

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19780233
 研究課題名（和文）イヌの子宮における Toll-like レセプターを中心とした感染防御機構の
 解明
 研究課題名（英文）The defensive mechanisms mediated by Toll-like receptors in canine
 uterus
 研究代表者
 喜田 加世子（KIDA KAYOKO）
 大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
 研究者番号：50405362

研究成果の概要（和文）：細菌の構成成分を認識して免疫・炎症反応を誘導する数種の Toll-like レセプター（TLR）とその誘導経路に関わる因子のイヌ子宮内膜における mRNA 発現を調べたところ、正常な発情周期中ではほとんど変化しないことがわかった。しかし、TLR が認識する細菌成分で子宮内膜を刺激したところ、発情の時期には炎症性サイトカインの一種である IL-6 と IL-8 の mRNA 発現が発情終了後の時期に比べて増加する傾向が見られ、TLR などの mRNA 発現は変化しないものの発情周期の時期によって細菌刺激に対する免疫・炎症反応が変化している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：The gene expression of Toll-like receptors (TLRs), that recognize the pathogen-associated molecular patterns (PAMP) and induce immune and inflammatory responses, and their signal pathway molecules were investigated in the canine endometrium. During estrous cycle, they didn't have most changes. However, when the endometrium was stimulated by PAMP, IL-6 and IL-8 mRNA (a kind of inflammatory cytokines) tended to more increase at estrus than at diestrus. It is possible that the immune and inflammatory responses induced by the stimulation of bacterial pathogen may change during the estrous cycle although TLR and their signal pathway molecules gene expression don't change.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	540,000	3,540,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：Toll-like レセプター、感染防御、イヌ、子宮、発情周期

1. 研究開始当初の背景

イヌの子宮蓄膿症は発情休止期早期に多発しその他の時期ではほとんど発生しないことが知られているが、その理由については明らかでない。発生機序が不明であるため、外科的に卵巣子宮を切除する以外、本症に対する有効な予防法や治療法は開発されていない。

研究者はイヌの子宮内膜サンプルを用いて、感染防御因子ムチン1とラクトフェリンの発情周期中における発現変化を調べてみたところ、両者は発情休止期早期に減少していることを発見した。このことより、イヌの子宮蓄膿症の発生には子宮内の感染防御能の変化が大きく関与していることが推察され、イヌ子宮における感染防御機構の解明がイヌ子宮蓄膿症の発生機序の解明につながると考えた。

Toll-like レセプター (TLR) は、体内に侵入した微生物の構成成分を認識し、いくつかの物質の仲介により最終的に炎症性サイトカインや抗菌ペプチドなどの殺菌・静菌物質の産生を誘導する蛋白質であり、感染防御の最前線を司っていると考えられている。TLRはヒト子宮においては発現が報告されているがイヌ子宮においてはまったく調べられていない。イヌ子宮の感染防御機構を解明するには、感染防御の最前線といわれるTLRやそれに関連するシグナル伝達経路物質、サイトカインおよび抗菌ペプチド発現の知見を加えることが非常に重要であると考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

感染防御の最前線として近年注目されているTLRとそれに関連する因子のイヌ子宮における発現および発情周期中におけるその変化について検討し、イヌの子宮内感染防御の視点から、イヌ子宮蓄膿症の発生機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 子宮蓄膿症は直接的には大腸菌を主とする細菌感染によって発生する。そこで、細菌の構成成分を認識するTLR2, 4, 5および9のイヌ子宮内膜における発情周期中の発現変化を調べた。サンプルは正常発情周期を持つイヌの発情周期各期より子宮を摘出し、一部は組織切片作成用にブアン固定をし、一部は子宮内膜を分離してtotal RNAとtotal蛋白質の抽出に用いた。蛋白質の分布は免疫組織染色法で蛋白量はwestern blotting法にて検討した。mRNA発現量はRT-PCR法にて測定した。発

情周期は、発情前期、発情期、発情休止期10日(早期)、発情休止期35日(中期)および無発情期の5期に分けた。また、子宮蓄膿症罹患犬の子宮内膜における発現とも比較した。

(2) TLRのシグナル仲介蛋白質であるMyd88とNFkBの発情周期各期におけるmRNA発現量をRT-PCR法にて測定した。サンプルは(1)と同様のものを用いた。

(3) 抗菌ペプチドdefensin、secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) およびelafinの発情周期各期におけるmRNA発現量を半定量的RT-PCR法にて測定した。また市販されている抗体を用いて、免疫組織染色を行い、蛋白発現の分布を各発情周期で比較した。サンプルは(1)と同様のものを用いた。

