

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24780316

研究課題名(和文)平滑筋を基軸としたウシ第四胃変位発症機構の解明

研究課題名(英文)Mechanism of bovine abomasal displacement - based on smooth muscle reseach

研究代表者

田島 剛 (Tajima, Tsuyoshi)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教

研究者番号：60508878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では乳牛の第四胃変位発症の背景に存在する第四胃運動機能障害の発症機構を明らかにするため、中鎖脂肪酸が第四胃平滑筋収縮を抑制するという仮説のもと、その証明と病態治療への応用をめざして研究を遂行した。その結果、1)第四胃変位罹患者では脂肪蓄積器官である第四胃で中鎖脂肪酸が局所的に増加する 2)中鎖脂肪酸は消化管常在型マクロファージのTLR4を介しiNOS発現を誘導してNOを産生し、第四胃運動を抑制する 3)第四胃変位罹患者ではTLR4シグナルを抑制するエイコサペンタエン酸の血中含有量が減少していることを明らかにした。本研究は第四胃変位の発症機序解明と新たな診断法開発に役立つものである。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study is to reveal mechanism of abomasal dysmotility that lies behind bovine abomasal displacement (AD) based on smooth muscle contraction. In organ culture model of bovine abomasum, we found medium chain fatty acids activated Toll-like receptor 4 (TLR4) and enhanced inducible NO synthase (iNOS) and NO production in gastric resident macrophages. Diffused NO affected abomasal smooth muscle dysmotility. Lauric acid was increased in displaced abomasal tissue but not in blood. On the other hand, blood eicosapentaenoic acid (EPA) was decreased, meaning TLR4 signaling by medium fatty acids was enhanced. These results highlight the pathophysiological role of medium fatty acids in AD and also show that the monitoring of blood EPA may contribute for the early diagnosis of AD.

研究分野：獣医臨床薬理学

キーワード：中鎖脂肪酸 TLR4 消化管常在型マクロファージ iNOS NO 平滑筋収縮機能障害 エイコサペンタエン酸

1. 研究開始当初の背景

牛の第四胃変位は主に産褥期にみられ、その後の生産性低下をもたらす。これまで第四胃変位発症メカニズムの研究は発症牛の血液生化学検査による代謝プロファイリングを中心に行われてきたが、変位した第四胃がおこしている収縮機能不全の原因に関する知見、すなわち、第四胃の運動を制御する機構のどこが破綻しているのかははまだ明らかになっていない。

2. 研究の目的

第四胃は主要な脂肪蓄積部位であり、産褥期に母牛のエネルギーバランスが負になるとエネルギー源として脂肪が動員される。このとき産生される中鎖脂肪酸はTLR4の内因性リガンドとなり、第四胃平滑筋収縮の抑制に参与する可能性がある。本研究では中鎖脂肪酸による新規第四胃収縮制御モデルを提案し、その証明と病態治療への応用を目的とした。

3. 研究の方法

と場で採取したウシ第四胃から平滑筋標本を作成して器官培養し、次の実験を行った。
 (1)ウシ第四胃平滑筋標本に中鎖脂肪酸を適用すると収縮張力が抑制されることをマグヌス法で確認した。
 (2)ウシ第四胃平滑筋標本に中鎖脂肪酸を適用すると消化管常在型マクロファージでiNOS発現が誘導されることをFACSおよびリアルタイムRT-PCRで確認した。
 (3)ウシ第四胃平滑筋の収縮調節機構としてどのような細胞内情報系が関与するかをマグヌス法により確認した。

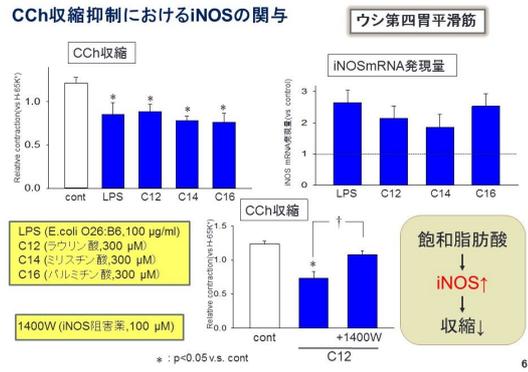
また、第四胃変位罹患牛および同一牧場で飼育されている健康牛の血液および第四胃組織を採取し、次の実験を行った。

