

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15646

研究課題名(和文) 乳牛の炎症性子宮疾患において治癒後も続く低受胎を引き起こす細菌毒素の分子作用機序

研究課題名(英文) The mechanism responsible for long-term infertility in cows with uterine inflammation.

研究代表者

真方 文絵 (Magata, Fumie)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：50635208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、発育初期にリポポリサッカライド(LPS)の曝露を受けた卵胞の発育動態とステロイドホルモン産生能を検証するとともに、発育途上卵胞に内包される卵母細胞の発育能におよぼすLPSの影響を明らかにすることを目的とした。ウシ初期胞状卵胞はLPSを受容する機構を持ち、体外発育培養における発育途上期のLPS曝露はエストラジオール産生を抑制した。また、LPSは卵母細胞の生存性を低下させたとともに、成熟能を不可逆的に低下させる可能性を明らかにした。さらに、子宮の炎症を示すウシ子宮内膜炎モデルを作出し、脳と卵巣のインタラクションにおけるLPSの即時的作用と長期的作用を精査することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性子宮疾患の罹患牛では、臨床的に子宮の炎症が治癒しても長期にわたり受胎性が低下する。本研究では、LPSが長期にわたるエストラジオール産生抑制と不可逆的な卵母細胞の成熟能低下を引き起こすことで、治癒後も継続する卵巣機能障害の一因となる可能性を示した。本研究成果は新たなアプローチによる革新的な治療法の開発のための基礎的知見となり、乳肉牛の生産性向上に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the effects of LPS on the developmental dynamics and steroidogenesis of follicles and the developmental competence of oocytes in developing follicles. LPS may directly act on bovine early antral follicles to suppress estradiol production in vitro. LPS also attenuated the viability of oocytes enclosed in the early antral follicles and induced an irreversible decrease in oocyte maturation capacity. Furthermore, a bovine endometritis model was developed to examine the immediate and long-term effects of LPS on the brain and ovarian interaction.

研究分野：臨床繁殖学

キーワード：リポポリサッカライド 炎症性子宮疾患 卵胞発育 エストラジオール 卵母細胞 顆粒層細胞 初期胞状卵胞 牛

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 炎症性子宮疾患による卵巣機能障害と細菌毒素

乳牛における繁殖障害の主要因に、子宮への細菌感染によって引き起こされる子宮炎や子宮内膜炎といった炎症性子宮疾患が存在する。罹患牛の約半数において、卵胞発育不全などの卵巣機能障害が発生する。また、子宮に感染した細菌が産生する細菌毒素であるリポポリサッカライド (LPS) が卵巣内の卵胞液中に移行し、卵胞の性ステロイドホルモン産生や卵母細胞の成熟機構を阻害する可能性が示されている。

(2) 治癒後も継続する卵巣機能障害

炎症性子宮疾患が家畜生産における重大なリスク疾病である要因として、臨床的に子宮が治癒しても長期にわたり受胎しないという問題が存在するが、その機序の解明には至っていない。原始卵胞の活性化によって発育を開始した直径 1mm 未満の発育途上卵胞は、約 2 ヶ月かけて成熟卵胞へと発育したのち排卵に至る。子宮の細菌感染によって産生された LPS が発育途上の卵胞に移行し、その機能に障害を与えた場合、発育が進んで成熟卵胞となり排卵する過程においても LPS による機能抑制が残存することで、子宮は治癒しているのに受胎しないという現象を引き起こす可能性は極めて高い。

2. 研究の目的

本研究は、発育初期に LPS の曝露を受けた卵胞の発育動態とステロイドホルモン産生能を検証するとともに、発育途上卵胞に内包される卵母細胞の発生能におよぼす LPS の影響を明らかにすることで、「子宮が治癒しても受胎しない」病態を分子レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 発育途上卵胞における LPS 受容能の検証

食肉処理場で採取したウシ卵巣より初期胞状卵胞 (直径 0.5~1 mm) を単離し、卵母細胞および卵丘細胞-顆粒層細胞複合体における LPS 受容体遺伝子 (*TLR4*, *CD14*, および *MD2*) の発現を検証した。また、ウシ卵巣の凍結組織切片を作製し、免疫組織化学により TLR4 タンパクの局在を検証した。

(2) 発育途上卵胞内の卵母細胞におよぼす LPS の作用の検証

ウシ発育途上卵胞から単離した卵母細胞-卵丘細胞-顆粒層細胞複合体 (OCGCs) を LPS 添加培地で 12 日間の体外発育培養に供することで、炎症性子宮疾患の病態を模倣した長期 LPS 曝露を行った。培養後の OCGCs は形態解析から生存性と発育能を評価したとともに、培地中のエストラジオール濃度を測定した。また、12 日間の体外発育培養後に生存していた OCGCs は LPS 非添加培地に移して体外成熟培養に供し、核の成熟率とミトコンドリア膜電位差を解析した。

