

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380155

研究課題名(和文) 排卵周期を支配する卵巣と子宮の機能調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of ovarian and endometrial functions controlling the reproductive cycle

研究代表者

奥田 潔 (OKUDA, KIYOSHI)

岡山大学・環境生命科学研究科・教授

研究者番号：40177168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣・子宮間には妊娠不成立時に排卵を回帰する機構が備わる。本研究では排卵回帰の起点物質PGF2_αが誘起する排卵回帰に必須の黄体消失機構を解明し、新規排卵周期制御技術開発に資する知見集積を試みた。雄性ホルモンのテストステロンや黄体細胞膜表面糖鎖に結合するgalectin-3はウシ黄体の消失する局面において発現が高く、黄体細胞死の誘導により排卵回帰を促す一方、galectin-1の黄体保護効果はその阻害物質シアル酸の発現上昇により抑制され、排卵回帰への関与が示唆された。子宮が主な産生源であるPGF2_αは黄体内で自己増幅的に濃度を上げ、より確実に黄体消失を誘導する機構の要点を担う可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：生殖内分泌学Prostaglandin (PG)F2_α-induced luteolysis is required for the progression of the reproductive cycle and inducing next ovulation. In this study, we tried to clarify the detailed mechanisms of luteolysis to contribute to develop the method of the artificial control of the reproductive cycle. During the stage that corpus luteum (CL) is regressing, galectin-3 expression in CL tissues and testosterone level in the circulation were high. Both factors decreased viability of cultured CL cells. In cultured CL cells, the CL-protective effect of galectin-1 was inhibited by 2,6 sialic acid that concentration was high during the stage that CL was regressing. PGF2_α increased the expressions of PGF synthases and the secretion of PGF2_α in cultured CL cells, implying the presence of auto-amplification system in CL tissues. Detailed mechanisms of CL regression which has been clarified by this study are expected to contribute to developing the artificial control the reproductive cycle.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：黄体 ウシ 発受誘起 PGF2_α galectin テストステロン 自己増幅 子宮

1. 研究開始当初の背景

ウシの卵巢と子宮の間には、「妊娠を成立・維持する機構」と共に、妊娠が成立しなかった際に「排卵を回帰する機構」が存在する。次の排卵周期への起点である黄体の消失(黄体退行)は子宮から分泌されるプロスタグランジン F₂ (PGF₂) により誘発されるが、子宮における PGF₂ 合成・分泌の調節機構に加え、黄体がどのように消失するのか、そのメカニズムは十分に解明されていない。

PGF₂ の投与は、人工授精の前段階としての発情誘起目的に広く用いられているが、この PGF₂ の投与によって発情の誘起されたウシの受胎率の低いことが問題となっている。この PGF₂ によって発情の誘起されたウシの中で不受胎であった個体の血中プロジェステロン(P4; 黄体が産生するホルモンで妊娠を維持するために必須)濃度が通常より高く、黄体退行が不十分であることが示唆されている。したがって、より自然に近い形で、かつ確実に黄体を退行させる「新規排卵周期制御技術」の開発が求められている。

2. 研究の目的

上述した「新規排卵周期制御技術」の開発に資する基礎的知見の集積を目的とし、子宮の PGF₂ 合成調節機構とともに PGF₂ 感作後の黄体機能の消失(機能的黄体退行)ならびに黄体組織の消失(構造的黄体退行)メカニズムを明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) まず初めに、黄体の構造的退行と直結する「細胞死(アポトーシス)」の誘導メカニズムに着目した。他の細胞においてアポトーシスに参与することの知られている galectin-3 のウシ黄体における発現動態を調べるとともに、ウシ中期黄体より単離した培養黄体細胞に PGF₂ を感作させ、galectin-3 発現量に及ぼす影響を検討した。さらに galectin-3 と結合することの知られる 1-integrin の発現動態を調べるとともに 1-integrin の作用の障害が黄体の細胞死にどのような影響を及ぼすのか検討した。

