

原 著

ウシ卵胞発育過程における卵胞膜細胞のエンドトキシン受容体の発現動態

堀内 まや・越前谷 陸・宮本 明夫・村山 千明・清水 隆*

帯広畜産大学大学院畜産衛生学専攻動物医科学分野

〒080-8555 北海道帯広市稲田町西2-11

*連絡著者 (Corresponding author) :shimizut@obihiro.ac.jp

Expression of endotoxin receptors in theca cells during follicular development in bovine ovary

Maya HORIUCHI, Riku ECHIZENYA, Chiaki MURAYAMA, Akio MIYAMOTO, Takashi SHIMIZU

Graduate School of Animal and Food Hygiene, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,

2-11, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido, 080-8555, Japan

キーワード：リポポリサッカライド、ペプチドグリカン、卵胞発育、卵胞膜細胞

Key words : Lipopolysaccharide, Peptidoglycan, follicular development, theca cell

Abstract

In cows, postpartum uterine infection due to bacteria that produce lipopolysaccharide (LPS) or peptidoglycan (PGN) leads to ovarian dysfunction. The LPS and PGN, which is a component of gram-negative or gram-positive bacterial walls, respectively, is increased in the plasma of cows with uterine infection. A recent study has reported that there is a relationship between uterine infection, endotoxin production and resumption of postpartum ovarian activity. The aim of this study is to examine the expression of LPS (TLR4 and CD14) and PGN (TLR2 and NOD2) receptors in theca cells that are an important cell for steroid production. Expression of *TLR4*, *CD14* and *NOD2* mRNA in theca cells increased as the follicles grew. *TLR2* mRNA expression in theca cells of EID follicles was high compared with other follicle stages. LH stimulated progesterone production and inhibited the expression of *NOD2* mRNA in cultured theca cells. Our data demonstrated that susceptibility to LPS or PGN in theca cells depends on the follicle developmental stage. Thus, LPS and PGN may be associated with ovarian dysfunction in cow with uterine infection.

要 約

分娩後、子宮への細菌感染によって子宮内膜炎を発症した乳牛では、発情兆候の減退や卵巣機能低下などを引き起こすことが報告されている。感染細菌の細胞壁にはリポポリサッカライド (LPS) およびペプチドグリカン (PGN) が存在し、LPSは子宮内膜炎発症牛の血中および卵胞液中で確認された。このことはLPSが卵巣機能の一つである卵胞発育 (ステロイド産生) に直接的に影響していることを示唆しているが、その詳細な機序については不明である。そこで、本研究では、エストロジェン (E2) 産生の基質であるアンドロジェン (A4) を産生する卵胞膜細胞に着目し、LPSおよびPGNの受容体発現を解析した。LPS受容体であるTLR4およびCD14の遺伝子発現は、卵胞発育に伴って増加した。一方、PGN受容体において、TLR2の遺伝子発現は卵胞発育に伴って減少したが、NOD2の遺伝子発現は増加した。これらの結果は、卵巣は内毒素 (LPS およびPGN) の影響を直接的に受けること、また卵胞発育に特異的に関与する受容体のあることが明らかとなった。

緒 言

分娩後、細菌感染によって引き起こされる子宮疾患や乳房炎は繁殖障害の一つの要因である。特に、子宮内膜炎を発症した乳牛では、発情発現の減退や受胎率

の低下の起こることが知られている。子宮内膜炎は潜在性のものを含めると乳牛の5割以上が罹患していると推察されている[Kasimanickam et al., 2004]。子宮内膜炎を発症した乳牛の繁殖障害を引き起こす原因の一つとして推察されているのが、グラム陰性細菌およびグラム陽性菌から放出される菌体由来成分である。グラム陰性細菌からはリポポリサッカライド(LPS)、グラム陽性菌からはペプチドグリカン(PGN)が融解、放出される。LPSは、その防御機構を誘導することによって、生体内で様々な現象を引き起こし、致死的な疾患を引き起こすこともある内毒素である[Mu et al., 2001]。子宮内膜炎を患った乳牛の末梢血中[Mateus et al., 2003]および卵胞液中[Sheldon et al., 2002]においてLPSが検出されている。したがって、子宮内膜炎の発症に関する細菌群から放出される内毒素が、繁殖障害を引き起こしていると推察される。しかしながら、LPSおよびPGNが乳牛の繁殖器官に与える影響を検証した事例はほとんどない。

