

平成 21 年 4 月 16 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18380166  
 研究課題名 (和文) 排卵周期制御機構における卵巣－子宮－免疫系ネットワークの解明  
 研究課題名 (英文) Study on the network in ovary-uterus-immune systems in regulating ovulation cycle  
 研究代表者  
 奥田 潔 (OKUDA KIYOSHI)  
 岡山大学・大学院自然科学研究科・教授  
 研究者番号：40177168

## 研究成果の概要：

本研究により、黄体で合成される PGF2a、PGE2、コルチゾール、アセチルコリンが細胞死抑制因子として黄体機能の維持に作用すること、また、低酸素環境は黄体機能の衰退と消失（細胞死）に重要な環境要因であることが明らかにされた。また、コルチゾール、interleukin-1a は、子宮内膜の PGF2a 合成制御因子として作用し、排卵周期の発現のみならず妊娠成立にも重要な役割を果たすことが示された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2007 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2008 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：生殖内分泌学

科研費の分科・細目：「畜産学・獣医学」・「応用動物科学」

キーワード：繁殖、代謝・内分泌制御、機能性物質

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の卵巣と子宮の間には、妊娠を成立・維持する機構とともに、妊娠が成立しなかった際に周期的に排卵を起こさせる機構が存在する。これは、種を維持していくために哺乳動物が長い進化の過程で獲得してきた生殖戦略の一つと言える。多くの哺乳動物において黄体退行が次の排卵周期への起点と考えられ、この排卵周期の発現には、卵巣（黄体）-

子宮間のクロストーク並びに、それらと免疫細胞との密接なネットワークが極めて重要であると推察されているが、詳細は明らかにされていない。

本研究では、原因不明の不妊の診断法や新たな治療法開発のためのデータベースを確立するとともに、新たな生殖制御技術確立することを目的に実施された。

## 2. 研究の目的

排卵周期発現のための卵巣（黄体）および子宮における局所ならびに相互調節機構を解明するとともに、得られた基礎的知見を基に新しい排卵周期制御技術の開発を試みる。具体的には、以下の4点に集約される。

- (1) 黄体の周期的死滅（黄体退行）を制御する黄体内制御機構の解明
- (2) 子宮内膜のプロスタグランジン（PG）合成調節機構に関する多角的解析
- (3) 生体への生理活性物質投与による排卵周期制御の試み

## 3. 研究の方法

上記の3点についてそれぞれ以下のように実施した。

(1) 黄体細胞ならびに黄体由来血管内皮細胞をそれぞれ単離培養し、黄体内生理活性物質からアポトーシス防御因子の候補物質について、申請者らが創出した黄体内細胞のアポトーシスモデルを用いてアポトーシス防御因子を決定するとともに、それらによって誘導される細胞内シグナル伝達機構を検討した。また、黄体退行促進因子に関しても培養黄体細胞のプロジェステロン合成能の変化ならびに細胞生存率から検討すると共にそれらの因子によって誘導される細胞内シグナル伝達機構を検討した。

(2) 子宮内膜のPG合成におよぼす卵巣、子宮内膜および免疫細胞由来生理活性物質（ステロイド、サイトカイン、成長因子など）の影響について子宮内膜細胞の培養系を用いて検討するとともに、子宮内膜におけるサイトカインの分泌源および分泌調節機構についても検討することにより、排卵周期および妊娠初期における子宮内膜のPG合成調節機構を検討した。

(3) 上記(1)(2)の研究において機能が明らかとなった生理活性物質の中から排卵周期の制御に応用可能と考えられるTNF $\alpha$ とIL-1 $\alpha$

