

研究紹介

ウシ卵管平滑筋運動を制御する局所因子とその発現制御機構

山本 ゆ き

(応用動物科学コース)

Regulatory mechanisms for the expressions of local factors controlling bovine oviductal smooth muscle motility

Yuki Yamamoto

(Course of Applied Animal Science)

Oviductal motility is required for transport of oocyte and embryo resulting in successful fertilization and implantation in mammals. The oviduct consists of epithelial, stromal and smooth muscle layers. Oviductal motility is systemically and locally regulated by various factors including prostaglandin F2 alpha (PGF) and endothelins (EDNs), and relaxing factors including prostaglandin E2 (PGE2) and nitric oxide (NO). The objective of our research is to clarify the regulatory system of oviductal motility including the production mechanisms of these factors in cattle. First, the expressions of regulating factors of oviductal motility were examined throughout the estrous cycle in the bovine oviduct. Some of them showed cyclical changes, which suggested that they were controlled by some other factors. Second, the effects of ovarian steroids or oviductal local factors on the expressions of PGs, EDNs and NO synthases were investigated using cell culture method. Several factors such as estradiol-17beta, progesterone and lysophosphatidic acid affected the expressions of regulating factors of smooth muscle motility. In addition, we found that these actions differed between the ampulla and isthmus in same types of cultured cell. Our studies suggest that regulatory factors of oviductal motility are produced during the optimal period and at proper location to transport the oocyte and early embryo in the bovine oviduct. Although the precise control of oviductal motility is essential for successful pregnancy, methods for diagnosing and treating of its functional abnormality have not been established yet not only in cows but also in other animals including human. Our studies should contribute to improving the fertility rates in mammals.

Key words : ovarian steroid, oviduct, prostaglandin, physiology, smooth muscle motility

緒 言

近年、世界的にウシの人工授精による初回受胎率は低下の一途をたどり、日本国内ではおよそ40%まで低下している。こういった事態は、安定した畜産食料品すなわち動物性タンパク質の供給のみならず畜産業界の経済的視点からも、早急に解決されなければならない重要な課題である。

哺乳動物の卵管は、受精および初期胚発育の場であるとともに、配偶子・初期胚の輸送経路である。卵巣の卵胞から放出された卵母細胞は、卵管采に補足されたのち受精の場「膨大部」へと送られ、受精する。受精した初期胚は「峡部」を通過し、排卵後約3～4日で子宮に到達する。卵母細胞ならびに初期胚は運動能をもたないため、受精および着床が成立するためには卵管の輸送機能が必須である。このことから、卵管輸送機能は家畜の低受胎改善やヒトの不妊治療のターゲットになりうると考えられるが、卵管輸送機能の検査および異常の診断・治療方法は、全ての哺乳動物において未だ確立されていない。

卵管は、上皮層、間質層、平滑筋層からなり、上皮および間質細胞はさまざまな物質を分泌し卵管機能を調節している (Fig. 1)。卵管の輸送能には、卵管平滑筋の収縮弛緩運動による卵管運動が大きく関与する。過去の報告によって、プロスタグランジン (PG) F2 α やエンドセリン (血管収縮因子) が卵管平滑筋の収縮を引き起こすことが明らかにされている。また一方、平滑筋の弛緩を引き起こす因子としては、プロスタグランジン (PG) E2 や一酸化窒素 (NO) が報告されている¹⁻⁴⁾。卵管運動制御メカニズムを明らかにすることを目的に、ウシの卵管を用いた卵管平滑筋運動調節因子の局所における発現制御について調査した。

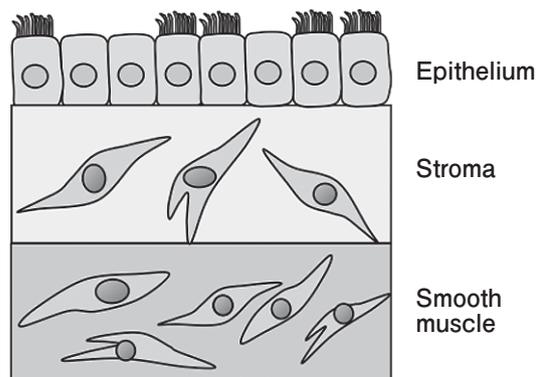


Fig. 1 Cross section diagram of oviductal wall. The luminal surface is epithelial layer consisting of ciliated cell and non-ciliated cells.

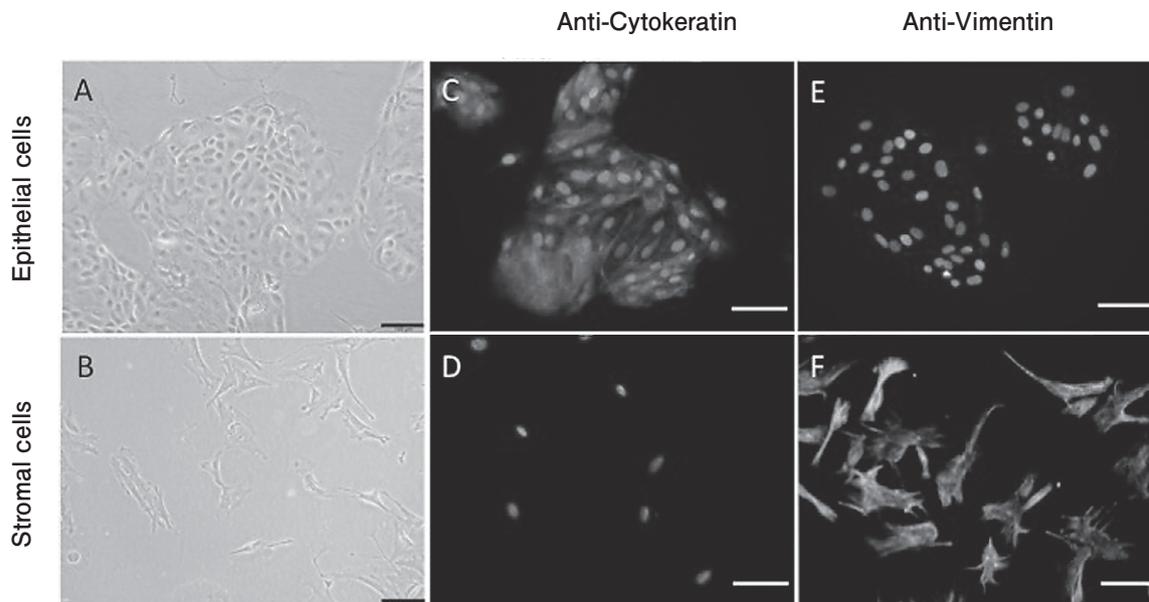


Fig. 2 Micrographs of oviductal epithelial (A) and stromal cells (B) in monolayer culture and immunostaining by anti-cytokeratin and anti-vimentin antibodies in ampullary oviductal epithelial cells (C, E) and stromal cells (D, F). Cytokeratin : epithelial cell marker, Vimentin : stromal cell marker. Staining in the isthmus was virtually the same as that in the ampulla. Each scale bar indicates 100 μ m.

材料および方法

1. ウシ卵管組織サンプリング

ウシ卵管組織は、岡山市および津山市の食肉処理センターにて採取し、氷上にて保存し岡山大学農学部まで運搬した。卵巣の肉眼的所見から、排卵周期ステージを分類した⁵⁾(排卵前0~2日, 排卵日, 排卵後2~3日, 5~6日, 8~12日, 15~17日)。卵管采, 膨大部, 膨大部峡部中間部, 峡部, 子宮卵管移行部に切り分けた後, 膨大部および峡部組織をRNAの抽出, 組織学的観察ならびに細胞培養実験に使用した。

2. 卵管細胞の単離・培養法

卵管上皮および間質細胞の単離・培養はそれぞれ Kobayashi⁶⁾および Yamamoto⁷⁾らの方法を用いた (Fig. 2)。コンフルエントに達した細胞を実験に供した。

3. RNA抽出ならびに遺伝子解析

液体窒素中で凍結保存していた卵管組織より, 定法に基づき total RNA を抽出した。抽出したRNAより, iScriptTM Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (BioRad Laboratories) を用いて第1鎖 cDNA を合成した。Reverse-Transcription (RT) PCR 法によって各因子または因子の産生酵素の遺伝子発現を解析した。発現量測定には定量的 RT-PCR 法を用い, 解析は比較 Ct 法を用いて行った。内在性コントロールには *GAPDH* を用いた。

4. エンドセリン関連因子タンパク質の局在解析

エンドセリン (EDN 1-3) と EDN 産生酵素 (ECE 1, 2)

