

令和 6 年 4 月 26 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02345

研究課題名(和文) ウシ視床下部で発見された泌乳・加齢による繁殖障害の原因物質：現場での応用に向けて

研究課題名(英文) Studies for plasmalogens, the discovered hypothalamic causative molecule to suppress reproductive functions due to lactation and ageing in cows

研究代表者

角川 博哉 (Kadokawa, Hiroya)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：80370592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体のゴナドトロフは、LHやFSHを分泌する重要な細胞である。分娩後乳牛での性機能回復遅延の主因は、未解明な機構によるゴナドトロフの分泌能力の低下である。代表者は、新規受容体GPR61とそのリガンド、プラズマローゲンが重要な機構である可能性を見出した。本研究では、独自開発の血中プラズマローゲン濃度測定法を用い、高泌乳牛では分娩直後に血中総プラズマローゲン濃度が低下した後に、正常濃度に回復するが、個体によっては回復遅延し、初回排卵の遅延、さらに分娩間隔の延長の原因になることを発見した。さらに初回排卵後の血中プラズマローゲン濃度は、血中FSH濃度や乳量と正に相関することも発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳牛の繁殖障害による分娩間隔延長は、多大な経済損失を世界中の酪農家で生じさせる。しかしそのメカニズムには不明点が多かった。本研究は、まず分娩間隔延長の主因は、分娩後の性機能の回復遅延である($P<0.05$)ことを北海道の乳牛で調査し明らかにした。続いて、分娩後の性機能の回復遅延のメカニズムを、代表者の独自研究で発見した、下垂体のゴナドトロフにおける新規受容体GPR61と、そのリガンド、プラズマローゲン群に基づいて解明した。さらに初回排卵後の血中総プラズマローゲン濃度は、血中FSH濃度や乳量と正に相関することも発見した。これらは非常に重要な発見で、未開発の繁殖障害予防法の開発の基盤となる。

研究成果の概要(英文)：Plasmalogens play crucial roles in maternal and breastfed infant bodies and stimulate gonadotropin secretion by gonadotrophs. To estimate changes in and importance of plasma concentrations in postpartum Holstein cows, plasma samples were collected from 3 weeks before expected parturition until approximately 8 weeks after parturition. The plasma concentrations declined before and increased after parturition and stabilised near the day of first postpartum ovulation (1stOV). The days from parturition to 1stOV correlated with days from parturition to conception. On the day of 1stOV, milk yield correlated with the plasma concentration. After the 1stOV, the plasma concentration correlated with plasma concentrations of both anti-Mullerian hormone and FSH. In conclusion, the plasmalogen concentrations changed dramatically around parturition and 1stOV, and the concentrations correlated with important parameters for milk production and reproduction.

研究分野：繁殖

キーワード：乳牛 繁殖

1. 研究開始当初の背景

乳牛の繁殖障害による分娩間隔延長は、多大な経済損失を世界中の酪農家で生じさせる。しかしそのメカニズムには不明点が多かった。下垂体に存在するゴナドトロフは、性腺刺激ホルモン (LH) や卵胞刺激ホルモン (FSH) という生殖のための非常に重要なホルモンを分泌する細胞であり、性機能調節の中心である。そして分娩後乳牛での性機能回復遅延の主因は、ゴナドトロフが血中に LH・FSH を分泌する能力の低下である。LH・FSH 分泌は視床下部から分泌される性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) がゴナドトロフ上の受容体 (GnRHR) に結合すると刺激される。しかし分娩後乳牛に GnRH 剤を投与しても未解明の機構のため LH・FSH 分泌は刺激されないため GnRH とは別個の性機能回復抑制メカニズムが存在する。このメカニズムは、ゴナドトロフ表面の特殊構造、脂質イカダ上で GnRHR と複合体を形成し、脳内リン脂質、プラズマローゲン群をリガンドとする新規受容体 GPR61 であることを代表者は発見していた (Pandey et al. 2017; Kereilwe et al. 2018a; Kadokawa et al. 2022a)。

プラズマローゲン群は、大きくエタノールアミン型プラズマローゲン (EPI) とコリン型プラズマローゲン (CPI) に分けられる。それぞれは, ethanolamine ether phospholipids (ePE), と choline ether phospholipid (ePC) の一種で、多様な生理作用を発揮する。経口投与が可能であり、ヒトの母乳にも含まれ、新生児の脳発育を促進する (Moukarzel et al. 2016; Liu et al. 2020)。一方で、老人の脳では加齢により含有量が減り、アルツハイマー症等の脳疾患の原因になる (Almsherqi 2021)。

