

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580446

研究課題名(和文)牛精漿に含まれる子宮機能調節蛋白の同定とその作用経路の解析

研究課題名(英文) Isolation and pathway of bovine seminal proteins to regulate uterine function

研究代表者

片桐 成二 (KATAGIRI, Seiji)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：00292061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：腔内に投与した牛の精漿が子宮機能を調節し、受胎性を改善する機序を明らかにするため、精漿のシグナルが子宮に伝達される経路を調べた。その結果、精漿のシグナルはリンパ系路を介して内腸骨および深単径リンパ節に運ばれ、リンパ節でのサイトカイン環境を変化させることにより、子宮に伝達されることを示した。また、精漿中の蛋白質を分離・精製することにより、オステオポンチン類似の蛋白質に精漿による子宮機能調節効果のあることを示した。

研究成果の概要(英文)：Pathways responsible for the effect of bovine seminal plasma (SP) to improve fertility through uterine functional modification was studied. Signals of SP was found to be transferred to the uterus by changing cytokine environment in the internal iliac lymph nodes and the deep inguinal lymph nodes. The activity of bovine SP could be found in an osteopontin-related protein that is separated from crude SP protein.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：子宮内膜 上皮成長因子 サイトカイン 精漿 受胎性 乳牛 内分泌 免疫

### 1. 研究開始当初の背景

わが国では、一部の例外を除き、ほぼ全ての牛が人工授精あるいは受精卵移植により妊娠している。人工授精では1頭の雌牛に注入される精漿量はわずかであり、受精卵移植に関しては精漿成分が雌牛に注入されることはなく、牛の生殖システムにおいて精漿蛋白質が担っている受胎促進機能は活用されていない。

研究代表者は、牛の子宮内膜における上皮成長因子(EGF)発現と受胎性の関係を明らかにし、精漿中にEGF発現を正常化する蛋白質の含まれていることを報告してきた。この研究の中で、精漿は腔への作用を介して子宮機能を調節することが示唆されており、その機序を解明し、合わせて同活性を有する精漿成分を特定することによって、精漿成分を用いた受胎促進技術の開発が可能になる期待されている。

### 2. 研究の目的

本研究では以下の2点について取り組み、精漿による受胎促進効果の生理的基盤を解明することで、生産現場における受胎促進技術の開発につなげることを目的とした。

(1) 子宮でのEGF発現増強に関わる精漿蛋白質の同定

子宮でのEGF発現増強効果を有する蛋白質を精製・同定する。

(2) 精漿中の蛋白質が生殖器の免疫系に及ぼす作用の解明

精漿あるいは精漿分画を腔内に投与し、リンパ節および子宮における免疫機能調節に関わる因子に及ぼす効果を明らかにする。また、腔内にトレーサーを投与し、腔から子宮へのシグナル伝達に関わる経路(リンパ流路)と経時的変化を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 子宮でのEGF発現増強に関わる精漿蛋白質の同定

精漿蛋白質を生化学的な手法により分離抽出し、雌牛の腔内に投与して子宮でのEGF発現に及ぼす効果を評価する。EGF発現増強効果の見られる蛋白質については、飛行時間型質量分析装置(TOF-MS)により解析し、蛋白質を同定した。

(2) 精漿中の蛋白質が生殖器の免疫系に及ぼす作用の解明

腔内に注入された精漿が生殖器の免疫系細胞を感作して子宮への作用を発現するとの仮説に基づき、腔内に精漿蛋白質を投与して腔、子宮および附属リンパ節でのサイトカイン発現と免疫細胞への効果を調べた。リンパ節については、合わせて全身の主要なリンパ節を採取し、精漿投与の効果について解析

した。

### 4. 研究成果

(1) 子宮でのEGF発現増強に関わる精漿蛋白質の同定

子宮でのEGF発現に対する効果を指標にしてゲル濾過法により精漿蛋白質を分画し、得られた分画を2次元電気泳動法により解析したところ6~8個の蛋白質スポットが含まれていた。その中でも主要な3つの蛋白質スポットについて飛行時間型質量分析計による同定を試みたところ、2つの蛋白質スポットはそれぞれBSPおよびオステオポンチン様の蛋白質であることが分かった。残る1つのスポットはデータベースにない蛋白質であったため、同定することはできなかった。

オステオポンチン様蛋白質については、ウェスタンブロット法によりオステオポンチンと共通の抗原性を有することを確認したが、これまでに報告されている分子に比べ分子量が約5kDa小さく、これまでに報告されていない短鎖の分子種である可能性が示唆された。オステオポンチンについては受胎性との関連を示唆する文献もあることから、子宮でのEGF発現調節に関わる分子としては有力な候補と考えられた。

一方、BSPは2次元電気泳動像上では他の3スポットと共通あるいは類似のペプチド骨格を有する、精漿蛋白質の主要成分である。しかし、研究代表者らの以前の予備検討により、EGF発現増強効果はみられていない。

