

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24年6月10日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究（C）（一般）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580357

研究課題名（和文）排卵時卵胞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）Investigation for physiological roles of glucocorticoid in the periovulatory follicle.

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

研究成果の概要（和文）：

排卵は炎症様反応であり、排卵時の卵子は炎症関連物質の影響を受けることが予測される。本研究ではウシ卵丘卵胞複合体（COC）における抗炎症性糖質コルチコイド（G）と代表的な炎症性サイトカインである IL-1 の作用とその調節機構を調べた。ウシ COC では G を活性化／非活性化する酵素の発現と活性、および IL-1 の発現と作用が認められた。以上のことから排卵時のウシ COC では IL-1 と G が細胞機能を複雑に調節していることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Ovulation in mammal is an inflammatory reaction and the oocyte undergoes this process is likely to be influenced by various inflammatory factors. In this study we investigated the presence and action of enzymes that catalyze anti-inflammatory glucocorticoid (G) and inflammatory cytokine IL-1 in the bovine cumulus-oocyte complex (COC). Expression and action of enzymes that activate/inactivate G as well as IL-1 and its functional receptor are demonstrated in COC. These results suggest that G and IL-1 act together to regulate functions of periovulatory bovine COC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：排卵、炎症、糖質コルチコイド、サイトカイン、卵母細胞

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の卵巣では LH の急激な高まりにより排卵が誘起される。LH-surge から排卵まではウシで約1日かかるが、その間に1) 卵胞破裂に向けた卵胞壁の変化、そして2) 受精に向けた卵母細胞の成熟が同時に進行す

る。排卵過程は生理的な炎症過程として捉えられ、多くの研究が行われてきた。しかしそのほとんどが卵母細胞には触れておらず、卵胞壁の変化のみを取り上げている。一方、卵母細胞の減数分裂再開と細胞質成熟、そして卵母細胞を取り囲む卵丘細胞の膨化は、様々

な種で精力的に研究されてきた。しかしこれらの研究は本来ならば同時に進行するはずの炎症反応とは全く切り離して行われてきた。近年炎症関連物質が卵母細胞の成熟や卵丘膨化にも関わっている事が報告されているが、排卵時の卵胞で卵母細胞がどのように炎症反応と関わっているのかについては知見がない。

一見相反する2つの事象が進化の過程で選抜され、次の世代を生み出すための最も根本的なシステムの一つとして哺乳動物の生殖生理に組み込まれた事を考えると、両者の間に密接な相補関係があることが予測される。しかし両者の関連性についてはほとんど解明されていない。

糖質コルチコイドとその類縁物質は抗炎症物質として広範に使用されている。糖質コルチコイド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。この過程は2つの糖質コルチコイド代謝酵素、11 β -HSD type1 (11HSD1) および 11 β -HSD type 2 (11HSD2) によって仲介される。11HSD1 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糖質コルチコイド活性を高める。一方 11HSD2 は非活性型酵素として働く。標的組織におけるコルチゾールレベルはこの2つの酵素の比活性によって決定される。標的組織でコルチゾールは糖質コルチコイドレセプター (GR) に結合し標的遺伝子の転写を調節するほか、他の転写調節因子 (e. g., AP-1) に結合する事で炎症メディエーターであるサイトカインやプロスタグランジンの生産、作用を抑制する事で抗炎症効果を発揮する。

近年 LH-surge 後、排卵卵胞の卵胞液中コルチゾール濃度が一時的に高まる事が実験動物や家畜、ヒトで報告されている。私たちはヒトとラットの成熟卵胞で LH-surge/hCG 注射後 11HSD1 の発現が急激に高まる事を見いだした。更に 11HSD1 の発現が排卵に関与するサイトカインによって増加する事から排卵時の卵胞には行過ぎた炎症を防ぐシステムが存在する可能性を示唆した。更にウシ排卵前卵胞でコルチゾール濃度が上昇すること、ウシ卵母細胞の成熟に伴い卵丘細胞での 11HSD1 発現が 1,000-10,000 倍増加する事を見いだした。これらの結果から排卵に向かう卵丘卵母細胞複合体では糖質コルチコイドシステムが活性化される事、そして糖質コルチコイドが排卵時の卵胞で何らかの生理的役割を担っている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

