

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870455

研究課題名(和文)超小型ミニブタのエストロジェン代謝経路の解明

研究課題名(英文)Estrogen metabolism after estradiol dipropionate treatment in Microminipigs

研究代表者

野口 倫子(Noguchi, Michiko)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：40506721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、超小型ミニブタ(マイクロミニブタ, MMP)に持続性エストロジェン製剤(EDP)を投与した後の末梢血中各種エストロジェン濃度の変化および肝臓におけるステロイド代謝にかかわる酵素の遺伝子発現動態を検討した。卵巣摘出したメスMMpigの末梢血中エストラジオール17 およびエストロン-3硫酸濃度はEDP投与による有意な変化を認めしたが、エストジオール濃度は変化を認めなかった。また、EDP投与後、肝臓におけるエストラジオール17 濃度の変化に伴うステロイド代謝に関する酵素の遺伝子発現を観察した結果、いずれの遺伝子も雌雄および投与後日数による有意な変化を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Gene expression of hepatic steroid metabolizing enzymes associated with estrogen concentrations after estradiol dipropionate (EDP) in Microminipigs (MMpig) was observed. Estradiol-17 and estrone-3-sulfate levels in ovariectomized MMpigs (n=3) significantly changed with EDP treatment, however plasma estradiol concentrations did not change throughout experimental period. Gene expression of CYP450 family (CYP1A1, CYP1A2, CYP3A22), 3-hydroxysteroid dehydrogenase/5-4 isomerase, hydroxysteroid sulfotransferase 2A1 and UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A in liver corrected from female (n=4) and male (n=5) MMpigs after EDP treatment were not significantly different among times from treatment, respectively. Furthermore, there was no significant difference in these mRNA expression between sexes.

研究分野：臨床繁殖学

キーワード：マイクロミニブタ

1. 研究開始当初の背景

ブタは、食性や睡眠行動、解剖学および生理学的特徴などにおいて、ヒトとの類似点が多い非げっ歯類であることから、臓器移植、再生医療および疾病モデルなどの生命科学研究への応用価値の高い実験動物として有望視されている。近年発表された世界最小の国産ミニブタ (Micro minipig; MMpig, 富士マイクラ株式会社) は、1) 成獣でも体重が 20 kg 未満と小型である、2) 発育が生後約 18 ヶ月齢で平衡に達する、3) 非近交系かつクローズドコロニーで維持されるといった特徴を持っている。MMpig は、すでに動脈硬化症、糖尿病、脳梗塞および心筋梗塞などの研究が進展しており、ヒト疾病モデルとしての有用性が示されている。

我々は、これまでに MMpig の安定的供給のための生殖補助技術の開発を目的とし、初めに正常発情周期を営むメス MMpig の発情周期日数および生殖内分泌動態を解析し、産業ブタと同等であることを明らかにした (Noguchi et al., In Vivo, 2015)。続いて、申請者が開発を行った産業ブタの母体認識機構を模倣した新規発情同期化技術を MMpig に応用し、その有用性を検証した。ブタでは、発情周期 11~12 日目および 14 日目以降に胚が分泌するエストロゲンによって母体が胚の存在を認識し、黄体退行が抑制される。この母体認識機構を応用し、発情周期 10~13 日目に持続性エストロゲン製剤であるエストラジオールプロピオン酸エステル (Estradiol dipropionate; EDP, あすか製薬株式会社) をブタに 1 回筋肉内投与すると、黄体退行を阻止する (偽妊娠誘起) ことで、発情周期を人為的に延長することが可能である。そこで、同様の効果を期待し MMpig に EDP を筋肉内投与した結果、産業ブタとは異なり、すべての個体で EDP 投与後 14 日目には末梢血中プロジェステロン濃度が 1 ng/mL 以下に低下した (Noguchi et al., J. Reprod. Dev., 2016)。さらに、末梢血中エストラジオール 17β (E_2) 濃度は、EDP 投与後 1 日目に比べて EDP 投与後 7 日目で有意に低下した (Noguchi et al., J. Reprod. Dev., 2016) ことから、産業ブタと MMpig では、 E_2 の代謝経路あるいは代謝速度が異なっている可能性が考えられた。

