ウシ子宮内膜細胞における miRNA 産生制御機構の解明

九州大学大学院農学研究大学院動物繁殖生理学分野・准教授 山内 伸彦

■ 目的

miRNA を人為的に制御してウシの受胎率向上に応用するには、その生産細胞および発現制御因子などの詳細を明らかにする必要がある。本研究では、培養ウシ子宮内膜細胞を用いて miRNA の発現を解析し、性周期および着床期において主要な制御因子の影響について解析した。さらに、BT 細胞を用いて子宮 EV の機能と内包される miRNA について解析した。

■ 方法

ウシ子宮内膜上皮細胞(BEE)、間質細胞(BES)および栄養膜細胞(BT)の培養は 10%FBS 添加 DMEM/F12 培地を基礎培地として用いた。細胞外小胞は卵胞期(F-EV)、黄体期(L-EV)および人工授精 8 日目(妊娠期; P-EV)のウシ子宮灌流液を限外濾過濃縮した後精製し、濃度を測定した。ウシ子宮組織で時期特異的に発現する miRNA (DEmiRNAs)の BEE および BES における発現解析は、RT-PCR および qPCR によって行った。本研究では DEmiRNAs 中の 7 個の miRNA (miR-34a, miR-125b, miR-204, miR-376c, miR-449a, miR-450b, miR2411-3p)について解析した。EV 処理 24h 後に BT における細胞増殖関連遺伝子(*PCNA*, *CCND1*, *cMYC*, *HMGAI*)の発現量をリアルタイム qPCR により測定した。さらに、*PCNA* を標的とする miRNA の中からウシの子宮内膜組織で発現量が高いと予測された 3 つの miRNA (miR-24-3p, miR-375 および miR-382)を選択し、それぞれの時期の EV における発現量を qPCR によって比較定量した。

■ 結果および考察

本研究で解析した 7 個の DEmiRNAs は BEE と BES の両細胞で全て発現していた。さらに、それぞれの細胞の miR-376c 発現に対す制御因子(E2、P4 および IFNt)の影響を RT-PCR および qPCR で解析した結果、両細胞の全ての処理区でバンドが検出され、有意な差は認められなかった。これらの結果からは細胞種特異的な miRNA およびその発現制御因子は明らかとならなかった。解析する miRNA 数の増加や制御因子の濃度などの詳細な解析が必要と考えられる。

BT を EV で 24h 処理し、細胞増殖関連遺伝子の発現を qPCR で解析した。その結果、P-EV 群における *PCNA* の発現は血清処理群と同程度であり、コントロール群、F-EV 群、L-EV 群よりも有意に高かった($P<0.05$)。一方、*CCND1* (B)、*cMYC* (C) および *HMGAI* (D) の発現は、いずれの群にも差は認められなかった。ついで、各時期の EV 中の miRNA 量を qPCR で解析した結果、L-EV 中の miR-24-3p の量は、他の時期に比べて有意に高かった($P<0.05$)。miR-375 および miR-382 の EV 中の量は、P-EV で有意に少なかった($P<0.05$)。これらの結果は、P-EV 中の *PCNA* 標的 miRNA の発現が低下することにより、BT の *PCNA* 発現が増加し、胚伸長を促進する可能性が示唆された。

■ 結語

本研究では、P-EV が BT 細胞の増殖を促進することを明らかにした。この結果から、P-EV が胚伸長を促進することで、早期胚死滅を防ぐ可能性が示唆された。この子宮 EV の効果を応用し、人為的にウシ胚の伸長を促進する技術を開発することで、ウシの受胎率向上に貢献できると考えられる。一方で、EV に含まれる miRNA の詳細な機能を明らかにするためには、子宮 EV の miRNA シークエンス解析を行うなど、さらなる検討が必要である。