

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月14日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580318
 研究課題名（和文） 黄体由来血管内皮細胞におけるプロスタグランジンおよび活性酸素作用機序の解明
 研究課題名（英文） Clarification of the mechanisms of action of prostaglandin and reactive oxygen species in bovine luteal endothelial cells
 研究代表者
 アコスタ トマス (Tomas J. Acosta)
 岡山大学・大学院環境生命科学研究科・准教授
 研究者番号：80379718

研究成果の概要（和文）：哺乳動物の黄体は、妊娠の成立と維持に必須の分泌期間であり、妊娠が成立しなかった場合には退行し次の発情発期が回帰する。プロスタグランジンF2 α (PGF)によって誘導される黄体退行は、プロジェステロンの減少を主徴とする機能的退行と黄体内細胞死による構造的退行の二つの局面からなる。こうしたPGFのウシ黄体退行作用は、PGFの活性酸素(ROS)の発生を刺激する事が示唆されているが、その作用機序について明らかにされていない。本研究では、PGFによる黄体退行メカニズムを明らかにし、PGFのウシ黄体由来血管内皮細胞およびステロイド合成細胞におけるROS発生刺激作用について明らかとなった。PGFはROSとの相互作用を介して、機能的退行（2時間）時の初期増加および構造退行（24時間）時の減少という二相的にSODを調節することが示された。

研究成果の概要（英文）：

Prostaglandin F2 α and reactive oxygen species (ROS) regulates the corpus luteum (CL) function. The accumulation of ROS is controlled by superoxide dismutase (SOD). Thus, PGF may induce luteolysis by decreasing the expression of SOD and its bioactivity. We examined whether SOD is involved in the luteolytic action of PGF in bovine CL. SOD protein expression and SOD activity increased at 2 h but decreased at 24 h after administration of a luteolytic dose of PGF. In addition, PGF and H₂O₂ increased SOD1 protein expression and SOD activity at 2 h but suppressed it at 24 h in cultured luteal cells. Furthermore, H₂O₂ increased PGF production by luteal endothelial cells and steroidogenic cells in a dose- and time-dependent manner. PGF in turn, induced ROS production. These results indicate that PGF via interaction with ROS regulate bovine luteal SOD in a biphasic manner with an initial increase at time of functional luteolysis (2 h) followed by a decrease at the time of structural luteolysis (24 h). The down regulation of SOD during structural luteolysis may enhance ROS production and luteal cell death to ensure the regression of bovine CL.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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, 繁殖, 発情周期, 黄体, プロスタグランジン, 活性酸素,

妊娠, 効率的生産

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な器官であり、妊娠が成立しなかった際に黄体の退行する事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ディン F2 α (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。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。我々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、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

ウシを含む多くの哺乳動物において排卵後に形成される黄体は、妊娠の成立と維持に必須の内分泌器官であり、妊娠が成立しなかった場合には退行し次の発情周期が回帰する。子宮由来の prostaglandin F2 α (PGF) によって誘起される黄体退行は、progesterone (P4) 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 の活性酸素 (ROS) の発生を刺激することによることが示されているが、その作用機序は明らかにされていない。本研究では、PGF のよる黄体退行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) およびステロイド合成細胞 (LSC) 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。

3. 研究の方法

黄体由来血管内皮細胞の培養系を用いて活性酸素種と 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
- ③ 酵素活性: SOD, catalase assay kit を用いて検討した。
- ④ PGF合成に及ぼすコルチゾル (Cr), ROS の影響について enzymeimmunoassay (EIA) によって検討した。
- ⑤ LSC 及び LEC 細胞死に及ぼすPGF, Cr および ROS の影響 MTT assay。

4. 研究成果

本研究でえ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。黄体退行制御機構を解明することによって、家畜の効率生産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

