

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05032

研究課題名(和文) 精漿による子宮機能調節作用を利用した受胎促進技術の開発

研究課題名(英文) Enhancement of fertility by using seminal proteins with an activity to normalize uterine function

研究代表者

片桐 成二 (Katagiri, Seiji)

北海道大学・獣医学研究院・教授

研究者番号：00292061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では不妊牛に見られる子宮での上皮成長因子(EGF)異常を解消する精漿中の有効成分を同定し、同定した蛋白を用いて投与を行うプロトコルを開発した。また、精漿によるEGF発現正常化の機序にリンパ節でのサイトカイン発現の変化が関与することを示した。さらに、肥満牛におけるEGF発現異常と牛の代謝状態の関係を検討し、EGF発現異常と糖負荷への反応性低下および血中テストステロン濃度増加とがこの病態に関係することも明らかにした。併せて子宮でのEGF発現異常による不妊症の経済的損失とその治療による経済効果を試算してモデル農場による本異常の治療効果がもたらす経済効果を試算し公表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、乳牛全体の約5%に見られる子宮での上皮成長因子濃度異常による不妊症への対策を行うものであり、同異常を解消する効果を持つ精液中の蛋白質を同定し、これを用いて子宮機能を正常化し、受胎性を回復させる治療プロトコルを開発した。また、この病態の予防につながる代謝および内分泌的な背景を明らかにした。さらに、経済的試算によりこの異常が解消されれば90頭の搾乳牛を飼養するモデル農場において年間約180万円の経済効果があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have identified a protein that could normalize the epidermal growth factor (EGF) profile and restore fertility in repeat breeder cows. We developed a treatment protocol with the identified protein and obtained a similar conception rate to the fertile controls. Further, seminal plasma changed expression of cytokines in the lymph nodes when the normal EGF profile was restored in the repeat breeder cows. In obese Japanese Black with an EGF abnormality, a reduction of glucose tolerance and an increase in testosterone levels were found in association with this type of infertility. We also estimated the economic impact of this abnormality and its treatment.

研究分野：臨床繁殖学

キーワード：乳牛 不妊症 子宮 精漿

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現代の乳牛は、乳生産に特化して改良された結果、高水準の泌乳能力を実現しているが、一方では高泌乳と良好な繁殖性を両立させるには高度な飼養管理技術を要する動物となっている。このため 1980 年代には 70% 程度であった経産牛の受胎率は現在 50% 以下にまで低下しており、その原因の一つとして胚死滅の増加が挙げられている。胚死滅増加の原因に関しては、分娩後の子宮の不顕性感染および内分泌異常による胚の発育不全がその背景にある。

われわれは、この内分泌異常が子宮での機能調節因子の発現異常を介して胚死滅を増加させるとの仮説を検証する中で子宮内膜での上皮成長因子 (Epidermal growth factor, EGF) の濃度異常が乳牛全体の約 5% にみられ、その多くはリピートブリーダーと呼ばれる不妊症を示すことを明らかにした。さらに、この異常は精液に含まれる蛋白質の作用で解消されることを示し、その臨床応用に向けた研究を提案した。

2. 研究の目的

精漿は雌性生殖器への作用を介して受胎性を高めることが示唆されているが、現在の人工授精による牛の交配システムにおいては精漿がもつこの作用は活用されていない。本研究は、牛の子宮における上皮成長因子 (Epidermal growth factor, EGF) の発現異常により低下した受胎性を、精漿の子宮への作用により回復させる治療処置の開発を目的としている。そのため、まずこの作用をもつ精漿蛋白質を同定し、その作用による治療効果を検証する。次いで精漿の作用機序を明らかにすることで、精漿蛋白質の腔内投与に代わる治療法の開発につなげる。また、この異常の解消による経済効果の試算を通して、牛の不妊症および疾病の経済効果を試算する汎用性の高い評価方法を開発する。

3. 研究の方法

精漿をクロマトグラフィーおよび電気泳動法により分画し、得られた分画を子宮での EGF 濃度異常の見られる不妊牛に投与して、子宮での EGF 濃度と受胎性に及ぼす効果を評価することにより、目的とする蛋白質を絞り込む。活性を示す蛋白質分画中の蛋白質スポットが数個になったところで、飛行時間型質量分析法 (TOF-MS) あるいはアミノ酸分析により各タンパク質を同定する。また、精漿による異常の解消と併せて観察される変化をモニターし、精漿による治療効果の機序を調べる。

さらに、EGF 濃度異常の病態を明らかにするため、肥満、高泌乳および暑熱などの同異常の発生頻度の増加と関わる因子に特徴的な内分泌および代謝異常と子宮での EGF 濃度異常との関係を調べる。

これらの生理学的な研究と併せて同異常による経済的損失を試算し、その治療による経済効果を明らかにすることで、本異常について酪農家および畜産農家への啓蒙の手段とする。