代表者はさらに、若牛と老牛のそれぞれの脳から抽出したプラズマローゲンを比較して、若牛脳由来 EPI は、GnRH が存在しなくても単独でゴナドトロフを刺激し LH・FSH 分泌させるのに対して、老牛脳由来 EPI にはそのような作用がないことを発見した (Kadokawa et al. 2022a)。この発見は、加齢に伴い繁殖障害が多発するメカニズムの中で、特に未解明な脳レベルのメカニズムとして非常に重要であることを示唆した。

2. 研究の目的

牛乳にもプラズマローゲンが含まれることが知られており、分娩後の乳牛は、大量の泌乳をする。そのため分娩前後の乳牛では、EPI や CPI の血中濃度が変化する可能性があるが、どのように変化するか、またその重要性は未解明である。代表者は、ウシ血中の EPI や CPI の血中濃度を測定する独自手法を開発した。そこでこの手法などを応用してこれらのことを明らかにすることにした。

3. 研究の方法

北海道立酪農試験場において、合計 54 頭 (初産牛 n=16、2 産牛 n=16、3 産牛 n=11、4 産以上牛 n=11) から、分娩前 3 週から分娩後 8 週まで週に 3 回採血し、血漿を冷凍保存した。分娩後 50 日以後には、人工授精を実施した。最終的には、合計 48 頭 (初産牛 n=14、2 産牛 n=14、3 産牛 n=10、4 産以上牛 n=10) が、分娩 200 後日以内に再妊娠した。

血漿から脂質を抽出し、phospholipase A1 で処理し、さらに溶媒で脂質を抽出した。その後、代表者が独自開発した測定法により、EPI や CPI の血中濃度を測定した。この測定原理は、(1) glycerophospholipid-specific phospholipase D 酵素により、サンプル中の ePE または ePC よりエタノールアミンまたはコリンを遊離させ、次に amine oxidase または choline oxidase 過酸化水素を発生させ、生成された過酸化水素量に比例して蛍光量が増える特殊な蛍光物質を反応させて蛍光量を測定することにある。以下、結果において、ePE 濃度は EPL 濃度を示し、ePC 濃度は CPL 濃度を示す。

解析にあたっては、他のホルモン濃度等との相関関係などを統計解析した。

4. 研究成果

最初に、分娩から初回排卵日までの日数と、分娩から妊娠までの日数の関係を調べた。その結果、**図1**に示すように、現在の北海道の乳牛においても古くから知られているように、初回排卵の遅延は、受胎遅延の重要な原因になることが確認された。

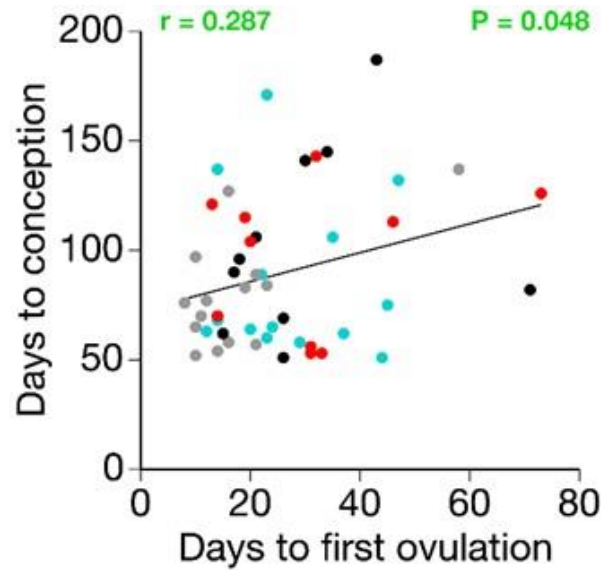


図1 調査牛における分娩後初回排卵日数と、受胎日との間の正の相関関係。水色点は初産牛、灰色点は2産牛、黒点は3産牛、赤点は4産以上牛を示す。グラフ上に、相関係数とそのP値を示した。

次に初回排卵遅延のメカニズム解明のために、血中プラズマローゲン濃度の推移を調べた。その結果、**図2**に示すように、高泌乳牛では分娩直後に血中総プラズマローゲン濃度が低下した後、正常濃度に回復するが、個体によっては回復遅延し、卵胞嚢腫等の繁殖障害になり、さらには初回排卵の遅延になることを発見した。