ヒトと同様に、ブタでは E_2 が主に抱合型あるいは非抱合型のエストロンとして尿中あるいは糞中に排泄される代謝経路をとる (Velle, Gen. Comp. Endocrinol., 1963)。産業ブタあるいはミニブタの肝臓において、ステロイド代謝の第 1 相反応の主要酵素であるチトクローム P450 (CYP) ファミリー (Rasmussen et al., Reprod. Dom. Anim., 2011) および水酸化酵素、第 2 相反応の主要酵素である硫酸化酵素 (Rasmussen et al., J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 2012) およびグルクロン酸抱合酵素 (Donado et al., J. Hepatol., 1999) の存在が認

められており、ブタのステロイドの代謝経路および代謝に関わる酵素はヒトに類似していると考えられており、ブタの薬物代謝評価動物としての有用性が期待されている。しかし、肝臓における CYP 群の酸化酵素活性は、ヒトと MMpig の間では必ずしも同一ではなく (Murayama et al., Drug. Metab. Pharmacokinet., 2009)。我々が得たこれまでの研究結果においても、MMpig と産業ブタのエストロゲン代謝は異なる可能性が考えられるため、MMpig のヒト医療における治験動物としての有用性を精査する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、MMpig のヒト医療における治験動物としての有用性を検討するため、MMpig に EDP を投与した後の末梢血中各種エストロゲン濃度の変化および肝臓におけるステロイド代謝にかかわる遺伝子発現動態を調査することを目的とし、以下の項目について検討を行った。

(1) EDP 投与後の末梢血中エストロゲン濃度動態の解析

(2) 末梢血中 E_2 濃度および代謝産物濃度変化に伴う MMpig 肝臓における主要代謝酵素の遺伝子発現解析

3. 研究の方法

(1) EDP 投与後の末梢血中エストロゲン濃度動態の解析

MMpig における EDP 投与後の E_2 の代謝経路について検討を行うため、卵巣摘出したメス MMpig (n=4) に EDP 0.3 ml (0.10 ± 0.01 mg/kg) を筋肉内注射した。試験開始 3 日前には、外頸静脈にカテーテルを留置し、EDP 投与前 1 日目から EDP 投与後 8 日目まで、24 時間間隔で採血を行った。得られた血液は遠心分離後、末梢血中エストロゲン (エストロン 3-硫酸 (E_1S), E_2 およびエストロン (E_3)) 濃度の測定を行った。 E_1S および E_3 濃度の測定は、酵素免疫測定法 (Estrone-3-Sulfate EIA Kit, Arbor Assays および Estriol EIA kit, Cayman)、 E_2 濃度の測定は時間分解蛍光測定法 (Noguchi et al., Reproduction, 2010) により行った。

(2) 末梢血中 E_2 濃度および代謝産物濃度変化に伴う MMpig 肝臓における主要代謝酵素の遺伝子発現解析

MMpig における EDP 投与後の末梢血中 E_2 濃度に付随するステロイド代謝酵素の発現動態について検討を行うため、卵巣摘出したメス MMpig (n=4) および去勢したオス MMpig (n=5) へ EDP 0.3 ml (メス; 0.10 ± 0.00 mg/kg, オス; 0.11 ± 0.01 mg/kg) をそれぞれ筋肉内投与した。麻酔管理した MMpig は、仰臥位に保定し、超音波ガイド下で 16G のバイオプシーガン (TRU-CORE II, エムディーテック社) を用いて肝生検を行った。すべての MMpig は、EDP 投与 3 日前 (E_2 濃度が基

底値である時期) EDP 投与後 2 日目 (E_2 濃度のピーク時と推測) 5 日目 (E_2 濃度が下ってくる時期と推測) および 9 日目 (E_2 濃度が基底値に達する時期と推測) に肝生検を行った。得られた肝臓は、肉用豚においてステロイド代謝に関与すると報告されている酵素 (CYP1A1, CYP1A2, CYP3A22, 硫酸転移酵素 (SULT2A1), UDP グルクロン酸転移酵素 (UGT1A), 3β ステロイド脱水素酵素 (3β HSD)) の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で観察した。血液は、肝生検を行うタイミングで外頸静脈から採取した。得られた血清は、前述の方法に従い、 E_1S および E_2 濃度の測定を行った。

