

氏名（本（国）籍）	田 路 矩 之（兵庫県）
主指導教員氏名	岩手大学 教授 木 崎 景一郎
学 位 の 種 類	博士（獣医学）
学 位 記 番 号	獣医博甲第495号
学位授与年月日	平成30年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岩手大学
学 位 論 文 題 目	ウシ栄養膜細胞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
審 査 委 員	主査 岩 手 大 学 教 授 高 橋 透 副査 帯広畜産大学 教 授 鈴 木 宏 志 副査 岩 手 大 学 教 授 木 崎 景一郎 副査 東京農工大学 教 授 渡 辺 元 副査 岐 阜 大 学 准教授 椎 名 貴 彦

学位論文の内容の要旨

哺乳類の着床は、多くの分子がその過程の制御に関わっている。なかでも栄養膜細胞は妊娠期間を通じて様々な特異的分子を産生、分泌し、母体の妊娠認識や維持に重要な役割を担っている。ウシ栄養膜細胞は単核細胞と二核細胞に大別され、単核細胞は着床に先立って、栄養膜特異的分子であるインターフェロン τ （IFNT）を合成、分泌する。IFNTは妊娠維持に深く関与する一方で、母体血中の末梢血白血球にも作用して、インターフェロン応答遺伝子群（ISGs）の発現を増加させることが知られている。子宮内膜でのIFNTの作用機構に関する研究は数多くなされているが、末梢血白血球におけるシグナル伝達及びIFNTによって誘導される遺伝子についての詳細は明らかではない。一方、栄養膜二核細胞も胎盤性ラクトジェン等の特異的分子を産生し、妊娠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、その特性については明らかになっていないのが現状である。本研究では、ウシ栄養膜細胞の特異的分子並びに二核細胞の特性について検証した。

第一章では、IFNTに対する反応性の高い末梢血白血球の細胞種の特定を試みたところ、単核球に比べ顆粒球がより高反応性であることが明らかになった。さらに網羅的遺伝子発現解析を用いて顆粒球におけるIFNTのシグナル伝達経路の検索したところ、I型インターフェロンのシグナル伝達に普遍的に機能するJanus kinase-signal transducers and activators of transcription（JAK-STAT）系の関与が推察された。さらに、網羅的遺伝子発現解析及び定量的RT-PCRの結果から、顆粒球においてIFNTに反応する新たなISGsを見出した。

第二章では、IFNTの*in vitro* バイオアッセイ系を構築する共に、インターフェロン α （IFNA）との作用の相違について検証した。バイオアッセイ系に使用するウシ腎上皮細胞（MDBK細胞）において、古典的ISGsの反応性を調べたところ、ISG15がIFNTに対して高反応性を示すことが明らかとなった。さらにISG15遺伝子の上流域をプロモーターとする

レポーターコンストラクトを MDBK 細胞へ安定的に導入し、I 型インターフェロンに高反応性を示すバイオアッセイ系を構築した。一方、Mitogen-activated protein kinase (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せず、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。このことから 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考えられた。

第三章では、栄養膜二核細胞の特性を明らかにするため、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法を用いてウシ胎盤から二核細胞画分と単核細胞画分を採取し、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。発現変動遺伝子の分子間ネットワーク・パスウェイ解析の結果から、Phosphoinositide 3-kinase シグナルを主とする経路を介して、二核細胞では酸化ストレスの軽減や細胞運動性の亢進が生じていることが推測された。さらに二核細胞において特異的に発現が上昇している遺伝子として Leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) を見出し、胎盤組織における LIFR の遺伝子及びタンパク質発現を検証したところ、二核細胞に発現していることを確認した。これらの結果から、二核細胞の機能は LIFR リガンドによる制御を受けている可能性が示唆された。

以上のように本研究では、1) ウシ栄養膜単核細胞が産生する特異的分子である IFNT が末梢血の顆粒球にも作用し細胞機能に影響していること、2) 本研究で構築した IFNT のバイオアッセイ系は従来の測定法に替わる IFNT の検出系となる可能性、3) 二核細胞の機能特性には LIFR 制御系に関与していることが示唆された。これらの結果は、栄養膜細胞が産生する特異的分子及びその細胞特性に焦点をあてた受胎や子宮内膜機能研究の新展開を導くものであり、ウシの着床および胎盤形成機構を解明する上での新知見を提供する。

