

## 学 位 論 文 要 約

氏 名 田 路 矩 之

題 目 ウシ栄養膜が産生する特異的分子および栄養膜二核細胞の特性に関する研究

栄養膜細胞は胚盤胞の最外層由来であり、受精胚の内部細胞塊から初めて分化した細胞系である。栄養膜単核細胞は着床に先立って、栄養膜特異分子であるインターフェロンタウ (Interferon-tau: IFNT) を産生し、子宮内膜でのプロスタグランジン  $F2\alpha$  の産生抑制を介して妊娠維持に深く関与する。IFNT は、妊娠認識物質として機能する一方、母体血中に放出されて末梢血白血球に作用し、Interferon-stimulated genes (ISGs) と呼ばれる遺伝子群の発現を増加させることから、末梢血白血球の ISGs 遺伝子の発現を指標にした早期の妊娠診断法が提唱されている。しかし、目標となる授精後 21 日までの妊娠診断法は確立されていない。

ウシ栄養膜細胞は着床前後に一部が二核の細胞に分化し、その後妊娠を通して栄養膜細胞全体の 20% の二核細胞が維持されることが知られている。栄養膜二核細胞はウシ胎盤性ラクトジェン、プロラクチン関連タンパク質などの二核細胞特異的分子を産生し、妊娠の維持や胎子の成長に重要な役割を果たすと考えられているが、特性や機能の多くは明らかになっていない。

本研究では、ウシ栄養膜二核細胞およびそれらが産生する特異分子に着目し、1) IFNT が末梢血白血球に及ぼす影響の検証、2) 培養細胞を用いた新規 IFNT 検出系の開発および IFNT の特性の解明、3) 網羅的遺伝子発現解析を用いたウシ栄養膜二核細胞の特性の解明を目的とし、以下の実験を行った。

第一章ではウシの早期妊娠診断に資する基盤的な知見の収集を目的として、IFNT に対する反応性の高い細胞種の特異性、IFNT によって活性化するシグナル伝達系の解析および新規 IFNT 応答性遺伝子の発見を試みた。qPCR を用いた ISGs 発現量測定の結果、顆粒球が単核球に比べ、rIFNT に対して高い反応性を持つことを明らかにした。このことから、早期妊娠診断に用いる細胞種としては顆粒球がより適切であると考えられる。網羅的遺伝子発現解析によって顆粒球における rIFNT のシグナル伝達系として、JAK-STAT 系を同定した。JAK-STAT 系は普遍的に I 型 IFN のシグナル伝達系として機能することが知られており、顆粒球においても他の細胞と同様の機構で IFNT の刺激が細胞内に伝達することが示唆された。新たな早期妊娠診断マーカー遺伝子の候補として、5 遺伝子を同定した。これらの遺伝子はより感度の高い妊娠診断法の確立に資する可能性がある遺伝子である。

第二章では古典的 ISGs である ISG15 プロモーター領域を用いて、簡便で高感度な IFNT のアッセイ系の作出を試みた。また、作出したアッセイ系を用いて、IFNT と代表的な I 型 IFN である IFNA の作用の違いについて検証した。qPCR を用いた ISGs 発現量測定の結果、MDBK 細胞において ISG15 が IFNT に対して高い反応性を有していることを明らかにした。また、プロモーターアッセイの結果 ISG15 の上流域-400~-200 に存在する ISRE が IFNT に対する反応性を上方制御していることが示唆された。ISG15 の上流域をプロモーターとする IFNT に対するレポーターシステムを MDBK 細胞に導入し、IFNT を検出する新規アッセイ