(3) 子宮内膜炎モデル牛における卵胞発育動態の検証

子宮内膜炎モデル牛を作出し、卵胞発育におよぼす LPS の長期的な作用を検証した。ホルモン処置によって卵胞発育を同期化した乳牛を用い、12 時間おき 6 日間にわたって子宮内膜上皮の搔爬と子宮内への LPS 反復投与を実施した。LPS 反復投与の前周期、投与周期、投与後周期のそれぞれにおいて発育卵胞数や卵胞直径などの卵胞発育動態を経時的に解析した。また、発育した主席卵胞の卵胞液を経腔超音波プローブにより吸引し、ステロイドホルモンおよび LPS 濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 発育途上卵胞における LPS 受容能の検証

ウシ初期胞状卵胞に内包される卵母細胞および卵丘細胞-顆粒層細胞複合体のいずれにおいても、LPS 受容体遺伝子である *TLR4*, *CD14*, および *MD2* の発現を認めた。また、免疫組織化学により、初期胞状卵胞を構成する卵母細胞、卵丘細胞、顆粒層細胞、および卵胞膜細胞における TLR4 タンパク局在を確認した。以上より、発育初期の微小な卵胞は LPS を受容する機構をもつ可能性が示された。

(2) 発育途上卵胞内の卵母細胞におよぼす LPS の作用の検証

子宮内膜炎罹患牛の卵胞液中濃度と同レベルの LPS 添加 (0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) によって、OCGCs の生存性が減少したとともに、正常な発育を反映する指標として用いられる顆粒層細胞の腔形成率が低下した (図 1A)。また、LPS 添加によって OCGCs のエストラジオール産生量が減少した (図 1B)。以上の結果より、LPS が初期胞状卵胞に内包される発育途上卵母細胞

胞の生存性および顆粒層細胞のステロイドホルモン産生能を低下させると考えられた。

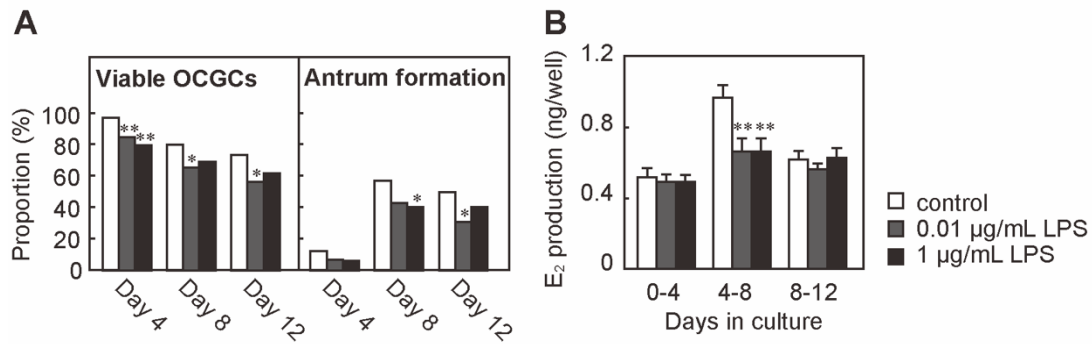


図 1. 初期胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞-顆粒層細胞複合体 (OCGCs) の体外発育培養における LPS 曝露は OCGCs の (A) 生存性と腔形成, および (B) エストラジオール (E₂) 産生を抑制した. **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$ (vs. control).

12 日間の体外発育培養後に生存していた OCGCs を LPS 非添加培地にて体外成熟培養に供したところ, LPS 存在下で体外発育した卵母細胞では核の成熟率が低下したとともに (図 2A), ミトコンドリア膜電位差が低下した (図 2B)。LPS 存在下で体外発育した卵母細胞では, 形態的に正常であっても核および細胞質の成熟能が低下したことから, 発育途上期の LPS 曝露は卵母細胞に不可逆的な影響をおよぼす可能性が示唆された。

