

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03129

研究課題名（和文）最終糖化産物がウシ子宮、卵管および胚発育に及ぼす影響とその作用機序の解明

研究課題名（英文）Effects of final glycation products on bovine uterus, oviduct and embryonic development and elucidation of the mechanisms

研究代表者

松山 秀一（Matsuyama, Shuichi）

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：50455317

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：メチルグリオキサール（MGO）がウシ子宮機能に及ぼす影響を検討した。ウシ子宮内膜細胞における活性酸素種（ROS）および H2AXタンパクはMGO添加後有意に増加した。また、細胞増殖率はMGO添加により有意に減少した一方、p16 mRNA発現および老化細胞率は有意に増加した。これらのことから、ウシ子宮内膜細胞においてMGOがROS産生を亢進することでDNA損傷を引き起こし、細胞老化を誘導することが示唆された。さらに、MGO処理後のウシ子宮内膜細胞ではIL-8産生が増加する傾向が見られたことから、MGOにより誘導された老化細胞から分泌されるサイトカインが子宮機能低下を引き起こす可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ウシにおいて高穀物含量の飼料摂取によって増加するメチルグリオキサールが、子宮内膜でのROS産生を亢進することでDNA損傷を引き起こし、細胞老化を誘導すること、さらには、老化細胞から分泌されるサイトカインが子宮機能低下を引き起こすことが示唆されました。乳牛では分娩後の受胎率が低いことが知られています。この受胎率の低下は、泌乳にともなう負のエネルギーバランスを補うように設計された穀物主体の飼料給与体系が一因となっている可能性があります。本研究の成果は、乳牛の低受胎要因の解明だけでなく、受胎率低下に対して飼養管理という側面からの予防および治療技術開発への応用が期待されます。

研究成果の概要（英文）：The effects of methylglyoxal (MGO) on bovine uterine function were examined. Reactive oxygen species (ROS) and H2AX protein in bovine endometrial cells were significantly increased after MGO treatment. In addition, cell proliferation rate was significantly decreased by MGO treatment, while p16 mRNA expression and senescent cell rate were significantly increased. These results suggest that MGO induces DNA damage and cellular senescence by enhancing ROS production in bovine endometrial cells. Furthermore, IL-8 production tended to increase in bovine endometrial cells after MGO treatment, suggesting that cytokines secreted by MGO-induced senescent cells may cause uterine dysfunction.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：メチルグリオキサール 牛 子宮 低受胎

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトにおいて高エネルギー食品の過剰摂取などにより体内で余剰となった糖が、非酵素的にタンパク質と結合して最終糖化産物を生み出して老化が促進されるとともに、炎症反応などの様々な細胞応答を引き起こすことが知られている (Xie J. et al., *Cell Signal*, 25, 2185-2197, 2013)。肥満患者の子宮内膜細胞において蓄積した最終糖化産物は、子宮内膜上皮細胞で炎症シグナルを活性化させることや、子宮内膜間質細胞で小胞体ストレスを増大させることで子宮機能を低下させ、着床を阻害することが報告されている (Antoniotto G.S. et al., *Hum Reprod*, 33, 654-665, 2018)。また、ウシにおいては、加齢に伴い上昇する卵胞液中の最終糖化産物が胚の品質低下を誘導することが示されている (Takeo S. et al., *Reprod Fertil Dev*. 29, 759-767, 2017)。最終糖化産物はグルコースからだけでなく、グルコースの自己酸化および分解産物により生成したメチルグリオキサール、グリオキサール、3-デオキシグルコソールなどのジカルボニル化合物からも生成される (Shipanova I.N. et al., *Arch Biochem Biophys*, 344:29-36, 1997)。なかでも、メチルグリオキサールは最終糖化産物の生成を促進するだけでなく、細胞内の NADPH、グルタチオンのレベルを下げることで、活性酸素種を増大させ (Fukunaga M. et al., *Ann N Y Acad Sci*, 1043:151-157, 2005)、酸化 DNA 損傷を誘発して細胞障害を引き起こすことが知られている。乳牛の繁殖において、未経産牛は受胎率が比較的高い一方で、経産牛では分娩を機に受胎率が低下することが知られている。泌乳に伴い、負のエネルギーバランスに陥りがちな経産乳牛に対しては、泌乳に伴うエネルギー収支の不足分を補うべく穀類依存比率が高い飼料を給与するような飼養体系がとられているが、受胎率は低下の一途を辿っている。申請者のこれまでの研究から、穀類依存比率が高い飼料を給与されたホルスタイン経産牛 (平均日齢 1,878 日) における血中メチルグリオキサール濃度は、穀類依存比率が低い飼料を給与された黒毛和種経産牛 (平均日齢 1,858 日) と比較して有意に高いという結果が得られており、穀類依存比率が高い飼料を給与されたホルスタイン経産牛における高レベルのメチルグリオキサールが卵巣や子宮といった雌の生殖器官の機能低下を引き起こし、受胎率低下の一因となっている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、メチルグリオキサールが胚のどの発育ステージにおいて作用し、胚死滅を誘導するか、また、メチルグリオキサールが雌の生殖器官にどのような機序で細胞老化を誘導するかを明らかにし、ホルスタイン経産牛における飼料由来の高メチルグリオキサールが受胎率低下の一因であることを示すことを目的とした。

