

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450460

研究課題名(和文) 卵丘卵子複合体における糖質コルチコイドの生理的役割の解明

研究課題名(英文) Study in physiological roles of glucocorticoid in bovine cumulus oocyte complex

研究代表者

手塚 雅文(Tetsuka, Masafumi)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：40311526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では強力な抗炎症物質である糖質コルチコイド(Glc)に注目し、炎症様反応である排卵前後のウシ卵丘卵母細胞複合体(COC)におけるGlc代謝とその調節機序について検証した。その結果、ウシCOCでは、1) Glc活性型酵素HSD11B1と非活性型酵素HSD11B2が発現しており、排卵・受精に向けて局所のGlcレベルを上昇させる機構が稼働すること、2) COC由来局所因子によってこの機構が増強されること、3) Glcとクロストークする可能性がある自然免疫系が存在すること、などが明らかになった。以上のことから排卵・受精前後のウシCOCではGlcが重要な役割を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ovulation is known as an inflammatory reaction and many inflammatory factors are associated with the event. In the present study, we have focused on anti-inflammatory glucocorticoid (Glc) and its regulatory system in the bovine cumulus oocyte complex (COC) undergoing ovulation and fertilization. We demonstrated that, 1) bovine cumulus expresses HSD11B1, which activates Glc while oocyte expresses HSD11B2, which inactivates Glc, and the net Glc metabolism shifted from inactivation to activation as the ovulatory process progresses, 2) HSD11B1 expression is modulated by autocrine/paracrine factors derived from cumulus and oocyte, and 3) bovine COC expresses receptors for innate immunity that may play physiological roles in fertilization, and locally produced Glc may attenuate this system. These results suggest that Glc may play important physiological roles in the processes of ovulation and fertilization in cattle.

研究分野：生殖生理学、家畜繁殖学、分子内分泌学

キーワード：排卵 糖質コルチコイド 卵丘卵母細胞複合体 卵丘細胞 卵母細胞 受精 自然免疫系 炎症反応

1. 研究開始当初の背景

排卵に伴う卵胞破裂とその後の黄体形成は組織の破壊と再生であり、多くの炎症性因子が関与する局所的炎症様反応であることが知られている¹⁾。一方卵子では排卵に向かって核や細胞質の成熟が進行するが、この過程にも多くの炎症関連因子が関わっていることが明らかにされている²⁾。最近では精液が子宮で炎症反応を引き起こすことや、精子の卵丘卵子複合体(COC)への侵入が自然免疫系を賦活化することが報告されており、排卵から受精、胚発生に至る一連の現象に免疫系が重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある³⁾。このように排卵前後の卵子や精子は様々な炎症関連因子の存在下で受精し、発生していかねばならないが、炎症から卵子を守るメカニズムについてはほとんど知見がなかった。糖質コルチコイド(Glc)が強力な抗炎症性物質であることは良く知られている。Glcは副腎皮質で生産され、各器官で必要に応じて活性化/非活性化されるが、この過程は2つのGlc代謝酵素、HSD11B1、およびHSD11B2によって仲介される。HSD11B1は主に活性型酵素として働き、コルチゾンをコルチゾールに変換する事で標的細胞におけるGlc活性を高める。一方HSD11B2は非活性型酵素として働くことで細胞が過剰のコルチゾールにさらされることを防ぐと考えられている。私たちはヒトやラット、ウシの卵巣でこれらのHSD11Bが発現していること、その発現がLHサージを境に非活性型から活性型へと劇的にシフトすることを発見した^{4,5)}。さらに排卵前のCOCで同様なGlc代謝が起きていることを見出し、排卵時にGlcが抗炎症性物質として働くことで卵子を炎症反応から守っているのではないかと仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では排卵前後から受精に至るまでのウシCOCにおけるGlc代謝調節機構について、1)卵丘細胞と卵母細胞における2つのHSD11Bの発現と活性の経時的変化、2)性腺刺激ホルモンやCOC由来のパラクリン、オートクリン因子によるこれらの酵素の発現調節、3)精子侵入によってCOCで誘起される一連の自然免疫反応との関連性、および4)Glcと、それとクロストークすることが知られている鉱質コルチコイドの受容体とその機能について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験はウシ体外成熟-体外受精系(IVM-IVF)をベースに行い、以下の手法を用いて解析を行った。

(1)ウシCOCにおけるGlc代謝の検証：トリチウムで標識されたGlc(コルチゾール、コルチゾン、デキサメサゾン)を用い、培養期間中の変換率から活性型HSD11B1(還元酵素)

と非活性型HSD11B2(酸化酵素)の活性を求めた。

(2)mRNA発現の定量：COCもしくは分離した卵丘細胞と卵母細胞からtotalRNAを抽出し、cDNAを作成、リアルタイムqPCRにより目的とする遺伝子の発現量を定量した。

(3)酵素・受容体の局在確認：蛍光免疫染色により卵丘細胞と卵母細胞における目的とするタンパクの局在を確認した。

(4)ホルモン測定：EIA法により培養液中のホルモン測定を行った。

4. 研究成果

(1)ウシCOCにおけるGlc代謝酵素の局在と発現・活性の経時的変化：

ウシCOCでは卵子の成熟に伴い、活性型HSD11B1の活性が高まった。一方、非活性型HSD11B2の活性は成熟期間を通して変化は無く、常に一定の活性が観察された。この結果、COC全体のGlc代謝は成熟培養の進行に伴い、非活性化から活性化へとシフトした(図1)。

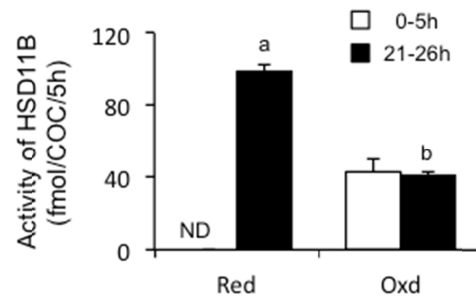


図1. 成熟培養(IVM)に伴うウシ卵丘卵母細胞複合体におけるGlc代謝の変化。IVMの初期には認められなかった活性型還元反応(Red)がIVM終了後に高まっている。一方、非活性型酸化反応(Oxd)は一定に保たれていた。

mRNAの発現解析、蛍光免疫染色、および分離した細胞のGlc代謝実験によりHSD11B1が卵丘細胞で、HSD11B2が卵母細胞でそれぞれ発現していることが明らかになった(図2)。

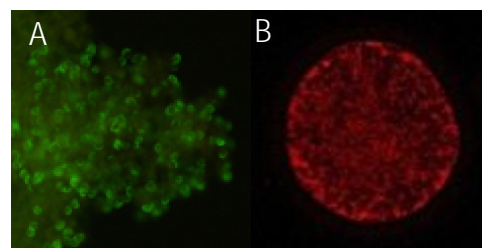


図2. 蛍光免疫染色によるウシ卵丘細胞のHSD11B1(A)および卵母細胞のHSD11B2(B)の局在。HSD11B1は卵丘細胞の細胞質で発現が認められた。一方HSD11B2は卵母細胞の細胞膜近傍(小胞体だと思われる)で強いシグナルが認められた。

HSD11B1 の活性は卵丘膨化と関連しており、膨化率が高い卵丘ほど強い活性が認められた。

受精に伴い卵丘細胞の *HSD11B1* 発現はさらに増加したが、先体反応によって卵丘の構造が破壊されると酵素活性は弱まった。

以上のことからウシ卵丘細胞では排卵・受精に向けて Glc の局所レベルを上昇させるメカニズムが存在することが明らかになった。一方、卵母細胞では成熟から受精まで非活性型酵素の活性が維持されており、COC を構成する細胞間で Glc 代謝が複雑に調節されていることが明らかとなった。

(2) COC 局所因子による Glc 代謝酵素の発現調節：COC 局所の Glc 環境が主に *HSD11B1* によって調節されていることを受け、COC 由来のパラクリン/オートクリン因子が *HSD11B1* の発現に与える影響を調べた。

FSH によって COC では Glc の活性化とともにプロゲステロン(P4)の合成が亢進する。P4 の合成を阻害、もしくは P4 受容体をブロックすると *HSD11B1* の発現が低下した。P4 合成阻害による影響は合成ジェスタージェン(NA)の同時処置によって無効になったことから FSH による *HSD11B1* 発現の上昇には P4 の仲介が必要であることがわかった。一方で活性型 Glc であるコルチゾルにはこのような効果は認められなかった(図3)。

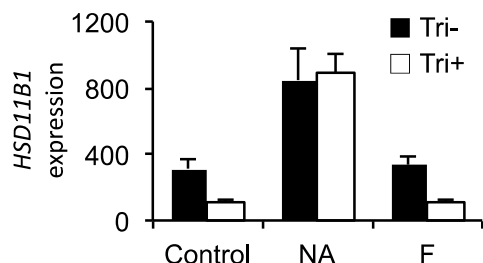


図3 . 成熟培養 (IVM) されたウシ卵丘卵母細胞複合体における *HSD11B1* mRNA 発現 . P4 合成阻害剤トリロスタン (Tri) の添加により減少した発現が合成ジェスタージェン、ノメゲステロール (NA) の添加により回復、さらに増加した。一方、コルチゾル (F) による効果は認められなかった。

(3) ウシ COC における自然免疫系の存在とその機能：上述したように自然免疫系が排卵や受精に関与していること^{1,2)}、および Glc が自然免疫系の調節に関与していること⁶⁾から、ウシ COC における自然免疫系受容体、TLR2 および TLR4 の発現とその機能について調べた。

成熟過程にあるウシ卵母細胞でヒアルロン酸断片をリガンドとしてサイトカインの発現を誘導する TLR2 が高いレベルで発現していることが明らかになった。また卵丘細胞でも低レベルの TLR2 発現が確認された(図4)。また低いレベルではあるが、*TLR4* の発現が両方の細胞で認められた。

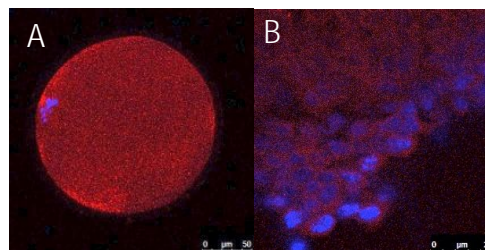


図4 . 蛍光免疫染色によるウシ卵母細胞(A)および卵丘細胞(B)の TLR2 発現 . 卵母細胞、卵丘細胞共に細胞膜でより強いシグナルが認められた。

COC の IVF やヒアルロニダーゼ処置により卵母細胞のサイトカイン (IL-6) の mRNA 発現が増加することが認められた。さらにヒアルロン酸断片による裸化卵母細胞の処置により同様な *IL6* 発現の増加が認められた(図5)。この発現の上昇は TLR2 の抗体による処理で阻害され、さらに転写阻害剤アマニチンによって減少した。

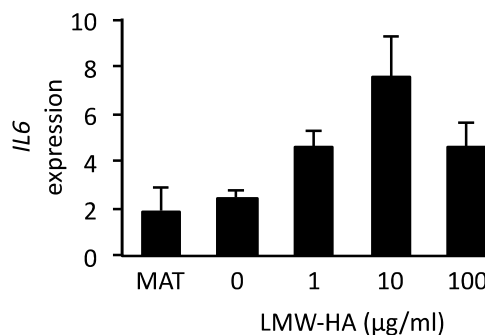


図5 . ヒアルロン酸断片 (LMW-HA) によるウシ卵母細胞の *IL6* 発現誘起 .

TLR4 のリガンドであるリポ多糖による処置を行ったところ、ヒアルロン酸断片とは異なり、卵丘細胞で *TLR2*、*IL6R*、*RANTES* などの炎症関連因子の発現に影響を与えたが、卵母細胞での効果は認められなかった。

以上のことから、ウシ卵母細胞では受精時に発生するヒアルロン酸断片が TLR2 を介して、*IL6* の転写を引き起こすことが示唆された。しかしこの時期の卵母細胞では転写はほとんど起きないと考えられており、また *IL6* の発現レベルが非常に低いこと、*IL6* タンパクが確認できていないことから、さらなる確認実験が必要であると考えられる。

(4) ウシ COC における Glc 受容体 (GR) および鉍質コルチコイド受容体 (MR) の発現：

ウシ COC では低レベルの *GR* mRNA 発現が認められたが、機能的な受容体の存在については本研究では明らかにできなかった。ウシ卵丘細胞では Glc によって調節されることが知られているプロスタグランジン合成酵素 (PLA2、COX2) や *IL1*、P4 合成酵素 (CYP11A1、

HSD3B1)が発現しているが、生理的濃度から薬理的濃度のGlcはこれらの因子の発現やP4合成に影響は与えなかった。ウシ卵母細胞では高いMRの発現が確認された。上述したようにウシ卵母細胞ではHSD11B2が発現しており、MRに対して交差反応を示すGlcによってMRが過剰に活性化されないように防御している可能性が示唆された。