(2) 次に、galectin-3 とは反対に「黄体の維持」に参与することの知られる galectin-1 に着目した。Galectin-1 は細胞膜上の糖鎖に結合することで作用を発揮するが、その結合は糖鎖にシアル酸が付加することで阻害される。本研究ではウシ黄体におけるシアル化レベルの動態を検討するとともに、単離した黄体細胞に galectin-1 を感作させる際に人為的にシアル化レベルを下げることでどのような影響を及ぼすのか調べた。

(3) ウシ黄体の退行時には、雄性ホルモンであるテストステロンの血中濃度が上昇することが知られる。しかしながら本ホルモンは雄性ホルモンであるが故、雌ウシの生殖機能に及ぼす影響についてあまり研究が遂行されてこなかった。本研究ではウシ黄体におけるテストステロンの合成・代謝酵素の発現動態を調べるとともに、単離した培養黄体細胞の P4 分泌に及ぼすテストステロンの影響を検討した。尚、本研究において使用した「PGF₂ 投与後のウシ黄体組織サンプル」は、共同研究者ポーランド科学アカデミー D.J. Skarzynski 博士より供与を受けた実験試料である。

(4) 黄体退行に最も重要な生理活性物質である PGF₂ は子宮より分泌され、血液を介して黄体に作用するが、これを受けた黄体自身も PGF₂ の分泌を亢進することが近年示唆された。本研究では黄体における PGF₂ の「自己増幅機構」に焦点を当て、PGF₂ 合成関連酵素群の発現に及ぼす PGF₂ を調べた。また子宮内膜における本機構の存在の可能性にもアプローチした。

4. 研究成果

(1) ウシ黄体組織における galectin-3 mRNA 発現は、他の周期と比較し黄体退行期に最も高くなることが明らかとなった。免疫組織化学的検討により、galectin-3 は黄体組織中の黄体細胞に発現が認められる一方、血管内皮細胞には発現が認められなかった。培養黄体細胞に PGF₂ を感作させると、galectin-3 mRNA およびタンパク質発現が亢進された。

1-integrin の mRNA およびタンパク質発現は発情周期を通じて一定レベルを維持し、どの周期の 1-integrin も galectin-3 への結合能を有していた。Galectin-3 を黄体細胞に感作させると細胞死が誘導される一方、同時に 1-integrin 中和抗体を添加することにより細胞死が抑制された。これらの結果より、ウシ黄体細胞により分泌される PGF₂ 誘導性 galectin-3 は黄体細胞表面の 1-integrin に結合することで黄体細胞の死を誘導し、黄体の構造的退行を促進することが示唆された。

(2) ウシ黄体組織におけるシアル酸付加酵素 ST6Gal-1 mRNA 発現およびそれにより付加される 2,6 シアル酸量は黄体退行期に最も高いことが明らかとなった。また 2,6 シアル酸は血管内皮細胞および黄体細胞に局在が認められた。培養黄体細胞への PGF₂ を感作により ST6Gal-1 mRNA 発現量が増加するとともに 2,6 シアル酸の付加された糖タンパク質量が増加した。Galectin-1 添加による細胞生存率上昇効果は、中期黄体から単離した

培養黄体細胞においては認められたが、後期黄体より単離した同細胞においては認められなかった。しかしながらノイラミナーゼを添加することでシアル酸付加を阻害すると、後期黄体細胞においても Galectin-1 が細胞生存率を上昇させた。これら中期黄体および後期黄体における 2,6 シアル酸の付加した糖タンパク質量を比較したところ、後期黄体においてより多くの 2,6 シアル酸付加が認められた。これらの結果より、黄体が機能的にはたらく黄体形成段階から黄体中期において黄体細胞より分泌され、黄体の機能維持に働く galectin-1 の作用が、子宮より分泌された PGF2 により惹起された黄体細胞膜上の 2,6 シアル酸付加により抑制されることで黄体機能維持ができなくなり、構造的黄体退行が誘導されていくことが示唆された。