(2) 精漿中の蛋白質が生殖器の免疫系に及ぼす作用の解明

牛の精漿は腔内に投与すると子宮での上皮成長因子の発現を正常化し、受胎性を促進する。その機序を明らかにするため、精漿機能の発現に関わる腔から子宮へのシグナル伝達経路を検討した。

まず、精漿を腔内に投与して子宮機能調節に関わるサイトカインおよび増殖因子発現への効果を調べた。その結果、牛の腔内に精漿を投与すると一過性にインターロイキン(IL)-2および-4の発現が増強された。IL-6の発現は一旦抑制された後、緩やかに増加することが分かった。このため、腔から子宮へのシグナル伝達には、免疫系の細胞あるいはこれらの細胞が産生する因子が中心的な役割を果たし、リンパ系を介してシグナルが伝達されるものと考

えられた。

そこで、腔壁内にトレーサー（微粒子活性炭およびスルファンブルー溶液）を投与して、腔からのリンパ液（細胞）が流入するリンパ節を調べたところ、腔からのリンパ液（細胞）は主に内腸骨および深単径リンパ節に流入することが分かった。また、腔内に精漿を投与した場合にも、これら2つのリンパ節でのサイトカイン発現の変化を示した。さらに、精漿を腔壁の左右いずれか一侧に投与した場合、精漿投与後4時間目まではサイトカイン発現の変化は精漿を投与した側の内腸骨および深単径リンパ節に局限していたが、8～12時間目以降は反対側のリンパ節、あるいは腹腔および体表リンパ節にもサイトカイン発現の変化がみられた。これらの結果から、精漿は腔からリンパ系路を介して骨盤腔内および全身の免疫系を修飾することにより子宮でのサイトカイン発現を調節することが示唆された。

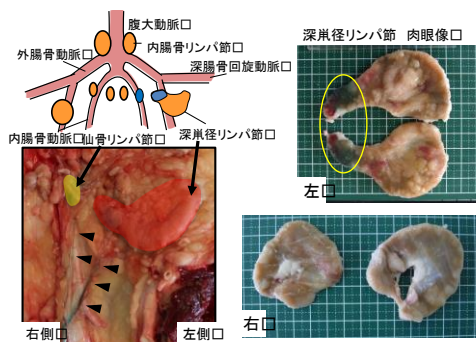


図1. スルファンブルーによるリンパ管およびリンパ節の染色陽性像

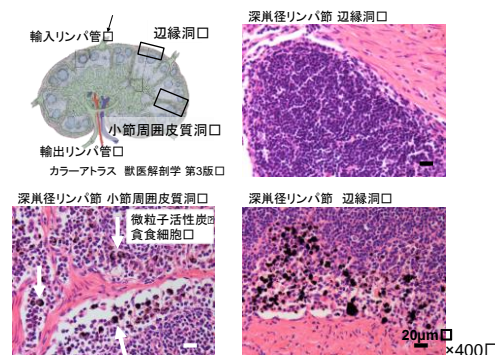


図2. リンパ節へのトレーサーの出現(微粒子活性炭)

## 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)

- ① 片桐成二. 精漿成分による牛の子宮機能調節. 日本胚移植学雑誌, 35:21-24 (2013) 査読あり
- ② Katagiri S, Moriyoshi M. Alteration of the endometrial EGF profile as a potential mechanism connecting the

alterations in the ovarian steroid hormone profile to embryonic loss in repeat breeders and high-producing cows. J Reprod Dev 59:415-420 (2013) 査読あり

- ③ Katagiri S, Moriyoshi M, Takahashi Y. Low incidence of an altered endometrial epidermal growth factor (EGF) profile in repeat breeder Holstein heifers and differential effect of parity on the EGF profile between fertile Holstein (dairy) and Japanese Black (beef) cattle. J Reprod Dev 59:575-579 (2013) 査読あり
- ④ 片桐成二. 特集 ホルモン剤による牛の繁殖管理：理論と実践 性ステロイドホルモン製剤および精漿を用いた子宮での上皮成長因子発現正常化処置による乳牛の妊娠率の向上. 臨床獣医, 第 31 巻第 8 号: 21-26 (2013) 査読なし
- ⑤ 座談会 出席者 片桐成二、古館 誠、松井基純. 特集 ホルモン剤による牛の繁殖管理：理論と実践 座談会 腔内留置型プロジェステロン製剤を再考する. 臨床獣医, 第 31 巻第 8 号:28-34 (2013) 査読なし
- ⑥ 座談会 座長：片桐成二、参加者：上松瑞穂、岡沢 学、鈴木貴博、鈴木保宣、オブザーバー：大滝忠利. 座談会 炎症性子宮疾患を考える. 臨床獣医, 第 31 巻 第 4 号:10-33 (2013) 査読なし
- ⑦ 片桐成二. 乳牛の子宮内膜における上皮成長因子濃度の周期的変化と受胎性の関係. 人工授精通信, 平成 25 年 1 月 1 日 第 354 号: 3-5 (2013) 査読なし
- ⑧ 片桐成二. 乳牛の子宮内膜における上皮成長因子濃度の周期的変化と受胎性の関係. 酪農ジャーナル, 第 66 巻 第 1 号:32-24 (2013) 査読なし
- ⑨ 片桐成二. 乳牛における胚死滅 - 発生状況とその背景. MP アグロジャーナル, 2011.07 No. 6: 5-9 (2011) 査読なし
- ⑩ 片桐成二. ヘルパーT 細胞を中心とした妊娠時の免疫系調節に関する最近の知見. 家畜診療, 59 巻 8 号: 451-458 (2012) 査読なし