を選択し、陰門部粘膜下、肛門下外陰部上部または子宮内に投与することにより、卵巣ならびに子宮機能におよぼす影響を臨床的ならびに内分泌学的に調べた。

## 4. 研究成果

(1) 黄体で合成されるPGF2 $\alpha$ , PGE2, acetylcholine, cortisolがアポトーシス抑制因子として作用することを自ら構築したアポトーシスモデルを用いて明らかにするとともに、黄体退行前の血流量の減少から誘導される「低酸素環境」が黄体の機能的退行と共に構造的退行を引き起こすこと、さらにnitric oxideやtumor necrosis factor  $\alpha$ が黄体退行因子として作用していることが明らかにした。これらの成果は、内分泌学ならびに生殖科学において最も権威のある*Endocrinology* (インパクトファクター: IF=5.31), *Biology of Reproduction* (IF=3.58), *Molecular Reproduction and Development* (IF=2.22), *Journal of Reproduction and Development* (IF=1.48)に掲載されており、排卵周期発現の制御機構における卵巣内の局所機能調節機構を理解する上で極めてインパクトがある。また、卵巣内の局所調節因子としてprolactin, estrogenが黄体内機能調節因子である可能性を物質と共にレセプターを証明することにより示唆した。これらの成果は、国際的な専門誌である*Prostaglandins and other Lipid Mediators* (IF=2.22), *Reproductive Biology*に発表されている。

(2) Cortisol, interferon-1 $\alpha$ , 植物性エストロジェンが子宮内膜におけるPGF2 $\alpha$ 分泌調節に関与することを多角的に明らかにした。cortisol, interferon-1 $\alpha$ については内分泌学、生殖科学分野で最も権威のある専門誌*Journal of Endocrinology* (IF=3.05)ならび

に *Biology of Reproduction* (IF=3.58) に掲載されており子宮内膜の PG 合成分泌における局所調節機構を世界中に示しインパクトは極めて高い。一方、飼料中に含まれる植物エストロジェンが子宮内膜の PGF<sub>2</sub> $\alpha$  分泌を亢進し、不妊を導く可能性を多くの人に読まれている *Experimental Biology and Medicine* (IF=2.85), *Reproduction* (IF=3.13) 等に公表され内外の研究者に大きなインパクトを与えた。(1)(2)の成果から、本研究の目的である「排卵周期発現のための卵巣(黄体)および子宮における局所ならびに相互調節機構の解明」の多くを達成できたと考える。(3) TNF $\alpha$  の子宮内投与により腹大動脈への投与と同様に発情周期の短縮を誘起することができ新たな生殖制御法確立の可能性が見いだせた。また、IL-1 $\alpha$  の子宮内投与は、子宮内膜の PGE<sub>2</sub> 合成を刺激することにより発情周期を延長することから、IL-1 $\alpha$  を用いた黄体機能の強化作用による受胎率向上技術の開発が期待できる。これらの成果は、獣医学会、畜産学会のシンポジウムで示され、また臨床獣医師を対象とする講演会などで大きな反響を得た。これらの成果は、上記のとおり国内の講演会などで公表するとともに *Journal of Endocrinology* (IF=3.05), *Domestic Animal Endocrinology* (IF=1.55), *Reproduction in Domestic Animals* (IF=1.83), *Animal Science Journal* などの専門誌に掲載されている。

##### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 26 件)

1. Al-zi'abi MO, Bowolaksono A, Okuda K. Survival role of locally produced acetylcholine in the bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, 80 (4), 823-832 (2009) 査読有
2. Lee HY, Acosta TJ, Skarzynski DJ, Okuda

K. Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  stimulates 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 enzyme bioactivity and protein expression in bovine endometrial stromal cells. *Biology of Reproduction*, 80 (4), 657-664 (2009) 査読有

3. Acosta TJ, Bah MM, Korzekwa A, Woclawek-Potocka I, Markiewicz W, Jaroszewski JJ, Okuda K, Skarzynski DJ. Acute changes in circulating concentrations of progesterone, nitric oxide and partial pressure of oxygen during prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  induced luteolysis in cattle. *Journal of Reproduction and Development*, in press 査読有

4. Skarzynski DJ, Piotrowska KK, Bah MM, Korzekwa A, Woclawek-Potocka I, Sawai K, Okuda K. Effects of exogenous tumor necrosis factor- $\alpha$  on the secretory function of the bovine reproductive tract depend on tumor necrosis factor-1 concentrations. *Reproduction in Domestic Animals*, in press 査読有