4. 研究成果

(1) EDP 投与後の末梢血中エストロゲン濃度動態の解析

MMpig 末梢血中 E_1S および E_2 濃度は投与前に比べ、それぞれ 3 および 4 日目まで有意に高い値で推移した ($P < 0.01$) が、 E_3 濃度は試験期間中有意な変化を認めなかった (図 1)。以上の結果から、MMpig において、EDP 投与後派生する E_2 は主に E_1S へ変換されることで体内からの排出がなされていると考えられた。

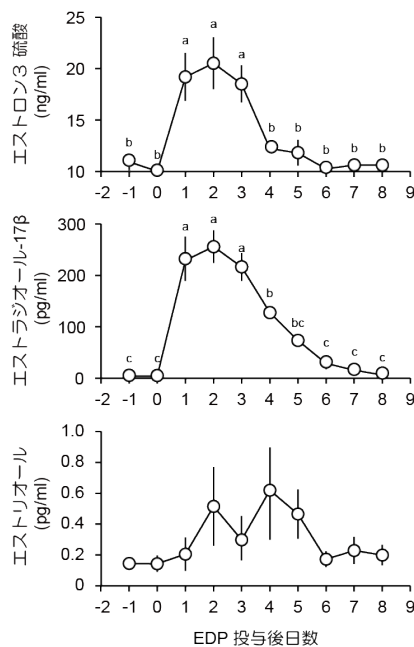


図 1. EDP 投与後の卵巣摘出 MMpig (n=4) における末梢血中エストロン 3 硫酸、エストラジオール 17β およびエストリオール濃度の変化
* 異符号間に有意差あり ($P < 0.01$)

(2) 末梢血中 E_2 濃度および代謝産物濃度変化に伴う MMpig 肝臓における主要代謝酵素の遺伝子発現解析

EDP 投与後 2 日目の末梢血中 E_1S および E_2 濃度は、雌雄 MMpig とともに他の採材日に比べて有意に高値を示した (図 2, $P < 0.01$)。しかし、観察した遺伝子はいずれも雌雄ならびに投与後日数による有意な変化を認め

なかった (図 3 および図 4)。本結果から、MMpig のエストロゲン代謝は、肉用豚と異なる可能性が示唆された。一方、本研究では、EDP 投与後の MMpig における肝臓の遺伝子発現量は、個体による差が大きいことが明らかとなったため、さらなる例数追加が求められる。

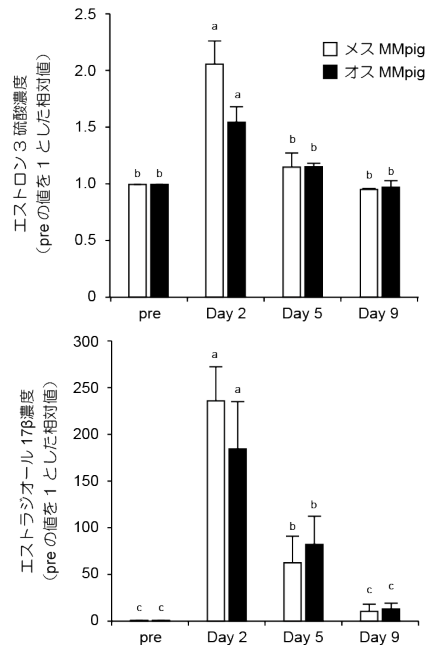


図 2. EDP 投与前および投与後の卵巣摘出 MMpig (n=4) あるいは去勢 MMpig (n=4) における末梢血中エストロン 3 硫酸およびエストラジオール 17β 濃度の変化
* 異符号間に有意差あり ($P < 0.01$)

