおいては、受精後、胚は卵管から子宮に移動し、子宮内で伸長する。この胚の伸長は子宮内膜から分泌される子宮乳により制御されている。ウシにおいて、胚移植時の不受胎の主な原因の一つが早期胚死滅であること(Gustafsson and Larsson, 1985)、またウシの子宮内腔液におけるタンパク質組成の違いと胚の品質の違いとの間に関係が見られたという過去の報告より(Beltman et al., 2014)、子宮機能の悪化が不受胎の一因となっていることが考えられる。一般的に、経産牛は未経産牛と比べ、低い受胎率を示すことが知られている(Chebel et al., 2008; Sasaki et al., 2016)。分娩時には胎子の娩出とともに胎盤が剥離して子宮は大きく損傷を受ける一方で、その後速やかに子宮内膜が再生されて子宮の修復がおこる。分娩後の子宮内膜再生は受胎性回復のために必要な過程であることから、経産牛における低い受胎率は分娩時の子宮内膜再生に不具合により、その後の子宮機能が悪化して受胎性が低下するために引き起こされる可能性が考えられる。また、ヒトの不妊治療の一環として子宮内膜スクラッチ法が行われており、子宮内膜を傷つけることで受胎性の改善が報告されている(Nastri et al., 2013; Olesen et al., 2019)。また、ウシにおいては低受胎を改善する目的でポビドンヨードの子宮内投与が行われているが、ポビドンヨードの子宮内投与は子宮内膜上皮の剥離を引き起こし、その後、子宮内膜が再生することが報告されている(Yoshida et al., 2020)。これらのことから、子宮内膜再生のクオリティがその後の受胎性に影響を及ぼす可能性がある。そこで、本研究ではウシの子宮内膜再生機序の解明を目的として研究を行った。

【第2章：ウシ子宮内膜幹細胞・前駆細胞の存在】

現在、多分化能を持つ組織幹細胞が様々な組織中に存在しており、組織の恒常性維持に必須であることが知られている。ヒトの子宮内膜においても子宮内膜幹細胞が存在し、子宮内膜再生に関わっていることが報告されている(Masuda et al., 2010)。そのため、ウシにおいても子宮内膜幹細胞が存在し、子宮内膜再生に関与している可能性がある。そこで第2章では、この可能性を検討するため、まずは幹細胞能を持つことが報告されている side population (SP) 細胞のウシ子宮内膜における存在とその細胞の特徴を検討した。ウシ子宮内膜細胞をHoechst33342で染色し、フローサイトメトリー解析に供したところSP細胞がウシ子宮内膜に存在することを確認した。ウシ子宮内膜細胞からSP細胞を単離し、培養実

験を行ったところ、SP 細胞は脂肪細胞、骨芽細胞、上皮細胞に分化する多分化能を有することが示された。また RNA-seq 解析により、SP 細胞の mRNA 発現パターンはその他の子宮内膜細胞である main population 細胞とは異なっていることが明らかとなった。SP 細胞で有意に高発現であった遺伝子による Gene ontology (GO) 解析では、RNA 代謝に関わる機能が検出された。また、SP 細胞で有意に高発現であった遺伝子の KEGG pathway 解析では、幹細胞および前駆細胞に関わるようなシグナリング経路が検出された。これらのことから、ウシ子宮内膜 SP 細胞が組織幹細胞・前駆細胞様な特徴を有していることが明らかとなった。また、この SP 解析が子宮内膜幹細胞・前駆細胞に関わる機序の解明に有用であることが示された。