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Vu, HV., Dam, TV., Acosta, TJ. Regulation of copper/zinc superoxide dismutase by prostaglandin F2 α in the bovine corpus luteum. Anim Reprod.査読有 10, 2013 in press
- ② Iwazawa, M., Acosta, TJ. Effect of elevated temperatures on bovine corpus luteum function: Expression of heat shock protein 70, cell viability and production of progesterone and prostaglandins by cultured luteal cells. Anim Prod Sci査読有 2013 (DOI: 10.1071/AN13027)
- ③ Kuse, M., Lee, HY., Acosta, TJ., Hojo, T., Okuda, K. Expression of glucocorticoid receptor α and its regulation in the bovine

- endometrium: Possible role in cyclic prostaglandin F2 α production. J Reprod Dev 査読有 59, 2013 (DOI: 10.1262/jrd.2012-185)
- ④ Hai, VV., Acosta TJ, Yoshioka, S., Abe, H., Okuda, K. Roles of prostaglandin F2 α and hydrogen peroxide in the regulation of Copper/Zinc superoxide dismutase in bovine corpus luteum and luteal endothelial cells. Reprod Biol Endocrinol 査読有 10, 2012, pp. 87
- ⑤ Yoshioka, S., Acosta, TJ, Okuda, K. Roles of cytokines and progesterone in the regulation of the nitric oxide generating system in bovine luteal endothelial cells. Mol Reprod Dev 査読有 79, 2012, pp. 689-696
- ⑥ Kozai, K., Hojo, T., Takahashi, M., Acosta, TJ., Nambo, Y., Okuda, K. Seasonal changes in luteal progesterone concentration and mRNA expressions of progesterone synthesis-related proteins in the corpus luteum of mares. J Reprod Dev 査読有, 58, 2012, pp. 393-397
- ⑦ Duong, H., Skarzynski, DJ., Piotrowska-Tomala, KK., Bah, M., Jankowska, P., Lukasik, K., Okuda, K., Acosta, TJ. Conversion of cortisone to cortisol and prostaglandin F2 α production by the reproductive tract of cows at the late luteal stage in vivo. Reprod Domest Anim 査読有 47, 2012, pp. 939-945
- ⑧ Duong, HT., Piotrowska-Tomala, KK., Acosta, TJ., Bah, MM., Sinderewicz, E., Majewska, M., Jankowska, K., Okuda, K., Skarzynski, DJ. Effects of cortisol on pregnancy rate and corpus luteum function in heifers: an in vivo study. J Reprod Dev 査読有 58, 2012, pp. 223-230
- ⑨ Duong, H., Vu, H, Bah M, Woclawek-Potocka, I., Dam, T., Skarzynski, D., Okuda, K., Acosta, TJ. Acute changes in the concentrations of prostaglandin F2 α (PGF) and cortisol in uterine and ovarian venous blood during PGF-induced luteolysis in cows. Reprod Domest Anim 査読有 47, 2012, pp. 238-243
- ⑩ Majewska, M., Lee, HY., Tasaki Y., Acosta TJ., Szostek, AZ., Siemieniuch, M., Okuda, K., Skarzynski, DJ. Is cortisol a modulator of interferon tau action in the endometrium during early pregnancy in cattle? J Reprod Immunol 査読有 93, 2012, pp. 82-93
- ⑪ Lee, SH., Acosta, TJ., Nakagawa, Y., Okuda, K. Role of nitric oxide in the regulation of superoxide dismutase and prostaglandin F2 α production in bovine luteal endothelial cells. J Reprod Dev 査読有 56, 2010, pp. 454-459
- [学会発表] (計 16 件)
- ① Acosta TJ, Progesterone regulates superoxide dismutases (SOD) in bovine luteal endothelial cells (LEC), 第 116 回日本畜産学会, 2013 年 3 月 27-30, 広島。
- ② 矢田咲子, ウシ黄体由来血管内皮細胞 (LEC) における一酸化窒素 (NO) および endothelin (ET)-1 産生に及ぼす cortisol (Cr) の影響第, 116 回日本畜産学会, 2013 年 3 月 7-30, 広島。
- ③ Vu Hai V, Prostaglandin F2 α and reactive oxygen species regulate the bioactivity and protein expression of copper/zinc superoxide dismutase in the bovine corpus luteum. International Conference on Biologically Active Substance-Bioactive Okayama 2012 (Okayama, Japan, September 13-14, 2012)
- ④ Acosta TJ, Roles of nitric oxide and hydrogen peroxide in the regulation of prostaglandin F2 α production in bovine luteal endothelial cells, 第 105 回日本繁殖生物学会大会 (筑波、2012. 9. 5-8)
- ⑤ Vu HV, Biphasic regulation of copper/zinc superoxide dismutase in the bovine corpus luteum during luteolysis, 第 105 回日本繁殖生物学会大会 (筑波、2012. 9. 5-8)
- ⑥ Acosta TJ, Role of glucocorticoid in the regulation of prostaglandin F2 α and nitric oxide production in bovine luteal endothelial cells, 45th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction (Pennsylvania, USA, August 12-15, 2012)
- ⑦ Hojo T, Effects of prostaglandin F2 α and nitric oxide on cell death in bovine luteal endothelial cells, World Congress on Reproductive Biology (Cairns, Australia, October 9-12, 2011)
- ⑧ Yoshioka S, Proliferation of bovine luteal steroidogenic cells. World Congress on Reproductive Biology (Cairns, Australia, October 9-12, 2011)
- ⑨ Iwazawa M, Effect of elevated temperatures on bovine corpus luteum function: heat shock protein 70 and 90 mRNA, cell viability and hormone production by cultured luteal cells. World Congress on