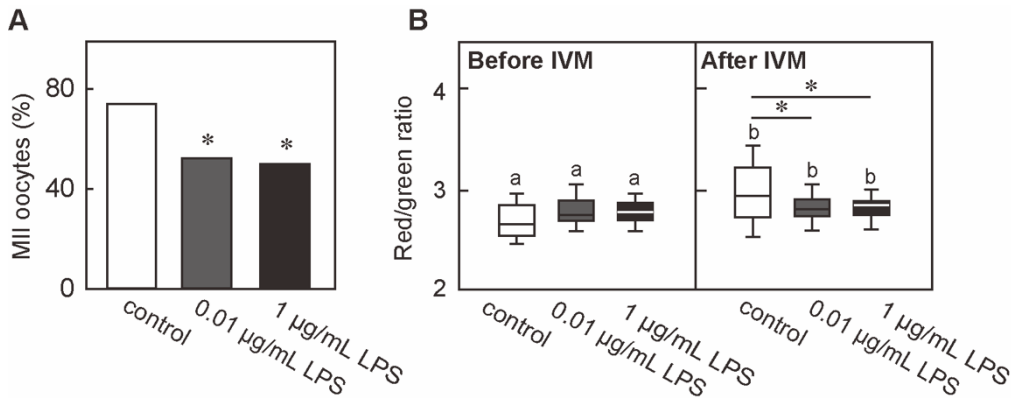


図 2. 初期胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞-顆粒層細胞複合体 (OCGCs) の体外発育培養における LPS 曝露は体外成熟培養後 (IVM) の (A) 核成熟率と (B) ミトコンドリア膜電位差を低下させた. *: $P < 0.05$ (vs. control). a, b: $P < 0.05$ (before vs. after IVM).

以上より, ウシ子宮内膜炎においては LPS が卵胞に移行し, エストラジオール産生抑制と不可逆的な卵母細胞の胚発生能低下を引き起こすことで, 長期にわたる卵巣機能障害の一因となる可能性が明らかになった。

(3) ウシ子宮内膜炎モデルにおける卵胞発育動態の検証

子宮内 LPS 反復投与によって, 発熱や子宮内膜の炎症, 膿貯留といった症状を示す子宮内膜炎モデル牛を確立した (図 3)。

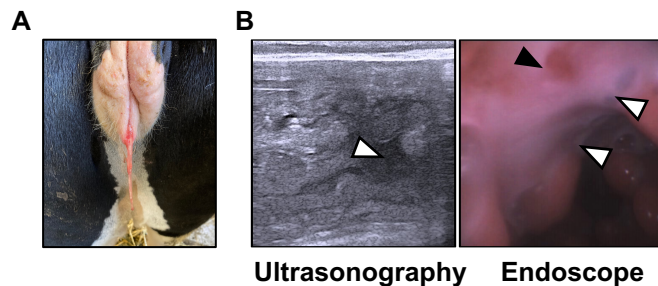


図 3. (A) 子宮内 LPS 投与後の乳牛. 外陰部より膿の排出を認めた. (B) 超音波検査 (左) および内視鏡検査 (右) で検出した子宮内膜の炎症を示す膿の貯留 (白やじり) と充血 (黒やじり).

子宮内 LPS 反復投与による発育卵胞数および卵胞直径への影響は認められなかった。子宮内に LPS を投与した牛では血中および卵胞液中の LPS 濃度が増加したことから, 子宮で産生された LPS が全身循環を介して卵胞へと移行する可能性を示した。また, LPS 反復投与を終了した

後に発育を開始した主席卵胞において、卵胞液中の LPS 濃度は投与前周期と同レベルに低下したが、エストラジオール濃度の低下が認められた。このことは、LPS 消失後も卵胞のステロイドホルモン産生への影響が残存する可能性を示唆している。

