

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580326

研究課題名（和文） 活性酸素による黄体退行制御機構の解明

研究課題名（英文） Clarification of the mechanism controlling the regression of corpus luteum by reactive oxygen species

研究代表者

T・J Acosta (T・J ACOSTA)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：80379718

ウシ子宮由来 prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF) によって誘起される黄体退行は progesterone (P_4) の減少を主徴とする機能的退行と黄体内の細胞死による構造的退行の二つの局面からなることが知られている。こうした PGF のウシ黄体退行作用は、PGF が活性酸素 (ROS) の発生を刺激することによることが示された。本研究では、PGF による黄体退行のメカニズムを明らかにするために、PGF のウシ黄体由来血管内皮細胞 (LEC) における ROS 発生刺激作用について培養系を用いて検討した。

研究成果の概要（和文）：

本書は、平成 一 2 1 年度の 3 カ年にわたり科学研究金補助金を受けた基盤研究一般(C) の課題である「活性酸素による黄体退行制御機構の解明」の成果をまとめたものである。

1) LEC における一酸化窒素合成酵素 (iNOS および eNOS) の発現に及ぼす PGF の影響

ウシ中期黄体より単離した細胞が LEC であることを Factor VIII (von Willebrand factor) 抗体を用いて確認し、培養 LEC における PGF receptor (FPr) mRNA 発現を半定量的 RT-PCR 法、protein 発現を Western blot 法で、さらにウシ黄体組織における FPr の局在ならびに培養 LEC における FPr 発現を免疫細胞化学的に検討した。黄体組織切片における FPr 抗体に対する陽性反応は、黄体細胞だけでなく血管内皮細胞にも認められ、また培養 LEC にも FPr の発現していることが明らかになった。培養 LEC の iNOS および eNOS の mRNA ならびに protein 発現量と NOS キットで NOS 活性に及ぼす PGF の影響を調べたところ、PGF は培養 LEC の eNOS mRNA および protein の発現に影響を及ぼさなかったが、iNOS mRNA および protein 発現量を有意に増加させた。

2) LEC における活性酸素分解酵素 (SOD) に及ぼす PGF、 H_2O_2 および NONOate の影響

ウシにおいて PGF 投与直後に卵巣静脈中の酸素および ROS の一種である一酸化窒素 (NO) が急増すること、また NO が黄体の機能的ならびに構造的退行に深く関与することを報告してきた。一方、SOD は過剰に生産された ROS を分解する酵素として知られていることから、PGF は黄体内 SOD の発現ならびに活性を抑制し、ROS の分解が進まないことによ

て黄体退行が促進すると考えられる。本研究では PGF の黄体退行機構における PGF と ROS の関係を明らかにする目的で、ウシ中期黄体より単離した LEC をコンフルエントになるまで培養し、液換と同時に PGF、過酸化水素 (H_2O_2) および NO のドナーである NONOate を添加し、さらに 2 または 24 時間培養した後 SOD mRNA および protein 発現、ならびに SOD 活性を半定量的 RT-PCR 法、Western blot 法または SOD キットでそれぞれ調べたところ、2 時間培養した LEC における PGF、 H_2O_2 および NONOate は培養 LEC の SOD mRNA および protein の発現量ならびに活性を有意に増加した。一方、24 時間培養した LEC における PGF、 H_2O_2 および NONOate は SOD mRNA および protein 発現量を有意に抑制した。さらに、PGF 産生に及ぼす H_2O_2 、NONOate および SOD の影響を検討した結果、ROS および SOD は PGF 産生を有意に増加した。

ウシ培養黄体細胞において NO は P_4 分泌を抑制し、apoptosis を誘導することが示されており、さらに本研究の結果と併せて考えると、子宮から分泌される PGF は LEC の NO 合成を刺激することにより黄体細胞の P_4 分泌を抑制し、黄体退行を促進する可能性が示された。さらに、PGF および ROS は LEC の SOD 発現と活性を抑制することによって細胞内 ROS が蓄積され、黄体細胞の apoptosis を誘導することが示唆された。また、ROS は LEC の PGF 分泌を刺激することから、LEC において PGF と ROS の間にはポジティブフィードバック機構が存在し黄体退行を促進することが示唆された。

研究成果の概要 (英文) :

Clarification of the mechanism controlling the regression of corpus luteum by reactive oxygen species

The corpus luteum (CL) is a transient endocrine gland, which is essential for the regulation of ovarian cycles as well as for establishment and maintenance of pregnancy. The luteal regression is characterized by a loss of the capacity to produce progesterone (P_4) functional luteolysis and tissue degeneration structural luteolysis. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF) and reactive oxygen species (ROS) are implicated in the functional and structural luteolysis. To determine the physiological role of PGF and ROS in the local regulation of CL function in cows, I examined 1) the effect of PGF on nitric oxide (NO) generating system in bovine luteal endothelial cells (LECs) and 2) the roles of PGF and ROS in the regulation of superoxide dismutase (SOD) enzyme in bovine LECs.