- Reproductive Biology (Cairns, Australia, October 9-12, 2011)
- ⑩ Oda A, Effects of tumor necrosis factor α and interferon γ on the viability and apoptosis signaling in bovine luteal endothelial cells. World Congress on Reproductive Biology (Cairns, Australia, October 9-12, 2011)
 - ⑪ 法上拓生, ウシ中期黄体由来血管内皮細胞における生存率および FAS、caspases ならびに BCL2 ファミリー遺伝子発現に及ぼす PGF および NO の影響, 第 104 回日本繁殖生物学会大会 (盛岡、2011. 9. 15-17)
 - ⑫ Duong HT, Effect of glucocorticoids on uterine prostaglandin F2 α production at the late luteal stage in cattle, 第 61 回関西畜産学会 (岡山、2011. 9. 11-12)
 - ⑬ 中川雄治, ウシ黄体由来血管内皮細胞 (LEC) の prostaglandin (PG) F2 α ならびに PGE2 産生に及ぼす hydrogen peroxide (H2O2) および nitric oxide (NO) の影響, 第 60 回関西畜産学会 (京都、2010. 9. 14-15)
 - ⑭ 中川雄治, ウシ黄体由来血管内皮細胞 (LEC) の prostaglandin (PG) F2 α ならびに PGE2 産生に及ぼす hydrogen peroxide (H2O2) および nitric oxide (NO) の影響, 第 60 回関西畜産学会 (京都、2010. 9. 14-15)
 - ⑮ Acosta TJ, Expression of superoxide dismutase in bovine corpus luteum and cultured luteal endothelial cells 43th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (Milwaukee, USA, July 30-August 3, 2010)
 - ⑯ Hojo T, Effects of glucocorticoid on cell death and mRNA expression of tumor necrosis factor receptor type I in bovine luteal endothelial cells. 43th Annual Meeting

of the Society for the Study of Reproduction (Milwaukee, USA, July 30-August 3, 2010)

- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
 - 出願状況 (計 0 件)
 - 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

岡山大学大学院生命科学研究科、動物生殖生理学研究室
<http://www.cc.okayama-u.ac.jp/~kokuda>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
アコスタ トマス (Tomas J. Acosta)
岡山大学・大学院環境生命科学研究科・准教授
研究者番号 : 80379718
- (2) 研究分担者
- (3) 連携研究者