(3) テストステロンは、経路 コレステロール プレグネノロン デヒドロエピアンドロステロン テストステロン、または経路 コレステロール プレグネノロン P4 テストステロンのどちらかの経路で合成される。PGF2 投与後のウシ黄体において、経路、 に共通のプレグネノロン合成に必須である P450scc 酵素発現を刺激することが明らかとなったが、経路 に特異的な 2 つの酵素 (CYP17A1 および HSD17B1) の発現に変化が認められず、黄体退行時に上昇するテストステロン合成は経路 を介さないことが示唆された。経路 の関与する可能性に関しては現在詳細な検討を進めている。また、黄体細胞におけるプロジェステロンの作用を検討する目的で、中期黄体および後期黄体より単離した培養黄体細胞にテストステロンを添加したところ、後期黄体より単離した黄体細胞においてのみ細胞生存率の低下 (= 細胞死) が認められた。またこれらの細胞においてプロジェステロン分泌量に変化は認められなかった。以上の結果より、何らかの経路を介して黄体退行時に濃度の上昇したテストステロンは黄体細胞に作用することで同細胞の死を招き、黄体組織の構造的退行に関与することが示唆された。

(4) 中期黄体より単離した培養黄体細胞において、PGF2 の感作は PGF2 自体の分泌を刺激する一方、黄体保護物質である PGE2 の分泌に影響を与えなかった。また PGF2 の感作が PGF2 合成酵素群 (PTGS2、PGFS および CBR1) の発現を亢進することが明らかとなった。ウシ黄体組織中の PGF2 受容体タンパク質発現を調べたところ、黄体形成時と比べて黄体中期、黄体後期に高いことが明らかとなった。これらの結果より、黄体中期以降の黄体において発現の高い PGF2 受容体を介して作用を発揮した PGF2 は、PGF2 合成酵素群全ての発現を亢進し、黄体組織中において自己増幅的な PGF2 分泌を誘導することが

示唆された。同時に、黄体が形成され始めた初期の段階において PGF2 受容体の発現量は低いいため、たとえ PGF2 が作用しても自己増幅的な PGF2 分泌量の増加は誘導されず、黄体退行は誘起され得ないことが示唆された。人為的黄体退行誘起に使用される PGF2 は、黄体の形成初期段階においてはその効果が発揮されないことが古くから知られていたが、その原因についてはまったく明らかでなかった。本研究によって得られた知見は、その謎に一步踏み入るきっかけを得る画期的なものであると言える。また、同様の PGF2 自己増幅機構は、子宮内膜細胞においても認められた。このことから、黄体退行を誘導するきっかけを作る子宮内膜においても PGF2 分泌が増幅され、この子宮内膜における自己増幅機構が黄体をより確実に退行させるメカニズムの一翼を担っている可能性が考えられた。本研究に関しては更なる詳細な検討を遂行中である。

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 17 件)

Hashiba K, Nio-Kobayashi J, Sano M, Maeda M, Kimura Y, Yamamoto Y, Kimura K, Okuda K. Possible contribution of 2,6-sialylation to luteolysis in cows by inhibiting the binding of galectin-1. *Biology of Reproduction*. 査読有. 印刷中.

Hashiba K, Sano M, Nio-Kobayashi J, Hojo T, Skarzynski DJ, Okuda K. Galectin-3 contributes to luteolysis by binding to Beta 1 integrin in the bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*. 査読有. Vol. 91. No. 1. 2014. Article 2. pp. 1-10. DOI: 10.1095/biolreprod.114.119057

Kumagai A, Yoshioka S, Sakumoto R, Okuda K. Auto-amplification system for prostaglandin F2 in bovine corpus luteum. *Molecular Reproduction and Development*. 査読有. Vol. 81. 2014. pp. 646-654. DOI: 10.1002/mrd.22332

[学会発表](計 13 件)

1. Hashiba K, Sano M, Nio-Kobayashi J, Yamamoto Y, Kimura K, Okuda K. An increase in the level of 2,6-sialic acid inhibits galectin-1 binding to glycan during luteolysis. *International conference on biology and pathology of reproduction in*

