

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871102

研究課題名(和文) 低VE血症を招くVE乳腺移行亢進機序の基礎的解明 - 周産期病リスク低減を目指して -

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of increased mammary vitamin E transfer that induces hypovitaminosis E: with the aim of reducing the risk of peripartum disease on dairy cow

研究代表者

芳賀 聡 (HAGA, Satoshi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所草地管理研究領域・研究員

研究者番号：90442748

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)：乳牛は分娩前後に様々な疾病に罹りやすく、その治療費や損失は酪農経営を悪化させます。この原因として、免疫や代謝機能に重要な栄養素ビタミンEが、分娩前後に欠乏することが考えられます。本研究では、ウシのビタミンE欠乏がなぜ起きるのかについて検討しました。その結果、ビタミンE欠乏に關与する可能性のある遺伝子がウシの乳腺において見出されました。今後、この遺伝子をターゲットにして、ビタミンE欠乏そして疾病から乳牛を守る研究への発展が期待できます。

研究成果の概要(英文)：In dairy cows, the majority of the production diseases occur around calving or during early lactation. The management of dairy farm is made worse by the many treatment pay and loss. This might be caused by the deficiency of vitamin E that very important nutrient can affect the immune and metabolic functions. The aim of this study was to elucidate the mechanism of the deficiency of vitamin E in dairy cows during transition period. In fact, we made clear the expression property of vitamin E-related gene in bovine mammary gland and mammary epithelial cells. The results of this study could help in the developmental work to reduce the risk of the deficiency of vitamin E and production diseases in dairy cows.

研究分野：農学(獣医学・動物生産科学)

キーワード：ウシ乳腺上皮細胞 ビタミンE 周産期疾病 初乳 乳腺バイオプシー

1. 研究開始当初の背景

(1) わが国の畜産業の中で、産出額約 25% を生乳生産が占めており、酪農は日本の重要な産業となっている。しかし、近年、酪農家の減少が続き、消費者の高い需要を賄うためには、国内の生乳生産量を如何に安定的に維持していくかが課題となっている。酪農家減少の理由の一つに、乳牛の疾病罹患に関わる生産コスト(治療費や淘汰損失)の増加がある。現在の乳牛は高泌乳化が進んだ反面、特に分娩前後にエネルギーや栄養の不足、免疫機能の変調を伴いやすく、周産期疾病の発症リスクが高いことが酪農経営上大きな問題である。

(2) この原因の一つとして、免疫や代謝機能に重要な栄養素ビタミン E(VE)が、周産期の乳牛において著しく不足することが挙げられる。乳牛は分娩前から血液中の VE を多量に初乳合成に動員してしまうため、低 VE 血症に陥りやすいと考えられてきたが、そのメカニズムは解明されていない。低 VE 血症化のメカニズムを解明し、予防技術を開発できれば、周産期疾病リスクの低減に繋がると期待される。

2. 研究の目的

申請者はウシ乳腺において、VE 特異的輸送タンパクである α -tocopherol transfer protein (α TTP) の発現を新規に見出した。この α TTP の乳腺における発現特性と VE 移行能の関連性を精査することにより、リスクファクターとなる VE 乳腺移行亢進機序を解明する。本研究の具体的な目的は、以下の通りである。

- (1) ウシ乳腺上皮細胞(BMEC)の VE 移行能を正確に評価できる *in vitro* 実験系を新規に構築する
- (2) (1)より、 α TTP 発現の VE 乳腺移行における機能的役割および内分泌制御機構を明らかにする
- (3) 乳牛を用いて、分娩前後の乳腺における α TTP 発現動態と血中 VE 濃度の関係を明らかにする

3. 研究の方法

- (1) ウシ乳腺モデルを応用した VE 移行能の評価系の新規構築

乳房内環境を近似したウシ乳腺モデルを確立するために、transwell insert 培養法を試みた。経上皮膜電気抵抗値(TEER)測定器および非細胞内通過型蛍光物質 Fluorescein を用いた細胞間隙透過テストにより、BMEC

単層バリア機能の簡易数値評価手法を検討した。また、細胞内および培地中の微量な VE を高感度に測定できる VE 抽出法および蛍光検出 HPLC 法を検討した。

- (2) *in vitro* ホルモン添加実験による、 α TTP 発現の内分泌制御の解明

ウシ乳腺モデルを用いて、各種ホルモン(DEX、Insulin、Prolactin、GH、E2)について 3 段階濃度域で刺激し、24 時間後の α TTP mRNA 発現変化を Q-RT-PCR 法により定量解析した。また、DIP(DEX、Insulin、Prolactin)分化誘導刺激を行い、1、3、6 および 9 日目の α TTP mRNA 発現変化を Q-RT-PCR 法により定量解析した。

- (3) 乳腺バイオプシー法による、周産期牛における乳腺 α TTP 発現動態の解明

ホルスタイン経産牛 10 頭を用いて、分娩約 8 週間前から分娩後 6 週間にかけて、定期的に低侵襲的な連続乳腺バイオプシーを行い、得られた乳腺組織における α TTP mRNA 発現変化を Q-RT-PCR 法により定量解析した。また、頸静脈採血により得た血清中の VE 濃度を HPLC 法により測定した。