(3)血中および組織中の脂肪酸含有量をGC/MSおよびLC/MS/MSで定量した。

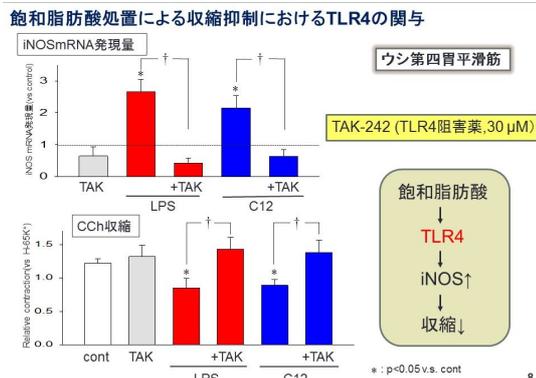
4. 研究成果

本研究で得られた結果を以下に記述する。

(1)健康牛の第四胃平滑筋標本にラウリン酸を適用すると、カルバコール誘発性収縮が抑制された。この抑制はiNOS阻害薬1400Wによって解除された。ミリスチン酸およびパルミチン酸でも同様の収縮抑制が見られたがラウリン酸よりも高濃度必要であった。

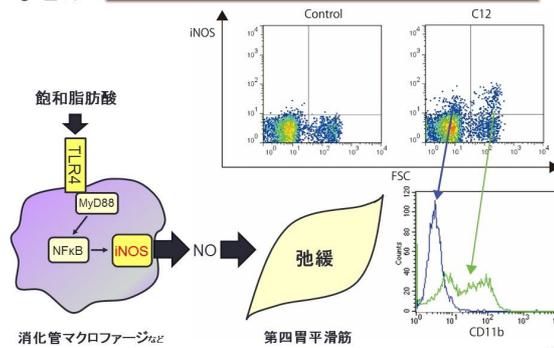


(2)ラウリン酸により第四胃平滑筋標本でおこるiNOS発現誘導および収縮抑制は、TLR4阻害ペプチドVIPERならびにTLR4阻害薬TAK-242で遮断された。



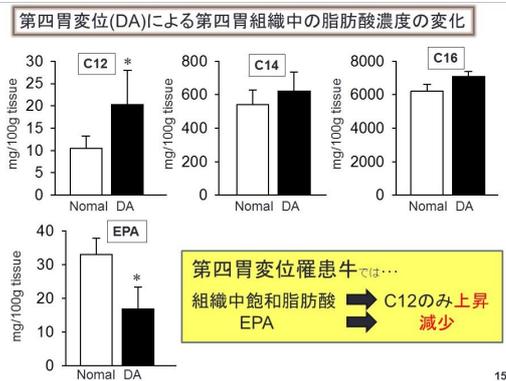
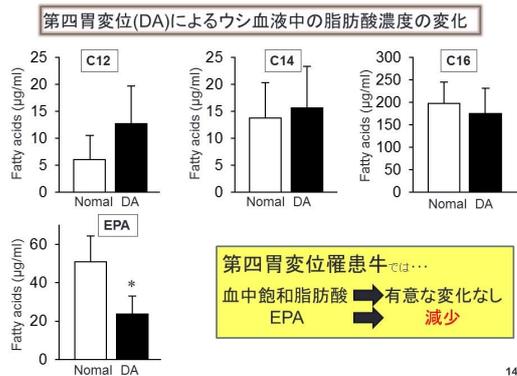
(3)ウシ第四胃平滑筋に常在型マクロファージが存在し、ラウリン酸によってTLR4を介してiNOS発現を誘導し、NOを産生することを明らかにした。

