

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21620

研究課題名(和文) 周産期病リスク因子「低ビタミンE血症」の分子メカニズム～肝臓と乳腺に着目して～

研究課題名(英文) The molecular mechanism of hypovitaminosis E which is a factor in the risk of peripartum diseases: Focusing on the mammary gland and liver

研究代表者

芳賀 聡 (HAGA, Satoshi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門 草地利用研究領域・主任研究員

研究者番号：90442748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：乳牛は分娩前後に疾病に罹りやすく、そのコストは酪農経営を悪化させます。この一因は、分娩前後に起きる低ビタミンE血症にあります。本研究では、疾病リスク低減に向けて、低ビタミンE血症の分子メカニズムを解明すべく、周産期の高泌乳牛の乳腺と肝臓に着目した研究を行い、低ビタミンE血症に関連する可能性がある、TTP、AfaminおよびTAPという3分子の周産期における特徴的な遺伝子発現特性を明らかにしました。今後、この成果を基盤にして、低ビタミンE血症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 cost. Peripartum hypovitaminosis E is a factor of this risk. The aim of this study was to elucidate of the molecular mechanism of hypovitaminosis E for the reducing the risk of peripartum diseases. In fact, focusing on the mammary gland and liver, we made clear the gene expression properties of TTP, Afamin, and TAP, which are related with hypovitaminosis E process in peripartum high-yield dairy cows. The results of this study could help in the developmental work to reduce the risk of the hypovitaminosis E and the production diseases in dairy cows.

研究分野：動物生産科学、獣医学

キーワード：乳牛 周産期疾病 乳腺 肝臓 初乳 ビタミンE 分娩性ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内農業における畜産の重要性

わが国のH27農業総算出額は8兆7,979億円であり、この内、畜産計は3兆1,179億円で農業総生産額の35.4%を占めている。次ぐ野菜が27.2%、米が17.0%であることから、畜産は今日の国内農業の基幹といえる[引用]。この畜産産出額の中で、約25%を占めているのは乳牛を飼養した生乳生産であり、新鮮で美味しい牛乳を国内消費者に届ける酪農は、日本の食産業そして国民の食生活を支える重要な役割を果たしている。

(2) 酪農が抱える課題

しかし、近年、酪農家が減り続けており、消費者の高い需要を賄うために、国内の生乳生産量を如何に安定的に維持していくかが非常に重要な課題である。酪農経営の難しさの一つに、乳牛の疾病罹患に関わる生産コスト(治療費や淘汰損失)の増加と酪農家の精神・肉体的ストレスがある。これは、現在の乳牛が、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、周産期の疾病発症リスクが非常に高い[引用]ことに起因する。また、分娩は後継牛と生乳の生産において避けて通れないイベントである。

(3) 周産期乳牛に起きる低ビタミンE血症

周産期疾病の発症リスクが高い原因の一つとして、免疫や代謝機能の調節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[引用]。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、本当にそれだけなのかどうか、低VE血症のメカニズムは未だ解明されていない。そこで、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発想した。

(4) VE体内動態に関わる遺伝子

そこで、VEの体内動態や選択的な細胞内輸送に関与する遺伝子に着目した。これまでに我々は、ヒトや実験動物において報告されているVE体内動態関連タンパク群である-トコフェロール輸送タンパク(TTP) Afaminおよびトコフェロール結合タンパク(TAP)のウシ組織遺伝子発現分布を調べ、主に肝臓に発現していること[引用]、そして、前研究[No.25871102]において、TTPがウシ乳腺上皮にも発現し、乳腺組織における発現が周産期に変化することを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

以上、申請者はこれまでの研究により見出したVE体内動態関連分子『TTP』、『Afamin』および『TAP』のウシ肝臓と乳腺における周産期特有の発現特性が、周産期疾病リスクである低VE血症化メカニズムに関与していると仮説を立てた。本課題では周産期の高泌乳牛の肝臓および乳腺におけるTTP、AfaminおよびTAPの発現特性を明らかにすることで、周産期疾病のリスク因子である低VE血症化の分子メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 周産期の乳腺における泌乳機能とVE体内動態関連遺伝子発現のダイナミックな変化を捉える

経産ホルスタイン乳牛10頭(平均産次約2.5)を分娩予定8週間前から分娩後6週まで供試した。周産期における乳腺組織の各遺伝子発現およびVE、中性脂肪(TG)蓄積量の変化を調べるために、分娩8、1週前、分娩直後(分娩12時間以内)、分娩後6週目の4時点において、それぞれ後分房から自動生検装置を用いた低侵襲的な乳腺バイオプシー法により乳腺組織を時系列的に連続採取した。

