

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23580383

研究課題名(和文) リポポリサッカライドによるウシ卵胞構成細胞の機能障害の解明とその起因分子の探索

研究課題名(英文) Ovarian follicular cell dysfunction by lipopolysaccharide

研究代表者

清水 隆 (Shimizu, Takashi)

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：90375113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：分娩後に起こる周産期病の一つである子宮内膜炎を患った乳牛では、卵巣機能や子宮機能の低下が認められ受胎率が極めて低い。その要因の一つとして死滅した感染細菌から放出されるリポポリサッカライド(LPS)の関与が上げられる。本研究では、子宮内膜炎のウシ卵巣内卵胞の各発育段階の卵胞液中にLPSが存在し、高いLPS濃度(>0.5 EU/ml)と低いLPS濃度(<0.5 EU/ml)の卵胞が存在することがわかった。特に、高LPS卵胞では繁殖に必須のステロイドホルモンの産生が抑制されていた。これらのことから、子宮内膜炎による繁殖性の低下は、LPSによる卵胞機能の抑制である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In postpartum dairy cows, various inflammatory diseases depress reproductive performance. Lipopolysaccharide (LPS) derived from infections of the uterus or mammary gland with Gram-negative bacteria was shown to affect reproduction of dairy cow. LPS concentration detected in follicular fluid ranged from 0.2 to 2.0 EU/mL. In follicles with a high level of LPS (>0.5 EU/mL, n = 15), the concentration of E2 was lower and that of P4 was higher when compared to those in follicles with a low level of LPS (<0.5 EU/mL, n = 23). These findings suggest a possible mechanism of ovarian dysfunction and subsequent infertility in cows with endometritis.

研究分野：生殖科学

キーワード：卵巣機能 ステロイドホルモン 内毒素 顆粒層細胞 卵胞膜細胞

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜炎は細菌感染によって引き起こされる生殖器官の疾患である。ウシにおける感染経路は主として経膈感染であり、人工授精、胚移植や子宮疾患の診断・治療の際の検査処置器具などを介して、また難産や胎盤停滞などの周産期の障害に対する処置時に人為的あるいは自然に細菌が子宮内に侵入して起こる。起因菌は、大腸菌、*Arcanobacterium pyogenes*、*Fusobacterium* 属などのグラム陰性細菌が主である。子宮内膜炎のウシ卵巣では、分娩後、最初に出現する優勢卵胞の発育が遅延すること、また卵胞で合成され、その発育や発情発現に関わるエストラジオール (E2) の血中濃度が低下することが報告されている。分娩したウシが次の妊娠に至るためには卵巣機能 (卵胞発育) および子宮機能の回復が必須であるが、子宮内膜炎の高頻度の発生率が繁殖障害の素因となっており、家畜繁殖 (家畜生産) において極めて重要な問題となっている。起因菌であるグラム陰性菌の細胞壁構成成分であるリポポリサッカライド (LPS) が子宮内膜炎乳牛の血中で濃度が増加していることが報告され、LPS と生殖機能との関係が示唆されるようになった。子宮内膜炎牛の排卵卵胞の卵胞液中には LPS が認められ、約 800 ng/ml の濃度で存在していることが報告されている。ステロイドホルモンの内分泌器官に与える血中濃度が 1 ~ 10 ng/ml であることを考えると、卵胞液中の LPS 濃度が高濃度であることが分かる。しかし、排卵卵胞の卵胞液中に高濃度に存在する LPS が卵胞構成細胞である顆粒層細胞や卵胞膜細胞の細胞機能に影響するののかについては、不明な点が多い。また、発育段階途上の卵胞の卵胞液中 LPS 濃度については、不明である。

2. 研究の目的

分娩後に起こる周産期病の一つである子宮内膜炎を患った乳牛では、卵巣機能や子宮機能の低下が認められ受胎率が極めて悪い。その要因の一つとして死滅した感染細菌から放出されるリポポリサッカライド (LPS) の関与が上げられる。しかし、LPS が卵巣機能にどのように作用して機能障害を誘発しているのかについては不明のままである。そこで、本研究では LPS による卵巣機能障害に焦点を当て、性周期に重要な役割を担う卵胞構成細胞である顆粒層細胞および卵胞膜細胞のステロイド産生に対する LPS の分子的作用機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 食肉処理場由来の乳牛の生殖器を利用し、子宮内膜炎 (子宮内に膿が蓄積されている状態、腐敗臭のするものなど) と判断した子宮に付随している卵巣を採取し、各発育段階の卵胞の卵胞液を採集する。卵胞直径算出計算式モデルを利用し、採集した卵胞液の量からその卵胞の大きさを算出す

る。また採取した卵胞液は、LPS 測定キット (Endospecy ES-24S kit, Seikagaku Biobusiness) を用いて測定すると同時に卵胞液中の E2 および P4 も酵素免疫法により測定する。さらに、卵胞液採取時に同時に取れる少量の顆粒層細胞から出来る限り RNA を抽出して、ステロイド産生関連酵素群の遺伝子発現を解析する。

