

# 三次元培養系を用いたウシ子宮内膜エクソソームの解析

九州大学大学院農学研究院動物繁殖生理学分野・准教授 山内 伸彦

## ■ 目的

起点の細胞から分泌されたエクソソームは体液を介して別の細胞に取り込まれ、内包される miRNA を伝達することから、近年新たな細胞間コミュニケーションツールとして注目されている。しかし、ウシ子宮液中のエクソソームの機能についてはいまだ不明であり、胚伸長制御機能については報告がない。本研究では、胚伸長における子宮内エクソソームの役割を明らかにすることを目的に、ウシ胚盤胞期胚由来の栄養膜細胞に対する影響を解析することで、胚伸長に対する影響を調べた。さらに、子宮内膜組織の全 RNA を用いて miRNA sequence 解析を行い、in silico 解析により着床過程における機能的な miRNA の解析を行った。

## ■ 方法

エクソソームは黄体期および人工授精 8 日目(妊娠期)のウシ子宮灌流液から MagCapture Exosome Isolation Kit PS を用いて精製した。ウシ胚盤胞期胚由来の栄養膜細胞(BT 細胞)の培養は DMEM/F12 培地を基礎培地とし、48well プレートで行なった。それぞれのエクソソームは 1 $\mu$ g/well の濃度で培地に添加した。細胞増殖関連遺伝子遺伝子(*PCNA*, *CCND1*)の発現量はリアルタイム qPCR により測定した。miRNA シークエンス解析には卵胞期、黄体期および着床期(妊娠 18 日目)の子宮内膜組織より抽出した全 RNA を用いた。サンプルの miRNA の網羅的解析は Azenta ライフサイエンスへの依頼分析によって行った。

## ■ 結果および考察

BT 細胞を BSA 添加基礎培地で 5 日間培養した結果、小胞構造を維持することができなかった。しかし、エクソソームを含む培地では小胞構造を維持されていた。また、細胞増殖関連遺伝子である *PCNA* および *CCND1* の発現量は、エクソソーム無添加区および黄体期エクソソーム添加区に対し、妊娠期エクソソーム添加区で有意に高い値を示した( $p < 0.05$ )。これらの結果は、妊娠期の子宮内エクソソームに細胞増殖を促進する因子が含まれていることを示すものであり、胚細胞の細胞増殖を促進させる可能性を示唆するものである。

miRNA sequence 解析の結果、各ステージにおける既知および新規の miRNA はそれぞれ卵胞期で 297 個および 77 個、黄体期では 317 個および 81 個、着床期では 293 個および 435 個であった。黄体期と着床期を比較して、変化倍率が 1.5 倍以上かつ片方のステージで 1000 リードを越える miRNA は合計 35 個同定された。GO 機能エンリッチメント解析の結果、それぞれのステージで発現が上昇した miRNA のターゲット遺伝子の多くは細胞構成成分、中でも細胞質、細胞膜、膜貫通型タンパク質の機能に関与するものであった。また、そのヒストグラム解析ではコラーゲン含有細胞外マトリックスに関与する遺伝子が最も高い値を示した。これらの結果は、子宮内の miRNA は時期特異的に発現が変化し、妊娠期エクソソームには細胞の分化と増殖を制御し得る新規 miRNA が多く含まれている可能性を示している。

## ■ 結語

本研究は、ウシ子宮灌流液中のエクソソームについて生体外培養系を用いて解析するとともに、ウシ子宮内膜に発現する miRNA を網羅的に解析した。その結果、エクソソームおよび miRNA は時期特異的に変化していることが示された。また、妊娠期エクソソームは胚細胞の細胞増殖関連遺伝子の発現を促進し、新規 miRNA が多く含まれていることが明らかとなった。これらの結果はウシ子宮内エクソソームの機能解明につながる基盤的な知見であると考えられる。