4. 研究成果

(1) ウシ乳腺モデルにおける BMEC 単層バリア機能について、非細胞内通過型蛍光物質 Fluorescein を用いた細胞間隙透過テストにより評価した。その結果(表 1)、コンフルエントに達した培養状態において、細胞間隙透過性は 0.52% と極めて低く、十分なバリア機能を有することが認められた。さらに培養継続 9 日間において、0.5% 以下のバリア機能が持続されることが確認された。一方、このバリア機能を示す TEER 値を測定したところ、1000 Ω ・cm² 以上であることが確認された(図 1)。また、DIP 分化誘導に伴い、細胞透過性は変化しないが、TEER 値が 2 倍以上高まる現象が認められた。

腸管上皮細胞(Caco-2)を用いた同等試験で、薬剤透過性試験に妥当なバリア機能指標は、0.3~2.0%とされており、本培養モデルも分化誘導の有無に関わらず、極性(血液側と乳分泌側)を有し、物質透過性・分泌活性測定が可能となった。また、TEER 測定器により、intact なバリア状態(>1000 Ω ・cm²)を簡易に確認可能となった。

	No cell insert	Confluent 80%	Confluent 100%	DIP 3day	DIP 6day	DIP 9day
細胞間隙透過性 (%)	31.7 ^a	2.76 ^b	0.52 ^c	DIP(+) 0.20 ^c	0.24 ^c	0.29 ^c
				DIP(-) 0.26 ^c	0.26 ^c	0.45 ^c

表 1. ウシ乳腺モデルにおける BMEC 単層バリア機能評価。Fluorescein 細胞間隙透過性の培養経過日数および分化誘導効果による推移。^{a-c} 異字間有意差あり ($p < 0.05$)

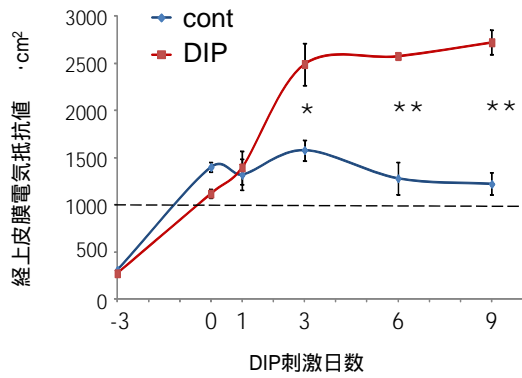


図1 .ウシ乳腺モデルにおける TEER 値の培養経過日数および分化誘導効果による推移。(cont VS. DIP、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)

(2) 各ホルモン 24 時間刺激の結果(図2) α TTP mRNA 発現に対して、DEX は低濃度域で抑制的効果、高濃度域で亢進の効果が認められた。E2 は 20pg/ml 刺激で亢進傾向が確認された。また、DIP 分化誘導により発現が亢進し、さらに経日的にその発現がより高くなることが認められた(図3)。

以上より、BMEC における α TTP mRNA 発現が内分泌的制御を受け、乳腺機能分化に関連していることが示唆された。

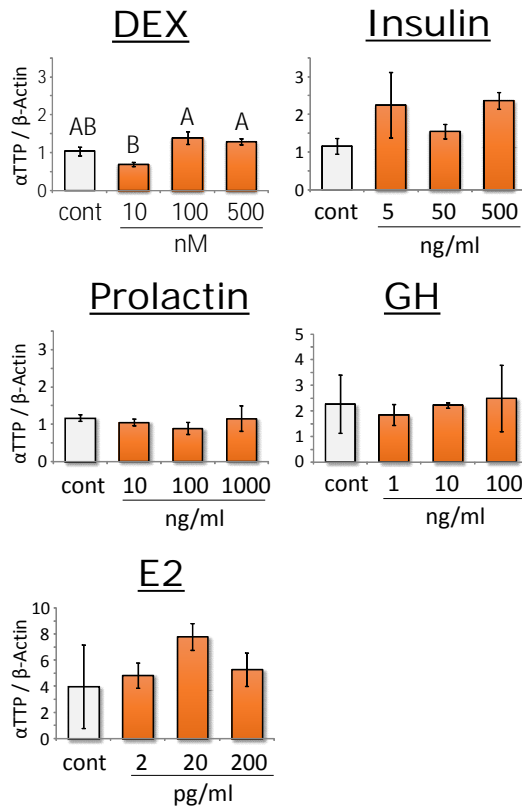


図2 . BMEC における α TTP mRNA 発現に及ぼす各種ホルモン刺激 24 時間の影響。A-B 異字間有意差あり ($p < 0.05$)