これまでの結果から私たちは排卵時の卵丘卵母細胞複合体には糖質コルチコイドによって仲介される、卵母細胞を炎症から守るシステムがあるのではないかと考えた。このシステムは今まで別々に研究されてきた2つの現象、卵胞破裂=炎症と卵母細胞の成熟を結ぶ接点となるかもしれない。本研究の目的は排卵に関する従来知識の枠組みに糖質コルチコイドによって仲介されるシステムを組み込む事である。本研究から得られる知見は家畜繁殖だけではなくヒトの生殖医療や様々な動物の体外受精技術の向上に寄与する事が期待される。

3. 研究の方法

- (1) 卵母細胞の体外成熟培養 (IVM) : 食肉処理場由来の卵巣から卵丘卵母細胞複合体 (COC) を採取し、既知成分を含む培養液 (mSOF) で 21-24h 培養した。IVM 培地中にホルモンや炎症関連物質、阻害物質を加え、卵母細胞の核成熟率、COC のステロイドや糖代謝・合成能、遺伝子の発現などを以下の方法を用いて解析した。
- (2) 遺伝子発現量の測定 : 培養終了後 COC を卵母細胞と卵丘細胞に分け RNA を抽出し cDNA を作成、リアルタイム PCR 法により遺伝子の発現量を定量した。
- (3) ステロイド、乳酸等の測定 : 実験終了後、培地を回収し、培地中のプロジェステロン濃度を EIA 法により、乳酸濃度を比色法によりそれぞれ測定した。
- (4) 糖質コルチコイド代謝能の測定 : IVM 培地に ³H-標識コルチゾン/コルチゾールを加え、21 時間培養した。培養終了後培地からステロイドを抽出し薄層クロマトグラフィで生成物を分離し、糖質コルチコイドの還元 (活性化、コルチゾンからコルチゾール)、および酸化 (非活性化、コルチゾールからコルチゾン) を変換率から求めた。
- (5) 糖質コルチコイド (G) 代謝酵素の局在特定 : 蛍光ラベルされた抗体を用い、共焦点顕微鏡下で各酵素の局在を求めた。
- (6) 体外受精 (IVF) と初期胚の培養 : IVM 後凍結精液を用いて IVF を行い、胎児血清 5% を含む発生培地 (M199) で 8 日まで培養を行った。受精後 2 日目と 8 日目の分割率と発生率を求めた。