【第3章：分娩後の子宮内膜再生時におけるウシ子宮内膜幹細胞・前駆細胞の変遷】

第3章では、分娩後のウシ子宮内膜再生機序の解明に向けて、分娩後の子宮内膜 SP 細胞の変遷および子宮内膜の遺伝子発現変化を検討した。分娩後 9-11、29-32、49-52、99-101 日目にバイオプシー鉗子を用いてウシ子宮内膜を採取し、SP 解析とマイクロアレイ解析に用いた。生細胞中の SP 細胞割合は分娩後 9-11 日目に最も低い値を示し、その後、時間経過とともに増加した。分娩後 9-11 日と比較して、29-32 日目に発現が有意に減少した遺伝子における GO 解析では、炎症や免疫に関わる機能が検出された。このことから、分娩後 9-11 日目において子宮内膜は分娩時の損傷による炎症状態であることが考えられた。また、分娩後 49-52 日目と 99-101 日目間で発現が変動した遺伝子数は 23 遺伝子で、49-52 日より前と比べると少なかったことから、分娩後 49-52 日目までには子宮内膜再生が完了することが推察された。マウスにおいて、分娩後 1 日目に子宮内膜幹細胞様細胞が一時的に増殖し、その後分娩後 7 日目から 21 日目まで減少することが報告されている (Cao et al., 2015)。さらに、子宮内膜幹細胞様細胞が分娩後に子宮内膜上皮細胞へ分化することが報告されている (Huang et al., 2012)。これらの報告に加えて、第2章で示したとおり、ウシ子宮内膜 SP 細胞が上皮細胞への分化能を有することを考慮すると、分娩後の一時的な SP 細胞割合の減少は、分娩時の子宮内膜損傷により子宮内膜幹細胞・前駆細胞の新しい子宮内膜細胞への分化により生じた可能性が考えられた。

【第4章：ポピドンヨード子宮内投与後の子宮内膜再生時におけるウシ子宮内膜幹細胞・前駆細胞の変遷】

低受胎傾向のウシにおいて、ポピドンヨードの子宮内注入は子宮内膜上皮を剥離させるとともに局所的な炎症を誘発し、その後の受胎率を改善することが報告されている (Yoshida et al., 2020)。詳細なメカニズムは明らかでないが、第3章では、子宮内膜幹細胞/前駆細胞が分娩後の子宮内膜再生に関与することを示唆しており、ウシ子宮内膜幹/前駆細胞は、ポピドンヨード投与後の子宮内膜再生に寄与する可能性が考えられる。すなわち、ポピドンヨード投与後の子宮内膜再生機序は分娩後の機序と同様である可能性が考えられるため、第4

章では、ポビドンヨードのウシ子宮内投与が子宮内膜 SP 細胞の変遷および子宮内膜の遺伝子発現変化にもたらす影響を検討し、第 3 章の分娩後の結果と比較、検討した。ポビドンヨードの投与日を 0 日とし、0(投与前)、投与後 2, 7, 14 日目にウシ子宮内膜組織を採取し、SP 解析およびマイクロアレイ解析を行った。生細胞中の SP 細胞の割合には実験期間を通して有意な変化は見られなかった。この結果からポビドンヨードの投与後の子宮内膜再生過程においてはウシ子宮内膜幹細胞・前駆細胞は動員されないことが示唆された。0 日目と 2 日目の間で発現が上昇した遺伝子の GO 解析では炎症や免疫に関わる機能が検出され、それらの機能は 7 日目と 14 日目の間で発現が減少した遺伝子の GO 解析でも検出された。また、血管発達に関わる機能は 0 日目と 2 日目の間、2 日目と 7 日目の間で発現が上昇した遺伝子の GO 解析により検出され、細胞増殖に関わる機能は 7 日目と 14 日目の間で発現が上昇した遺伝子で検出されたものの、どの期間においても発現が減少した遺伝子の GO 解析では検出されなかった。これらの結果から、ポビドンヨードの子宮内投与により子宮内膜の炎症が誘導されるものの、その炎症は 14 日目までに回復すること、またそのほかの損傷治癒過程は 14 日目において進行中であることが示唆された。またポビドンヨード投与後と分娩後の子宮内膜で共通して発現が変化した遺伝子を検討したところ、どの期間の比較においても共通して変化した遺伝子は非常に少なかった。したがって、ポビドンヨード投与後と分娩後には異なった子宮内膜再生機序があることが示唆された。ポビドンヨード投与時には剥離した子宮内膜上皮は約 2 日で再生されるが (Yoshida et al., 2020)、分娩後は約 23 日経過した後も上皮に覆われていない部分が存在することが報告されている (Okano and Fukuhara, 1980)。これらのことから、分娩後の子宮内膜が、ポビドンヨードと比較して激しく損傷していることが考えられる。そのため、分娩後とポビドンヨード投与時における損傷度の違いが、異なった子宮内膜における SP 細胞割合変化の原因となっている可能性が考えられた。

