

# ウシ子宮内膜上皮細胞における暑熱-酸化ストレス応答経路の解析

北海道大学大学院農学研究院・助教 唄 花子

## ■ 目的

乳牛では夏に受胎率が低下する。今後も温暖化による環境温度の上昇が懸念されており、暑熱ストレス対策は世界的に重要な課題である。また、暑熱ストレスに伴い増加する酸化ストレスについても、生産性の低下や胚発育への悪影響が報告されている。現在までに、所属研究室では、過去に知見が少なかったウシ子宮内膜上皮細胞を用いて *in vitro* 暑熱負荷培養系を用いて暑熱負荷の影響を検証し、ウシ子宮内膜細胞においても暑熱負荷に伴い酸化ストレスが増加する結果を得ている。また昨年度の助成研究の結果、この変化が KEAP1-NRF2 経路に関連することを明らかにした。一方、本経路で働く因子は一部しか明らかにできていなかった。そこで本研究では、本経路に関連した因子群の動態に着目し、暑熱-酸化ストレスの機序を検証することを目的とした。

## ■ 方法

### 1. 子宮内膜上皮細胞の単離・培養と暑熱負荷

非妊娠ウシ子宮内膜組織から上皮細胞を単離・培養した。培養液は、5% ウシ胎子血清および Antibiotic-Antimycotic 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium を用い、5.0% CO<sub>2</sub> に設定したインキュベーター内で培養した。細胞は5回の継代以内に使用した。暑熱負荷を行わない通常条件は、平常時の牛の体温と同じ 38.5°C とした。暑熱条件は 40.5°C とし、日最高気温時の牛の体温と同じ温度とした。暑熱負荷時間は12時間とし、暑熱負荷を行わない区を対象区(Cont.)とした。

### 2. mRNA 発現解析

培養後の細胞から ISOGEN II を用いて RNA を抽出後、ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いて逆転写反応を行い cDNA を得た。暑熱負荷を確認するため、熱ショック性タンパク質(HSP)の発現変動を Real-Time PCR により解析した。暑熱負荷確認後、KEAP1-NRF2 経路に関連する遺伝子発現を評価するため、ヘム酸素添加酵素(*HO1*)、NAD(P)H キノン還元酵素(*NQO1*)、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(*G6PD*)、ペルオキシレドキシシン(*PRDX1*)の発現を解析した。内部標準遺伝子として *H2AFZ* を用いた。Real-Time PCR には THUNDERBIRD<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> qPCR Mix を用いた。

### 3. レポーターアッセイ

暑熱負荷培養時の熱応答配列(HSE)および酸化ストレス応答配列(ARE)の活性をレポーターアッセイにより調べた。HSE または ARE 配列を pNL[NLucP/minP/Hygro]ベクターに組み込んだものを用い、導入効率の補正には pGL4.53[luc2/PGK]firefly reporter を用いた。導入には ViaFect<sup>™</sup> Transfection Reagent を用いた。導入から48時間は通常通り培養し、その後12時間の暑熱負荷培養を行った。測定は Nano-Glo<sup>®</sup> Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System およびプレートリーダー (ARVO<sup>™</sup> X4) を用いた。

### 4. 統計解析

統計解析には、解析ソフト StatView (Version 5.0, SAS Institute Inc.) を用いて行った。危険率が5%以下の場合を統計学的に有意であるとみなした。

## ■ 結果および考察

本研究において、子宮内膜上皮細胞への12時間の暑熱負荷により *HSP70* および *HSP90* の発現が有意に増加し、HSE および ARE の活性化状態も増加したため、暑熱12時間負荷を十分とみなした。検証した因子はいずれも、生殖関連の細胞において KEAP1-NRF2 経路との関与が報告されていた。しかし、*NQO1* の遺伝子発現量は有意に増加したが、*HO1*、*G6PD*、*RPDX1* の発現量に変化はみとめられなかった。このことから、ストレス条件下において *NQO1* はウシ子宮内膜細胞においても役割を担う可能性が示唆された。一方、変化がみとめられなかった遺伝子は、その原因がストレスの種類や強度によるのか、細胞種によるのかは明らかでなく、さらに検証する必要がある。

## ■ 結語

本研究結果から、ウシ子宮内膜上皮細胞において暑熱負荷時に働く KEAP1-NRF2 経路において、*NQO1* の関与が示唆された。今後は、他の因子の関与等を踏まえて、さらに検証する必要がある。