

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780288

研究課題名（和文） ウシ黄体形成を促進する局所の免疫細胞群とその調節機構の解明

研究課題名（英文） Study of local immune cell function that regulates corpus luteum development in the cow

研究代表者 白砂 孔明（SHIRASUNA KOUMEI）
自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20552780

研究成果の概要（和文）：

黄体形成や黄体退行には免疫細胞の動員が見られることから、炎症様反応と捉えることができる。ウシ排卵直後の黄体内では、黄体がインターロイキン-8を高濃度で産生することで好中球が動員されることが分かった。また、好中球とインターロイキン-8は、黄体の血管新生を促進する可能性があることを明らかにした。一方、黄体退行時でも好中球が一過性に集積し、黄体退行誘導因子であるPGFがP-selectin局在を変化させることで、好中球の動員に関与することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Corpus luteum (CL) formation and regression resembles an inflammatory response due to the influx of immune cells. Neutrophils migrate into the early CL partially due to its major chemoattractant interleukin-8 produced at high levels in the CL, and neutrophils is a potential regulator of angiogenesis together with interleukin-8 in developing CL in the cow. On the other hand, during luteolysis, PGF_{2α} rapidly induces the accumulation of neutrophils into the bovine CL at 5 min and enhances neutrophil adhesion *via* P-selectin expression in luteal endothelial cells. Therefore, development and regression of the CL may involve an acute inflammatory-like response due to rapidly infiltrated neutrophils.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：畜産学・獣医学

科研費の分科・細目：基礎獣医学

キーワード：ウシ、免疫、黄体

1. 研究開始当初の背景

乳牛は妊娠し分娩することで初めて乳生産が可能になり、妊娠成立は“経済動物”である乳牛において重要な事象である。先進国では乳量を重視した育種改良により乳牛の高泌

乳化が達成された。その代償として分娩後の母体の免疫機能が大幅に減退し、卵巣機能の異常（黄体機能不全・卵胞嚢腫など）や早期胚死滅が多発した結果、人工授精後の受胎率

は40%程度に低下した。分娩後の卵巣機能を正常に稼働させ受胎率を改善することは、酪農家の収支の改善、延いては安定的な食糧供給に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

免疫細胞がウシ卵巣機能を調節する可能性が考えられているが、免疫細胞は種類・機能ともに多岐にわたり、多様な免疫細胞群が関与している可能性がある。本研究では、好中球やマクロファージの黄体内での局在及び機能を詳細に解析することで、免疫細胞群によるウシ黄体形成の制御機構を解明することを企画した。また、黄体退行における免疫細胞の局在や機能を検証することで、黄体形成と退行という双方向からの免疫細胞機能を理解することを目的とした。研究成果から、分娩後の免疫機能減退による黄体機能不全の対応策への展望を得ることを目指す。将来的に、免疫細胞を人為的に制御し、黄体機能・形成不全に陥らない、妊娠可能な黄体が作出されれば、繁殖問題による淘汰牛数の減少や乳生産を介した食の安定供給に貢献できる可能性がある。

3. 研究の方法

黄体形成期における免疫細胞及び走化性因子の探索：ウシ黄体形成において、どの免疫細胞が局在し、どの様に黄体内に動員されるのかは全く分かっていない。黄体形成段階における免疫細胞及び走化性因子の特定と免疫細胞の黄体内動員機構の解明を目指した。

黄体退行期における好中球の動員とそのメカニズムの解明：黄体退行時期にマクロファージなどが動員され構造的退行に関与すると考えられているが、好中球については不明である。黄体退行誘導因子PGFをウシ生体に投与し、適時に黄体を採取し、黄体内の好中

球局在および好中球の動員機構について調査した。

4. 研究成果

黄体形成：

ウシ黄体期を形成期・中期・後期・退行期に分類し、免疫化学染色法を用いて好中球の黄体内局在と変動を検証したところ、好中球は黄体形成期および退行期に多く局在し、中期および後期で少なかった。特に、黄体形成において最も重要である排卵後1-2日目の黄体内で、好中球が多く局在した。好中球の数の変動と同様に、好中球の走化性因子であるインターロイキン8 (IL-8) の遺伝子およびタンパク質発現も黄体形成期で高かった。このIL-8は濃度依存的に好中球の遊走を刺激すること、黄体由来血管内皮細胞の血管新生を誘導すること、また黄体細胞からのプロジェステロン分泌には影響しないことを、*in vitro*細胞実験で示した。一方、黄体細胞に好中球を添加するとプロジェステロン分泌が有意に刺激された。また、好中球の培養上清でも黄体細胞からのプロジェステロン分泌の刺激は可能であった。

以上から、排卵直後の黄体は高濃度のIL-8を産生・分泌することで好中球を黄体内に動員し、好中球は黄体細胞との細胞間接触を介して、またはIL-8を含む何らかの液性因子を分泌することで、黄体機能・形成の亢進を促すことが示唆された。

黄体退行：

実験1：中期黄体 (Days 10-12) を持つウシにPGFを投与 (=0 h) し、0、5、15、30分および2時間で卵巣を採取した。黄体を回収し、PAS染色で好中球数を、real-time PCR法でIL8および白血球接着分子(P-selectin)の遺伝子発現を解析した。PGF投与後5分で