4. 研究成果

精漿蛋白質がもつ EGF 濃度異常解消効果を 3 つの蛋白質スポットを含む分画まで絞り込み、TOF-MS による蛋白質スポットの同定を行った。その結果、2 つのスポットは異なる修飾を受けたオステオポンチンであり、もう一つの蛋白質はデータベースになく、また N 末端がブロックされており同定できなかった。一方、同分画を用いた治療プロトコルの検討では、発情日に蛋白量として 100~250 μg を腔内に投与することで約 70% の牛で EGF 濃度が正常化し、その約 70% が妊娠した。

EGF 濃度異常と関連する因子を検索したところ、糖負荷試験への耐性低下と高アンドロゲン血漿が EGF 発現異常の発生頻度増加と治療処置への抵抗性増加に関わることが示唆された。

さらに、北海道における子牛、成牛の価格、乳価および飼料価格などの生産費をもとに、本異常による経済的損失と治療による経済効果を調べたところ、本異常に対する治療成績、治療が分娩間隔の短縮に及ぼす効果から 90 頭の搾乳牛を飼養する平均的な農場で 1 年当たり約 180 万円の経済効果があることが分かった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Sakaguchi K, Maylem ERS, Tilwani RC, Yanagawa Y, Katagiri S, Atabay EC, Atabay EP, Nagano M. Effects of follicle-stimulating hormone followed by gonadotropin-releasing hormone on embryo production by ovum pick-up and in vitro fertilization in the river buffalo (*Bubalus bubalis*). Anim Sci J. 90:690-695, 2019 査読あり
2. Sakaguchi K, Ideta A, Yanagawa Y, Nagano M, Katagiri S, Konishi M. Effect of a single epidural administration of follicle-stimulating hormone via caudal vertebrae on superstimulation for *in vivo* and *in vitro* embryo production in Japanese black cows. J Reprod Dev 64:451-455, 2018 査読あり

3. Sakaguchi K, Tanida T, Abdel-ghani MA, Kanno C, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano M. Relationship between the antral follicle count in bovine ovaries from a local abattoir and steroidogenesis of granulosa cells cultured as oocyte-cumulus-granulosa complexes. *J Reprod Dev* 64:503-510, 2018 査読あり
4. Abdel-ghani MA, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano M. Astaxanthin improves the developmental competence of in vitro grown oocytes and modifies the steroidogenesis of granulosa cells derived from bovine early antral follicles. *Reprod Fertil Dev* 31:272-281, 2018 Aug 3. doi: 10.1071/RD17527 査読あり
5. Abdel-Ghani MA, Sakaguchi K, Kanno C, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano M. Effects of pre-maturational culture duration on developmental competence of bovine small-sized oocytes. *J Reprod Dev* 64:365-369, 2018 査読あり
6. Sugiura T, Akiyoshi S, Inoue F, Yanagawa Y, Moriyoshi M, Tajima M, Katagiri S. Relationship between bovine endometrial thickness and plasma progesterone and estradiol concentrations in natural and induced estrus. *J Reprod Dev* 64:135-143, 2018 査読あり
7. Toishi Y, Tsunoda N, Nagata S, Kirisawa R, Nagaoka K, Watanabe G, Yanagawa Y, Taya K. Evaluation of chemiluminescent enzyme immunoassay system for the measurement of testosterone in the serum and whole blood of stallions. *J Reprod Dev* 64:41-47, 2018 査読あり
8. Kanno C, Sakamoto KQ, Yanagawa Y, Takahashi Y, Katagiri S, Nagano M. Comparison of sperm subpopulation structures in first and second ejaculated semen from Japanese black bulls by a cluster analysis of sperm motility evaluated by a CASA system. *J Vet Med Sci* 79:1359-1365, 2017 査読あり
9. Kanno C, Yanagawa Y, Takahashi Y, Katagiri S, Nagano M. Effects of semen preservation procedure in egg yolk-tris based extender on bull spermatozoa characteristics. *Jpn J Vet Res*. 65:151-157, 2017 査読あり
10. Okuyama MW, Sugiura T, Moriyoshi M, Yamashita K, Tamura J, Katagiri S. A transvaginal endoscopy-based technique for performing ovarian examinations in sows. *J Reprod Dev* 63:617-622, 2017 査読あり
11. Yang Y, Kanno C, Sakaguchi K, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano M. Extension of the culture period for the in vitro growth of bovine oocytes in the presence of bone morphogenetic protein-4 increases oocyte diameter, but impairs subsequent developmental competence. *Anim Sci J*. 88:1686-1691, 2017 査読あり
12. 山岸修一、藤井貴志、森安 悟、陰山聡一、平山博樹、片桐成二. 普及と研究が連携した受胎率向上技術の経済効果試算方法. *農業普及研究 Hokkaido*, 43:1-7, 2017 査読なし
13. Nagai K, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano M. The relationship between antral follicle count in a bovine ovary and developmental competence of in vitro-grown oocytes derived from early antral follicles. *Biomed Res*. 37:63-71, 2016 査読あり
14. Katagiri S, Moriyoshi M, Yanagawa Y. Endometrial epidermal growth factor profile and its abnormalities in dairy cows. *J Reprod Dev*. 62:465-470, 2016 査読あり
15. Higaki S, Kishi M, Koyama K, Nagano M, Katagiri S, Takada T, Takahashi Y. Early germinal vesicle breakdown is a predictor of high preimplantation developmental competent oocytes in mice. *Zygote*. 25:41-48, 2016 査読あり
16. 萩原清一、菅野智裕、伊藤純一、廣田和久、永野昌志、片桐成二. 北海道における乳牛への性選別乳牛精液の使用が産子の性別及び母牛の生存率似及ぼす影響. *日本獣医師会雑誌*. 69:383-388, 2016 査読あり
17. 山岸修一、藤井貴志、森安 悟、陰山聡一、平山博樹、片桐成二. 乳牛の子宮内膜上皮成長因子 (EGF) 濃度を指標にした受胎性評価とその治療による経済効果. *畜産の研究* 70: 177-183, 2016 査読なし