(2) 排卵前の大卵胞 (優勢卵胞) および選抜前卵胞から卵胞膜細胞を分離・採取し、生体で起こる下垂体からの LH のパルス状分泌を模倣した低用量 LH を曝露すると同時に LPS を処理し、LH サージ後に起こる細胞機能変化に対する LPS の影響を検討する。

(3) 大卵胞から顆粒層細胞および卵胞膜細胞を分離・採取し、体外培養システムを用いた両細胞の黄体化への分化誘導モデルを利用し、LPS の影響を検討する。

4. 研究成果

(1) 炎症症状が認められた子宮 (炎症性子宮) に付随していた卵巣内に存在する大卵胞の卵胞液中には、LPS の存在が確認された。大卵胞の中でも高濃度の LPS が存在する卵胞 (高 LPS 卵胞) と低濃度の LPS が存在する卵胞 (低 LPS 卵胞) の 2 つが存在することが明らかとなった。

(2) 高 LPS 卵胞および低 LPS 卵胞の卵胞液中のエストラジオール (E2) 濃度は、低 LPS 卵胞に比べ高 LPS 卵胞で有意に減少した。E2 合成に関わる P450arom の遺伝子発現を解析したところ、低 LPS 卵胞に比べ高 LPS 卵胞で有意に減少した。一方、高 LPS 卵胞および低 LPS 卵胞の卵胞液中のプロゲステロン (P4) 濃度は、低 LPS 卵胞に比べ高 LPS 卵胞で有意に増加した。

(3) 培養卵胞膜細胞の P4 およびアンドロジェン (A4) 産生における LPS の影響は、抑制的に作用することが明らかとなった。すなわち、下垂体からの LH のパルス状分泌を模倣した低用量の LH を卵胞膜細胞に感作すると P4 および A4 の産生分泌量が増加するが、LPS は卵胞膜細胞に対する低用量 LH の作用を強く抑制し、P4 および A4 産生量を減少させた。また、この作用は選抜後の大卵胞の卵胞膜細胞に比べ選抜前の卵胞の卵胞膜細胞で顕著であった。

(4) 大卵胞から採取した顆粒層細胞を用いて作出した体外培養黄体化モデルにおいて、黄体化誘導前、黄体化同時および黄体化誘導前からの長期期間の LPS 感作を行った。その結果、LPS はいずれの感作時期においても顆粒層細胞の黄体化に伴う P4 産生に影響を及ぼさなかった。

(5)大卵胞から採取した卵胞膜細胞を用いて作出した体外培養黄体化モデルにおいて、黄体化誘導前、黄体化同時および黄体化誘導前からの長期間のLPS感作を行った。その結果、黄体化誘導前からの長期間のLPS感作が、卵胞膜細胞の黄体化に伴うP4産生を強く抑制した。さらに、P4産生に関連する因子の遺伝子およびタンパク質発現を解析したところ、LPSは遺伝子レベルの発現には関与せず、タンパク質の発現を抑制した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10件)

Magata, F., Horiuchi, M., Miyamoto, A., Shimizu, T. Lipopolysaccharide (LPS) inhibits steroid production in theca cells of bovine follicles: Distinct effect of LPS on theca cell function in pre- and post-selection follicles. **J. Reprod. Dev.** 60(4), 280-287 (2014)査読有

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24769841>

Magata, F., Horiuchi, M., Miyamoto, A., Shimizu, T. Peptidoglycan inhibits progesterone and androstenedione production in bovine ovarian theca cells. **Toxicol. In vitro** 28(5), 961-967 (2014) 査読有 doi: 10.1016/j.tiv.2014.04.005.

Magata F, Horiuchi M, Echizenya R, Miura R, Chiba S, Matsui M, Miyamoto A, Kobayashi Y, Shimizu T. Lipopolysaccharide in ovarian follicular fluid influences the steroid production in large follicles of dairy cows. **Anim. Reprod. Sci.** 144(1-2), 6-13 (2014)査読有

doi:10.1016/j.anireprosci.2013.11.005.

Shimizu, T., Miyauchi, K., Shirasuna, K., Bollwein, H., Murayama, C., Miyamoto, A. Effects of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) on estradiol

production in bovine granulosa cells from small and large follicles. **Toxicol. In vitro** 26, 1134-1142 (2012)査読有doi: 10.1016/j.tiv.2012.06.014.

[学会発表](計 2件)

真方文絵, 堀内まや, 越前谷陸, 三浦亮太郎, 松井基純, 宮本明夫, 清水隆: ウシ卵胞液中に存在するLipopolysaccharide (LPS)による卵胞でのエストラジオール(E2)産生抑制作用 第106回日本繁殖生物学会 平成25年9月 東京農工大学(東京都 府中市)
堀内まや, 村山千明, 白砂孔明, 宮本明夫, 清水隆: ウシ卵胞膜細胞のステロイド産生における内毒素の影響 第115回日本畜産学会 平成23年3月 名古屋大学(愛知県 名古屋市)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 隆 (SHIMIZU Takashi)
帯広畜産大学・畜産学部・准教授
研究者番号: 90375113

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：