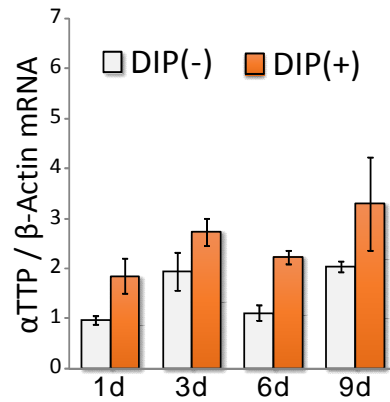


図3 . BMEC における α TTP mRNA 発現に及ぼす DIP 分化誘導刺激の影響。DIP 刺激 ($P < 0.005$)、Day ($P < 0.05$)、DIP \cdot Day ($P = 0.933$)

(3) 周産期乳牛の乳腺組織における α TTP mRNA 発現について(図4) 乾乳期と比較して泌乳期に発現が低下することが新たに確認された。一方、分娩直後の発現について、発現が亢進する高発現群 ($n = 3$) と発現亢進がない低発現群 ($n = 7$) の 2 パターンに分類された ($P < 0.05$)。有意差はなかったが、低発現群と比較して、高発現群では血清中 VE 濃度が低く(図5) 3 頭中 2 頭が分娩後不良(1 頭: 脂肪壊死症およびケトosis、1 頭: 乳房炎および泌乳停止)となった。

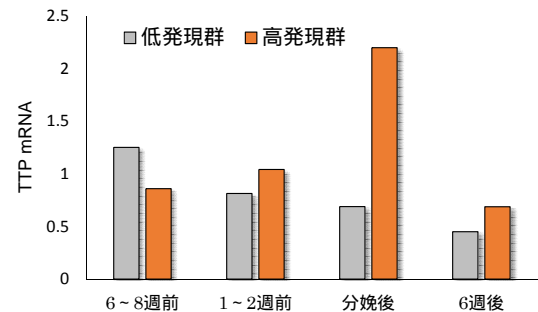


図4 . 周産期の乳腺組織における α TTP mRNA 発現量の推移。

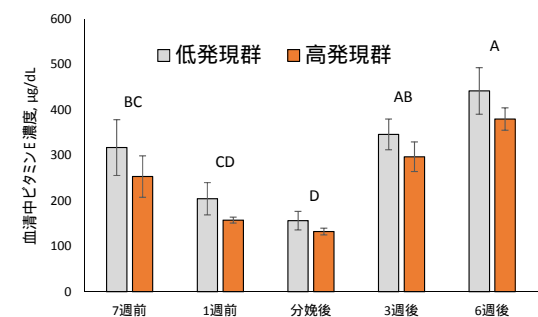


図5 . 周産期の血清中 VE 濃度の推移。Group ($P = 0.42$)、Period ($P < 0.01$)、Group \cdot Period ($P = 0.98$)、A-D 異字間有意差あり ($p < 0.05$)

以上、本研究課題の遂行により、新たに構築した *in vitro* ウシ乳腺モデルにより、*in vivo* に近い状態において乳腺に発現する α TTP が内分泌制御を受けるという新知見を得られた。また、今回確立した乳腺バイオプシーを用いた周産期試験法は国内での実施例がほとんどなく、 α TTP 発現亢進と周産期疾病リスクを関連付ける貴重なデータが得られた。本研究成果は周産期疾病発症の機序のみならず、哺乳類の初乳合成機序を解き明かす上でも極めて有意義なものになると期待できる。

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1件)

Haga, S., Nakano, M., Ishizaki, H., Roh, S.G. and Katoh, K: "Expression of α -tocopherol-associated genes and α -tocopherol accumulation in Japanese Black (Wagyu) calves with and without α -tocopherol supplementation" *Journal of Animal Science* (in press). (2015), 査読有り

[学会発表](計3件)

芳賀聡、中野美和、石崎宏、盧尚建、加藤和雄、Tissues distribution and expression changes of the α -tocopherol related genes due to short term high dose oral administration of α -tocopherol in weaned beef calves、Joint ISNH/ISRP International conference 2014、2014年9月8-12日、キャンベラ(オーストラリア)。

芳賀聡、小林洋介、中野美和、石崎宏、盧尚建、加藤和雄、ウシ乳腺上皮細胞におけるトコフェロール細胞内輸送関連分子の発現に及ぼす催乳性ホルモンの影響、日本畜産学会第118回大会、2014年3月28日、つくば国際会議場エポカルつくば(茨城県つくば市)。

芳賀聡、小林洋介、中野美和、石崎宏、盧尚建、加藤和雄、Hormonal regulation of α -tocopherol transfer related molecules expression in bovine mammary epithelial cells、アメリカ酪農科学会(ADSA)・アメリカ畜産学会(ASAS)合同年次大会 2013、2013年7月8-12日、インディアナポリス(アメリカ)。

6. 研究組織

(1)研究代表者

芳賀 聡 (HAGA, Satoshi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所草地管理研究領域・研究員

研究者番号：90442748

(2)研究協力者

加藤和雄 (KATOH, Kazuo)

石崎 宏 (ISHIZAKI, Hiroshi)