まとめ 第四胃平滑筋収縮における飽和脂肪酸の作用機序

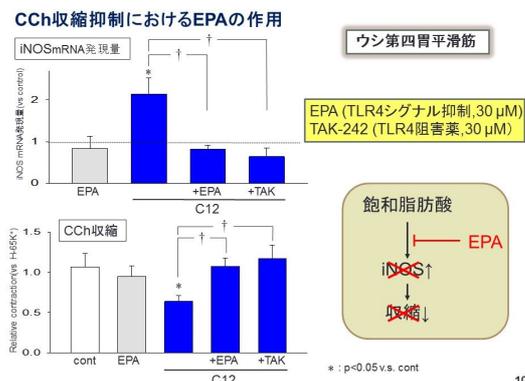


(4)第四胃平滑筋の収縮調節にはPDE4、PDE5ならびにPKCが関与することをそれぞれの阻害薬(Ro20-1724、valdenafilおよびRo31-8425)を用いた張力実験で明らかにした。ウシ第四胃平滑筋標本にPDE4およびPDE5が発現することをRT-PCRで確認した。

(5)AD 発症牛と健康牛とを比較すると、第四胃組織中のラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸量が有意に増加していたが、血中濃度に差は無かった。一方、AD 発症牛では血中のドコサヘキサエン酸（DHA）量が増加し、エイコサペンタエン酸（EPA）とその前駆物質である リノレン酸量が減少していた。



(6)EPA はラウリン酸による第四胃平滑筋での iNOS 発現誘導ならびに収縮抑制を解除した。



これらの結果をまとめると、第四胃変位の発症メカニズムとして次のようなモデルが考えられた。

(1)母牛が分娩直後から産乳に伴う負のエネルギーバランスになり、主要な脂肪蓄積部位である第四胃から多量の脂肪酸を動員する際、第四胃組織中でラウリン酸などの中鎖脂

肪酸量が増加すると同時に血中のEPA量が減少する。

(2)生じた中鎖脂肪酸は第四胃組織中の常在型マクロファージのTLR4を活性化する。このときTLR4の内因性ブロッカーであるEPA量が減少しているため、TLR4の活性化は効率よくおこる。

(3)常在型マクロファージでTLR4が活性化するとiNOS発現が誘導され、NOが産生される。NOは平滑筋層に拡散して平滑筋収縮を抑制し、結果第四胃は収縮機能が低下する。

本研究により、第四胃変位の発症には第四胃局所での中鎖脂肪酸産生とEPA減少が重要であることが示唆された。また、血中EPAの減少は第四胃変位を早期に発見する臨床マーカーとなり得る可能性が示唆された。

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 3 件)

Michishita M, Uto T, Nakazawa R, Yoshimura H, Ogiwara K, Naya Y, Tajima T, Azakami D, Kishikawa S, Arai T, Takahashi K. Antitumor effect of bevacizumab in a xenograft model of canine hemangiopericytoma. J Pharmacol Sci. 査読有. 2013;121(4):339-42.

Kaneda T, Kido Y, Tajima T, Urakawa N, Shimizu K. PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotide contents and relaxing effects on carbachol-induced contraction in the bovine abomasum. J Vet Med Sci. 2015 Jan;77(1):15-9. 査読有. doi:10.1292/jvms.14-0248.

Michishita M, Ohtsuka A, Nakahira R, Tajima T, Nakagawa T, Sasaki N, Arai T, Takahashi K. Anti-tumor effect of bevacizumab on a xenograft model of feline mammary carcinoma. J Vet Med Sci. 査読有. 2016 May 3;78(4):685-9. doi:10.1292/jvms.15-0550.

〔学会発表〕(計 1 件)

鈴木孝一郎、田島剛、相川麗衣、金田剛治、浦川紀元、清水一政 飽和脂肪酸はToll-like receptor 4を介してウシ第四胃平滑筋収縮を抑制する 第158回日本獣医学会学術集会 2015年9月7日 北里大学獣医学部(青森県十和田市)

〔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 0 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〕

ホームページ等

<http://www.nvlu.ac.jp/veterinary-medicine/members/004.html>

<http://tlo.nms.ac.jp/researcher/1557.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田島 剛 (TAJIMA, Tsuyoshi)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・基礎獣医学部門・獣医薬理学研究室・助教

研究者番号：60508878