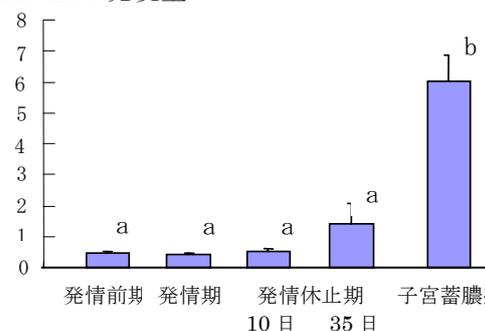
(4) 炎症性サイトカインであるIL-8およびIL-6の発情周期各期におけるmRNA発現量を半定量的RT-PCR法にて測定した。サンプルは(1)と同様のものを用いた。

(5) 本大学あるいは近隣の動物病院における避妊手術で得られた子宮のうち、卵巣に卵胞が存在し、現在発情中との問診が得られた子宮と卵巣に黄体が存在し、発情の時期から推測して発情休止期と推定される子宮から子宮内膜を分離し、TLR4が認識する細菌構成成分であるLPSあるいは多くの細菌成分を含む大腸菌死菌浮遊液とともに細胞培養用インサートを用いて2時間培養をした後、Myd88、NFkB、IL-8およびIL-6のmRNA発現を、RT-PCR法にて調べた。

4. 研究成果

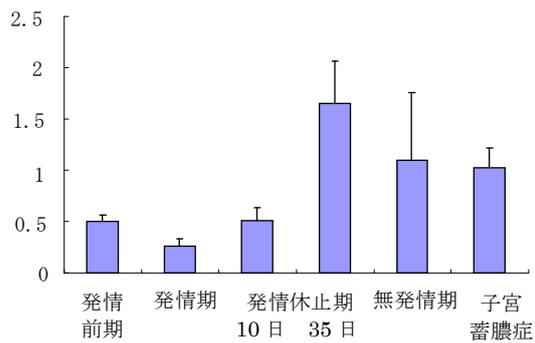
(1) TLR2, 4および9のmRNA発現量は発情周期各期の子宮内膜において有意な差は見られなかった。TLR5 mRNA発現量は無発情期で発情休止期10日と比較して有意に増加していた。TLR4蛋白質発現は発情休止期早期で減少する傾向が見られた。TLR2蛋白質発現には変化が見られなかった。子宮蓄膿症罹患犬の子宮内膜においてTLR2 mRNA発現量の有意な増加が見られた。

TLR2 mRNA 発現量

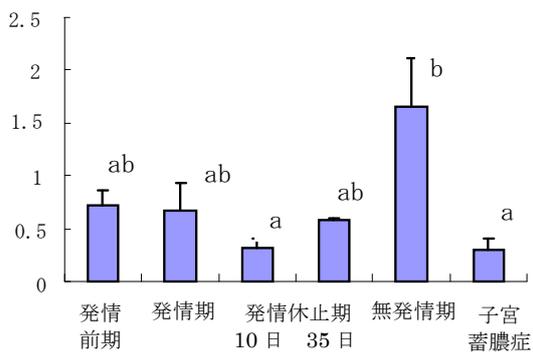


(異なる文字間でP<0.05で有意差あり)

TLR4 mRNA 発現量

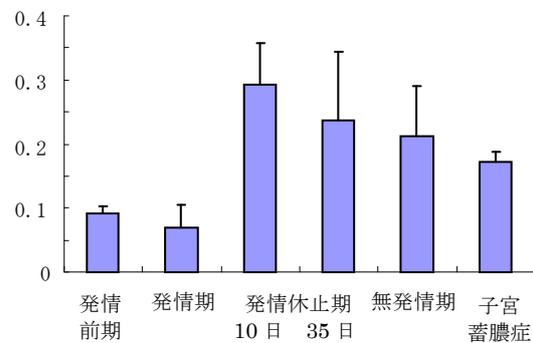


TLR5 mRNA 発現量



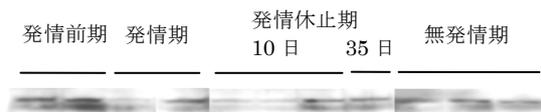
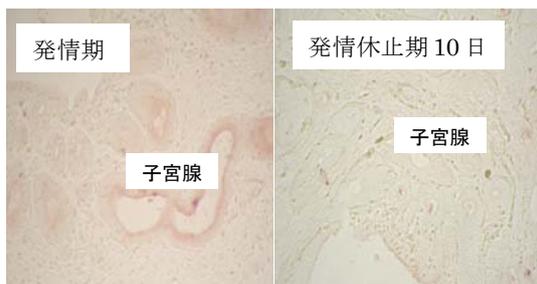
(異なる文字間で P<0.05 で有意差あり)

