

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08056

研究課題名(和文) 牛の妊娠認識における子宮内ケモカインクロストーク機構の解明

研究課題名(英文) Chemokine cross talk mechanism between endometrium and immune cells during the maternal recognition in cows

研究代表者

作本 亮介 (SAKUMOTO, RYOSUKE)

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・上級研究員

研究者番号：20343999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠認識時の牛子宮内膜で発現が増加するケモカイン(CCL2, CCL8, CCL14, CCL16, CXCL10)のうち、CCL8とCXCL10が免疫細胞(白血球)でも発現が増加すること、また、自身の遊走を刺激することを明らかにするなど、子宮内膜 免疫細胞間のクロストーク機構にケモカインが密接に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠認識時の牛子宮内膜および免疫細胞間におけるケモカインクロストーク機構の解明により、長年の課題である早期胚死滅に起因する受胎率低下の改善に向けた、妊娠初期胚の生存性や機能更新、子宮への着床を誘起するためのケモカインを用いた新たな繁殖機能制御技術の開発などにつながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The expression of chemokine genes is increased in the endometrium (CCL2, CCL8, CCL14, CCL16, CXCL10) and immune cells (CCL8, CXCL10) during early pregnancy. Both CCL8 and CXCL10 also induce chemotaxis of immune cells. These findings suggest that the chemokine cross talk system plays important roles at the time of maternal recognition in cows.

研究分野：動物生命科学

キーワード：繁殖 牛 ケモカイン 妊娠

1. 研究開始当初の背景

現在、牛の生産現場ではほぼ 100%の割合で人工授精 (AI) が実施されているが、その受胎率は乳用牛で 45%、肉用牛で 55%程度と年々低下の一途を辿っており (H25 家畜改良事業団受胎調査成績) 日本だけでなく世界的にも喫緊かつ深刻な問題となっている。受胎率低下の問題解決に向けて様々な角度から研究されているが、いまだ明確な解決策は見出されていない。

近年では牛の発情微弱化に起因する発情の見逃しによって、授精適期を逃していることが受胎率低下の大きな要因の一つと考えられている。しかし、受精卵移植による受胎率も新鮮胚で 50%程度、凍結胚で 45%程度であることから、胚が生育して着床する子宮内環境の不備は受胎率低下の大きな要因と考えられる。また、AI 後 16-21 日までに胚が死亡する早期胚死滅は胚死滅全体の 7-8 割を占め、着床前期から着床期の妊娠初期は妊娠の成否を左右する極めて重要な時期である。

一方、インターフェロンタウ (IFNT) は AI 後 17-19 日をピークとして胚から分泌される反芻動物に特異的なタンパク質であり、妊娠成立の鍵となる物質と考えられている。しかし、胚が子宮内で異物として認識され、攻撃されるのを避ける母体子宮側の免疫応答機構と IFNT との関連性には未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、妊娠初期の牛子宮内膜における免疫応答系、特にケモカインによる局所機能調節機構に焦点をあてて多角的に解析し、子宮内膜と胚および免疫細胞間のクロストーク機構におけるケモカインの役割を明らかにすることによって、哺乳動物の受胎をコントロールする新たな技術開発に資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

(1) 人工授精後 14、15、16、17 ならびに 18 日目の黒毛和種経産牛から採血した血液を凍結保存し、その後の牛の状態 (分娩あるいは発情回帰) を踏まえ、妊娠牛と非妊娠牛に分類した (各 5 頭)。凍結保存した全血液から NucleoSpin RNA Blood kit を用いて総 RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法でケモカイン等の遺伝子発現を調べた。

(2) 発情周期中期にある牛から血液を採取し、Histopaque-1077 を用いた密度勾配遠心法により白血球画分を採取した。その後フローサイトメーターを用いて単球、顆粒球、リンパ球に分けて培養し、IFNT ならびに CCL16 (いずれも 50 ng/ml) を添加後、血球のケモカイン遺伝子発現変化を調べた。

(3) (2) と同様の手法により採取した白血球画分について、細胞遊走アッセイキットに付属する 96well-plate (pore size 5 μm) に播種し、ケモカイン (CCL2、CCL8、CCL14、CCL16 および CXCL10) ならびに IFNT (いずれも 100 ng/ml) を添加した後、18 時間培養を継続した。定法に従って蛍光を測定し、細胞遊走作用におよぼすケモカインの影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 妊娠牛では、人工授精後 18 日の血球において、型インターフェロン応答性遺伝子 (ISG15, MX1, MX2) だけでなく、CCL8 および CXCL10 遺伝子発現が 14 日と比較して有意に高くなることが示され、妊娠すると血球の CCL8 と CXCL10 遺伝子発現が増加することが明らかとなった (図 1)。