LPSやPGNが、細胞に影響を及ぼすためには、それらの受容体が標的細胞に発現していなければならない。LPSの受容体にはTLR4、CD14およびMD2の3つの分子が必要である。膜上に位置するCD14は血中の遊離LPSと複合体を形成し、CD14-LPS複合体が膜貫通型受容体のTLR4に結合することでLPS刺激が細胞内へと伝達される。MD2はCD14とTLR4の結合を補助する[Cohen, 2002]。一方、PTGの認識機構は細胞膜上に存在するTLR2と細胞内に存在するNOD1およびNOD2を介して認識される。ヒトの子宮内膜組織では増殖期前期から後期にかけてTLR4の発現が減少することがわかっている[Hirata et al., 2007]。

哺乳動物における周排卵期の卵胞発育は、視床下部一下垂体によって制御されている。黄体の退行とともにプロゲステロン濃度が低下すると、その抑制から解除された視床下部一下垂体系が活発になり、その結果、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)が頻繁に放出され、これに対応して下垂体からの黄体形成ホルモン(LH)のパルス状分泌の頻度が増加する。卵巣ではLHのパルス状分泌に反応して卵胞発育が促進されるとともに、多量のエストラジオールが合成される[Ginther et al., 1997]。このエストラジオールは発育卵胞中の卵胞液中に蓄積されると同時に血中にも放出される。特に、卵胞液中に蓄積したエストラジオールは、卵胞の発育段階に伴って増加することが知られている[Henderson et al., 1982]。

LPSおよびPGNの受容機構がウシの生殖器官、とくに卵巣に備わっているかどうかは不明である。そこで、本研究では卵巣内卵胞のステロイドホルモン合成細胞である卵胞膜細胞に着目し、卵胞を発育段階別に分類し、それぞれの卵胞膜細胞のLPS受容体およびPGN受容体の遺伝子発現動態を解析した。卵胞膜細胞

のステロイドホルモン産生は、下垂体から分泌される黄体形成ホルモン(以下LH)の作用を強く受ける。このようなことから、本研究では卵胞から単離した卵胞膜細胞にLHを処理し、LPS受容体およびPGN受容体のmRNA発現動態に及ぼすLHの影響についても検証した。

材料および方法

食肉処理場(北海道畜産公社十勝事業所家畜処理場)で屠殺されたホルスタイン経産牛および未経産牛より採取した卵胞を実験に供した。卵胞から卵胞液を採取し、卵胞液の重さを計測し、以下に示す計算式に当てはめ卵胞直径を算出した[Murasawa et al., 2005]。

計算式： $y=12.96x^{0.31}$ (y =卵胞直径(mm)、

x =卵胞液の重さ(g))

卵胞液中からエストラジオール(E2)およびプロゲステロン(P4)を抽出し、2抗体法(Enzyme Immuno Assay, EIA)によりE2およびP4濃度の測定をした。2抗体法は本研究室で確立した方法で行なった[Miyamoto et al., 1992]。卵胞液中のステロイドホルモンの濃度をもとに、卵胞を低E2大卵胞(EID, E2/P4<1)、高E2大卵胞(EAD, E2/P4 \geq 1)、および退行黄体存在下の前排卵卵胞(POF, E2/P4 \geq 1)に区分し(表1)、各発育段階の卵胞から卵胞膜細胞を採取した。各発育段階の卵胞から卵胞膜細胞を採取した。

Table 1. Follicle diameter, the concentration of estradiol (E2) and progesterone (P4), and ration of E2/P4 at different developmental stages in bovine ovary.

	EID	EAD	POF
Follicle diameter (mm)	14.7 \pm 0.4	14.1 \pm 0.8	15.0 \pm 1.1
E2 conc. (ng/ml)	13.0 \pm 6.5 ^a	45.4 \pm 21.3 ^b	214.3 \pm 48.7 ^c
P4 conc. (ng/ml)	42.4 \pm 12.6	12.3 \pm 4.0	11.0 \pm 4.3
E2/P4	0.4 \pm 0.2 ^a	4.5 \pm 2.8 ^b	23.8 \pm 5.6 ^c

Different superscripts indicate significant difference ($p < 0.05$).

培養に用いた卵胞膜細胞の採取は、採取した卵胞を Digestion Mixture buffer (2 mg collagenase, 1 mg hyaluronidase, 1 mg protease, 0.4% Bovine Serum Albumin / 4 ml PBS) に浸漬させ、37°Cで50–60分間加温した。その後、DMEM/F12培地(GIBCO)にNaHCO₃ (2.2g/ml), Streptomycin (0.1mg/l), およびKanamycin (0.1mg/l) を溶解したWashing溶液を加え、遠心分離後に上清を除去した。その後、Red blood lysis buffer (0.01M Tris-HCl, 8.4mg/ml NH₄Cl pH8.0)を加え溶血処理を行った。生存細胞数はトリパンブルー染色後、血球計算盤を用いて算出した。

本実験では基礎培地として1%FCSを含有した

Table 2. Sequences for target gene primers.

Gene	Primer sequence	Size(bp)	Anneal(°C)
LPS receptor			
TLR-4	Forward: 5'-CTT GCG TAC AGG TTG TTC CTA A-3'	153	56
	Reverse: 5'-CTG GGA AGC TGG AGA AGT TAT G-3'		
CD14	Forward: 5'-GGG TAC TCT CTG CTC AAG GAA C-3'	199	56
	Reverse: 5'-CTT GGG CAA TGT TCA GCA C-3'		
MD2	Forward: 5'-GGG AAG CCG TGG AAT ACT CTA T-3'	204	54
	Reverse: 5'-CCC CTG AAG GAG AAT TGT ATT G-3'		
PGN receptor			
TLR2	Forward: 5'-GCT CCT GTG ACT TCC TGT CC-3'	501	54
	Reverse: 5'-CCG AAA GCA CAA AGA GGT T-3'		
NOD1	Forward: 5'-CAT CCT TCT CCC ACC TCT CA-3'	179	58
	Reverse: 5'-TCG TTG CTG AAG TTG ACC AG-3'		
NOD2	Forward: 5'-CCC AAC TTT GCC ATC AAC TT-3'	236	58
	Reverse: 5'-GTG GAC GAA CCA CTC AAC CT-3'		
Other			
GAPDH	Forward: 5'-CTC TCA AGG GCA TTC TAG GC-3'	120	58
	Reverse: 5'-TGA GAA AGT CGT TGA GG-3'		

DMEM/F12培地を用いた。1 well当たり 1×10^5 個の卵胞膜細胞を播種し (12wellプレート)、24時間の馴致培養後、各wellに 0 ng/mlあるいは2.5 ng/mlのLHを処理し、96時間培養を行った。培地交換は48時間おきに行った。培養した細胞は、Trizol (Invitrogen) に溶解し、後述するRNA抽出まで -80°C で保存した。培養した培地は、ホルモン測定をするまで -30°C で保存した。

卵胞膜細胞からmRNAを抽出し、Reverse Transcription (逆転写) によるcDNA合成を行った。定量的PCRはSYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) を使い、iQ5 cyclor (BIORAD) で行った。PCRの反応条件は、 95°C で10分間 (denature) 後、 95°C で10秒間 (denature)、各因子で設定したアニール温度で10秒間 (annealing)、および 72°C で20秒間 (extension) を50サイクル行った。融解曲線分析は $0.1^\circ\text{C}/\text{sec}$ で 70°C から 95°C まで温度を上げて行い、 $20^\circ\text{C}/\text{min}$ で 40°C まで下げた後、30秒間冷却した。解析に用いた各因子のプライマー配列は表2に示した。それぞれのmRNA発現は内部標準因子であるGAPDHとの割合で示した。各mRNA発現量はそれぞれのGAPDHのmRNA発現量で補正した値をmean \pm S.E.M.で示した。各データは群間の多重比較検定による一元配置の分散分析を行った後、Tukey-Kramer法あるいはスチューデントt検定を用いて有意差の検定を行った。

結果および考察

卵胞発育段階の卵胞膜細胞におけるLPS受容体およびPGN受容体のmRNA発現をそれぞれ図1および図2に示した。TLR4およびCD14のmRNA発現は、EADお

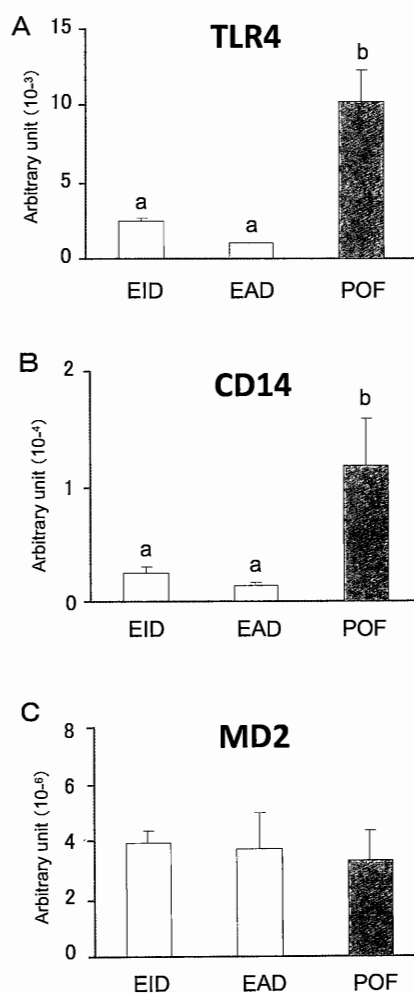


Figure 1. Expression of (A) TLR4, (B) CD14 and (C) MD2 mRNA in follicles at different developmental stages in bovine ovary. Different superscripts (a,b) within columns indicate $p < 0.05$.

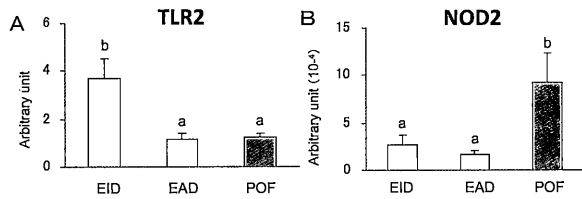


Figure 2. Expression of (A) TLR2 and (B) NOD2 mRNA in follicles at different developmental stages in bovine ovary. Different superscripts (a,b) within columns indicate $p < 0.05$.

よびEIDの卵胞膜細胞に比べPOFの卵胞膜細胞で有意に増加した(図1Aおよび1B)。しかし、MD2のmRNA発現は、いずれの卵胞発育段階の卵胞膜細胞で有意な変化は認められなかった(図1C)。LPSの細胞内シグナル伝達には、TLR4およびCD14が重要な役割を果たすことから[Cohen, 2002]、POFの卵胞膜細胞におけるこれら因子の増加はLPSの感受性の高さを示しているかもしれない。一方、PGN受容体であるTLR2およびNOD2の遺伝子発現についてみると、TLR2のmRNA発現はEADおよびPOFの卵胞膜細胞に比べEIDの卵胞膜細胞で有意に増加していた(図2A)。本研究に用いたEIDは、卵胞液中のエストラジオール濃度が他の卵胞に比べ低い。このような卵胞は、発育せずに退行していく(卵胞閉鎖)ことが知られている。従って、TLR2は卵胞の閉鎖に関与する可能性が示唆される。また、NOD2のmRNA発現はEADおよびEIDの卵胞膜細胞に比べPOFの卵胞膜細胞で有意に増加していた(図2B)。NOD2のmRNA発現がPOFの卵胞膜細胞で高かったことから、LPS受容体と同様、この発育段階の卵胞はPGNに対する感受性の高いことが推察される。このようにPOFの卵胞膜細胞でLPSおよびPGNに対する感受性が高い理由として、卵子の正常性の有無に関係している可能性が挙げられる。すなわち、卵胞発育の最終段階である排卵期にLPSやPGNが存在した場合、卵胞膜細胞がそれらを受容し排卵卵胞を排卵させないように作用するのかもしれない。事実、培養卵胞膜細胞にLPSやPGNを処理した場合、アンドロステンジオン産生やプロゲステロン産生およびLH受容体発現が抑制あるいは阻害されることを本研究室の実験で確認している(data not shown)。

卵胞は、下垂体から分泌されるLHのパルス状分泌によって発育が促進される[Bao B et al., 1998]。また、LHのパルス状分泌は卵胞膜細胞の機能であるアンドロステンジオン産生およびプロゲステロン産生を亢進することが知られている[McNatty, 1984]。このようなことから、LPSおよびPGN受容体のmRNA発現がLHの影響を受ける可能性が推察される。そこで、本研究室では卵胞発育後期(排卵前期)に相当するPOFの卵胞膜細胞で発現が高かったTLR4、CD14およびNOD2のmRNA発現におけるLHの効果を検証した。その結

果、TLR4およびCD14のmRNA発現は対照区とLH処理区との間に有意な差が認められなかったが(図3Aおよび3B)、NOD2のmRNA発現は対照区に比べLH処理区で減少する傾向($p=0.0506$)が認められた(図3C)。これらの結果から、卵胞膜細胞におけるTLR4およびCD14のmRNA発現はLHによって影響されないことが示された。POFの卵胞膜細胞におけるTLR4およびCD14のmRNA発現の増加は、LHではない他の因子によって引き起こされる可能性がある。

本研究において、卵胞膜細胞におけるNOD2のmRNA発現がLHによって低下する傾向が示された。この結果は、卵胞発育段階の卵胞膜細胞におけるNOD2のmRNA発現がEIDおよびEADと比べPOFで有意に増加した結果と異なる。この相違には、卵胞膜細胞で産生されるプロゲステロンの関与が考えられる。過去の報告では、ヒト子宮内膜細胞におけるNOD2のmRNA発現は血中P4濃度と負の相関関係をもつことが報告されている[King et al., 2009]。本研究

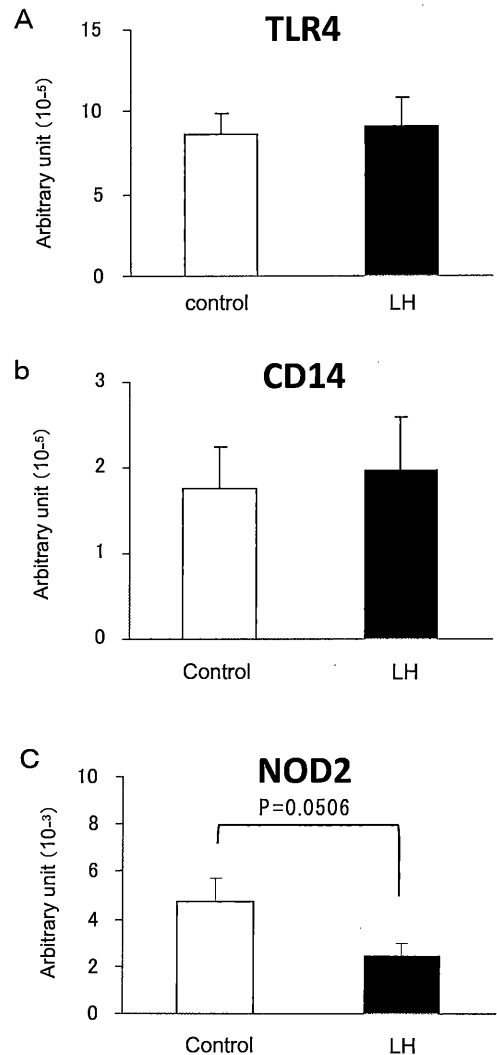


Figure 3. Effect of LH on expression of TLR4(A), CD14(B) and NOD2(C) mRNA in theca cells from bovine large follicles.

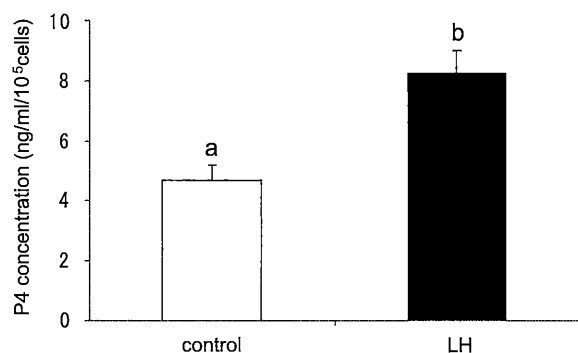


Figure 4. Effect of LH on progesterone production in theca cells from bovine large follicles. Different superscripts (a,b) within columns indicate $p < 0.05$.