3. 研究の方法

食肉センター由来のウシ子宮を用いた。各子宮角腔内を 0.3%トリプシン+0.02% EDTA+PBS(-)で満たし、37°Cで 30 分インキュベートした後、子宮内膜管腔上皮細胞を単離し、回収した。その後、表面を葉さじで掻き取った後、残った子宮内膜をハサミで細かく切り刻み、0.2%コラゲナーゼ-DMEM で 37°C、60 分インキュベートし、子宮内膜間質細胞を回収した。

(1) Methylglyoxal が子宮内膜細胞の増殖に及ぼす影響

単離した子宮内膜上皮細胞および間質細胞 (P2) を 96 well plate に 6.25×10^3 cells/well となるように播種し、DMEM+10%FBS で 24 時間培養した。その後、MGO をそれぞれ 0、0.1、1 mM となるように添加し、6、12 または 24 時間後に WST-1 assay kit (シグマアルドリッチジャパン株式会社) を用いて 2 時間呈色反応を行った後、細胞を回収した。プレートリーダーを用いて 450nm の吸光度を測定することで生細胞数を算出し、細胞増殖率を測定した。

(2) Methylglyoxal が子宮内膜細胞の ROS 産生量に及ぼす影響

単離した子宮内膜上皮細胞および間質細胞 (P2) を 8 ウェルチャンバーに 4.0×10^4 cells/well となるように播種し、DMEM+10%FBS で 24 時間培養した。その後、MGO をそれぞれ 0、0.1、1 mM となるように添加し、6 時間に CellROX Green Reagent (Thermo Fisher Scientific) を加えて 37°C、30 分間インキュベーションした。ImageJ Software を用いて顕微鏡の撮影画像の蛍光強度を定量し、全細胞数に対する蛍光強度を ROS 産生量として定量解析を行った。

(3) メチルグリオキサールがウシ子宮内膜細胞における γ H2AX タンパク発現に及ぼす影響

単離した子宮内膜上皮細胞および間質細胞 (P2) を Black 96well plate (秋田住友ベーク株式会社) に 6.25×10^3 cells/well となるように播種し、DMEM+10%FBS で 24 時間培養した。その後、MGO をそれぞれ 0、0.1、1 mM となるように添加し、12 時間後に DNA Damage Detection Kit- γ H2AX-Green (同仁化学研究所) を用いて 450nm の吸光度を測定した。続いて、Hoechst33342 溶液を用いて 461nm の吸光度を測定した。Hoechst33342 の測定値は細胞数を反映しているため、各ウェルの γ H2AX の測定値を Hoechst33342 の測定値で補正した。