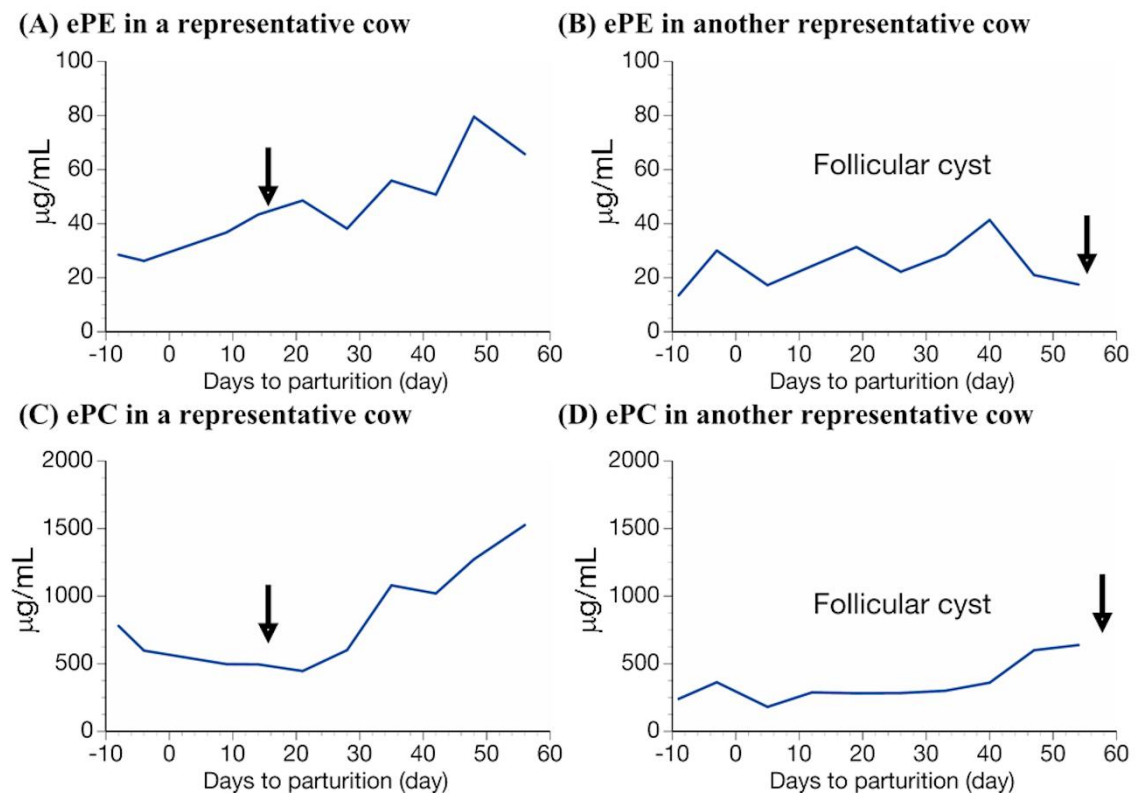


図2 代表個体における分娩前後の血中の ePE 濃度と ePC 濃度の推移。正常個体では、矢印で示す分娩後16日に初回排卵をした。一方、分娩後に卵胞嚢腫になった個体では、血中の ePE 濃度と ePC 濃度は低値で推移した後、遅延した初回排卵をした。