の図4に示すように卵胞膜細胞は、LH処理によってプロゲステロン産生が増加する。さらに、POFの卵胞液中のプロゲステロン濃度が低いことから(表1)、LH処理によるNOD2のmRNA発現の抑制傾向はLHの直接的な作用ではなく、プロゲステロンを介する間接的な作用である可能性が推察される。

本研究より、ウシの卵胞膜細胞はLPSおよびPGN受容体を発現していること、さらに各受容体のmRNA発現量は卵胞の発育段階間で異なることが明らかとなった。このことから、子宮内膜炎発症牛における繁殖障害は、細菌由来成分のLPSおよびPGNが直接的に卵胞膜細胞に関与している可能性が示唆された。今後、LPSおよびPGNが卵胞膜細胞へ与える影響について詳細に検証していくことが重要である。

参考文献

BAO, B. and H. A. GARVERICK. (1998) Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.*, **76**:1903-1921

COHEN, J. (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. **420**:885-891.

GINTHER, O.J., K. KOT, L.J. KULICK. and M.C. WILTBANK. (1997) Sampling follicular fluid without altering follicular status in cattle: oestradiol concentrations early in a follicular wave. *J.Reprod.Fert.*, **109**:181-186

HENDERSON, K.M., A.S. McNEILLY, and I.A. SWANSTON. (1982) Gonadotrophin and steroid concentrations in bovine follicular fluid and their relationship to follicle size. *J. Reprod. Fert.* **65**:467-473.

HIRATA, T., Y. OSUGA, K. HAMASAKI, Y. HIROTA, E. NOSE, C. MORIMOTO, M. HARADA, Y. TAKEMURA, K. KOGA, O. YOSHINO, T. TAJIMA, A. HASEGAWA, T.

YANO. and Y. TAKETANI. (2007) Expression of toll-like receptors 2, 3, 4, and 9 genes in the human endometrium during the menstrual cycle. *J. Reprod. Immunol.*, **74**: 53-60.

KASIMANICKAM, R., T.F. DUFFIELD, R.A. FOSTER, C.J. GARTLEY, K.E. LESLIE, J.S. WALTON. and W.H. JOHNSON. (2004) Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. **62**:9-23.

KING, E., W. HORNE. ANDREW, HOMBACH-KLONISCH. SABINE, J.I. MASON, O.D. HILARY. and CRITCHLEY. (2009) Differential expression and regulation of nuclear oligomerization domain proteins NOD1 and NOD2 in human endometrium: a potential role in innate immune protection and menstruation. *Mol. Hum. Reprod.*, **5**: 311-319.

MATEUS, L., D.A. LOPES, L. COSTA, P. DINIZ. and A.J. ZIECIK. (2003) Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE2 and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis. *Anim. Reprod., Sci.* **76**:143-154.

MCNATTY, K.P., D.A. HEATH, S. LUN, J.M. FANNIN, J.M. MCDIARMID. and K.M. HENDERSON. (1984) Steroidogenesis by bovine theca interna in an in vitro perfusion system. *Biol. Reprod.*, **30**:159-170.

MIYAMOTO, A., K. OKUDA, F.J. SCHWEIGERT. and D. SCHAMS. (1992) Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. *J. Endocrinol.*, **135**:103-114

MU, H.H., A.D. SAWITZKE. and B.C. COLE. (2001) Presence of Lps(d) mutation influences cytokine regulation in vivo by the Mycoplasma arthritis mitogen superantigen and lethal toxicity in mice infected with M. arthritis. *Infect. Immun.*, **69**:3837-3844.

MURASAWA, M., T. TAKAHASHI, H. NISHIMOTO, S. YAMAMOTO, S. HAMANO. and M. TETSUKA. (2005) Relationship between ovarian weight and follicular population in heifers. *J. Reprod. Dev.*, **51**:689-93

SHELDON, I.M., D.E. NOAKES, A.N. RYCROFT, D.U. PFEIFFER. H. DOBSON. (2002) Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction*. **123**:837-845.