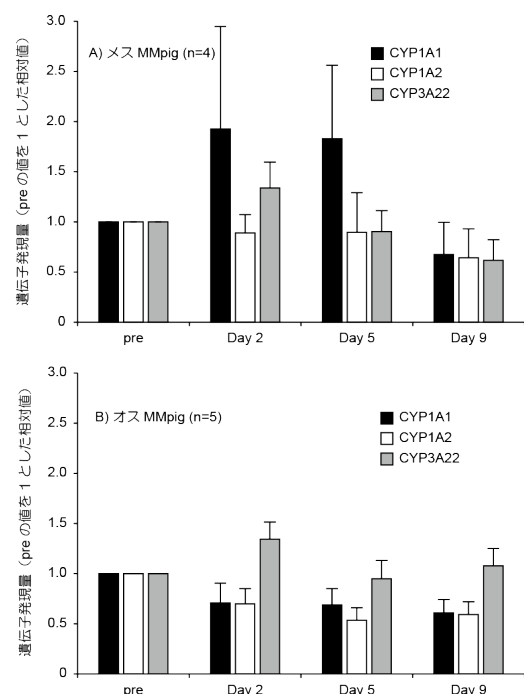


図 3. EDP 投与前および投与後の卵巣摘出 MMpig (n=4) あるいは去勢 MMpig (n=4) における肝臓組織中のチトクローム P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP3A22) 遺伝子発現動態

回日本獣医学会学術集会・札幌（北海道大学）. 2014年9月.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 倫子 (NOGUCHI, Michiko)

麻布大学獣医学部 講師

研究者番号: 40506721

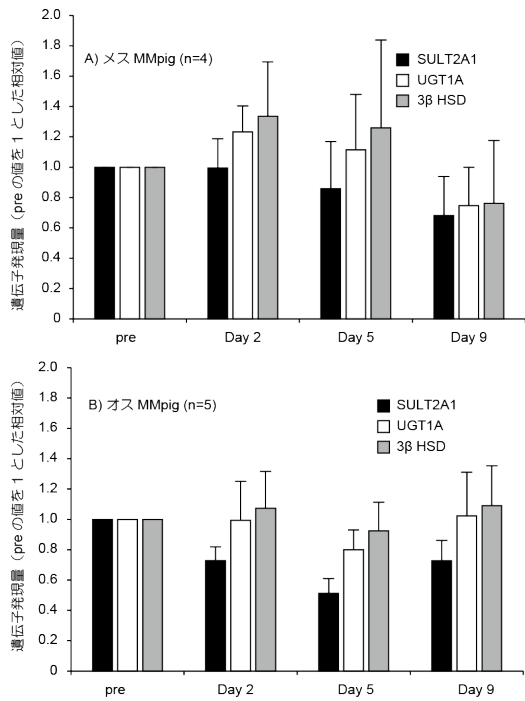


図4. EDP投与前および投与後の卵巣摘出MMpig (n=4)あるいは去勢MMpig (n=4)における肝臓組織中の硫酸転移酵素(SULT2A1)、UDP-グルクロン酸転移酵素(UGT1A)および3βステロイド脱水素酵素(3β HSD)遺伝子発現動態

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2件)

1. Noguchi M., Ikedo T., Kawaguchi H., Tanimoto A. Estrus Synchronization using Estradiol Dipropionate and Prostaglandin F_{2α} in Microminipig. Journal of Reproduction and Development. In press. 2016.
2. Noguchi M., Miura N., Ando T., Kubota C., Hobo S., Kawaguchi H., Tanimoto A. Profiles of Reproductive Hormone in Microminipig during the Normal Estrous Cycle. In Vivo. 29, pp17-22. 2015

〔学会発表〕(計1件)

1. 池堂智信、平田勝也、堀之内千恵、高橋香純、帆保誠二、谷本昭英、川口博明、野口倫子。持続性エストロゲン製剤を用いたマイクロミニピッグの発情同期化。GO-14。第158回日本獣医学会学術集会。十和田(北里大学)。2015年9月。
2. 野口倫子、池堂智信、平田勝也、帆保誠二、窪田力、安藤貴朗、谷本昭英、川口博明。マイクロミニピッグの正常発情周期における生殖内分泌動態の解明。GO-17。第157回日本獣医学会学術集会。札幌(北海道大学)。2014年9月。
3. 池堂智信、平田勝也、帆保誠二、谷本昭英、川口博明、野口倫子。プロピオン酸エストラジオールを用いたマイクロミニピッグの偽妊娠誘起。GO-19。第157