[学会発表] (計 13 件)

- ① 鳥居佳子、野元拓哉、松田一哉、森好政晴、片桐成二. 腔粘膜に投与したトレーサーおよびリンパ節でのサイトカイン発現を指標とした乳牛における精漿の作用機序解明のためのモデル検討. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 2013

- 年 9 月 22 日, 岐阜
- ② 石中将人、湯浅亮太、及位公哉、吉田 隆、井上俊樹、角田 浩、長嶋和典、米山 修、片桐成二。成乳牛における上皮成長因子(EGF)濃度の正常化を目的として5mgの安息香酸エストラジオール投与とシダーショートプログラムを組み合わせた新たな定時授精プログラムの有用性の検討。第64回北海道獣医師大会, 2013年9月6日, 帯広
  - ③ 片桐成二、鳥居佳子、関 誠、竹内伸晃、社浦宗徳。レシピエント牛への定時胚移植処置に用いる腔内留置型プロジェステロン(P4)徐放剤が子宮のP4及び上皮成長因子(EGF)濃度に及ぼす効果。平成24年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会, 2013年2月10日, 大阪
  - ④ 関 誠、椎名拓海、鳥居佳子、片桐成二。リピートブリーダー牛における腔内留置型プロジェステロン徐放剤処置が子宮内膜でのプロジェステロン及び上皮成長因子濃度と受胎性に及ぼす効果。平成24年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会, 2013年2月10日, 大阪
  - ⑤ 片桐成二。内分泌異常と胚死滅を結ぶ子宮でのサイトカイン発現異常 -乳用牛・肉用牛の違いを中心に-。産業動物臨床講習会(九州地区), 2012年12月13日, 熊本
  - ⑥ 片桐成二。特別講演 牛の精漿蛋白質を用いた子宮機能調節と受胎性改善の試み。北海道家畜人工授精技術研修大会, 2012年10月18日, 苫小牧
  - ⑦ 片桐成二。子宮内膜における上皮成長因子発現を指標にした牛の受胎性診断法と受胎性改善法の開発。第105回日本繁殖生物学会, 2012年9月7日, 筑波
  - ⑧ 片桐成二。日本獣医学会・日本産業動物獣医学会 - シンポジウム「牛の胚はいつどのような理由で失われるのか?」。平成23年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会, 2012年2月3日, 札幌
  - ⑨ 片桐成二。精漿成分による牛の子宮機能調節。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 平成23年度問題別研究会, 2011年10月25日, 東京
  - ⑩ Katagiri S. A new approach to repeat breeding in cows - treatments the endometrial growth factor-cytokine network. Joint Symposium of Thai and Japanese Societies for Animal Reproduction, 2011年9月29日, Bangkok Thailand
  - ⑪ 片桐成二、Gautam Gokarna、森好政晴。乳牛における発情後3日目の子宮内膜上皮

成長因子と胚死滅の発生時期および頻度の関係。第104回日本繁殖生物学会, 2011年9月17日, 盛岡

- ⑫ Gokarna GAUTAM, Takashi KAMIGUCHI, Katsuhisa NAGAI, Masaharu MORIYOSHI, Seiji KATAGIRI. Prediction of pregnancy status by interferon-stimulated genes-15 (ISG-15) expression in peripheral blood leukocytes in Holstein cows. 第104回日本繁殖生物学会, 2011年9月17日, 盛岡
- ⑬ 永井克尚、Gautam Gokarna、小坂啓太、安藤貴朗、森好政晴、片桐成二。2種の腔内留置型プロジェステロン徐放剤処置を用いた定時胚移植プログラムにおける受胎率、P4濃度変化および排卵後2日目の子宮内膜EGF濃度の検討。平成22年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会, 2011年2月12日, 岐阜

[図書] (計1件)

- ① 片桐成二。排卵同期化法による定時人工授精。Dairy Japan, 2013年6月臨時増刊号:96-105 (2013)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片桐 成二 (KATAGIRI, Seiji)  
 酪農学園大学・獣医学群獣医学類・教授  
 研究者番号：00292061

### (2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし