

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450448

研究課題名(和文) 飼育動物の生殖器疾患等における INSL3測定 of 臨床検査への応用と同受容体発現解析

研究課題名(英文) Application of INSL3 measurements for clinical application and expression analyses of INSL3 receptors in reproductive disorders in domestic animals

研究代表者

川手 憲俊 (Kawate, Noritoshi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：80221901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、妊娠牛の母体血中・尿中 INSL3 測定による胎子雌雄判別への臨床応用について検討し、妊娠中期・後期の複数時点の血中テストステロンと INSL3濃度を測定することによって、約90%の的中率で胎子雌雄を判別できることを見出した。精液性状不良牛および卵巢嚢腫牛の血中 INSL3濃度は正常牛との顕著な差はみられなかった。また潜在精巣犬の停留精巣の INSL3と同受容体の発現を調べた結果、停留精巣では十分量の INSL3が発現しているが、受容体である RXFP2の発現は消失していることが判明した。子宮蓄膿症犬の卵巢・子宮の INSL3と RXFP2の遺伝子発現は正常子宮犬との間に顕著な差は見出せなかった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined an application of INSL3 measurements in maternal peripheral blood and urine of pregnant cattle. As the results, we found that nearly 90% of accuracy for fetal gender prediction was obtained when we used data of blood testosterone and INSL3 concentrations at multiple-time points from the mid to late gestation. There were no significant differences of blood INSL3 concentrations, between bulls with abnormal and normal semen, and also between cows with ovarian cysts and normal ovarian activity. We also investigated expression of INSL3-Receptor (RXFP2) in retained testes in cryptorchid dogs, and elucidated that loss of RXFP2 gene expression in spite of substantial expression of INSL3 in retained testes. No significant differences were found in INSL3 and RXFP2 gene expressions in ovaries and uteruses between dogs with pyometra and normal dogs.

研究分野：獣医繁殖学

キーワード：INSL3 テストステロン RXFP2 精液性状不良牛 卵巢嚢腫牛 ウシ胎子雌雄判別 潜在精巣 子宮蓄膿症犬

1. 研究開始当初の背景

インスリン様ペプチド 3 (INSL3) はリラキシン様因子あるいはライディッチ・インスリン様ペプチドとも呼ばれ、精巣に特異的に発現するペプチドとして、1990年代中頃に発見された新しいホルモンである (Adham IM et al, J Biol Chem, 1993)。INSL3 は雄マウスではテストステロンと同様に精巣のライディッチ (間質) 細胞から分泌され、雌では卵巣の内卵胞膜細胞や黄体細胞から分泌されることが報告されている (Ivell R et al, Endocrinology, 1998)。INSL3 の役割はマウスでは胎生期の精巣下降作用を持つことが示唆されているが (Nef S et al, Nat Genet, 1999)、性成熟過程とそれ以降の生殖器における役割については不明な点が多い。ヒトや齧歯類では 2000 年前後に血中 INSL3 の放射免疫測定法が開発され、男性および雄ラットの血中 INSL3 濃度は性成熟過程で増加することが示され、INSL3 はホルモンであることが明らかにされた (Büllesbach E et al, Endocrine, 1999; Reproduction, 2001)。血中 INSL3 濃度は、テストステロンとは異なり、時間単位での変動がみられないため、1 時点の血液検査で精巣の内分泌機能を正確に把握することができるとされている (Ivell R et al, Human Reprod Update, 2009)。また、妊婦の羊水中の INSL3 濃度は、男児では高値を示すが、女児では検出限界以下の低値を示すことが報告されている (Anand-Ivell et al, Human Reprod, 2008)。さらに、多嚢胞性卵巣患者の血中 INSL3 濃度は健常者に比較して高値を示すことが示唆されている (Gambineri A et al, J Clin Endoc Metab, 2007)。しかし、産業動物や伴侶動物では INSL3 の測定法が開発されておらず、その血中動態はごく最近まで全く不明であった。

応募者らは、世界で初めて、ウシの血中 INSL3 の酵素免疫測定法およびイヌの時間分解蛍光免疫測定法を確立し、雄ウシの出生から性成熟後までの血中 INSL3 動態、ならびに雄イヌの性成熟前後の動態と潜在精巣例の濃度を明らかにした (Kawate N et al, Theriogenology, 2011; Pathirana I et al, Theriogenology, 2012)。これらの研究成果から、雄ウシとイヌの性成熟前後における血中 INSL3 動態は、同じ間質細胞から分泌されるテストステロンの動態とは異なることが判明した。さらに両側性潜在精巣犬の血中 INSL3 濃度は正常犬に比べて低いが、去勢犬よりは高いことが明らかになった。しかし、精液性状不良や卵巣嚢腫などの繁殖障害牛の血中 INSL3 濃度を調べた報告、ならびに妊娠牛の母体血中と尿中の INSL3 濃度による胎子雌雄判別に関する報告は皆無である。したがって、それらの研究を行うことにより、ウシの繁殖障害の検査・診断や胎子雌雄判別における新しい方法を開発できる可能性がある。

INSL3 の受容体は、リラキシンファミリーペプチド受容体 2 (RXFP2) もしくはロイシンリッチリピート含 GPC 受容体 8 (LGR8) と呼ばれ、成熟雄では精巣の間質細胞、精子細胞や精巣上体、成熟雌では子宮内膜や子宮筋に存在することがげっ歯類で報告されている (Filonzi M et al, Reprod Biol Endocrinol, 2007; Li Z et al, Endocrinology, 2011)。しかし、伴侶動物や産業動物の生殖器における RXFP2 の発現に関する報告は極めて乏しく、正常なイヌの性成熟や発情周期に伴う同受容体量の変化、ならびにイヌの潜在精巣や子宮蓄膿症などの生殖器疾患例における同受容体発現については全く不明である。

2. 研究の目的

本研究では、1)ウシ血中 INSL3 測定による繁殖障害・生殖器疾患 (精液性状不良・卵巣嚢腫) の検査・診断および妊娠牛の母体血中・尿中 INSL3 測定による胎子雌雄判別への臨床応用について検討する。また、2)正常なイヌの生殖器における INSL3 - 同受容体システムの意義を調べるとともに、生殖器疾患 (潜在精巣・子宮蓄膿症) の病態発生における同システムの関与を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 精液性状不良牛および卵巣嚢腫牛の血中 INSL3 濃度解析

精液性状不良牛と正常雄ウシの血中 INSL3 濃度の比較

黒毛和種雄ウシの性成熟期 (9 ヶ月齢) から性成熟後 (22 ヶ月齢) まで約 1 ヶ月間隔で血液採取を行った。12 ヶ月齢からは精液を採取して検査を行い、精液性状が正常あるいは不良 (新鮮精液の精子の奇形と運動性低下、凍結融解後の精子運動性低下と低受胎を含む) を判別した。血漿 INSL3 およびテストステロン濃度を酵素免疫測定法で測定し、精液性状不良例と正常例のホルモン動態を比較した。

卵巣嚢腫牛と正常雌ウシの血中 INSL3 濃度の比較

ホルスタイン種乳牛の卵巣嚢腫牛および正常牛を用いた。卵巣嚢腫は 1 ~ 2 週間間隔で 2 回の直腸検査により、直径が 25 mm 以上の嚢腫卵胞を有し、黄体の存在しないウシを本疾患と診断した。卵巣嚢腫牛は、その血漿中プロゲステロン濃度から卵巣嚢腫牛 (<0.5 ng/mL) と黄体嚢腫 (嚢腫様黄体を含む) 牛 (>0.5 ng/mL) に分類した。卵巣嚢腫牛は 2 回目の直腸検査時に採血し、正常牛は定時人工授精 (Ovsynch+CIDR 法) 前日の卵胞期と人工授精後 7 日目の黄体期から採取した。血漿 INSL3 濃度を酵素免疫測定法で測定し、卵巣嚢腫牛と卵胞期の正常牛、また

黄体嚢腫牛と黄体期の正常牛をそれぞれ比較した。

(2) 妊娠牛の母体の INSL3 測定による胎子雌雄判別の検討

ホルスタイン種および黒毛和種牛の妊娠 2 ヶ月から 8 ヶ月まで、月 1 回の頻度で血液の採取を行った。また、ホルスタイン種の妊娠 4 ヶ月から 8 ヶ月まで、月 1 回の頻度で尿の採取を行った。胎子の性別は分娩直後に判定した。採取した血漿のテストステロン濃度および INSL3 濃度、尿のテストステロン濃度を酵素免疫測定法により測定し、雌雄胎子間で比較した。雌雄判別のために、雌雄胎子間で有意差がみられた妊娠月数において ROC 曲線分析を用いてホルモン濃度の基準値を設け、胎子の雌雄判別の的中率および検出率を算出した。

(3) 正常犬と潜在精巣犬の精巣・精巣上体の INSL3 - 同受容体システムの発現解析

性成熟期 (6 ヶ月~12 ヶ月齢)、性成熟後 (1 才~5 才齢) および中年期 (5 才~10 才齢) の小型犬から精巣を採取した。精巣・精巣上体の INSL3 と RXFP2 の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法で測定する。また INSL3 量を酵素免疫測定法で測定するとともに、産生細胞を同定するため、免疫組織化学法を行った。

(4) 正常犬と子宮蓄膿症犬の卵巣・子宮内 INSL3 - 同受容体システムの発現解析

正常な雌イヌから卵巣・子宮を採取し、臨床所見、卵巣の肉眼的形態とプロジェステロン含量、子宮の組織所見等から、無発情期と黄体期を判定した。採取した卵巣・子宮の INSL3 と RXFP2 の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。また INSL3 量を酵素免疫測定法で測定した。また、INSL3 と RXFP2 の発現細胞を同定するため、免疫組織化学法および *In situ* hybridization 法を行った。それらの結果を無発情期と黄体期で比較した。また、子宮蓄膿症犬の卵巣・子宮も採取し、上記の解析を行って、正常例の無発情期・黄体期と比較した。

(5) 性成熟後の精巣ホルモン分泌における INSL3 の役割の解明

ヤギの静脈内にカテーテルを留置し、15 分間隔の 2 時間の頻回血液採取を行った。頻回血液採取開始から 2 時間後にヤギの精巣内に INSL3 拮抗剤を投与した。投与後 6 時間は 15 分間隔の頻回血液採取を行った。その後 7 日間は 1 日 1 回の血液採取を行った。血漿中テストステロン濃度を EIA 法で測定した。

4. 研究成果

(1) 精液性状不良牛および卵巣嚢腫牛の血中 INSL3 濃度解析

精液性状不良牛と正常雄ウシの血中 INSL3 濃度の比較

血中 INSL3 およびテストステロン濃度のデータを解析した結果、黒毛和種雄ウシの血中 INSL3 濃度は性成熟期から性成熟後にかけて増加するが、テストステロン濃度は顕著に増加しないことがわかった。一方、精液性状が不良 (精子奇形や凍結融解後異常) であった雄ウシの血中 INSL3 およびテストステロン濃度は、同時期の正常な雄ウシにくらべて、顕著な異常はみられないことがわかった。なお、今回の結果では精液性状不良牛の例数が少ないため、本研究は例数を増やして今後も検討を続ける必要があると考えている。

卵巣嚢腫牛と正常雌ウシの血中 INSL3 濃度の比較

血漿 INSL3 濃度を酵素免疫測定法で測定し、卵巣嚢腫牛と卵巣期の正常牛、また黄体嚢腫牛と黄体期の正常牛をそれぞれ比較した結果、卵巣嚢腫および黄体嚢腫の血中 INSL3 濃度に異常はみられないことが判明した。

(2) 妊娠牛の母体の INSL3 測定による胎子雌雄判別の検討

ホルスタイン種妊娠牛の各妊娠月数における血漿テストステロン濃度の胎子雌雄差については、4、5、7、8 ヶ月において、雄受胎牛のそれは雌受胎牛に比べて有意に高い値を示した。テストステロン濃度による胎子雌雄判別の的中率は、妊娠 5 ヶ月 (77~79%) と 7 ヶ月 (79~80%) で高かった。血漿 INSL3 濃度については、妊娠 2 ヶ月と 6 ヶ月において、雄受胎牛の INSL3 濃度は、雌受胎牛のそれに比べて有意に高い値を示した。INSL3 濃度による胎子雌雄判別の的中率は妊娠 6 ヶ月が高かった (71%)。尿中テストステロン濃度は、胎子の雌雄間で顕著な差はみられなかった。

黒毛和種妊娠牛の各妊娠月数における血漿テストステロン濃度の胎子雌雄差については、妊娠 4、5、6、8 ヶ月の雄受胎牛の同濃度は、雌受胎牛に比べて、有意に高い値を示した。テストステロン濃度による胎子雌雄判別の的中率は妊娠 5 ヶ月 (77~82%)、6 ヶ月 (75~76%) および 8 ヶ月 (75~89%) で高い値を示した。血漿 INSL3 濃度については、妊娠 4~8 ヶ月の雄受胎牛の INSL3 濃度は、雌受胎牛のそれに比べて有意に高い値を示した。INSL3 濃度による胎子雌雄判別の的中率は妊娠 8 ヶ月で最も高かった (67%~79%)。

妊娠中期・後期のテストステロンと INSL3 濃度

ホルスタイン種および黒毛和種牛の妊娠中期 (4~6 ヶ月)・後期 (7・8 ヶ月) の複数時点の血中テストステロンと INSL3 濃度のデータを組み合わせることによって、ホルスタイン種では 89.3%、黒毛和種牛では 88.0% の的中率となった。

以上の成績から、雄胎子を受胎したホルスタイン種および黒毛和種牛の妊娠中期・後期の母体血中テストステロンと INSL3 濃度は雌胎子受胎牛のそれらよりも高いことが判明した。妊娠中期牛の1時点の血中テストステロン濃度による雌雄判別の的中率は約80%であった。さらに妊娠中期・後期の複数時点の母体血中テストステロンと INSL3 濃度を組み合わせると、その的中率は90%程度に上昇した。

(3) 正常犬と潜在精巣犬の精巣の INSL3 - 同受容体システムの発現解析

正常な小型雄犬の精巣内 INSL3 の mRNA 濃度は性成熟期(6~12 ヶ月齢)から性成熟後(1~5 歳齢)に、さらに壮齢期(5~10 歳齢)にかけて有意に減少した。INSL3 受容体の RXFP2 の mRNA 濃度は性成熟期から性成熟後にかけて有意に増加した。

潜在精巣犬の停留精巣の INSL3 の mRNA 濃度は正常犬の正常精巣よりも有意に高かった。しかし、停留精巣の精巣重量は正常精巣よりも有意に低いため(約 1/5)、停留精巣の精巣1個当たりの総 INSL3 mRNA 量および総 INSL3 ペプチド量は、正常精巣に比べて有意に低い値を示した。停留精巣の RXFP2 の mRNA 濃度および総 mRNA 量はほとんど存在しないレベルであり、正常精巣よりも極めて低い値を示した。

INSL3 の免疫染色を行った結果、正常精巣および停留精巣ともに精巣間質(ライディッヒ)細胞にのみ発現がみられた。

上述したように、潜在精巣犬の停留精巣の INSL3 mRNA 濃度は高く、INSL3 ペプチドの免疫染色は明瞭であることから、停留精巣のライディッヒ細胞は十分量の INSL3 を発現しているが、停留精巣容積が小さいために、精巣1個当たりでは産生量は少なくなることが示唆された。INSL3 受容体の RXFP2 の遺伝子は、潜在精巣犬の陰嚢内精巣では正常に発現しているが、停留精巣では消失していることが判明した。

(4) 正常犬と子宮蓄膿症犬の卵巣・子宮内 INSL3 - 同受容体システムの発現解析

正常犬の黄体期の卵巣 INSL3 の mRNA 濃度は、非黄体期のそれよりも有意に高い値を示した。子宮蓄膿症罹患犬の卵巣 INSL3 の mRNA 濃度は正常犬の黄体期と同程度の値を示したが、非黄体期のそれよりも有意に高い値を示した。正常犬および子宮蓄膿症犬の卵巣と子宮の RXFP2 の mRNA 濃度は各群間で有意な差はみられなかった。*In situ* hybridization により卵巣の黄体や卵胞、子宮の腺上皮と内膜上皮および子宮筋層に RXFP2 の mRNA の発現がみられた。

(5) 性成熟後の精巣ホルモン分泌における INSL3 の役割の解明

精巣機能における INSL3 の役割を解明す

るため、INSL3 の拮抗剤を雄シバヤギの精巣内に投与し、血中テストステロン濃度に及ぼす影響を調べたが、血中濃度の顕著な減少はみられなかった。したがって、今回の実験においては、INSL3 の精巣テストステロン分泌における役割を解明することはできなかった。

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)

Hannan MA, Kawate N, Fukami Y, Pathirana IN, Büllesbach EE, Inaba T, Tamada H.

Acute regulation of plasma insulin-like peptide 3 concentrations by luteinizing hormone in male goats. *Theriogenology*. 2016. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.02.028. 査読有

Hannan MA, Fukami Y, Kawate N, Sakase M, Fukushima M, Pathirana IN, Büllesbach EE, Inaba T, Tamada H. Plasma insulin-like peptide 3 concentrations are acutely regulated by luteinizing hormone in pubertal Japanese Black beef bulls. *Theriogenology*. 2015;84:1530-5. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.039. 査読有

Hannan MA, Kawate N, Kubo Y, Pathirana IN, Büllesbach EE, Hatoya S, Inaba T, Takahashi M, Tamada H. Expression analyses of insulin-like peptide 3, RXFP2, LH receptor, and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in testes of normal and cryptorchid dogs. *Theriogenology*. 2015;84:1176-84. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.06.021. 査読有

[学会発表](計4件)

Kawate N, Hannan MA, Fukami Y, Weerakoon WWP, Büllesbach EE, Inaba T, Tamada H.

Effects of long-acting GnRH antagonist on plasma insulin-like peptide 3 and testosterone concentrations and scrotal circumference in male goats. The 18th International Conference on Animal Reproduction. PS-18. June 26-30th, 2016. Centre international des congress Le Vinci a Tours, France.

Hannan MA, Kawate N, Fukami Y, Weerakoon WWP, Büllesbach EE, Inaba T, Tamada H.

Acute regulation of plasma insulin-like peptide 3 concentrations by luteinizing hormone in male goats. The 18th

International Conference on Animal Reproduction. PS-17. June 26-30th, 2016. Centre international des congress Le Vinci a Tours, France.

Hannan MA, Fukami Y, Kawate N, Sakase M, Fukushima M, Pathirana IN, Büllesbach EE, Inaba T, Tamada H. Acute regulation of insulin-like peptide 3 secretion in peripheral blood by LH in pubertal Japanese Black beef bulls. 第108回日本生物繁殖学会 2015年9月18日. OR2-8. 宮崎大学 宮崎市.

Hannan MA, Kubo Y, Pathirana IN, Büllesbach EE, Takahashi M, Tamada H, Hatoya S, Inaba T, Kawate N. Expression analyses of insulin-like peptide 3 and its receptor, RXFP2, in testes of normal and cryptorchid dogs. The 12th International Symposium on Spermatology and the 9th Biennial Conference of AAAA 2014. PS-8. August 9 and 10th, 2014. Newcastle City Hall, Australia.

〔図書〕(計1件)

川手憲俊 近代出版 牛病学第三版(明石博臣他編). III 繁殖. 分娩と新生子. A 分娩機序, B 分娩経過. 448頁(100-102). 2013年10月 ISBN978-4-87402-196-5.

〔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.vet.osakafu-u.ac.jp/reprod/research/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

川手 憲俊 (KAWATE NORITOSHI)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：80221901

(2)研究分担者

高橋 正弘 (TAKAHASHI MASAHIRO)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号：50582334

玉田 尋通 (TAMADA HIROMICHI)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：10155252

稲葉 俊夫 (INABA TOSHIO)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：00137241