審 査 結 果 の 要 旨

哺乳類の着床機構には多くの分子が制御に関わっており、栄養膜細胞は様々な特異的分子を産生、分泌し、その過程に重要な役割を担っていると考えられている。ウシ栄養膜細胞は単核細胞と二核細胞に大別され、単核細胞は着床に先立って、栄養膜特異的分子であるインターフェロン τ (IFNT) を合成、分泌する。IFNT は妊娠維持に深く関与する一方で、母体血中の末梢血白血球にも作用して、インターフェロン応答遺伝子群 (ISGs) の発現を増加させることが知られている。子宮内膜での IFNT の作用機構に関する研究は数多くなされているが、末梢血白血球におけるシグナル伝達及び IFNT によって誘導される遺伝子についての詳細は明らかではない。一方、栄養膜二核細胞も胎盤性ラクトジェン等の特異的分子を産生し、妊娠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、その特性については明らかになっていないのが現状である。本研究では、ウシ栄養膜細胞が産生する特異的分子並びに二核細胞の特性を明らかにすることを目的として、以下の3項を検証した。

第一章では、IFNT に対する反応性の高い末梢血白血球の細胞種の特定及びそのシグナル伝達経路を検証した。単核球に比べ顆粒球がより高反応性であること、I 型インターフェロンのシグナル伝達に普遍的に機能する Janus kinase-signal transducers and activators of transcription 系が関与すること、顆粒球において IFNT に反応する新たなインターフェロン応答遺伝子群 (ISGs) を明らかにした。

第二章では、IFNT の *in vitro* バイオアッセイ系の作出を試みると共に、インターフェロン α (IFNA) との作用の相違について検証した。その結果、古典的 ISGs の遺伝子上流域

のプロモーターを利用した高感度で簡便なバイオアッセイ系を構築した。さらに、IFNT の作用機構の解析では、IFNT および IFNA は p38 Mitogen-activated protein kinase シグナル伝達系を活性化するが、IFNT による活性化能は IFNA に比べて低いことが示唆された。これらのことから、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考えられた。

第三章では、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法を用いてウシ胎盤から二核細胞画分と単核細胞画分を採取し、網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、Phosphoinositide 3-kinase シグナルを主とする経路を介して二核細胞の細胞機能が特徴付けられること、さらに Leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) が二核細胞において特異的に発現が上昇していることが示された。

以上のように本研究では、ウシ栄養膜単核細胞が産生する特異的分子である IFNT の新たな特性を明らかにすると共に、二核細胞機能への LIFR 系の関与が示唆した。さらに本研究で構築した IFNT のバイオアッセイ系は従来の測定法に替わる IFNT の検出系となる可能性についても示された。これらの結果は、栄養膜細胞が産生する特異的分子及びその細胞特性に焦点をあてた着床や受胎の制御機構研究の新展開を導くものであり、ウシの着床および胎盤形成機構を解明する上での新知見を提供するものである。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Evaluation of interferon-stimulated genes in peripheral blood granulocytes as sensitive responders to bovine early conceptus signals

著 者 名 : Toji, N., Shigeno, S., Kizaki, K., Koshi, K., Matsuda, H., Hashiyada, Y., Imai, K., Takahashi, T., Ishiguro-Oonuma, T. and Hashizume, K.

学術雑誌名 : The Veterinary Journal

巻・号・頁・発行年 : 229 : 37-44, 2017

- 2) 題 目 : A cell-based interferon-tau assay with an interferon-stimulated gene 15 promoter

著 者 名 : Toji, N., Koshi, K., Furusawa, T., Takahashi, T., Ishiguro-Oonuma, T., Kizaki, K. and Hashizume, K.

学術雑誌名 : Biomedical Research

巻・号・頁・発行年 : In Press