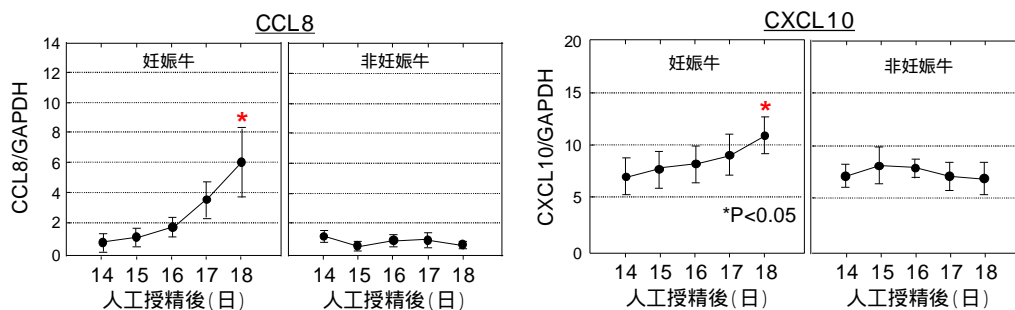


図 1 : 人工授精 14-18 日の妊娠牛と非妊娠牛の血球ケモカイン発現の変化。
アスタリスクで有意差あり (n=5, P<0.05)。

(2) 単球、顆粒球、リンパ球のいずれも IFNT および CCL16 を処理することによって、CCL8 と CXCL10 遺伝子発現が増加したことから、妊娠初期のケモカイン遺伝子発現の増加は胚由来の IFNT だけでなく、CCL16 でも誘起されることが示唆された (図 2)。

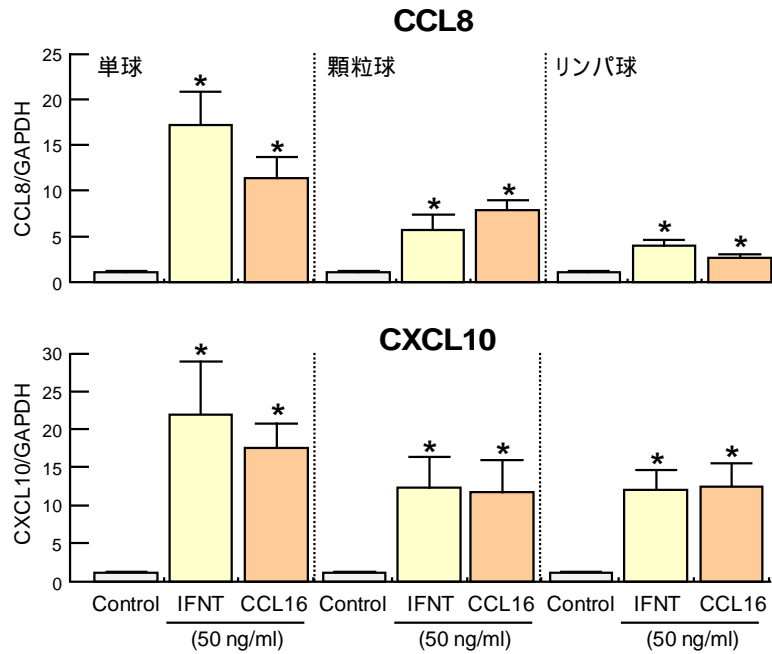


図 2 : 牛白血球のケモカイン遺伝子発現におよぼす IFNT ならびに CCL16 の影響。アスタリスクで有意差あり (n=5, P<0.01)。

(3) ポジティブコントロールとして用いた牛胎児血清 (FBS) とともに、CCL8、CCL16、CXCL10、IFNT 添加区において、対照区と比較して有意な白血球の遊走促進作用が認められた (図 3)。