TLR9 mRNA 発現量



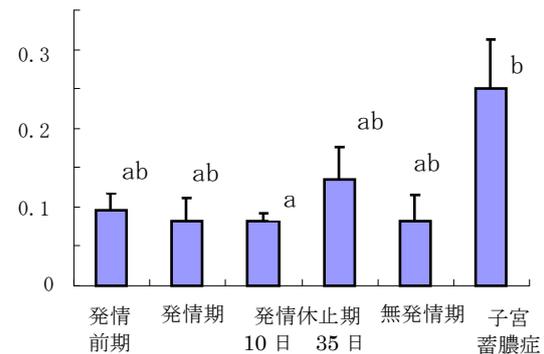
(グラフ縦軸はすべて内部標準 18S rRNA との相対量)

TLR4 蛋白質発現部位および発現量



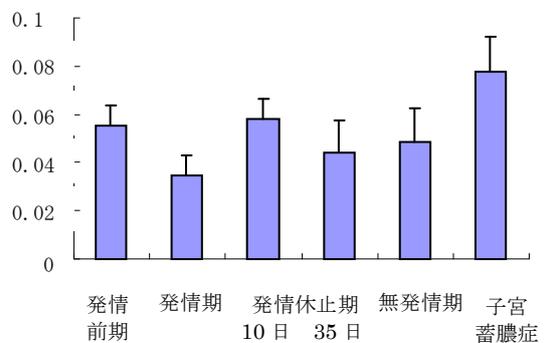
(2) Myd88 および NFkB mRNA 発現量についても発情周期各期の子宮内膜において有意な差は見られなかった。Myd88 mRNA 発現量は子宮蓄膿症罹患犬の子宮内膜において正常犬の発情休止期早期と比較して有意に増加していた。

Myd88 mRNA 発現



(異なる文字間で P<0.05 で有意差あり)

NFkB mRNA 発現量



(グラフ縦軸はすべて内部標準 18S rRNA との相対量)

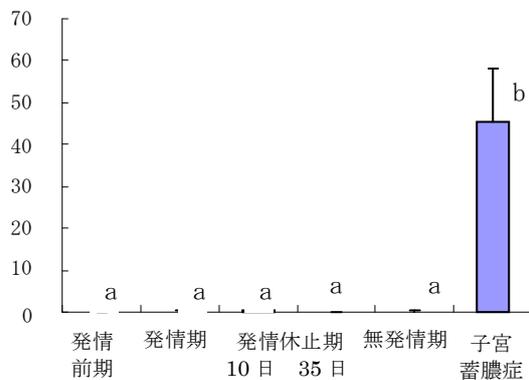
(3) 抗菌ペプチド defensin、SLPI および elafin の発情周期各期の子宮内膜における mRNA 発現は、発情休止期で増加した。ただし、SLPI mRNA は発情休止期中期以降で増加していた。蛋白質の免疫組織染色については、抗体の非特異的反応が除去できず、調べられなかった。

	発情前期	発情期	発情休止期		無発情期
			10日	35日	
β -Defensin 1	0/6*	2/4	5/5	3/3	1/3
SLPI	1/6	2/4	3/6	3/3	1/3
Elafin	0/6	0/4	6/7	3/3	1/4

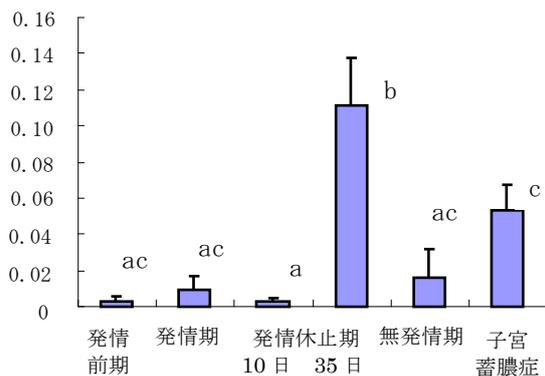
* 発現が認められた例数 / 全例

(4) 炎症性サイトカイン IL-8 mRNA は発情周期中の子宮内膜ではほとんど発現しておらず、子宮蓄膿症罹患犬の子宮内膜でのみ発現が増加していた。IL-6 mRNA 発現量は発情休止期 35 日の子宮内膜で他の周期と比較して有意に増加していた。子宮蓄膿症罹患犬の子宮内膜でも増加する傾向にあった。

IL-8 mRNA 発現量



IL-6 mRNA 発現量

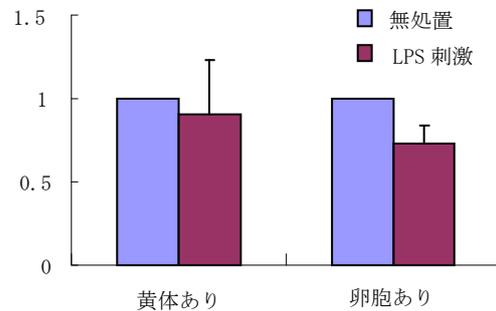


(異なる文字間で $P < 0.05$ で有意差あり)
(グラフ縦軸はすべて内部標準 18S rRNA との相対量)