5. Woclawek-Potocka I, Brzezicka E, Komiyama J, Siemieniuch M, Okuda K, Skarzynski DJ. Lysophosphatic acid modulates prostaglandin secretion in the bovine uterus. *Reproduction*, 137(1), 95-105 (2008) 査読有

6. Bowolaksono A, Nishimura R, Hojo T, Sakumoto R, Acosta TJ, Okuda K. Anti-apoptotic roles of prostaglandin E<sub>2</sub> and F<sub>2</sub> $\alpha$  in bovine luteal steroidogenic cells. *Biology of Reproduction*, 79(2), 310-317 (2008) 査読有

7. Hama N, Kanemitsu H, Sakamoto K, Oyama Y, Acosta TJ, Ishikawa O, Pengyan W, Okuda K. Urinary concentrations of estrone-3-glucuronide and estrous behavior in a captive female giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Journal of Reproduction and Development*, 54(4), 281-285 (2008) 査読有

8. Korzekwa A, Murakami S, Woclawek-Potocka I, Bah MM, Okuda K, Skarzynski DJ. The influence of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF) on the secretory function of bovine corpus luteum: TNF and its receptor expression during the estrous cycle. *Reproductive Biology*, 8(3), 245-262 (2008) 査読有

9. Tanikawa M, Lee HY, Watanabe K, Majewska M, Skarzynski DJ, Piotrowska KK, Park SB, Lee DS, Park CK, Acosta TJ, Okuda K. Regulation of prostaglandin biosynthesis by interleukin-1 in cultured bovine endometrial cells. *Journal of Endocrinology*, 199, 425-434 (2008) 査読有