実験 1 : COC の成熟に伴う G 代謝酵素、G レセプターの発現動態と、酵素活性の変化を調べた。

実験 2 : COC の成熟に及ぼす G の影響と阻害

物質をもちいて G 代謝酵素の生理的役割を調べた。

実験 3 : COC の成熟に及ぼす IL-1 の影響とその生理的役割を調べた。

実験 4 : IVM 時の IL-1 やそのアンタゴニストがその後の胚発生に与える影響を調べた。

4. 研究成果

- (1) ウシの卵丘卵母細胞複合体 (COC) では性腺刺激ホルモン (FSH) 処置に伴い、糖質コルチコイド (G) を活性化する酵素 (還元型酵素) の活性が高まる。これは卵丘細胞で発現が急激に高まる 11HSD1 によるものである。G は白血球からの炎症性サイトカイン分泌を抑制することが知られており、局所的 G の活性化は COC を炎症からの防御する働きがあると考えられる。
- (2) G 受容体は主に卵子で発現しており、高濃度の G 処置によって卵子成熟が抑制される傾向が認められた。
- (3) 卵子では G の非活性型酵素 (酸化型酵素) 11 β -HSD2 の発現と活性が認められた。阻害剤により 11 β -HSD2 の活性を抑制すると G の卵子成熟抑制効果が高まることから 11 β -HSD2 が卵子を卵丘で合成される G から守っている可能性がある。
- (4) 代表的なサイトカイン IL-1 はウシ卵子の核成熟を誘起するが、卵丘細胞のプロジェステロンやプロスタグランジン合成酵素、11 β -HSD1 の発現には影響を与えない。これは IL-1 受容体が卵子でのみ発現しているためである。
- (5) ウシ卵子では IL-1 α/β 、IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1 RA) の高い発現が見られる。また成熟培地に IL-1 RA を添加すると卵母細胞の核成熟率が低下することから、ウシ COC から IL-1 β が放出され、オートクリン/パラクリン因子として卵母細胞の成熟に関わっている可能性が考えられる。
- (6) 成熟培地中への IL-1 RA に対する抗体の添加は、卵母細胞の核成熟には影響を与えなかったが、4 細胞以降の胚発生率を減少させ、胚盤胞への発生を完全にブロックした。一方、成熟培地への IL-1 RA の添加は胚発生には影響を与えなかった。以上の結果から、ウシ COC では IL-1 RA が合成されており、初期胚の発生過程に影響を与えることが示された。

以上のことからウシ COC では G システムが存在しており、局所の G 濃度を合目的に調節することで COC を炎症反応や高濃度の G から

防御していること、および IL-1 のリガンド、機能的レセプター、レセプターアンタゴニストからなる IL-1 システムがウシ COC に存在し卵母細胞の成熟だけではなく、胚発生にまで影響を与える可能性が示された。

これらの結果はウシ COC で機能的な炎症性糖質コルチコイドシステムと炎症性 IL-1 システムが排卵前後に同時に活性化されていることを示した初めてのデータである。特に卵巣局所における糖質コルチコイドの作用とその調節についての研究は私たちを含めごく少数の研究グループによって行われてきたに過ぎず、本研究の主要課題である排卵時の卵丘卵母細胞複合体における糖質コルチコイドシステムの役割についての研究はほぼ皆無である。卵母細胞の成熟、受精、発生に関与するかも知れない炎症/抗炎症作用の解明は、家畜繁殖だけではなくヒトの生殖医療や様々な動物の繁殖技術の向上に寄与すると思われる。今後両者の相互作用をさらに検証すると共に、他の炎症/抗炎症性物質や免疫細胞、精子などの存在下での両システムの動態とその生理的意義を明らかにしてゆきたい。

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 1 件)

- ① Tetsuka M et al. 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. *Journal of Reproduction and Development*, 査読あり, 56, 2010, 616-622, DOI:10.1262/jrd.10-019K

[学会発表] (計 4 件)

- ① Onuma A, Akasaka K, Tetsuka M, IL-1 β directly acts on bovine oocyte to induce nuclear maturation, 2nd World Congress on Reproductive Biology, 2011 年 10 月 10 日, Cairns Convention Centre, Cairns, Australia.
- ② 小沼あすか, 赤坂清美, 手塚雅文, 成熟培養時のウシ卵丘卵母細胞複合体における IL-1 β の卵子核成熟促進作用, 第 104 回日本繁殖生物学会大会, 2011 年 9 月 15 日, 岩手大学, 盛岡市.
- ③ Tetsuka M, Takeuchi T, Okawara S,

Ota S, Onuma A, Akasaka K, Hamano S, Changes in gene expression and metabolic activity of 11 β -HSD in bovine cumulus-oocyte complex during maturation culture, 14th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, 2010年9月23日, University of Edinburgh, Edinburgh, UK.

- ④ 手塚雅文, 竹内拓勝, 太田慎太郎, 小沼あすか, 赤坂清美, 成熟培養に伴う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の変化, 第103回日本繁殖生物学会大会, 2010年9月4日, 北里大学獣医学部, 十和田市.

[その他]

ホームページ等

帯広畜産大学学術情報リポジトリ

<http://ir.obihiro.ac.jp/dspace/handle/10322/2810>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：