(4) Methylglyoxal が子宮内膜細胞の細胞老化に及ぼす影響

(1)と同様に細胞を播種し、DMEM+10%FBS で 24 時間培養した。その後、MGO をそれぞれ 0、0.1、1 mM となるように添加し、12 時間に SPIDER- β -gal working solution (同仁化学研究所) を加えて 37°C、30 分間インキュベーションした。ImageJ Software を用いて顕微鏡の撮影画像の蛍光強度を定量し、全細胞数に対する蛍光強度を老化細胞率として定量解析を行った。また、(1)と同様に細胞を播種し、DMEM+10%FBS で 24 時間培養した。その後、MGO をそれぞれ 0、0.1、1 mM となるように添加し、12 時間に細胞を回収して RNA を抽出し、p16 および p21 mRNA

発現量をデジタルPCR解析により測定した。

(5) Methylglyoxal が子宮内膜細胞の IL-8 分泌に及ぼす影響

単離した子宮内膜上皮細胞および間質細胞 (P2) を 24 well plate に 1.0×10^5 cells/well となるように播種し、DMEM+10%FBS で 24 時間培養した。その後、培養液中に MGO を 0、0.1、1 mM となるように添加して 12 時間培養し、培養液を交換してさらに 12 時間培養した後、培養上清を採取し、培養上清中の IL-8 濃度を ELISA Flex kit for Bovine IL-8 (Mabtech Inc, US) を用いて測定した。また、TaKaRa BCA Protein assay Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて、各ウェルの細胞におけるタンパク質濃度を測定し、各ウェルにおける IL-8 濃度を補正した。

(6) Methylglyoxal の静脈内への投与がウシ子宮内膜の細胞老化に及ぼす影響

正常な発情回帰を示す黒毛和種雌牛 (n=13) を用い、任意の時期に腔内留置型プロゲステロン製剤 (CIDR) を留置した。その 6 日後に CIDR を抜去し、プロスタグランジン F2 α (PGF2 α) 製剤を筋肉内に投与 (2 mL/頭) した。CIDR を抜去し、PGF2 α 製剤を投与した日から 9 日間、MGO 溶液 (50 mM) を流速 1.67 mL/min で 2 時間、頸静脈に留置したカテーテルを通じて投与した。対照群には 0.01M PBS を同様の手法で投与した。MGO 溶液の投与を開始した日を 0 日目とし、0 日目は MGO 溶液の投与開始直前および投与終了後 30 分、2 時間、6 時間、22 時間で採血を行った。その後、1、2、3、7 日目の MGO 投与終了後 22 時間で採血を行った。8 日目の MGO 溶液 (n = 4) または PBS (n = 5) の投与終了後、22-24 時間後に、黄体が存在する側の子宮角から子宮内膜組織を採取し、採取した子宮内膜組織から RNA を抽出して p16 および p21 mRNA 発現量を qRT-PCR 解析により測定した。血清中の MGO 濃度は OxiSelect Methylglyoxal (MG) Competitive ELIZA Kit (Cell Biolabs, Inc.) を用い、EIA 法により測定した。

4. 研究成果

(1) ウシ子宮内膜上皮細胞における増殖率は MGO 添加による変化がみられなかったが、ウシ子宮内膜間質細胞では、MGO (1 mM) 添加後 6、12、24 時間後における増殖率は MGO 0 mM 添加区と比較して有意に減少した (図 1)。