10. Komiyama J, Nishimura R, Lee HY, Sakumoto R, Tetsuka M, Acosta TJ, Skarzynski DJ, Okuda K. Cortisol is a suppressor of apoptosis in bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, 78(5), 888-895 (2008) 査読有
11. Nishimura R, Komiyama J, Tasaki Y, Acosta TJ, Okuda K. Hypoxia promotes luteal cell death in bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, 78(3), 529-536 (2008) 査読有
12. Sakumoto R, Ito I, Okuda K. Changes in expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type-1, type-2 and glucocorticoid receptor mRNAs in porcine corpus luteum during the estrous cycle. *Molecular Reproduction and Development*, 75(5), 925-930 (2007) 査読有
13. Kobayashi S-I, Sakatani M, Kobayashi S, Okuda K, Takahashi M. Gene silencing of cyclooxygenase-2 mRNA by RNA interference in bovine cumulus-granulosa cells. *Journal of Reproduction and Development*, 53(6), 1305-1311 (2007) 査読有
14. Shibaya M, Matsuda A, Hojo T, Acosta TJ, Okuda K. Expressions of estrogen receptors in bovine corpus luteum: cyclic changes and effects of prostaglandin F2 $\cdot$  and cytokines. *Journal of Reproduction and Development*, 53(5), 1059-1068 (2007) 査読有
15. Skarzynski DJ, Shibaya M, Tasaki Y, Korzekwa A, Murakami S, Woclawek-Potocka I, Majewska M, Okuda K. Fas-mediated apoptosis is suppressed by calf serum in cultured bovine luteal cells. *Reproductive Biology*, 7(1), 3-15 (2007) 査読有
16. Skarzynski DJ, Woclawek-Potocka I, Korzekwa A, Bah MM, Piotrowska K, Barszczewska B, Okuda K. Infusion of exogenous tumor necrosis factor dose dependently alters the length of the luteal phase in cattle: differential response to treatment with indomethacin and L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. *Biology of Reproduction*, 76(4), 619-627 (2007) 査読有
17. Lee HY, Acosta TJ, Tanikawa M, Sakumoto R, Komiyama J, Tasaki Y, Piskula M, Skarzynski DJ, Tetsuka M, Okuda K. The role of glucocorticoid in the regulation of prostaglandin biosynthesis in non-pregnant bovine endometrium. *Journal of Endocrinology*, 193(1), 127-135 (2007) 査読有
18. Acosta TJ, Yoshioka S, Komiyama J, Lee SH, Grazul-Bilska AT, Skarzynski DJ, Okuda K. Effects of storage and passage of luteal endothelial cells on endothelin-1 and prostaglandin F2 $\cdot$  production. *Journal of Reproduction and Development*, 53(3), 473-480 (2007) 査読有
19. Woclawek-Potocka I, Borkowski K, Korzekwa A, Okuda K, Skarzynski DJ. Phyto- and endogenous estrogens differently activate intracellular calcium ion mobilization in the bovine endometrial cells. *Journal of Reproduction and Development*, 52(6), 731-740 (2006) 査読有
20. Korzekwa A, Okuda K, Woclawek-Potocka I, Murakami S, Skarzynski DJ. Nitric oxide induces apoptosis in bovine luteal cells. *Journal of Reproduction and Development*, 52(3), 353-361 (2006) 査読有
21. Nishimura R, Sakumoto R, Tatsukawa Y, Acosta TJ, Okuda K. Oxygen concentration is an important factor for modulating progesterone synthesis in bovine corpus luteum. *Endocrinology*, 147(9), 4273-80 (2006) 査読有
22. Tatsukawa Y, Bowolaksono A, Nishimura R, Komiyama J, Acosta TJ, Okuda K. Possible roles of intracellular cyclic AMP, protein kinase C and calcium ion in the apoptotic signaling pathway in bovine luteal cells. *Journal of Reproduction and Development*, 52(4), 517-22 (2006) 査読有
23. Woclawek-Potocka I, Bober A, Korzekwa A, Okuda K, Skarzynski DJ. Equol and para-ethyl-phenol stimulate prostaglandins F2 $\cdot$  in bovine corpus luteum. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 79, 287-297 (2006) 査読有
24. Sakumoto R, Komatsu T, Kasuya E, Saito T, Okuda K. Expression of mRNAs for interleukin-4, interleukin-6 and their receptors in porcine corpus luteum during the estrous cycle. *Domestic Animal Endocrinology*, 31(3), 246-257 (2006) 査読有
25. Bah MM, Acosta TJ, Pilawski W, Deptula KM, Okuda K, Skarzynski DJ. Role of intraluteal prostaglandin F2 $\cdot$ , progesterone and oxytocin in basal and pulsatile progesterone release from developing bovine corpus luteum. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 79, 218-229 (2006) 査読有
26. Shibaya M, Murakami S, Tatsukawa Y, Skarzynski DJ, Acosta TJ, Okuda K. Bovine corpus luteum is an extrapituitary site of prolactin production. *Molecular Reproduction and Development*, 73, 512-519 (2006) 査読有

[学会発表] (計 5 2 件)

奥田 潔：ウシの発情周期発現機構における子宮の役割. 第 110 回日本畜産学会シンポジウム「ルミネントバイオロジーの進展開」招待講演 (神奈川、2009. 3. 27-29)

Okuda K: Possible roles of hypoxia in luteal formation and regression in cattle. V Jubilee Congress of the Society for Biology of Reproduction (Worclaw, Poland, September 10-13, 2008)

Okuda K, Nishimura R, Acosta TJ: Hypoxia plays important roles not only in luteolysis but in luteal formation in cattle. First World Congress on Reproductive Biology (Hawaii, USA, May 24-26, 2008)

Bowolaksono A, 西村亮, Acosta TJ, 奥田潔: ウシ黄体細胞におけるアポトーシス抑制因子としての黄体形成ホルモン (LH) の役割. 第101回日本繁殖生物学会大会 (福岡, 2008. 9. 18-20)

法上拓生, Al-zi'abi MO, Acosta TJ, 奥田潔: ウシ黄体における発情周期を通じた血管分布変化および中期黄体内血管分布に及ぼす PGF $2\alpha$  の影響. 第101回日本繁殖生物学会大会 (福岡, 2008. 9. 18-20)

Lee HY, Acosta TJ, Okuda K: Prostaglandin F $2\alpha$  stimulates 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type1 activity and protein expression in bovine endometrial stromal cells. 41th Annual Meeting Society for the Study of Reproduction (Hawaii, USA, May 27-30, 2008)