系を構築した。このアッセイ系は I 型 IFN に対して高反応性を示した。このアッセイ系は構築にウイルスを用いておらず、比較的廉価で実施できる上、0.4 ng/mL の検出限界を有するため、Cytopathic アッセイに替わる IFNT 検出・定量系となる可能性がある。ウエスタンブロッティングを用いて MAPK シグナル伝達系の活性化を測定した結果、IFNT および IFNA は p44/42 MAPK シグナル伝達系を活性化しなかった。一方 IFNT および IFNA は共に p38 MAPK シグナル伝達系を活性化した。しかし、IFNT による活性化は、IFNA による活性化に比べて低かった。IFNT は IFNA に比べて、JAK-STAT シグナル伝達系の活性化能は高いが、p38 MAPK シグナル伝達系の活性化能は低いことが示唆された。このことは IFNT の高い抗ウイルス活性と低い細胞毒性という機能特性に関与している可能性がある。

第三章では LCM を用いて BNC および MNC を採取し、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析による BNC の特性の解明を試みた。BNC と MNC の間で網羅的遺伝子発現解析を行い、約 1450 遺伝子の発現変動があることを明らかにした。またこれら変動遺伝子群に対して IPA 解析を行い、BNC において PI3K シグナルを始めとする多数の因子の影響で酸化ストレスの軽減および運動性の亢進が推測された。BNC において発現量が増加している遺伝子を検索し、LIFR を見出した。LIFR とその関連分子である gp130 および LIF について胎盤節およびその周辺組織並びに BNC 誘導 BT-C における mRNA およびタンパク質発現を qPCR および免疫染色を用いて解析し、LIFR がほとんどすべての BNC に高発現していること、gp130 が一部の BNC と子宮内膜腺細胞で高発現していること、LIF の mRNA が子宮小丘間領域で高発現していることを示した。これらのことから BNC の特性や機能は LIF の影響を受けており、LIF の産生自体も LIF 自身によるオートクリン制御を受けていることが示唆された。BNC における PI3K および LIF の作用を明らかにするため、PI3K 阻害剤および rLIF が BT-C の BNC 誘導に与える影響の解析を試みたが、試料である BT-C の BNC 誘導が不安定で、目的とした機能の解析には至らなかった。

本研究において、ウシ栄養膜細胞とその特異的分子の機能特性の一端を明らかにした。本研究によって得られた結果はウシの受胎率改善を通じた生産性の向上に貢献するのみならず、哺乳類の妊娠について普遍的な知見を提供するものであると考える。

## 学 位 論 文 要 約

氏 名 TOJI, Noriyuki

題 目 Studies on Characteristics of A Trophoblast-specific Molecule and Trophoblast Binucleate Cells  
(ウシ栄養膜が産生する特異的分子および栄養膜二核細胞の特性に関する研究)

Trophoblast cells originated from trophoctoderm that constitutes the outermost layer of the blastocyst, and defined as a cell population that differentiate at the earliest stage of the fertilized embryo generation process, together with the inner cell mass that will form the fetus in the future. Trophoblastic mononuclear cells (MNC) produce interferon-tau (IFNT), a trophoblast specific molecule, prior to implantation and are deeply involved in pregnancy maintenance through suppression of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  production in the endometrium. Since IFNT functions as a pregnancy recognition substance, it is released into maternal blood stream and acts on peripheral blood leukocytes to increase expression of a group of genes called Interferon-stimulated genes (ISGs), so that the early pregnancy diagnosis method has been proposed with ISGs expression of peripheral blood leukocytes as indicators. However, no pregnancy diagnosis method has been established until 21 days after artificial fertilization.

It is known that bovine trophoblast cells differentiate into trophoblastic binucleate cells (BNC) in part from around implantation, and then they compose about 20% of total trophoblast cells in the outermost layer of cotyledon throughout gestation. It is thought that BNC produce BNC-specific molecules such as bovine placental lactogen and prolactin-related proteins, and play an important role in maintenance of pregnancy and growth of fetuses; many characteristics and functions have not been revealed.