(5)結論：本研究では排卵・受精時のウシCOCでは外側の卵丘細胞ではGlcを活性化すのに対し、卵母細胞ではGlcを非活性化することが明らかになった。COCにおけるGlcレベルは卵丘細胞のHSD11B1によって主に調節されており、性腺刺激ホルモンやCOC局所で生産されるP4やGDF9などのオートクリン・パラクリン因子によって制御されることが示された。局所的なGlcの活性化の生理的な意義については本研究では明らかにできなかったが、少なくともCOCの主要な機能には影響を与えないことが示された。COC周辺のGlc濃度を高めることによって排卵、受精時に近傍に存在する免疫細胞などから卵母細胞や精子を守る働きがある可能性が考えられる。今後免疫細胞を用いた研究が必要である。一方でウシ卵母細胞はMRを発現しており、Glc非活性化酵素HSD11B2の存在と合わせて、卵母細胞が典型的な鉱質コルチコイド標的細胞の特徴を備えていることが明らかになった。また本研究では受精時にTLR2を介した自然免疫系の活性が起こることが示唆された。自然免疫系とGlcとの関連については本研究では明らかにできなかったが、解明に向けての研究に着手したところである。以上のことから排卵・受精時のウシCOCではコルチコステロイドの系を含める複数の炎症・免疫関連系が機能していることが示唆された。卵巣レベルでのコルチコステロイドの役割についてはほとんど研究が行われておらず、今後さらなる研究が必要であると考える。

参考文献

1. Richards JS *et al.* 2002 Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu Rev Physiol* 64 69-92.
2. Shimada M *et al.* 2008 Hyaluronan fragments generated by sperm-secreted hyaluronidase stimulate cytokine/chemokine production via the TLR2 and TLR4 pathway in cumulus cells of ovulated COCs, which may enhance fertilization. *Development* 135 2001-2011.
3. Field SL *et al.* 2013 Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation. *Mol Reprod Dev* 81 284-314.
4. Tetsuka M 2007 Actions of

glucocorticoid and their regulatory mechanisms in the ovary. *Anim Sci J* 78 112-120.

5. Tetsuka M *et al.* 2010 Gene expression of 11 β -HSD and glucocorticoid receptor in the bovine (*Bos taurus*) follicle during follicular maturation and atresia: The role of follicular stimulating hormone. *J Reprod Dev* 56 616-622.
6. Chinenov Y, Rogatsky I 2007 Glucocorticoids and the innate immune system: crosstalk with the toll-like receptor signaling network. *Mol Cell Endocrinol* 275 30-42.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Tetsuka M, Takagi R, Ambo N, Myat TS, Zempo Y, Onuma A, Glucocorticoid metabolism in the bovine cumulus-oocyte complex matured in vitro. *Reproduction*, 査読あり, Vol.151,1,2016,pp.73-82. doi: 10.1530/REP-15-0363.

〔学会発表〕(計4件)

1. 高木諒, 安保信周, 手塚雅文, ウシ卵子・卵丘細胞の受精時におけるToII様受容体の発現と機能, 日本繁殖生物学会大会第108回大会, 2015年9月16日, 宮崎大学(宮崎県, 宮崎市).
2. 安保信周, 高木諒, 手塚雅文, プロジェステロンによる成熟時ウシ卵丘卵母細胞複合体のC21ステロイド産生調節, 日本繁殖生物学会大会第108回大会, 2015年9月16日, 宮崎大学(宮崎県, 宮崎市).
3. Tetsuka M, Takagi R, Ambo N, Zempo Y, Onuma A, Glucocorticoid metabolism in bovine cumulus-oocyte complex during in vitro maturation, World Congress of Reproductive Biology, 2014, September 4, 2014, Edinburgh (UK).
4. 手塚雅文, 安保信周, 高木諒, 受精時のウシ卵丘卵母細胞複合体における糖質コルチコイド代謝, 日本繁殖生物学会大会第107回大会, 2014年8月20日, 帯広畜産大学(帯広市, 北海道).

6. 研究組織

(1)研究代表者

手塚 雅文 (TETSUKA Masafumi)
国立大学法人帯広畜産大学
畜産生命科学研究部門・教授
研究者番号: 40311526