また、乳中VE濃度を調べるために、供試牛から分娩前乳汁、分娩直後の初乳および分娩4~6週後の常乳をサンプリングした。

さらに、内5頭について、乳腺に流入する動脈血と乳腺通過後の静脈血を採取するために、分娩8、4、1週前、分娩直後、分娩3、6週後に、尾動脈および乳静脈から採血を行った。

得られた乳腺組織における各mRNA発現変化をQ-RT-PCR法により定量解析した。また、組織中および乳中のVEおよびTG蓄積量はそれぞれHPLC法および比色法により測定した。動静脈差法により、乳糖の基質となるグルコース(Glu)および乳脂肪の基質となるヒドロキシ酪酸(BHBA)の乳腺取込率を算出した。これらを基に、同法によりVEの乳腺取込率について検討した。

(2) 肝臓のVEレベルとVE体内動態関連遺伝子発現が周産期にどのように変化していくか、明らかにする

経産ホルスタイン乳牛7頭(平均産次約2.9)を乾乳期から供試した。分娩4週前、1週前、分娩直後(分娩後12時間以内)、泌乳期として分娩後1週および4週の計5時点において、低侵襲的な肝臓バイオプシー法により肝臓組織を時系列的に連続採取した。

得られた肝臓組織における各mRNA発現変化をQ-RT-PCR法により定量解析した。また、VEおよびTG蓄積量はそれぞれHPLC法および比色法により測定した。

4. 研究成果

(1) 分娩約1週前の乳腺におけるGlu取込率は分娩約8週前と同等で、分娩直後および泌乳期と比較して有意に低かった。一方、分娩約1週前の乳腺におけるBHBA取込率は分娩約8週前より有意に高く、分娩直後と有意差がなかった。

Gluの細胞内取り込みに関与するトランスポーターGLUT1およびGLUT8のmRNA発現量は泌乳開始後に有意に高まった一方、BHBAの取り込み輸送に関与するトランスポーターMCT1 mRNAは分娩約1週前に有意に発現が高まり、泌乳期と同等の発現レベルに至った。乳腺組織中のTG蓄積量も分娩約1週前に有意に高く、分娩後泌乳に伴い、蓄積量が有意に低下した。

以上より、分娩前に乳糖基質に先行して乳脂肪基質の取込みが活性化されるという乳腺におけるダイナミックな泌乳機能分化および初乳生産機序の一端が示唆され、同時に、本サンプルがVE乳腺移行に関する検討に適用できると判断した。

乳腺組織中VEレベルに有意な変動は見られなかった。また、動静脈差法による乳腺取込率についてもGluやBHBAが示すような取込の活性化を観察できなかった。しかし、VEは分娩前乳汁や常乳と比較して有意に初乳中に高含量であったことから、VEの微量濃度に対して、現法ではVEの乳腺取込みを正確に示すことができないことが判明した。

乳腺組織中のVE体内動態関連遺伝子の発現挙動を調べると、TTP mRNA発現量は分娩時と比較して分娩6週後の泌乳期に有意に低下した。TAP mRNA発現量は分娩が近づくにつれて低下し、分娩時に最も低値となり、分娩8週前より有意に低いレベルであった。興味深いことに、TTPとTAPのmRNA発現は分娩時に相対的な挙動を示し、TTP/TAP発現比が一過的に上昇していた(図1)。TAPによる結合競合が抑制されることで、TTPによる乳腺細胞内輸送が結果的に増加するという、初乳合成機序の新たな可能性が示唆された。

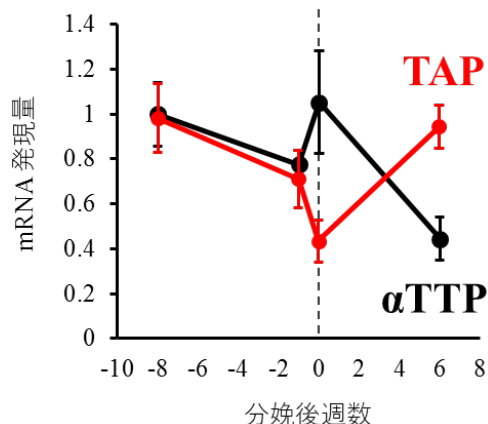


図1. 周産期乳牛の乳腺組織におけるTTPおよびTAP mRNA発現量の変動パターン

(2) VE濃度が低下する分娩前後において、肝組織中VE含量は、分娩直後および分娩後1週ではむしろ漸増していた。この結果より、分娩直後は、肝臓からの血液循環へのVE放出が抑制されている可能性が示唆された。