李和容, Acosta TJ, 奥田潔: ウシ子宮内膜の glucocorticoid receptor  $\alpha$  および 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases protein 発現に及ぼす cortisol の影響. 第145回日本獣医学会学術集会 (神奈川, 2008. 3. 28-30)

西村亮, 小見山純一, Acosta TJ, 奥田潔: ウシ黄体の形成および退行における低酸素環境の意義. 第145回日本獣医学会学術集会 (神奈川, 2008. 3. 28-30)

Okuda K, Bowolaksono A, Nishimura R, Sakumoto R, Komiyama J, Acosta TJ: Possible anti-apoptotic roles of prostaglandins in bovine luteal cells. 40th Annual Meeting Society for the Study of Reproduction (San Antonio, USA, July 21-25, 2007)

西村亮, Acosta TJ, 奥田潔: 低酸素環境はウシ黄体細胞のプロジェステロン合成を抑制することによりアポトーシスを誘導する. 第100回日本繁殖生物学会大会 (東京, 2007. 10. 20-22)

李和容, Acosta TJ, 小見山純一, 田崎ゆか

り, 奥田潔: Prostaglandin (PG) F $2\alpha$  は 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11HSD) 1 活性 および protein 発現を刺激する. 第100回日本繁殖生物学会大会 (東京, 2007. 10. 20-22)

Al-zi'abi O, Hojo T, Matsuda-Minehata F, Acosta TJ, Manabe N, Okuda K: Immunohistochemical study on cFLIP in the bovine corpus luteum. 第108回日本畜産学会 (岡山, 2007. 9. 26-27)

西村亮, 作本亮介, Acosta TJ, 奥田潔: 低酸素環境による黄体退行誘導メカニズムの解析. 第99回日本繁殖生物学会 (名古屋, 2006. 9. 7-9)

Acosta TJ, 吉岡伸, 小見山純一, 西村亮, Skarzynski DJ, 奥田潔: ウシ黄体由来血管内皮細胞における一酸化窒素 (NO) 合成酵素 mRNA 発現. 第99回日本繁殖生物学会 (名古屋, 2006. 9. 7-9)

柴谷雅美, Acosta TJ, 奥田潔: ウシ黄体における aromatase 及び estrogen receptor 発現に及ぼす prostaglandin F $2\alpha$  の影響. 第99回日本繁殖生物学会 (名古屋, 2006. 9. 7-9)

李和容, Acosta TJ, 西村亮, 小見山純一, 田崎ゆかり, 作本亮介, 手塚雅文, 奥田潔: ウシ子宮内膜における発情周期を通じた 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11HSD) 1 活性とその活性におよぼす PGF $2\alpha$  の影響. 第99回日本繁殖生物学会 (名古屋, 2006. 9. 7-9)

小見山純一, 西村亮, 李和容, 作本亮介, 手塚雅文, Acosta TJ, 奥田潔: ウシ黄体における 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type1 (11HSD1) 活性および glucocorticoid (GC) の作用機序. 第99回日本繁殖生物学会 (名古屋, 2006. 9. 7-9)

Okuda K, Bowolaksono A, Nishimura R, Sakumoto R, Acosta TJ: Survival factors against apoptosis in bovine corpus luteum. 39th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (Omaha, USA, July 29-August 1, 2006)

Nishimura R, Sakumoto R, Acosta TJ, Okuda K: Oxygen concentration is an important factor for luteolysis in cattle. 39th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (Omaha, USA, July 29-August 1, 2006)

Lee HY, Acosta TJ, Sakumoto R, Tetsuka M, Okuda K: Effects of glucocorticoid on

prostaglandin production in bovine  
endometrium. 39th Annual Meeting of the  
Society for the Study of Reproduction  
(Omaha, USA, July 29-August 1, 2006)

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥田 潔 (OKUDA KIYOSHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：40177168

### (2) 研究分担者

アコスタ ティージェー (Acosta TJ)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：80379718

### (3) 研究協力者

スカルジンスキー ダリウスズ ジェー

(Skarzynski Dariusz J)

ポーランド科学アカデミー・教授