結論と今後の展望

ウシの子宮内膜炎において、子宮内の LPS が卵胞に移行する可能性を明らかにした。また、LPS は長期にわたるエストラジオール産生抑制と不可逆的な卵母細胞の成熟能低下を引き起こすことで、治癒後も継続する卵巣機能障害の一因となる可能性を示した。哺乳類メスの生殖機能は視床下部-下垂体-卵巣軸によって制御されていることから、今後は脳と卵巣のインタラクションにおける LPS の即時的作用と長期的作用を明らかにするとともに、LPS の抑制作用を緩和する新奇物質を見つけ出すことにより、子宮内膜炎による長期不受胎に対する新たな治療法の開発を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sato Marimo, Minabe Shiori, Sakono Takahiro, Magata Fumie, Nakamura Sho, Watanabe Youki, Inoue Naoko, Uenoyama Yoshihisa, Tsukamura Hiroko, Matsuda Fuko	4. 巻 162
2. 論文標題 Morphological Analysis of the Hindbrain Glucose Sensor-Hypothalamic Neural Pathway Activated by Hindbrain Glucoprivation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 bqab125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endo/bqab125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Magata Fumie, Sone Akihiro, Watanabe Yuki, Deguchi Yuichiro, Aoki Takahiro, Haneda Shingo, Ishii Mitsuo	4. 巻 176
2. 論文標題 Prevention of retained fetal membranes and improvement in subsequent fertility with oxytocin administration in cows with assisted calving	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 200 ~ 205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.theriogenology.2021.09.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishiyama Dai, Yamamoto Kie, Kikuchi Masato, Magata Fumie, Takahashi Kei, Chambers James K., Uchida Kazuyuki, Fujiwara Reina, Mochizuki Manabu, Inokuma Hisashi	4. 巻 84
2. 論文標題 Congenital syringohydromyelia in a crossbred (Holstein-Friesian × Japanese Black) beef calf	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 31 ~ 35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0441	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Chen Jing, Minabe Shiori, Munetomo Arisa, Magata Fumie, Sato Marimo, Nakamura Sho, Hirabayashi Masumi, Ishihara Yasuhiro, Yamazaki Takeshi, Uenoyama Yoshihisa, Tsukamura Hiroko, Matsuda Fuko	4. 巻 -
2. 論文標題 Kiss1-dependent and independent release of luteinizing hormone and testosterone in perinatal male rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ21-0620	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Magata Fumie	4. 巻 66
2. 論文標題 Lipopolysaccharide-induced mechanisms of ovarian dysfunction in cows with uterine inflammatory diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 311 ~ 317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oshimo Yukina, Mumetomo Arisa, Magata Fumie, Suetomi Yuta, Sonoda Shuhei, Takeuchi Yukari, Tsukamura Hiroko, Ohkura Satoshi, Matsuda Fuko	4. 巻 67
2. 論文標題 Estrogen increases KISS1 expression in newly generated immortalized KISS1-expressing cell line derived from goat preoptic area	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 15 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Magata Fumie, Urakawa Manami, Matsuda Fuko, Oono Yoshio	4. 巻 161
2. 論文標題 Developmental kinetics and viability of bovine embryos produced in vitro with sex-sorted semen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 243 ~ 251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.theriogenology.2020.12.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dai Mingdao, Nakamura Sho, Takahashi Chudai, Sato Marimo, Munetomo Arisa, Magata Fumie, Uenoyama Yoshihisa, Tsukamura Hiroko, Matsuda Fuko	4. 巻 -
2. 論文標題 Reduction of arcuate kappa-opioid receptor-expressing cells increased luteinizing hormone pulse frequency in female rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ20-0832	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Magata Fumie, Ideta Atsushi, Matsuda Fuko, Urakawa Manami, Oono Yoshio	4. 巻 167
2. 論文標題 Glutathione ethyl ester improved the age-induced decline in the developmental competence of bovine oocytes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 37~43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.theriogenology.2021.03.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 真方文絵	4. 巻 68
2. 論文標題 牛卵母細胞における加齢の発生要因と胚発育低下のメカニズム	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 家畜診療	6. 最初と最後の頁 241-245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 黒木智絵, 真方文絵, 迫野貴大, 松田二子
2. 発表標題 ウシ初期卵状卵胞由来卵母細胞の発育と成熟におよぼすエンドトキシンの抑制作用
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真方文絵
2. 発表標題 豊かな食卓を守る「ウシ人工繁殖オタク」の挑戦
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真方文絵
2. 発表標題 持続可能な畜産に向けたウシ受精卵タイムラブス解析
3. 学会等名 農学と工学の超越創発イノベーションフォーラム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Magata Fumie
2. 発表標題 Mechanisms of ovarian dysfunction associated with bacterial endotoxin in cows with uterine inflammatory diseases
3. 学会等名 NTU-UTokyo Veterinary Medicine Online Symposium（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 真方文絵、松田二子、羽田真悟
2. 発表標題 ウシ卵胞液中に存在する細菌毒素と肝機能障害関連物質が卵母細胞の胚発生能におよぼす影響
3. 学会等名 日本畜産学会第128回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真方文絵、曽根昭宏、羽田真悟、滄木孝弘、松田二子、石井三都夫
2. 発表標題 分娩時の潜在性低カルシウム血症が分娩状況および新生子牛の活力におよぼす影響
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ukina Oshimo, Arisa Munetomo, Fumie Magata, Yuta Suetomi, Shuhei Sonoda, Yukari Takeuchi, Hiroko Tsukamura, Satoshi Ohkura, Fuko Matsuda
2. 発表標題 Establishment of an immortalized KISS1-expressing cell line derived from goat preoptic area
3. 学会等名 54th SSR Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 16.Marimo Sato, Fumie Magata, Hiroko Tsukamura, Fuko Matsuda
2. 発表標題 Evaluation of the function of hindbrain ependymal cells in glucose sensing by analyzing the counterregulatory responses to glucoprivation in female rats with ependymal denudation
3. 学会等名 Neuroscience 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------