黄体内好中球数が有意に増加した。IL8 mRNA 発現は PGF 投与後 30 分で増加したが、P-selectin mRNA 発現は 5-30 分で減少した。実験 2：発情周期中期のウシ末梢血から好中球を単離し、PGF による好中球遊走アッセイを行った。また、好中球における PGF 受容体 (FPr) の遺伝子と蛋白発現を調べた。P-selectin の蛍光免疫染色を行った。好中球で FPr は発現せず、PGF は好中球遊走性に影響しなかった。

実験 3：中期黄体由来血管内皮細胞 (EC) に PGF を添加して 5 分後に細胞を固定し、PGF 添加後 5 分で EC における P-selectin 発現が増加した。

以上から、ウシ黄体退行現象では PGF は全身系で好中球に作用するのではなく、PGF が黄体血管内皮細胞の P-selectin 発現を迅速に刺激し、好中球の血管内皮細胞への接着が増加することで、黄体内に好中球が 5 分で動員されることが示唆された。

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 6 件)

Jiemtaweeboon S, Shirasuna K*, Nitta A, Kobayashi A, Schuberth HJ, Shimizu T, Miyamoto A. Evidence that polymorphonuclear neutrophils infiltrate into the developing corpus luteum and promote angiogenesis with interleukin-8 in the cow. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9: 79 *; corresponding author

Nitta A, Shirasuna K*, Haneda S, Matsui M, Shimizu T, Matsuyama S, Kimura K, Schuberth HJ, Miyamoto A. Possible involvement of IFNT in lymphangiogenesis in the corpus luteum during the maternal recognition period in the cow. *Reproduction* 2011; 142: 879-892 *;

corresponding author

Shirasuna K, Matsumoto H, Kobayashi E, Nitta A, Haneda S, Matsui M, Kawashima C, Kida K, Shimizu T, Miyamoto A. Upregulation of interferon-stimulated genes and interleukin-10 in peripheral blood immune cells during early pregnancy in dairy cows. *J Reprod Dev* 2012; 58: 84-90

Shirasuna K*, Jiemtaweeboon S, Raddatz S, Nitta A, Schuberth HJ, Bollwein H, Shimizu T, Miyamoto A. Rapid accumulation of polymorphonuclear neutrophils in the corpus luteum during prostaglandin F_{2α}-induced luteolysis in the cow. *PLoS ONE* 2012;7: e29054 *; corresponding author

Shirasuna K*, Kobayashi A, Nitta A, Nibuno S, Sasahara K, Shimizu T, Bollwein H, Miyamoto A. Possible action of vasohibin-1 as an inhibitor in the regulation of vascularization of the bovine corpus luteum. *Reproduction* 2012; 143: 491-500 *; corresponding author

Shirasuna K, Akabane Y, Beindorff N, Nagai K, Sasaki M, Shimizu T, Bollwein H, Meidan R, Miyamoto A. Expression of prostaglandin F_{2α} receptor and its isoforms in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and PGF_{2α}-induced luteolysis. *Domest Anim Endocrinol* 2012; 43: 227-238

[学会発表] (計 6 件)

Shirasuna K, Jiemtaweeboon S, Nitta A, Shimizu T, Miyamoto A. The corpus luteum development regulated by angiogenic factors and polymorphonuclear neutrophils in the cow. *JSPS*

Japan-Poland Joint Seminar, Iwate Aiina hall (Iwate University), Iwate (2011).

Shirasuna K, Matsumoto H, Sinnenard J, Kobayashi A, Haneda S, Matsui M, Shimizu T, Bollwein H, Miyamoto A. Recruitment of neutrophils within the pregnant corpus luteum in response to interferon tau at the maternal recognition period in the cow. *44th annual meeting; Society for the Study of Reproduction*. Oregon (USA). 2011 July.

白砂孔明, 松本悠, Jientaweeboon S, 羽田真悟, 松井基純, Bollwein H, 清水隆, 宮本明夫. ウシ妊娠認識時期でのインターフェロンτによる黄体内好中球動員機構 第104回日本繁殖生物学会(岩手) 平成23年9月

Sinnenard J, **Shirasuna K**, Kobayashi A, Schuberth HJ, Shimizu T, Bollwein H, Miyamoto A. High number of neutrophils exists in the developing corpus luteum and promotes angiogenesis and progesterone secretion in the cow. *44th annual meeting; Society for the Study of Reproduction*. Oregon (USA). 2011 July.

Kobayashi A, **Shirasuna K**, Sinnenard J, Shimizu T, Bollwein H, Miyamoto A. Capacity of the corpus luteum to migrate mononuclear immune cells and their effect on luteal function in the cow. *44th annual meeting; Society for the Study of Reproduction*. Oregon (USA). 2011 July.

Jientaweeboon S, **白砂孔明**, 小林明由未, Schuberth HS, 清水隆, 宮本明夫. The predominant infiltration of neutrophils at the very early stage of development into the cyclic bovine corpus luteum 第103

回日本繁殖生物学会(青森) 平成22年9月

[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0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
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
白砂孔明 (SHIRASUNA KOUMEI)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20552780

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: