

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K18803

研究課題名(和文)ウシ初期黄体のPG抵抗性と低酸素環境の関係 - 初期黄体におけるBNIP3の役割 -

研究課題名(英文) Study for the relationship between hypoxia and PG-resistance in bovine early corpus luteum - roles of BNIP3 in early corpus luteum-

研究代表者

西村 亮 (NISHIMURA, Ryo)

鳥取大学・農学部・助教

研究者番号：20704901

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)：ウシ初期黄体において低酸素環境がアポトーシス/オートファジー調節因子 BNIP3 の発現、糖輸送担体 GLUT1 の発現を亢進して progesterone (P4) 分泌を促すことで黄体形成に関わる (J Vet Med Sci 2017;79:1878-1883., 2018;80:368-374)。ウシ初期黄体細胞は低酸素環境において P4 分泌を維持する (J Reprod Dev 2019;65::67-72)。GLUT1 を介して黄体細胞に供給される糖が低下することがウシ黄体の構造的退行に関わる。TGF $\beta$  がウシ黄体の機能的、構造的退行に関わる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では哺乳動物の卵巣における低酸素環境の生理的役割について研究を展開し、特にウシの黄体形成機構に着目して研究を進めた。特に、排卵後数日の初期黄体内における低酸素環境に誘導される因子の特定、およびそれらの因子と黄体のプロジェステロン産生の関係について明らかにした。本研究ではウシを対象としたが、その成果は哺乳動物全体としても新しいものであり、ヒトを含めた動物種で同様の解析を進める際の重要な参考資料となる。家畜であるウシの卵巣の生理機構を解明することは、その機構を利用した繁殖制御に応用でき、他の動物種も含めた新しい動物生産技術開発の基礎データとなる。

研究成果の概要(英文)：This project has revealed as follows:

1) Hypoxia induces BNIP3 and GLUT1 expressions in bovine early corpus luteum (CL), resulting in supporting bovine luteal formation (J Vet Med Sci 2017; 79: 1878-1883., J Vet Med Sci 2018; 80: 368-374). 2) Bovine early luteal cells maintain production of progesterone (P4) under hypoxic conditions during luteal formation (J Reprod Dev 2019; 65: 67-72). 3) Decrease of glucose supply via GLUT1 is related to bovine luteal cell apoptosis. 4) TGF $\beta$  inhibits P4 production and facilitates apoptosis in bovine luteal cells.

研究分野：獣医繁殖学

キーワード：ウシ 黄体 低酸素環境 黄体形成 黄体退行

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ウシの繁殖効率は 20 世紀後半から日本を含め世界的に低下し続けており、生産性向上のための発情周期同期化技術として、最も普及した方法の一つがプロスタグランジン F<sub>2</sub> (PG) 投与による黄体退行の誘導である。しかし、本法は排卵後 5 日以内の初期黄体をもつ個体には有効ではなく (PG 抵抗性)、有効期間が延長すればより有用な技術となるが、PG 抵抗性の原因は不明である。申請者らは、ウシの初期黄体において転写因子 hypoxia-inducible factor-1 (HIF1) をはじめとする低酸素環境に誘導される種々の因子の発現が高まることを見出していたことから、これらの因子と PG 抵抗性の関係を解明することで、臨床的な PG の汎用性を高めることができると考え、研究を立案、実施した。

### 2. 研究の目的

近年、ウシの生産性の向上は食料確保にとって重要な国際課題である。ウシの繁殖効率を高めるために、黄体を退行させる PG が汎用されているが、排卵後数日以内 (初期黄体期) には効果がなく、その原因は不明である。申請者は過去にウシの初期黄体内で HIF1 とそれに誘導されるタンパク質 BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3) の発現が亢進していることを見出した。本研究では、初期黄体で起こる低酸素環境と関連因子の発現の意義・役割を明らかにして、PG 抵抗性の克服、すなわちウシの繁殖効率の向上に貢献する基礎的知見を提供することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究ではウシの初期黄体における PG 抵抗性について低酸素環境との関係を明らかにすべく①～③を実施する。①発情周期各期のウシ黄体組織から RNA を抽出し、標的遺伝子の mRNA 発現について定量的 RT-PCR により調べた。ウシの初期黄体細胞及び中期黄体細胞を単離し、通常の酸素濃度下 (20%) あるいは低酸素環境下 (3%) において培養し、プロジェステロン (P4) 分泌について酵素免疫測定法 (EIA) により調べ、標的遺伝子の mRNA 発現について定量的 RT-PCR により調べた。ウシの中期黄体細胞を単離し、通常の酸素濃度下 (20%) あるいは低酸素環境下 (3%) において、標的生理活性物質を添加して培養し、細胞生存率について WST-8 法により調べ、標的遺伝子の mRNA 発現について定量的 RT-PCR により調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) ウシ黄体における BNIP3 の役割

ウシの黄体形成において、VEGF (血管内皮増殖因子) に次ぐ重要な因子を特定するために、発情周期各期の黄体組織および初代培養黄体細胞を用いた検討を実施した。特に低酸素環境および HIF1 によって誘導され、アポトーシスやオートファジーに関わるタンパク質である BNIP3 のウシ黄体における機能が不明であることから、BNIP3 の黄体における役割について検討した。発情周期各期のウシ黄体組織および卵巣由来顆粒層細胞の BNIP3 mRNA 発現について定量的 RT-PCR により調べた。ウシの初期黄体細胞および顆粒層細胞において、低酸素環境が BNIP3 mRNA 発現に及ぼす影響について定量的 RT-PCR により調べた。BNIP3 mRNA 発現は初期黄体において顕著に高かった。また、BNIP3 mRNA 発現は排卵前の大型卵胞においても顕著に高かった。低酸素環境は培養した初期黄体細胞および顆粒層細胞における BNIP3 mRNA 発現を増加させた。ウシの初期黄体において、低酸素環境が血管新生に加え、排卵前の卵胞の顆粒層細胞、および排卵後の初期黄体細胞の BNIP3 mRNA 発現を増加させて初期黄体細胞の生存を支持することで黄体形成に関与する可能性が示された。

#### (2) ウシ黄体における GLUT1 の役割

ウシの黄体形成において、VEGF、BNIP3 に次ぐ重要な因子を特定するために、発情周期各期の黄体組織および初代培養黄体細胞を用いた検討を実施した。特に低酸素環境および HIF1 によって誘導される糖輸送担体 glucose transporter-1 (GLUT1) の初期黄体における機能が不明であることから、GLUT1 の黄体形成における役割について検討した。発情周期各期のウシ黄体組織の GLUT1 mRNA 発現について定量的 RT-PCR により調べた。ウシの初期・中期黄体細胞を単離培養し、グルコース (0.25-250 μM) および GLUT1 阻害剤 (Cytochalasin B; 10 μM, STF-31; 10 μM) の P4 分泌に及ぼす影響について EIA により調べた。初期黄体細胞において、低酸素環境が GLUT1 mRNA 発現に及ぼす影響について定量的 RT-PCR により調べた。GLUT1 mRNA 発現は初期黄体において顕著に高かった。グルコースは初期黄体においてのみ P4 分泌を増加させた。GLUT1 の阻害は両細胞において P4 分泌を低下させた。低酸素環境は初期黄体細胞における GLUT1 mRNA 発現を増加させた。ウシの初期黄体において、低酸素環境が血管新生、細胞生存に加え、黄体細胞の GLUT1 発現を増加させて糖輸送を支持して P4 分泌を促すことで黄体形成に関与する可能性が示された。

#### (3) ウシ初期黄体の低酸素環境における機能

ウシ黄体の形成における初期黄体細胞の特徴を見出すため、初期黄体細胞と中期黄体細胞の P4 分泌機能について比較した。ウシの初期黄体細胞及び中期黄体細胞を通常の酸素濃度下 (20%) あるいは低酸素環境下 (3%) において培養し、P4 分泌量を EIA で調べるとともに、P4 合成調

節タンパク質 (StAR, CYP11A1, HSD3B1) mRNA 発現について定量的 RT-PCR により調べた。両細胞において、低酸素環境下で 24 時間培養することで P4 分泌は低下した。6 時間の培養では、中期黄体細胞の P4 分泌および合成酵素 CYP11A1 mRNA 発現が低酸素環境において低下するのに対し、初期細胞では低下しなかった。ウシ初期黄体細胞は、低酸素環境においても P4 分泌を維持する機能を持つことが示唆された。

#### (4) ウシ黄体における トランスフォーミング増殖因子 (TGF) III 型受容体 (endoglin, betaglycan) の役割

ウシの黄体形成において、VEGF、BNIP3 に次ぐ重要な因子を特定するために、TGF III 型受容体 (endoglin, betaglycan) のウシ黄体形成における役割について解析を実施した。発情周期各期のウシ黄体組織の endoglin, betaglycan mRNA 発現について定量的 RT-PCR により調べた。ウシの初期黄体細胞及び中期黄体細胞を通常の酸素濃度下 (20%) あるいは低酸素環境下 (3%) において培養し、endoglin および betaglycan mRNA 発現について定量的 RT-PCR により調べた。betaglycan mRNA 発現は形成期-後期に高く、退行期に低い傾向を示した。endoglin mRNA 発現は形成期-中期に高く、退行期と比較して有意な差が認められた。初期黄体細胞において、hCG は通常気相で betaglycan mRNA 発現を増加させ、低酸素環境はその作用を有意に増強した。endoglin mRNA 発現に及ぼす低酸素環境の影響は認められなかった。ウシ黄体初期における低酸素環境は、LH とともに betaglycan 発現を促進することによって黄体形成に関与することが示唆された。

#### (5) ウシの黄体退行における GLUT1 およびグルコースの関係

ウシの黄体形成における関与を見出した糖輸送担体 GLUT1 およびこれにより輸送されるグルコースの黄体機能における役割について検討した。ウシの中期黄体細胞をグルコース添加あるいは無添加培地において一定時間培養し、細胞生存率を調べるとともにアポトーシスに関連するタンパク質 (FAS, CASP8, BCL2, BAX, CASP3) の mRNA 発現について定量的 RT-PCR により調べた。グルコース添加培地のウシ中期黄体細胞に GLUT1 阻害剤を添加して一定時間培養した後、細胞生存率を調べた。グルコースを除去あるいは GLUT1 を阻害することで、グルコースを添加した無処理区と比較して細胞生存率が有意に低下した。グルコースの除去により CASP3 および FAS の mRNA 発現量が増加し、さらにグルコース (25 mM) を追加することでグルコースを含む培地の細胞における発現量と差のない発現量となった。GLUT1 がウシ初期黄体において機能する一方で、GLUT1 を介して黄体細胞に供給されるグルコースが低下することで黄体細胞のアポトーシスすなわち黄体の構造的退行が誘導されることが示唆された。