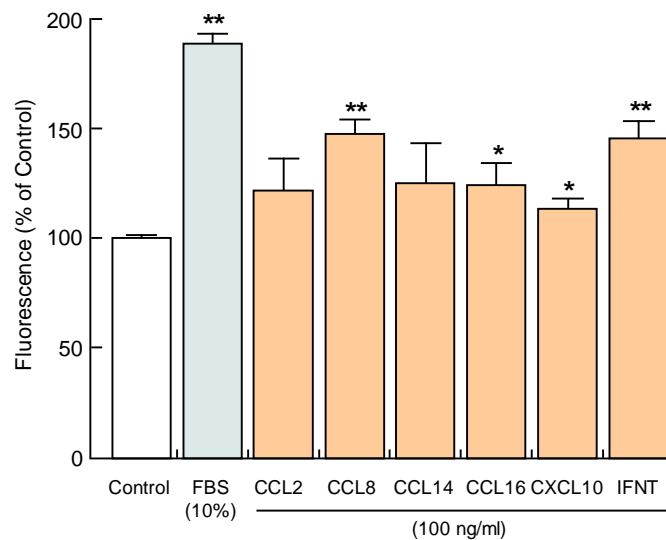


図 3 : ウシ白血球の遊走作用におよぼすケモカインの影響。アスタリスクで有意差あり (n=4, *P<0.05, **P<0.01)。

本研究の結果ならびに過去に明らかにした研究成果から、牛の妊娠認識時における胚と子宮内膜、免疫細胞間でのケモカインによる相互作用機構が明らかとなった (図 4)。

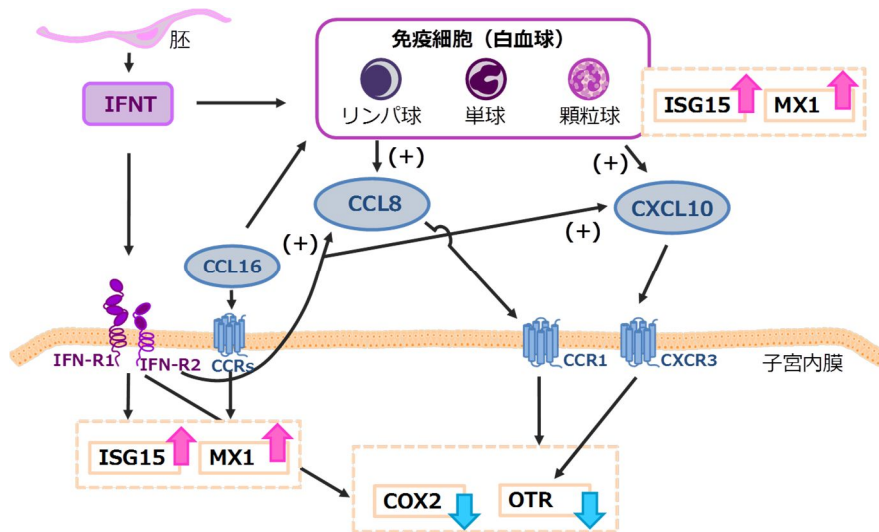


図 4：牛妊娠認識時におけるケモカインネットワーク機構の概念図（一部）

すなわち、

胚由来の IFNT は子宮内膜だけでなく、免疫細胞の CCL8 と CXCL10 発現を増加させる。

CCL8 と CXCL10 は子宮内膜のプロスタグランジン合成に関わる酵素（COX2）やオキシトシン受容体（OTR）発現を減少させ、妊娠の成立と維持に必要な黄体を退行させるプロスタグランジン F₂ の合成を抑制する。

CCL16 は子宮だけでなく免疫細胞にも作用し、CCL8 と CXCL10 発現を増加させる。

IFNT だけでなく、CCL8 と CXCL10 が免疫細胞自身の遊走を誘導する。

以上のように、牛の妊娠認識時の胚 子宮内膜 免疫細胞間のクロストーク機構にケモカインが密接に関与することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakamoto Ryosuke, Iga Kosuke, Hayashi Ken-Go, Fujii Shiori, Kanahara Hiroko, Hosoe Misa, Furusawa Tadashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Gene expression of CCL8 and CXCL10 in peripheral blood leukocytes during early pregnancy in cows	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Animal Science and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1186/s40104-018-0263-z	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 SAKUMOTO Ryosuke, HAYASHI Ken-Go, HOSOE Misa, IGA Kosuke, KIZAKI Keiichiro	4. 巻 66
2. 論文標題 Pregnancy-associated changes of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta (PPARD) and Cytochrome P450 Family 21 Subfamily A Member 2 (CYP21A2) expression in the 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 205-213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1262/jrd.2019-132	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0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----