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 片桐成二. 乳牛の繁殖に関わる最近の知見. 第 36 回九州実験動物研究会総会・第 38 回日本実験動物技術者協会九州支部研究発表会 合同開催プログラム, 大分県労働福祉会館, 2018
2. Madalitso Chelenga, Mohammed A. Abdel-Ghani, 坂口謙一郎、柳川洋二郎、片桐成二、永野昌志. Usefulness of gas permeable culture device in in vitro production of competent bovine oocytes by shortened culture period. 第 161 回日本獣医学会学術集会, つくば国際会議場, 2018
3. 植芝滉己、呉ユエ、陳震、坂口謙一郎、柳川洋二郎、片桐成二、千葉仁志、惠淑萍、永野昌志. 液体クロマトグラフィー高分解能質量分析を用いた牛卵子中遊離脂肪酸およびトリアシルグリセロールの分析. 第 161 回日本獣医学会学術集会, つくば国際会議場, 2018
4. 菅野智裕、柳川洋二郎、片桐成二、永野昌志. 精子運動能自動解析装置 (CASA) を用いた受精能獲得精子の運動性評価. 第 160 回日本獣医学会学術集会. 鹿児島大学 群元キャンパス. 2017.
5. 坂口謙一郎、谷田孝志、楊応華、菅野智裕、永井克尚、Abdel-Ghani Mohamed.A.,柳川洋二郎、片桐成二、永野昌志. 牛卵巣内胞状卵胞数と初期胞状卵胞由来卵子-顆粒層細胞複合体の顆粒層細胞増殖能および卵子発生能の関連性. 第 160 回日本獣医学会学術集会, 鹿児島大学 群元キャンパス, 2017
6. 池田侑樹、奥山みなみ、森好政晴、山田未知、杉浦智親、柳川洋二郎、永野昌志、片桐成二. 交配および妊娠が豚の末梢血単核球中のサイトカイン発現および制御性 T 細胞に与える影響. 第 160 回日本獣医学会学術集会, 鹿児島大学 群元キャンパス, 2017
7. 谷田孝志、坂口謙一郎、菅野智裕、池田侑樹、田嶋彩野、柳川洋二郎、永野昌志、片桐成二. 黒毛和種リピーター牛の子宮内膜上皮成長因子発現異常に対する治療への抵抗性と肥満との関係. 第 160 回日本獣医学会学術集会, 鹿児島大学 群元キャンパス, 2017
8. Abdel-Ghani Mohammed. A., 坂口謙一郎、菅野智裕、柳川洋二郎、片桐成二、永野昌志. Astaxanthin improves the growth parameters, developmental competence, and quality of in vitro grown oocytes derived from bovine early antral follicles. 第 160 回日本獣医学会学術集会, 鹿児島大学 群元キャンパス, 2017
9. 坂口謙一郎、谷田孝志、永井克尚、楊応華、柳川洋二郎、片桐成二、永野昌志. 牛卵巣内胞状卵胞数と初期胞状卵胞由来卵子顆粒層細胞複合体の性ステロイドホルモン産生能の関係. 第 159 回日本獣医学会学術集会, 日本大学 生物資源科学部, 2016
10. 片桐成二. 牛の子宮内膜機能調節因子の発現異常とその背景にある内分泌および代謝因子の変化. 第 159 回日本獣医学会学術集会 獣医繁殖分科会企画シンポジウム, 日本大学 生物資源科学部, 2016

〔図書〕(計 2 件)

1. 片桐成二. 牛の受精卵の着床過程と早期胚死滅. 臨床獣医臨時増刊号. 緑書房. 2018. Vol. 36, pp82-89
2. 片桐成二. 子宮からのアプローチ: 上皮成長因子と妊娠率. 臨床獣医臨時増刊号. 緑書房. 2017. Vol. 35, pp102-106

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：柳川 洋二郎

ローマ字氏名：Yojiro Yanagawa

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学院獣医学研究院

職名：助教

研究者番号(8桁)：20609656

研究分担者氏名：藤井 貴志

ローマ字氏名：Takashi Fujii

所属研究機関名：地方独立行政法人北海道立総合研究機構

部局名：農業研究本部畜産試験場

職名：研究員

研究者番号(8桁)：60609105