1) PGF receptor (FPr) mRNA and protein were expressed in cultured LECs obtained from mid-stage CLs. PGF increased NO (nitrite and nitrate) concentrations in the medium of cultured LECs. When LECs were exposed to 1 μ M PGF, PGF did not affect the expressions of endothelial NO synthase (eNOS) mRNA and protein. On the other hand, PGF stimulated the expression of inducible NOS (iNOS) mRNA and protein. In addition, PGF stimulated the NOS activity in cultured LECs ($P<0.05$).

2) When LECs were exposed to PGF, H_2O_2 or NONOate (NO donor) for 2 or 24 h. PGF, H_2O_2 and NONOate stimulated SOD mRNA and protein expression, and SOD activity at 2 h ($P<0.05$). On the other hand, PGF, H_2O_2 and NONOate inhibited SOD mRNA and protein expressions at 24 h ($P<0.05$). In addition, exposure of LECs to H_2O_2 , NONOate and SOD induced an increase in PGF biosynthesis (2 h).

The present results indicate that bovine LECs are target for PGF, and suggest that stimulation of the NO generating system and NOS activity induced by PGF result in increasing local NO production followed by luteolysis. The overall findings suggest the presence of a positive feedback loop between PGF and ROS in bovine LECs. SOD may play important roles in controlling the intraluteal ROS concentrations during functional and structural luteolysis in cows.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学・生殖生理学

キーワード：ウシ、一酸化窒素、発情周期、内分泌、黄体、子宮、プロスタグランジン F2α、酸素

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の黄体は、妊娠の成立と維持に必須の器官であり、妊娠が成立しなかった際に黄体の退行することが次の排卵周期への起点と考えられる。黄体は、子宮由来のプロスタグランジン F2α (PGF) により血流量の減少を伴って退行することが知られているが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。申請者らは生体へ PGF を投与することにより急激かつ一過性に血流量の増加することを見出しており、黄体内は一時的に高酸素環境に移行すると考えている。申請者は生体を用いた予備実験において PGF 投与時に卵巣静脈中の酸素濃度の上昇することを見出しているが、その生理的意義は不明である。一方、生体内において酸素を消費する過程で生成される活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) は細胞障害を引き起こすことから、申請者は PGF により誘導される卵巣内の高酸素環境が、ROS 産生を介して黄体退行制御機構の中

で重要な役割を果たしているという仮説を立てた

2. 研究の目的

本研究は、黄体退行機構を血流量の変化と関連の深い ROS に着目し、細胞培養系を中心に多角的な解析を展開する計画である。具体的な研究の内容は以下の 4 点に集約される。

- (1), 黄体の ROS 産生調節機構と PGF の関係
- (2), 黄体の内分泌機能に及ぼす ROS の影響
- (3), 黄体内細胞のアポトーシス制御機構における高酸素、ROS および PGF の影響,
- (4), 黄体における抗酸化物質産生調節機構の影響。

3. 研究の方法

- (1) 生体の局所レベルで観察するために、ウシ卵巣静脈、子宮静脈および頸静脈内にカテーテルを挿入し、同時に血液を採取することによって、卵巣および子宮局所の生理活性物質の動態を経時的に観察することを可能にした。
- (2) 黄体由来血管内皮細胞の培養系を用いて NO 合成酵素 および活性酸素種と PGF の関

係をしらべるために、

- ① 遺伝子発現：リアルタイムPCR,
- ② タンパク発現：Western Blot

4. 研究成果

本研究で得られた成果は既に国内外の専門学術誌に発表済みか、あるいは印刷中となっているので、本書にはこれら既刊論文および投稿原稿についてその全文を収録した。黄体退行制御機構を解明することによって、家畜の効率的生産のための新たな生殖制御法開発に重要な基礎資料を提供するばかりでなく、異常な排卵周期を主徴とする不妊症の診断やその治療法確立のための基礎研究としても大きな意義がある。

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 7 件)