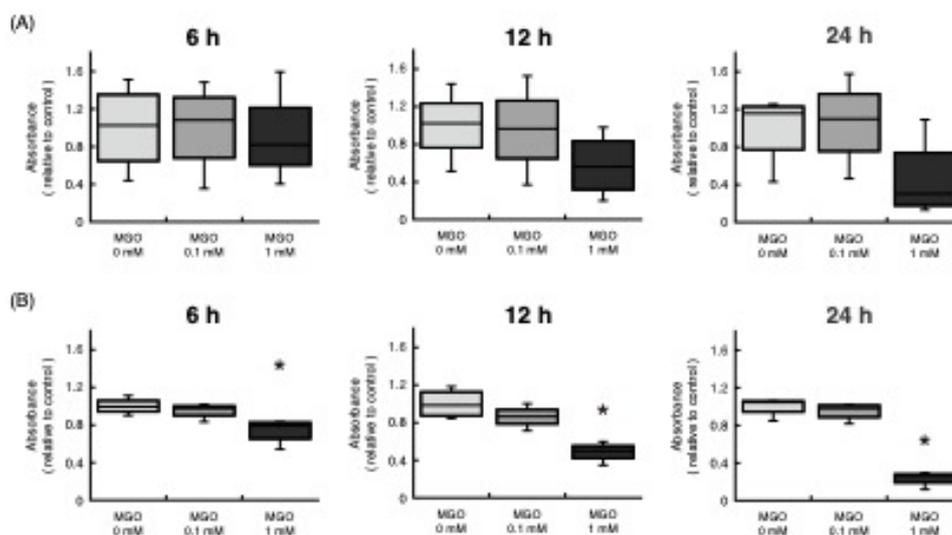


図 1 (A)子宮内膜上皮細胞 (n=4) および (B)子宮内膜間質細胞 (n=4) における MGO 添加後の細胞増殖率 (*, $p < 0.05$ v.s. MGO 0 mM, Dunnet's test)

(2) 子宮内膜上皮細胞および子宮内膜間質細胞において、MGO (1 mM) 添加後 6 時間の ROS 産生量は、MGO 0 mM 添加区と比較して有意な増加が認められた (図 2)。

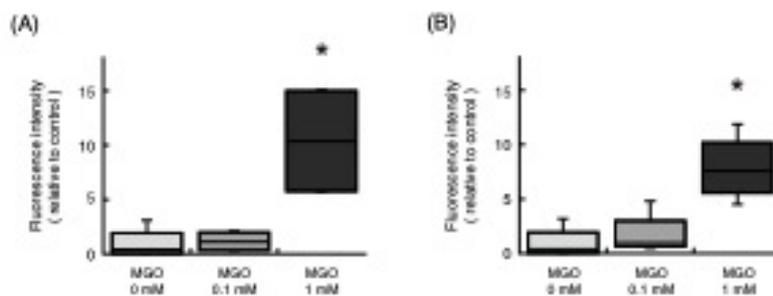


図 2 (A)子宮内膜上皮細胞 (n=4) および (B)子宮内膜間質細胞 (n=4) における MGO 添加後の ROS 産生量 (*, $p < 0.05$ v.s. MGO 0 mM, Dunnet's test)

(3) ウシ子宮内膜間質細胞において、MGO (1 mM) 添加後 12 時間の γ H2AX タンパク発現量は、MGO 0 mM 処置区と比較して有意に増加した (図3) ことから、MGO が DNA 損傷を誘発したことが示された。一方、ウシ子宮内膜上皮細胞における γ H2AX タンパク発現量は、各処置区間で有意差は認められなかった。

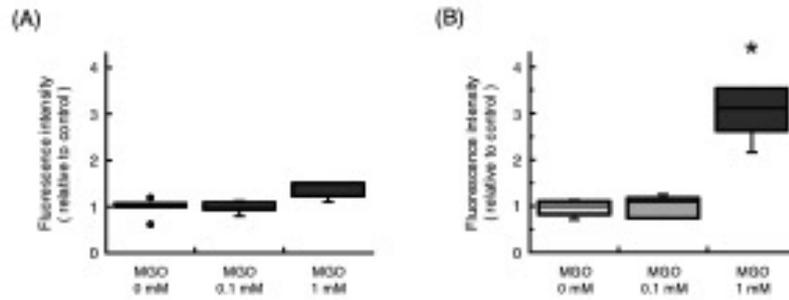


図3 (A)子宮内膜上皮細胞(n=4)および(B)子宮内膜間質細胞(n=4)におけるMGO添加後の γ H2AX発現量(*, $p < 0.05$ v.s. MGO 0 mM, Dunnet's test)