そこで、肝臓におけるVE体内動態関連遺伝子の発現挙動を解析した結果、TTP、AFMおよびTAPのmRNA発現量が分娩直後に一過的に低下していることが明らかとなった。この時、肝臓におけるアルブミンや抗酸化酵素のmRNA発現も同様に一過的に抑制され、相対して、急性期マーカーであるハプトグロビンや小胞体ストレスマーカーのmRNA発現が分娩直後に亢進していた。

一方、分娩直後の肝臓におけるTG蓄積レベルは分娩1週間後より低レベルであった。

以上の結果より、分娩直後の乳牛の肝臓では、脂肪肝化に起因する肝機能低下とは異なる、分娩性ストレスによる一過性の炎症応答が引き起こされ、重要な肝機能が阻害されている可能性が考えられた。この機能阻害に伴い、TTPやAFMのmRNA発現が低下し、肝臓からのVE放出が制限されるために、低VE血症化がさらに進行するのではないかと推察された。

以上、本研究課題において、実際に周産期の高泌乳牛を供試し、連続的な乳腺および肝のバイオプシー法を駆使することにより、周産期乳牛の低VE血症化プロセスと乳腺および肝臓におけるVE体内動態関連遺伝子の発現挙動との間に関連性があることを初めて示すデータを得るに至った。すなわち、乳腺および肝臓に発現する遺伝子の発現特性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を予防する技術開発の基盤になると期待できる。

<引用>

農林水産統計、農林水産省大臣官房統計部
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/nougyou_sansyutu/attach/pdf/index-2.pdf

Ingvarstsen *et al.*, 2003, *Livestock Production Science* 83:277-308.

Politis *et al.*, 2012, *J. Dairy Science* 95:7331-7335.

Qu *et al.*, 2013, *J. Dairy Science* 96:3012-3022.

Haga *et al.*, 2015, *J. Animal Science* 93:4048-4057.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

芳賀 聡、中野 美和、宮地 慎、石崎 宏、松山 裕城、鈴木 裕、北山 峻、小林 洋介、加藤 和雄、盧 尚建 (2017)

ウシ組織における α -トコフェロール体内動態関連遺伝子の発現特性に関する研究. 栄養生理研究会報. 61(1):9-19. (査読有)

域・主任研究員
研究者番号：90442748

Satoshi HAGA (2016) STUDY ON THE DISPOSITION OF VITAMIN E AND EXPRESSION OF α -TOCOPHEROL-RELATED GENES DURING WEANING AND PERIPARTUM IN CATTLE. 博士学位論文(東北大学)(査読有)
<http://hdl.handle.net/10097/64013>

[学会発表](計4件)

芳賀 聡、中野 美和、宮地 慎、石崎 宏、松山 裕城、鈴木 裕、北山 峻、小林 洋介、加藤 和雄、盧 尚建 ウシ組織における α -トコフェロール体内動態関連遺伝子の発現特性に関する研究. 家畜栄養生理研究会平成 29 年度春季集談会 2017.3.26 京都大学(京都府・宇治市)

Satoshi HAGA, Miwa Nakano, Makoto Miyaji, Hiroshi Ishizaki, and Sang-gun Roh Changes of the hepatic expression of α -tocopherol-related genes in relation to the hypovitaminosis E around calving in dairy cows. 17th AAAP Animal Science Congress 2016.8.25 九州産業大学(福岡県・福岡市)

芳賀 聡、中野 美和、宮地 慎、石崎 宏、松山 裕城、米倉 真一、盧 尚建 「妊娠有無」を乾乳牛の乳腺機能変化の要因として考慮すべきか? 日本畜産学会第 121 回大会 2016.3.28 日本獣医生命科学大学(東京都・武蔵野市)

芳賀 聡、中野 美和、宮地 慎、松山 裕城、加藤 和雄、盧 尚建 初乳生産期の乳腺における Glucose・BHBA 取込率および輸送体発現. 日本畜産学会第 120 回大会 2015.9.11 酪農学園大学(北海道・江別市)

[図書](計1件)

芳賀 聡他, 養賢堂, 畜産の研究 反芻動物の生産に関する最近の研究動向(4) 泌乳生理機能と乳量制御, 2015, 69(12)1005-1009.

[その他]

<http://researchmap.jp/rr-haga-rr>
<http://www.naro.affrc.go.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芳賀 聡 (HAGA, Satoshi)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門 草地利用研究領