図3に、産次ごとの分娩前後の血中濃度の推移を示した。その結果、繁殖障害が多発する4産以上では、分娩後に血中 ePE 濃度が低値で推移することを発見した。

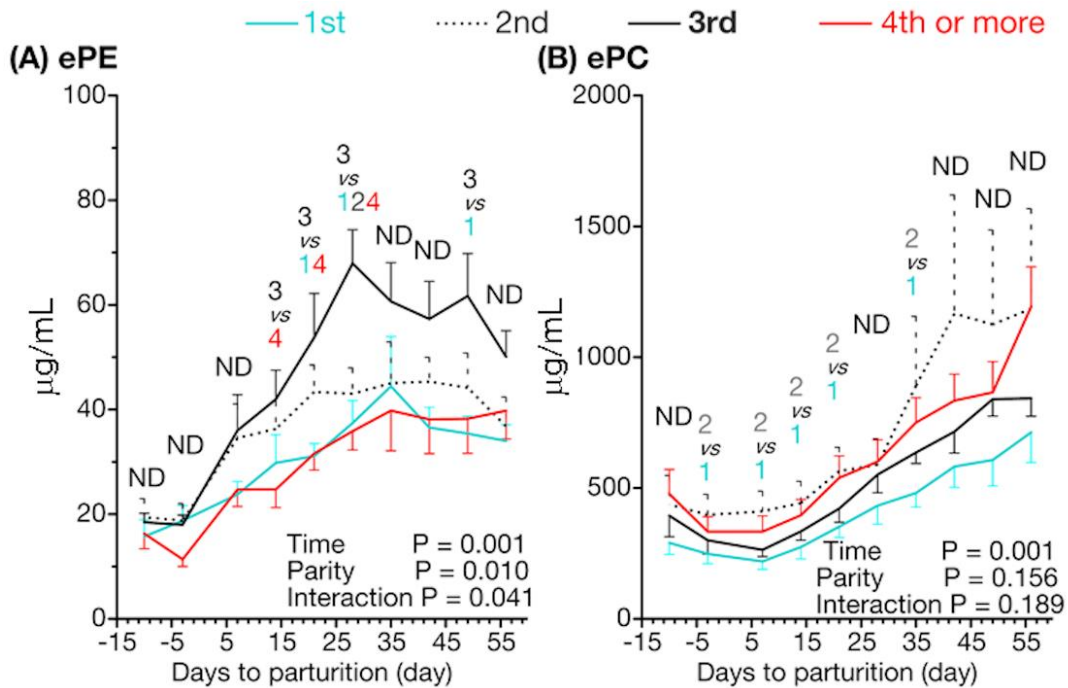


図3 産次別の分娩前後の血中の ePE 濃度と ePC 濃度の推移。水色線は初産牛 (n = 16)、黒点線は2産牛 (n = 16)、黒線は3産牛 (n = 11)、赤線は4産以上牛 (n = 11) を示す。P 値は、時間と産次の2要因の分散分析の結果を示す。各ポイントの上は、Tukey-Kramer 検定による、産次間の有意差を示す。たとえば、3 vs. 124 は、3産と初産・2産・4産の間に有意差 ($P < 0.05$) があることを示す。ND は差が無いことを示す。

さらに図4に示すように、初回排卵後の血中総プラズマローゲン濃度は、繁殖機能にとって重要な AMH や FSH の血中濃度と正に相関することも発見した。

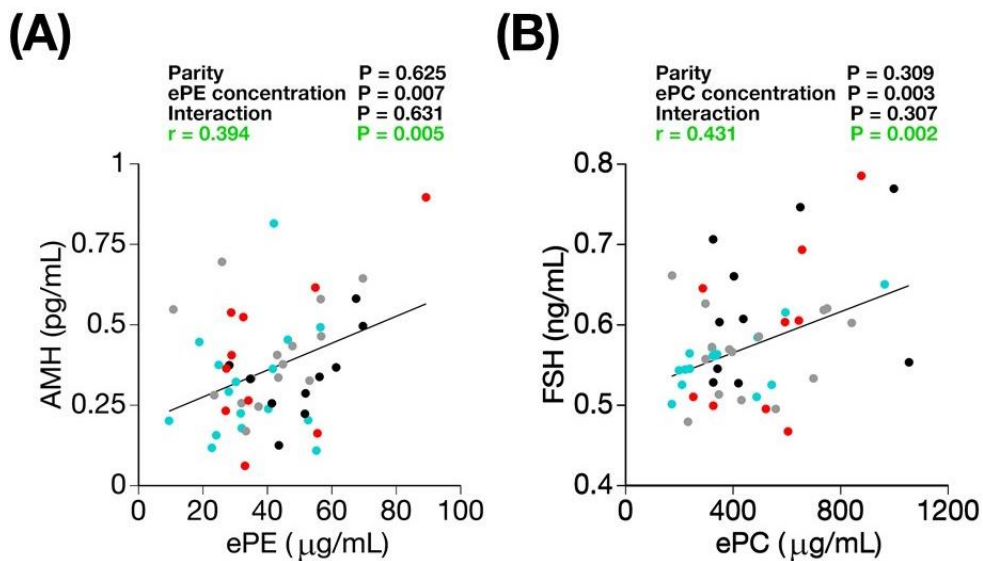


図4 初回排卵後の血中 ePE 濃度は血中 AMH 濃度と正に相関し、血中 ePC 濃度は血中 FSH と正に相関する。水色点は初産牛、灰色点は2産牛、黒点は3産牛、赤点は4産以上牛を示す。P 値は、産次と濃度の2要因の共分散分析の結果を示す。緑色は、相関係数とその P 値を示す。

さらに図5に示すように、初回排卵後の血中総プラズマローゲン濃度は、乳量と正に相関することも発見した。

したがって本研究によって、分娩後早期のプラズマローゲン濃度回復は繁殖と乳生産の両方に重要であるという重大な発見をした。

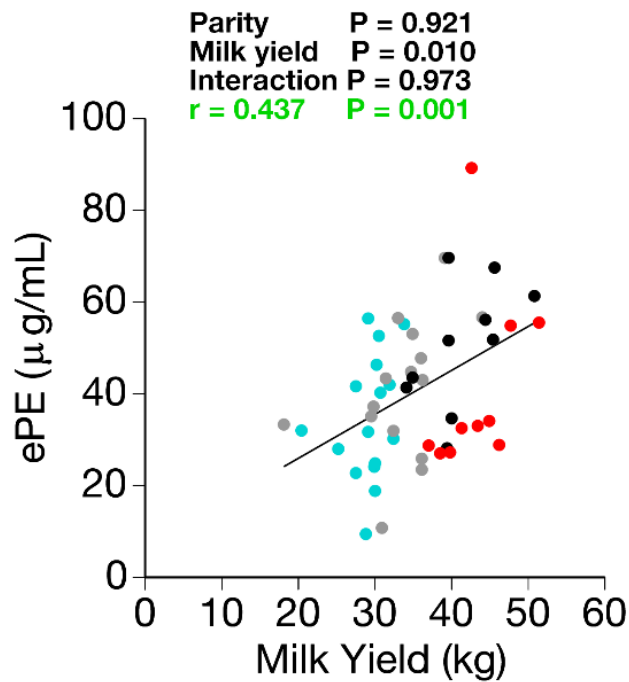


図5 初回排卵後の血中 ePE 濃度は、乳量と正に相関する。水色点は初産牛、灰色点は2産牛、黒点は3産牛、赤点は4産以上牛を示す。P値は、乳量と産次の2要因の分散分析の結果を示す。緑色は、相関係数とそのP値を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kadokawa Hiroya, Kotaniguchi Miyako, Mawatari Shiro, Saito Risa, Fujino Takehiko, Kitamura Shinichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Ethanolamine plasmalogens derived from scallops stimulate both follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone secretion by bovine gonadotrophs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16789
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-20794-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Abdillah Dimas Arya, Kereilwe Onalenna, Mizukami Yoichi, Watanabe Kenji, Kadokawa Hiroya	4. 巻 33
2. 論文標題 Age-associated changes in gene expression in the anterior pituitary glands of female Japanese black cattle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mammalian Genome	6. 最初と最後の頁 606 ~ 618
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00335-022-09958-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kadokawa Hiroya, Yoshino Ryunosuke, Saito Risa, Hirokawa Takatsugu	4. 巻 241
2. 論文標題 Chemosynthetic ethanolamine plasmalogen stimulates gonadotropin secretion from bovine gonadotrophs by acting as a potential GPR61 agonist	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Animal Reproduction Science	6. 最初と最後の頁 106992 ~ 106992
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anireprosci.2022.106992	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 角川博哉, Onalenna Kereilwe, 渡邊健司, 水上洋一
2. 発表標題 RNAseq法により発見された加齢に伴い発現量が変化する黒毛和種雌ウシの下垂体前葉内の遺伝子
3. 学会等名 第165日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤理紗, 坂東武治, 小谷口美也子, 田村力, 北村進一, 角川博哉
2. 発表標題 新規ゴナドトロフ刺激因子のクジラの脳での探索：近縁種のウシと異なる驚異的な寿命と繁殖可能年数の謎に挑む
3. 学会等名 第165日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroya Kadokawa, Ryunosuke Yoshin, Dimas Arya Abdillah, Takatsugu Hirokawa
2. 発表標題 Synthetic ethanalamine plasmalogen (EPI) stimulate FSH secretion from bovine gonadotroph, but old brain EPI inhibits such stimulation
3. 学会等名 19th International Congress on Animal Reproduction (ICAR) 2022+2 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroya Kadokawa
2. 発表標題 Discoveries of new receptors on bovine gonadotrophs: possible new mechanisms to control reproductive functions.
3. 学会等名 19th International Congress on Animal Reproduction (ICAR) 2022+2 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔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
研究分担者	窪 友瑛 (Kubo Tomoaki) (50825338)	地方独立行政法人北海道立総合研究機構・農業研究本部 酪農試験場・研究職員 (80122)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	北村 進一 (Kitamura Shinichi) (60117869)	大阪公立大学・研究推進機構 ・特任教授 (24405)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関