- ① Hojo, T., Al-zi'abi, MO., Komiyama, J., Manabe, N., Acosta, T.J. and Okuda, K. Expression and localization of cFLIP, an anti-apoptotic factor, in the bovine corpus luteum. *J Reprod Dev.* 査読有 56, 2010 *in press*
- ② Korzekwa, A., Acosta, T.J., Miklewiec, M., Okuda, K., Lee, S.H., and Skarzynski, D.J. Leukotrienes affect secretory function of ovarian cells in vitro. *Reprod Dom Anim.* 査読有 2010 *in press*
- ③ Majewska, M., Woclawek-Potocka, I., Bah, MM., Hapunik, J., Piotrowska, KK., Tasaki, Y., Acosta, T.J., Okuda, K., and Skarzynski, DJ. Is interleukin 1- α a luteotropic or luteolytic agent in cattle? *Reproduction.* 査読有 139, pp. 665-672 (2010)
- ④ Hojo, T., Al-Zi'abi, MO., Skarzynski, DJ., Acosta, T.J., and Okuda, K. Changes in the vasculature of bovine corpus luteum during the estrous cycle and prostaglandin F 2α -induced luteolysis. *J Reprod Dev.* 査読有 55, pp. 512-517
- ⑤ Lee, S.H., Acosta, T.J., Yoshioka, S., and Okuda, K. Prostaglandin F(2alpha) regulates the nitric oxide generating system in bovine luteal

endothelial cells. *J Reprod Dev.* 査読有 55, 2009, pp. 418-424.

⑥ Acosta, T.J., Bah, MM., Korzekwa, A., Woclawek-Potocka, I., Markiewicz, W., Jaroczewski, JJ., Okuda, K., and Skarzynski, DJ. Acute changes in circulating concentrations of progesterone and nitric oxide and partial pressure of oxygen during prostaglandin F 2α -induced luteolysis in cattle. *J Reprod Dev.* 査読有 55, 2009, pp. 149-155

⑦ Lee, HY., Acosta, T.J., and Okuda, K. Prostaglandin F 2α stimulates 11beta hydroxysteroid dehydrogenase enzyme bioactivity and protein expression in bovine endometrial stromal cells. *Biol Reprod.* 査読有 80, 2009, pp. 657-664

[学会発表] (計 9 件)

- ① Acosta T.J. Changes in blood flow within the bovine corpus luteum: Possible role of reactive oxygen species during luteolysis. The 9th International Symposium on Developmental Biotechnology Korean Society of Animal Reproduction, 2009年10月23日, Daejeon, Korea.
- ② Lee Seun-Hyung, ウシ黄体由来血管内皮細胞 (LEC) における superoxide dismutase (SOD) に及ぼす prostaglandin F 2α (PGF) および reactive oxygen species (ROS) の影響, 第102回日本繁殖生物学会大会, 2009年9月10-12, 奈良。
- ③ 法上拓生, ウシ黄体組織および黄体細胞における cellular FLICE-like inhibitor protein (cFLIP) の発現解析, 第59回関西畜産学会, 2009年8月27-28日, 鳥取。
- ④ Duong HT, Acute changes in the concentration of prostaglandin F 2α (PGF) and cortisol in the uterine and ovarian venous blood during PGF-induced luteolysis in cow. 第59回関西畜産学会, 2009年8月27-28日, 鳥取。
- ⑤ 小田 朗博, ウシ中期黄体由来血管内皮細胞のアポトーシス誘導機構, 第59回関西畜産学会, 2009年8月27-28日, 鳥取。
- ⑥ 中川雄治, ウシ中期黄体由来血管内皮細胞 (LEC) の prostaglandin F 2α (PGF) 産生に及ぼす hydrogen peroxide (H $_2$ O $_2$) および nitric oxide (NO) の影響, 第59回関西畜産学会, 2009年8月27-28日, 鳥取。
- ⑦ Acosta T.J. Effect of cytokines and steroid hormones on nitric oxide generating system in bovine luteal endothelial cells. 42th Annual Meeting Society for the Study of Reproduction. 2009年7月18-22日。
- ⑧ Lee SH. Effects of prostaglandin F 2α and reactive oxygen species on superoxide

dismutase enzyme in bovine luteal endothelial cells. 42th Annual Meeting Society for the Study of Reproduction. 2009年7月18-22日.

- ⑨ Hojo T. Changes in the vasculature of bovine corpus luteum during the estrous cycle and prostaglandin F2 α -induced luteolysis. 42th Annual Meeting Society for the Study of Reproduction. 2009年7月18-22日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

T・J A c o s t a (T・J ACOSTA)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：80379718

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者