#### (6) ウシの黄体退行における TGF の役割

TGF III 型受容体 (endoglin, betaglycan) のウシ黄体機能への関与を示したことから、リガンドである TGF の黄体機能における役割について検討した。発情周期各期のウシ黄体組織の TGF 受容体 (TGFBR1, 2) mRNA 発現について定量的 RT-PCR により調べた。ウシ中期黄体細胞を単離培養し、TGF をヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) あるいは細胞死受容体 FAS のリガンド (FasL) の刺激下および非刺激下において添加し、一定時間培養後、培養上清中の P4 濃度を測定するとともに細胞生存率を調べ、さらにアポトーシスに関連するタンパク質 (FAS, CASP8, BCL2, BAX, CASP3) の mRNA 発現について定量的 RT-PCR により調べた。TGFBR2 mRNA 発現は黄体後期で高かった。TGF を添加することで黄体細胞の P4 分泌量と細胞生存率が有意に低下し、hCG 刺激下でより顕著であった。FasL を組み合わせることでさらに生存率は低下した。TGF は hCG 刺激下で FAS, BAX, CASP3 の mRNA 発現量を増加させた。TGF はウシの黄体細胞において P4 分泌機能の低下および FAS を介したアポトーシスを誘導することが明らかとなり、黄体の機能的、構造的退行に関与することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nishimura R, Okuda K.	4. 巻 66
2. 論文標題 Multiple roles of hypoxia in bovine corpus luteum.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hasegawa H, Nishimura R, Yamashita M, Yamaguchi T, Hishinuma M, Okuda K.	4. 巻 65
2. 論文標題 Effect of hypoxia on progesterone production by cultured bovine early and mid luteal cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 67-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-061.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 NISHIMURA Ryo, OKUDA Kiyoshi, GUNJI Yosuke, KHALID Ahmed Magzoub, YAMANO Yoshiaki, YAMASHITA Yasuhisa, HISHINUMA Mitsugu	4. 巻 80
2. 論文標題 BNIP3 expression in bovine follicle and corpus luteum	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 368 ~ 374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.17-0267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 NISHIMURA Ryo, HASEGAWA Hiroki, YAMASHITA Masamichi, ITO Norihiko, OKAMOTO Yoshiharu, TAKEUCHI Takashi, KUBO Tomoaki, IGA Kosuke, KIMURA Koji, HISHINUMA Mitsugu, OKUDA Kiyoshi	4. 巻 79
2. 論文標題 Hypoxia increases glucose transporter 1 expression in bovine corpus luteum at the early luteal stage	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1878 ~ 1883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.17-0284	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fadhillah, Yoshioka S, Nishimura R, Yamamoto Y, Kimura K, Okuda K.	4. 巻 63
2. 論文標題 Hypoxia- inducible factor 1 mediates hypoxia-enhanced synthesis of progesterone during luteinization of granulosa cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 75-85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2016-068.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 3件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 西村 亮, 神保 葵, 長谷川啓喜, 山下真路, 山口武視, 菱沼 貢, 奥田 潔
2. 発表標題 Glucose 供給の低下はウシ黄体の構造的退行に關与する
3. 学会等名 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo NISHIMURA, Kiyoshi OKUDA
2. 発表標題 Multiple roles of hypoxia in bovine corpus luteum function
3. 学会等名 JSPS & PAS Japanese-Polish Joint Seminar "Cutting-edge Reproductive Physiology-Key process for birth of a new life" (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村 亮, 長谷川啓喜, 山下真路, 伊藤典彦, 岡本芳晴, 木村康二, 菱沼 貢, 奥田 潔
2. 発表標題 ウシ黄体における骨形成蛋白質結合蛋白質の役割.
3. 学会等名 第 161 回日本獣医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川啓喜、山下真路、伊藤典彦、岡本芳晴、窪 友瑛、伊賀浩輔、木村康二、菱沼 貢、奥田 潔、西村 亮
2. 発表標題 ウシ黄体における betaglycan の役割とその発現調節
3. 学会等名 第 124 回日本畜産学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村 亮、長谷川啓喜、山下真路、伊藤典彦、岡本芳晴、窪 友瑛、伊賀浩輔、木村康二、菱沼 貢、奥田 潔
2. 発表標題 ウシ初期黄体における低酸素環境の glucose transporter 1 (GLUT1) 発現を介した機能亢進
3. 学会等名 第 160 回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroyuki Hasegawa, Mitsugu Hishinuma, Masamichi Yamashita, Norihiko Ito, Yoshiharu Okamoto, Tomoaki Kubo, Kosuke Iga, Koji Kimura, Kiyoshi Okuda and Ryo Nishimura.
2. 発表標題 Possible role of glucose transporter-1 in progesterone synthesis in bovine corpus luteum.
3. 学会等名 4th World Congress of Reproductive Biology (WCRB 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長谷川啓喜・西村 亮・菱沼 貢・山下真路・伊藤典彦・岡本芳晴・窪 友瑛・伊賀浩輔・木村康二・奥田 潔
2. 発表標題 ウシ初期および中期黄体細胞のプロジェステロン (P4) 分泌に及ぼす低酸素環境の影響
3. 学会等名 日本畜産学会第122回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西村 亮
2. 発表標題 黄体の消長と低酸素環境
3. 学会等名 北海道受精卵移植研究会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西村 亮
2. 発表標題 ウシ黄体の消長と酸素濃度の関係
3. 学会等名 岡山県農業共済組合連合会平成28年度家畜診療技術者講習会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Okuda K, Nishimura R (Meidan R. eds.)	4. 発行年 2016年
2. 出版社 Springer press	5. 総ページ数 283
3. 書名 The Life Cycle Of The Corpus Luteum	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----