- domestic animals. 査読有. ポーランド・グダンスク. 2015年9月28-30日.
2. Irie Y, Hashiba K, Kimura K, Yamamoto Y, Okuda K. Gene expressions of enzymes involved in testosterone synthesis in the bovine corpus luteum. International conference on biology and pathology of reproduction in domestic animals. 査読有. ポーランド・グダンスク. 2015年9月28-30
 3. 入江 結唯, 羽柴 一久, 吉岡 伸, 木村 康二, 山本 ゆき, 奥田 潔. ウシ黄体における testosterone 合成酵素の遺伝子発現. 第108回日本繁殖学会大会. 査読無. 宮崎・宮崎市. 2015年9月17-20日. 発表番号: P-36.
 4. Hashiba K, Sano M, Nio-Kobayashi J, Okuda K. Galectin-3 participates in luteolysis by binding to b1 integrin in the bovine corpus luteum. 9th International Ruminant Reproduction Symposium. 査読有. 北海道・帯広市. 2014年8月25-29日. 発表番号: 73.
 5. 羽柴 一久, 佐野 栄宏, 小林 純子, 奥田 潔. 発情周期を通じたウシ黄体におけるシアル酸および siglec 1 の発現ならびに局在に関する研究. 第107回日本繁殖生物学会大会. 査読無. 北海道・帯広市. 2014年8月21-24日. 発表番号: P-42.
 6. 羽柴 一久, 佐野 栄宏, 奥田 潔. ウシ黄体における galectin-3 の 1 integrin を介した黄体退化機構の解明. 第106回日本繁殖生物学会大会. 査読無. 東京・府中市 2013年9月12-14日. 発表番号: AW-2.
 7. Hashiba K, Sano M, Hojo T, Okuda K. Possible role of galectin-3 in the bovine corpus luteum during luteolysis. 46th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction. 査読有. カナダ・モントリオール. 2013年7月22-26日. 発表番号: 266.
 8. 熊谷 明日香, 吉岡 伸, 作本 亮介, 奥田 潔. ウシ黄体における ERK1/2 を介した PGF 自己増幅機構に関する研究. 日本畜産学会第116回大会. 査読無. 広島・広島市 2013年3月27-30日. 発表番号: VII30-10.
 9. 佐野 栄宏, 羽柴 一久, 法上 拓生, 奥田 潔. ウシ黄体における galectin-3 の機能解析. 第17回日本生殖内分泌学会学術集会. 査読有. 東京. 2012年12月8日. 発表番号: 8.
 10. 熊谷 明日香, 吉岡 伸, 作本 亮介, 奥田 潔. ウシ黄体における prostaglandin F2 の auto-amplification system に関する研究. 第17回日本生殖内分泌学会学術集会. 査読有. 東京. 2012年12月8日. 発表番号: 7.
 11. 大石 圭徳, 田崎 ゆかり, 吉岡 伸, 作本 亮介, 奥田 潔. ウシ子宮内膜における PGF2 自己増幅機構に関する研究. 第105回日本繁殖生物学会大会. 査読無. 茨城・つくば市. 2012年9月5-8日. 発表番号: OR2-17.
 12. 羽柴 一久, 法上 拓生, 作本 亮介, 小林 純子, 奥田 潔. ウシ黄体における galectin-3 の役割に関する研究. 第105回日本繁殖生物学会大会. 査読無. 茨城・つくば市. 2012年9月5-8日. 発表番号: OR2-7.
 13. Kumagai A, Yoshioka S, Sakumoto R, Okuda K. Local auto-amplification system for prostaglandin F2 in bovine corpus luteum. 45th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction. 査読有. アメリカ・ペンシルバニア州. 2012年8月12-15日. 発表番号: 184.
6. 研究組織
- (1)研究代表者
奥田 潔 (OKUDA, Kiyoshi)
 帯広畜産大学・学長
 研究者番号: 40177168
- (3)連携研究者
作本 亮介 (SAKUMOTO, Ryosuke)
 農業・食品産業技術総合研究機構・農業資源
 生物研究所・主任研究員
 研究者番号: 20343999