(4) 子宮内膜間質細胞において、MGO (1 mM) 添加後 12 時間における細胞老化率は MGO 0 mM 処置区と比較して有意に上昇した (図4)。一方、子宮内膜上皮細胞における細胞老化率は MGO 添加による変化が認められなかった。

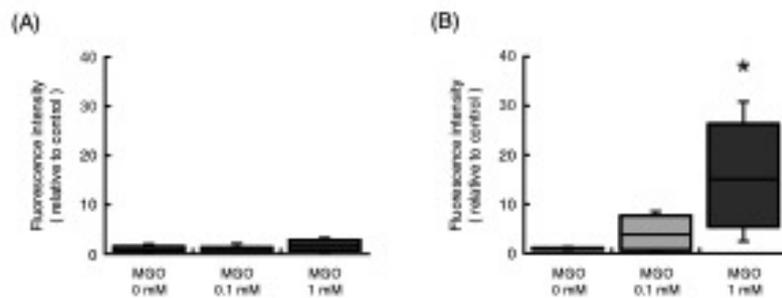


図4 (A)子宮内膜上皮細胞(n=4)および(B)子宮内膜間質細胞(n=4)におけるMGO添加後の細胞老化率(*, $p < 0.05$ v.s. MGO 0 mM, Dunnet's test)

子宮内膜間質細胞において、MGO (1 mM) 添加後 12 時間における p16 mRNA 発現量は MGO 0 mM 処置区と比較して有意に増加し、p21 mRNA 発現量は増加する傾向がみられた (図5)。子宮内膜上皮細胞においては、p21 mRNA 発現量は MGO 0 mM 処置区と比較して有意に増加したが、p16 mRNA 発現量は MGO 添加による変化が認められなかった。以上のことから、MGO 添加により子宮内膜細胞の細胞老化が誘導されたことが示唆された。

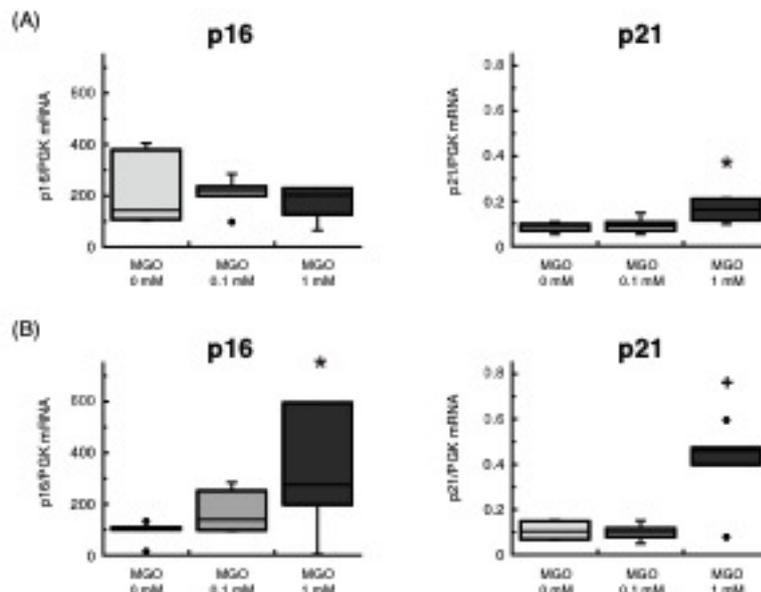


図5 (A)子宮内膜上皮細胞(n=6)および(B)子宮内膜間質細胞(n=6)におけるMGO添加後のp16, p21 mRNA発現量(*, $p < 0.05$, +, $p < 0.1$ v.s. MGO 0 mM, Dunnet's test)

(5) ウシ子宮内膜間質細胞の培養上清中における IL-8 濃度は、MGO 1 mM 処置区において対照区と比較して増加する傾向がみられた ($p=0.073$) (図6)。一方、ウシ子宮内膜上皮細胞の培養上清中における IL-8 濃度は各処置区間で有意差は認められなかった。

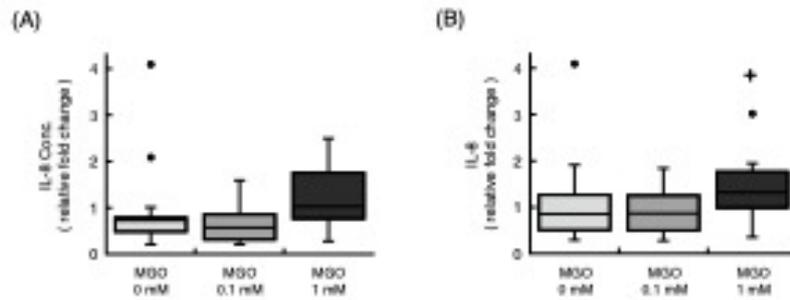


図6 (A)子宮内膜上皮細胞(n=13)および(B)子宮内膜間質細胞(n=11)におけるMGO添加後の培養上清中IL-8濃度(+, $p < 0.1$ v.s. MGO 0 mM, Dunnett's test)

(6) MGO を静脈内に投与した後の平均血中メチルグリオキサール濃度は、投与開始前0日目と比べて、3日目において有意に上昇しており、9日目で上昇する傾向が見られた(図7)。MGOの静脈内投与(2時間/日)後の子宮内膜組織におけるp16およびp21mRNA発現量はMGO添加による変化が認められなかった。以上の結果からウシ子宮内膜で老化細胞を誘導するためには、より長期間のMGO投与が必要であった可能性が考えられた。

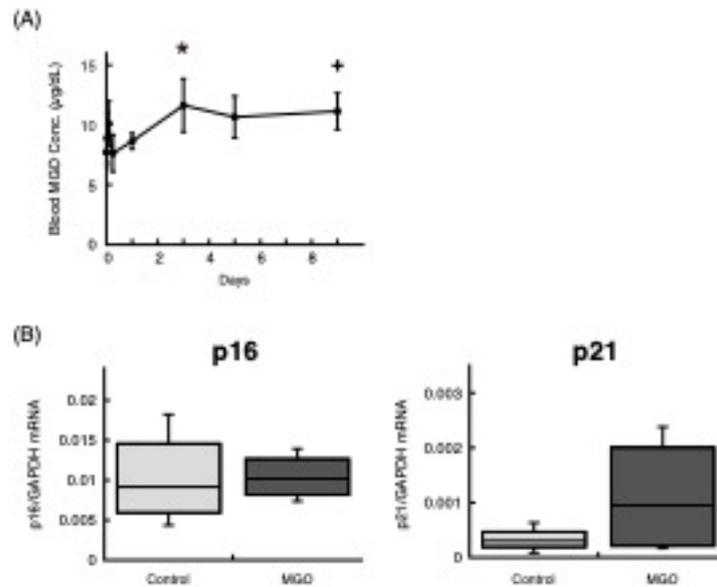


図7 (A)MGO投与前後における平均血中MGO濃度(*, $p < 0.05$, +, $p < 0.1$ v.s.投与前, Contrast test) (B)MGO投与後の子宮内膜におけるp16, p21mRNA発現量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 東誠也、阿部良哉、館林亮輝、中村翔、大蔵聡、木村康二、松山秀一
2. 発表標題 メチルグリオキサールがウシ子宮内膜細胞に及ぼす影響とその作用機序の解明
3. 学会等名 第116回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Seiya Higashi, Ryoya Abe, Ryoki Tatebayashi, Sho Nakamura, Satoshi Ohkura, Koji Kimura, Shuichi Matsuyama
2. 発表標題 Elevated Methylglyoxal Concentrations Induces Cellular Senescence in Endometrial Cells in Dairy Cows
3. 学会等名 Society for the Study of Reproduction 57th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 阿部 良哉, 館林 亮輝, 加治佐 実希, 森田 康広, 大蔵 聡, 松山 秀一
2. 発表標題 メチルグリオキサールがウシ子宮内膜細胞に及ぼす影響
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	木村 康二 (Kimura Koji) (50355070)	岡山大学・環境生命自然科学学域・教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------