【第 5 章：考察および結論】

以上本研究により、多分化能および幹細胞・前駆細胞様な遺伝子発現を持った SP 細胞がウシ子宮内膜に存在し、子宮内膜幹細胞・前駆細胞が分娩後の子宮内膜再生に関与することが示唆された。一方で、ポビドンヨード子宮内投与後の子宮内膜再生時には子宮内膜幹細胞・前駆細胞は動員されない可能性が考えられ、分娩後とは異なった子宮内膜再生機序が存在することが考えられた。本研究では、ウシの子宮内膜再生機序に対する子宮内膜幹細胞の役割の一端を明らかにした。この研究の成果は基礎的な知見として、ウシ子宮内膜幹細胞をターゲットとした分娩後の子宮内膜再生の促進技術や低受胎の予防、改善手法の確立に貢献でき、その後のウシの分娩間隔の短縮および生産性の向上に資すると考えられる。

【引用文献】

- Beltman, M. E., M. P. Mullen, G. Elia, M. Hilliard, M. G. Diskin, A. C. Evans, and M. A. Crowe. 2014. "Global Proteomic Characterization of Uterine Histotroph Recovered from Beef Heifers Yielding Good Quality and Degenerate Day 7 Embryos." *Domestic Animal Endocrinology* 46(1):49–57.
- Cao, Mingzhu, Rachel W. S. Chan, and William S. B. Yeung. 2015. "Label-Retaining Stromal Cells in Mouse Endometrium Awaken for Expansion and Repair after Parturition." *Stem Cells and Development* 24(6):768–80.
- Chebel, R. C., D. G. B. Demétrio, and J. Metzger. 2008. "Factors Affecting Success of Embryo Collection and Transfer in Large Dairy Herds." *Theriogenology* 69(1):98–106.
- Gustafsson, H. and K. Larsson. 1985. "Embryonic Mortality in Heifers after Artificial Insemination and Embryo Transfer: Differences between Virgin and Repeat Breeder Heifers." *Research in Veterinary Science* 39(3):271–74.
- Huang C-C, Orvis GD, Wang Y, Behringer RR. Stromal-to-epithelial transition during postpartum endometrial regeneration. *PLoS One* 2012; 7:e44285.
- Masuda, Hiroataka, Yumi Matsuzaki, Emi Hiratsu, Masanori Ono, Takashi Nagashima, Takashi Kajitani, Toru Arase, Hideyuki Oda, Hiroshi Uchida, Hironori Asada, Mamoru Ito, Yasunori Yoshimura, Tetsuo Maruyama, and Hideyuki Okano. 2010. "Stem Cell-like Properties of the Endometrial Side Population: Implication in Endometrial Regeneration" edited by M. Tena-Sempere. *PLoS ONE* 5(4):e10387.
- Nastri, C. O., R. A. Ferriani, N. Raine-Fenning, and W. P. Martins. 2013. "Endometrial Scratching Performed in the Non-Transfer Cycle and Outcome of Assisted Reproduction: A Randomized Controlled Trial." *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 42(4):375-382.
- Okano, Akira and Riichi Fukuhara. 1980. "Histological Studies on Postpartal Uterine Involution in Japanese Black Cows." *Jpn. J. Zootech. Sci.* 51(4):284–92.
- Olesen, Mia Steengaard, Benedicte Hauge, Lisbeth Ohrt, Tine Nørregaard Olesen, Janne Roskær, Vibeke Bæk, Helle Olesen Elbæk, Bugge Nøhr, Mette Nyegaard, Michael Toft Overgaard, Peter Humaidan, Axel Forman, and Inge Agerholm. 2019. "Therapeutic Endometrial Scratching and Implantation after in Vitro Fertilization: A Multicenter Randomized Controlled Trial." *Fertility and Sterility* 112(6):1015–21.
- Sasaki, Yosuke, Mizuho Uematsu, Go Kitahara, and Takeshi Osawa. 2016. "Reproductive Performance of Japanese Black Cattle: Association with Herd Size, Season, and Parity in Commercial Cow-Calf Operations." *Theriogenology* 86(9):2156–61.
- Yoshida, Rumika, Go Kitahara, and Takeshi Osawa. 2020. "Intrauterine Infusion of Povidone-Iodine: Its Effect on the Endometrium and Subsequent Fertility in Postpartum Dairy Cows." *Journal of Veterinary Medical Science* 82(7):926–34.