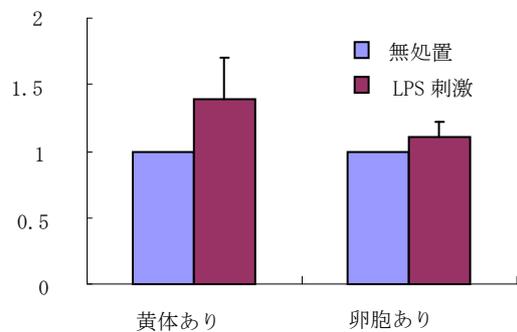
(5) 卵巣に卵胞のあるイヌの子宮内膜と黄体のあるイヌの子宮内膜を LPS および大腸菌死菌で刺激した結果、Myd88 および NFkB mRNA 発現量には変化は見られなかった。IL-6 mRNA 発現量は、黄体のあるイヌと比較して卵胞の

あるイヌの子宮内膜で LPS 刺激時に増加する傾向が見られた。一方、IL-8 mRNA 発現量は、卵胞のあるイヌの子宮内膜で大腸菌死菌刺激時に増加する傾向が見られた。

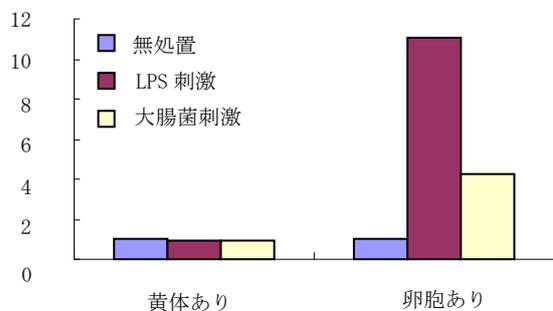
Myd88 mRNA 発現量



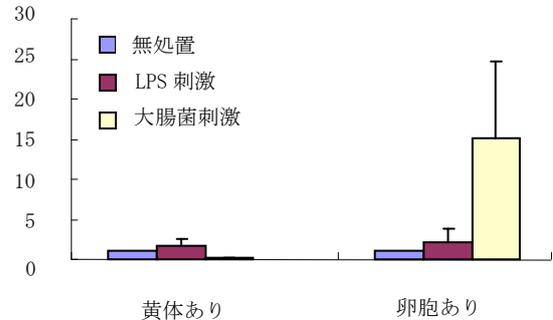
NFkB mRNA 発現量



IL-6 mRNA 発現量



IL-8 mRNA 発現量



(縦軸は内部標準 18S rRNA との相対量、ただし無処置を 1 とした)

以上の結果より、TLR、シグナル伝達経路中の Myd88 および NFkB、および最終生成物である炎症性サイトカイン IL-8 と IL-6 の mRNA 発現量は、発情周期中でほとんど変化せず正常子宮の恒常的な感染防御にはあまり関与していないと考えられた。一方、抗菌ペプチドは正常子宮の発情休止期に何らかの感染防御の役割を果たしていると考えられた。細菌感染時において Myd88 と NFkB mRNA 発現量は変化しないが、サイトカイン IL-6 と IL-8 mRNA 発現量は感染によって増加し、特に卵胞のある発情期のほうがより増加している傾向が見られたため、この時期には感染に対してより強力にサイトカインが働いている可能性が考えられた。また、IL-6 は TLR4 刺激に、IL-8 は TLR2 など他の TLR 刺激に対して主に産生されると考えられた。本研究によって得られた知見は国内外問わず初めてのものであり、イヌの子宮蓄膿症の発生機構を考える上で重要であると思われる。今後はさらに TLR による感染防御に対する性ステロイドホルモンの影響を調べ、発情周期とそれに対する感染予防の方法を考えていく必要がある。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

①喜田加世子 (代表)、イヌ子宮内膜における Toll-like レセプター 4 および 2 の発現と分布、第 148 回日本獣医学会、2009 年 9 月 25 日、鳥取

[その他]

商業雑誌

①喜田加世子 「イヌの子宮蓄膿症と子宮内感染防御因子」、エバルスアグロテック株式会社、EAT 情報、2010 年 4 月号

②喜田加世子 「子宮蓄膿症の発症機序を考える」、アニマル・メディア社、インフォベッツ、2008 年 3 月号

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜田 加世子 (KIDA KAYOKO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号：50405362

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：