

学 位 論 文 要 旨

氏名 Asrafun Nahar

題 目 :

Effects of nutritional condition or estrus cycle on GMCSF and MIF expression in bovine oviducts (栄養状態や性周期がウシ卵管での GMCSF や MIF の発現量に与える効果)

論文要旨 :

Obese heifers produce fewer excellent grade embryos than lean and normal heifers due to unknown mechanisms. In order to clarify mechanisms, this thesis focused 2 important proteins granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GMCSF) and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in bovine oviducts, because these recent discovered proteins have functions as promoter of fertilization and embryogenesis and as chemokine. Both GMCSF and MIF promotes glucose transport by murine preimplantation embryos. Although glucose is an important energy source for preimplantation embryos, the presence of excess glucose is detrimental for the embryos during the early cleavage stages. Therefore, if the energy source is in excess in the maternal body, GMCSF or MIF expression in the oviduct may be downregulated to protect the embryo.

In Study 1, I hypothesized that GMCSF expression may be downregulated in the oviducts of obese cows compared to oviducts of normal cows. I collected ampullary or isthmic section of oviducts from lean [n = 5; body condition score (BCS) on a 5-point scale, 2.5], normal (n = 6; BCS, 3.0), and obese (n = 5; BCS, 4.0) Japanese Black cows and confirmed the expression of GMCSF mRNA and protein by real-time PCR, western blotting, and immunohistochemistry. I found that GMCSF mRNA and protein expression in the ampulla were lower ($P < 0.05$) in the obese group than in the normal group. Both mRNA and protein expression of GMCSF did not differ significantly in the isthmus among the 3 groups. Also, the obese group showed weaker GMCSF immunoreactivities in the tunica mucosa of the ampulla than the normal and lean groups. Therefore, GMCSF may be a key molecular link between maternal nutritional status and early embryogenesis in the oviduct.

Oviduct may have another molecular link, because genetically GMCSF deficient female mice produce normal size litter. MIF may be such a molecule as promoter for sperm, ovum, and early embryos in bovine oviducts according to the maternal nutritional condition. Therefore, in Study 2, I evaluated whether MIF expression level downregulated in the oviducts of obese cows as compared to lean and normal cows. MIF mRNA and protein in ampullae or isthmuses were measured by real-time PCR or western blot. I found that MIF

mRNA and protein expression were lower in both ampulla and isthmus parts of oviducts in the obese and lean groups than in the normal group ($P < 0.05$). Also, immunohistochemistry revealed that the obese and lean groups had weaker MIF immunoreactivity in the tunica mucosa than the normal group. Therefore, MIF may be another key molecular link between maternal nutritional status and early embryogenesis in the oviduct.

In order to estimate importance of GMCSF or MIF in oviducts for early embryogenesis further, I evaluated a hypothesis that expression of GMCSF and MIF in oviducts are increased during post-ovulation phase when fertilized ovum are present in oviducts in Studies 3 and 4. I conducted a study to evaluate the GMCSF and MIF expression level during estrus (Day 0, $n = 5$), post-ovulation (Day 3, $n = 6$), and luteal (Days 9 to 12, $n = 5$) phases. The mRNA and protein expression of GMCSF or MIF in the ampullar and isthmus samples were measured by real-time PCR and western blot, respectively. GMCSF mRNA and protein expression levels were higher during estrus and post-ovulation phases than the luteal phase ($p < 0.05$). MIF mRNA and protein expression were higher in the post-ovulation phase than during the estrus and luteal phase ($P < 0.05$). Fluorescent immunohistochemistry confirmed that both GMCSF or MIF mainly expressed in the tunica mucosa during all the evaluated phases. Therefore, the results of Studies 3 and 4 suggested the importance of GMCSF or MIF in oviducts for early embryogenesis also *in vivo*.

Higher blood insulin concentration was observed in the obese heifers produced fewer excellent-grade embryos than those observed in lean and normal heifers. Insulin control GMCSF and MIF expression in myocytes and adipocytes. Therefore, in Studies 5 and 6, I conducted a study to evaluate whether insulin control GMCSF or MIF expression in bovine oviduct epithelial cells (BOECs) in *in vitro*. In first, I confirmed expression of insulin receptor in the tunica mucosa by fluorescent immunohistochemistry. In next, I prepared epithelial cells of the tunica mucosa of ampullar and isthmus sections from Japanese Black heifers. Then, I cultured BOECs. I confirmed expression of insulin receptor in the cultured BOECs. Then, I added insulin as final concentration of 0, 1, 20, or 5000 ng/mL in order to culture for 24 hours. Both mRNA and protein expression of GMCSF and MIF were measured by real-time PCR and western blot, respectively. Both mRNA and protein expression of GMCSF were higher in ampulla or isthmus BOECs treated with 20 ng/ml insulin than BOECs treated with 0, 1, or 5000 ng/ml ($P < 0.05$). Both mRNA and protein expression of MIF were higher in ampulla or isthmus BOECs treated with 20 ng/ml than BOECs treated with 0, and 5000 ng/ml ($P < 0.05$). Therefore, middle level insulin stimulate both GMCSF and MIF expression in oviducts whereas low and high level of insulin can stimulate only weakly, suggesting this may be the central mechanism to control both GMCSF and MIF expression in oviducts *in vivo*.

In conclusion, GMCSF and MIF expression is increased in bovine oviducts during the post-ovulation phase when embryo presents in oviduct, but GMCSF and MIF expression is suppressed in the obese cows compared to the normal or lean cows probably because of hyperinsulinemia.

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Asrafun Nahar
審査委員	主査：山口大学・准教授 角川博哉
	副査：山口大学・教授 田浦保穂
	副査：鹿児島大学・教授 窪田力
	副査：山口大学・教授 木曾康郎
	副査：山口大学・教授 高木光博
題目	Effects of nutritional condition or estrous cycle on GMCSF and MIF expression in bovine oviducts (栄養状態や性周期がウシ卵管での GMCSF や MIF の発現量に与える効果)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>肥満の未経産牛は、正常や消瘦状態の未経産牛よりも良質受精卵を作る能力が低い (Kadokawa et al. 2008)。しかし未だメカニズムは不明である。GMCSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) と MIF (macrophage migration inhibitory factor) には、受精や初期胚の発生に対する促進作用がある可能性が明らかになってきた。そこで本学位論文は、ウシ卵管におけるこれらのタンパクについて調べた。</p> <p>最初に、免疫染色法等によりウシ卵管の粘膜層が GMCSF や MIF を発現する部位であることを明らかにした。その後、肥満牛の卵管での GMCSF 発現量は、正常牛の卵管での GMCSF 発現量よりも低下しているという仮説を検証した。消瘦 (n = 5)、正常 (n = 6)、肥満 (n = 5) の黒毛和種牛から、卵管膨大部と卵管狭部を発情後 3 日に採取し、リアルタイム PCR 法とウエスタンブロット法を用いて、GMCSF の mRNA やタンパクの発現量の差を比較した。その結果、肥満牛の卵管膨大部での GMCSF 発現量は、正常牛での発現量と比較して低下していた (P < 0.05)。また卵管膨大部の粘膜層の GMCSF 発現量は、肥満牛では正常牛や消瘦牛での発現量よりも有意に低下していた。したがって卵管粘膜層における GMCSF は母体の栄養状態に伴い変化する可能性が示唆された。</p> <p>ウシ卵管では、GMCSF 以外にも母体の栄養状態に伴い発現量が変化する、胚発生促進物質が存在する可能性がある。そこで肥満牛の卵管での MIF 発現量は、正常牛での発現量よりも低下しているという仮説を検証した。消瘦 (n = 5)、正常 (n = 6)、肥満 (n = 5) の黒毛和種牛から、卵管膨大部と卵管狭部を発情後 3 日に採取し、MIF の mRNA やタンパクの発現量の差を比較した。その結果、肥満牛と消瘦牛の膨大部と狭部における MIF 発現量は、正常牛での発現量と比較して低下していた (P < 0.05)。卵管における</p>	

MIF 発現部位では粘膜層であるが、粘膜層における MIF 発現量は、肥満牛と削瘦牛では正常牛よりも低下していた。したがって、卵管粘膜層における MIF は母体の栄養状態に伴い変化する、もうひとつのタンパクである可能性が示唆された。

次に卵管における GMCSF や MIF の胚発生にとっての重要性を検討するために、卵子が卵巣にいる時期である発情期 ($n = 5$)、初期胚が卵管にいる時期である排卵後期 (発情後 3 日 ; $n = 6$)、胚が子宮に移動した後の時期である黄体期 ($n = 5$) における発現量を比較した。その結果、GMCSF の発現量は、発情期や排卵後期には、黄体期に比較して増加していた ($P < 0.05$)。一方、MIF の発現量は、排卵後期には、発情期や黄体期に比較して増加していた ($P < 0.05$)。またいずれの時期においても、GMCSF と MIF の発現部位は粘膜層であった。したがって GMCSF と MIF の、初期胚発生にとっての重要性が、より一層示唆された。

良質受精卵を作る能力が低下している肥満の未経産牛は、高インスリン血症である (Kadokawa et al. 2008)。インスリンは、細胞によるグルコース取り込み量を調節する作用の他に、様々な細胞の機能を調節する因子でもある。またグルコースは初期胚にとっての主要エネルギー源ではあるが、最適なグルコース濃度は正常な血中グルコース濃度と比較して非常に低く、グルコース濃度が高いと胚発生を抑制する。さらに卵管粘膜層における GMCSF と MIF は、初期胚のためのグルコースの供給量を調節している可能性が考えられる。そこで、インスリンが卵管の GMCSF や MIF の発現量を調節しているという仮説を検証した。最初に、卵管膨大部と狭部の粘膜層がインスリン受容体を発現していることを蛍光免疫染色法等により明らかにした。次にウシ卵管粘膜細胞を培養し、インスリン添加 (終濃度は 0、1、20、または 5000 ng/mL) による GMCSF や MIF の発現量を調べた。インスリン添加 24 時間後の、GMCSF や MIF の発現量を調べた結果、20 ng/ml インスリンで処理した卵管粘膜細胞では、他濃度インスリンで処理した同細胞よりも GMCSF や MIF の発現量は多かった ($P < 0.05$)。したがって、インスリンは GMCSF や MIF の発現量を調節していることが明らかになった。

以上の結果から、肥満牛で増加した血中インスリンは、胚発生にとって重要な卵管での GMCSF や MIF の発現量を抑制するため良質受精卵を作る能力が低いというメカニズムが考えられた。

以上の内容により、審査員一同は、本論文は博士 (獣医学) の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。