In this study, focusing on BNC and a specific molecule produced by trophoblast cells, experiments were conducted with the purpose of 1) verification of the influence of IFNT on peripheral blood leukocytes, 2) development of a novel IFNT detection system using cultured cells and elucidation of the characteristic of IFNT and 3) Elucidation of the characteristics of BNC using global gene expression analysis

In the first chapter, in order to gather fundamental knowledge that will contribute to early pregnancy diagnosis of cattle, I attempted to identify cell types highly responsive to IFNT, analyze signal transduction systems activated by IFNT, and discover of new IFNT responsive genes. As a result of measuring the expression level of ISGs using quantitative PCR (qPCR), it was revealed that granulocytes have higher reactivity with recombinant IFNT (rIFNT) than mononuclear cells. This indicated that granulocytes are more appropriate as the cell type used for early pregnancy diagnosis.

Ingenuity pathway analysis following a global gene expression analysis identified that the Janus kinase–Signal transducers and activators of transcription (JAK–STAT) signaling pathway as a signaling system of rIFNT in granulocytes. It is known that the JAK–STAT signaling pathway universally functions as a signaling system of type I IFN, and it is suggested that even in granulocytes, the stimulation of IFNT transfers intracellularly with the same mechanism as other cells. Five genes were identified as new candidates for early pregnancy diagnosis marker gene. These genes may contribute to the establishment of a more sensitive pregnancy diagnosis method.

In the second chapter, I attempted to create a convenient and highly sensitive assay system to IFNT using the ISG15 promoter region. I also examined the difference in the action mechanism between IFNT and IFNA, a typical type I IFN, using the assay system created. As a result of measuring the expression level of ISGs using qPCR, it was revealed that ISG15 had high reactivity with IFNT in MDBK cells. As a result of the promoter assay, it was suggested that the ISRE which present in the upstream region -400 to -200 of ISG15 upregulates the reactivity to IFNT. I stably introduced a reporter system for IFNT using promoter upstream of ISG 15 into MDBK cells and constructed a novel assay system for detecting IFNT. This assay system showed high reactivity to type I IFN. This assay system does not use virus for construction, it can be carried out relatively inexpensively and a limit of detection was about 0.4 ng/mL, so it may be an IFNT detection/quantification system to replace the cytopathic assay. As a result of measuring the activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways using Western blotting, IFNT and IFNA did not activate the p44/42 MAPK signaling pathway, while IFNT and IFNA both activated the p38 MAPK signaling pathway. However, activation of the p38 MAPK signaling pathway by IFNT was lower than activation by IFNA. It was suggested that IFNT has higher ability to activate JAK–STAT signaling pathway, but activation ability of p38 MAPK signaling pathway is lower than IFNA. This may be responsible for the functional properties of high antiviral activity and low cytotoxicity of IFNT.

In the third chapter, I collected BNC and MNC using LCM and tried to elucidate the characteristics of BNC by a global gene expression analysis using microarray. A global gene expression analysis was performed between BNC and MNC, and it was revealed that about 1450 genes were differentially expressed between BNC and MNC. IPA analysis was performed on these differentially expressed genes, and reduction of oxidative stress and enhancement of motility were presumed by BNCs due to many factors including Phosphoinositide 3-kinase signal. I searched for genes whose expression level was increased in BNC and found Leukemia inhibitory factor receptor (LIFR). Analysis of mRNA and protein expression of LIFR and its related molecules, gp130 and Leukemia inhibitory factor (LIF) in placental and endometrium tissues and BNC-induced cultured trophoblast cells using qPCR and immunostaining revealed that LIFR was highly expressed in almost all BNC, gp130 was highly expressed in some BNC and endometrial gland cells, and mRNA of LIF was highly expressed in the uterine inter-caruncle region. From these facts, it was suggested that the characteristics and functions of BNC are influenced by LIF, and the production of LIF itself is also under autocrine control by LIF itself. In order to clarify the effects of PI3K and LIF to BNC, I attempted to analyze the effect of PI3K inhibitor and rLIF on NC-induced

cultured trophoblast cells, but these effects were not confirmed.

In this study, some functional property of bovine trophoblast cells and their specific molecules were clarified. We believe that the results obtained in this study not only contribute to improvement of productivity through improving the conception rate of cattle but also provide universal knowledge on mammalian pregnancy.