および EDN 受容体 (EDNRA, EDNRB) については, 卵管膨大部および峡部におけるそれぞれのタンパク質局在を, 免疫組織化学法にて検討した。

5. プロスタグランジン測定

細胞培養上清中の PGF および PGE2 濃度は, 酵素免疫測定法 (EIA) を用いて測定した。また, 各 well における細胞の DNA 量を測定し, PG 濃度/DNA 量を算出して標準化を行った。

6. 統計方法

二群間の比較は Student's T test, 他群間の比較は One-way ANOVA および Tukey's multiple comparison test を用いて行った。危険率 (P 値) が 5% 未満のものを有意差ありとした。

結果および考察

1. ウシ卵管におけるプロスタグランジン産生制御因子の探索

プロスタグランジン F2 α (PGF) および PGE2 は, 排卵直後に卵管組織中濃度が高いことが報告されている⁹⁾。そのため, 卵管における PGs 産生は排卵直後に上昇するよう制御されていると推察された。そこで, 培養細胞を用いて PGs 産生に影響を与える因子の検討を行った。

1) 腫瘍壊死因子 (TNF)

TNF はサイトカインの一つで, ウシ卵管では上皮細胞から分泌される。ウシ子宮内膜では TNF が PGF 産生を刺激することが報告されていることから⁸⁾, 膨大部およ

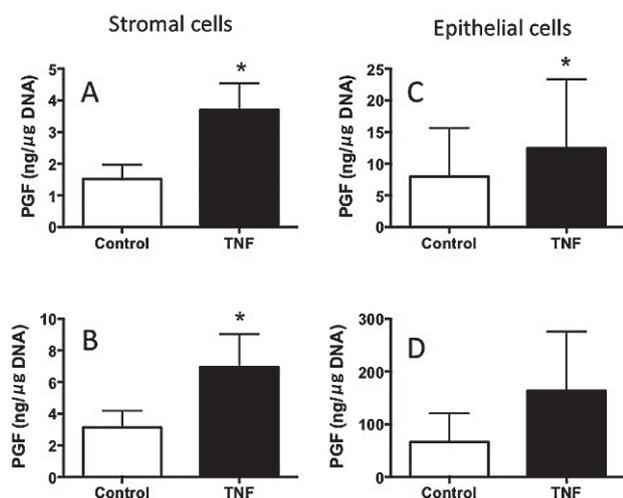


Fig. 3 Effects of tumor necrosis factor alpha (TNF) on prostaglandin F₂α (PGF) production in the bovine oviductal stromal (A, B) and epithelial (C, D) cells from ampullary (A, C) and isthmic (B, D) parts (mean ± SEM, n = 3–10 oviducts). * indicates significant difference (P < 0.05).

び峡部の培養卵管上皮および間質細胞に与える TNF の影響を調査したところ、いずれの細胞においても TNF は細胞からの PGF 産生を刺激した (Fig. 3)。このことから、ウシ卵管において TNF は PGF 産生制御因子である可能性が示された。

2) リゾホスファチジン酸 (LPA)

LPA はリン脂質の一種で、様々な器官で産生され生理作用を発揮する。ウシ子宮内膜細胞においては PG 産生を制御することが報告されている¹⁰⁾。ウシ卵管における LPA 産生酵素 (ATX, PLA1α, PLA1β) ならびに LPA 受容体 (LPAR1–6) の遺伝子発現を確認したところ、全ての遺伝子発現が培養卵管上皮および間質細胞で確認された。膨大部および峡部組織で遺伝子発現量の差を検討したところ、LPAR1–3 の発現は膨大部で、LPAR4–6 の発現は峡部で高いことが明らかとなった。さらに、培養細胞を用いて LPA が細胞の PG 産生能に与える影響を検討した結果、峡部の間質細胞においてのみ、LPA が PG 産生酵素の COX-2 遺伝子発現と PGF および PGE₂ の産生を刺激した。このことから、LPA はウシ卵管峡部において PG 産生促進因子として作用する可能性が示された。部位間での反応性の違いは、受容体発現量の差によるものと推察された。

2. ウシ卵管におけるエンドセリン発現制御

エンドセリン (EDN) は血管収縮因子として知られており、ウシ卵管の収縮を引き起こすことも報告されている¹⁰⁾。そこで、ウシ卵管において、卵管の収縮を制御するための EDN 局所システムがあると仮説を立て、以下について検討した。

1) ウシ卵管における EDN 関連因子のタンパク質局在

EDN (EDN1–3)、EDN 変換酵素 (ECE1, ECE2) および EDN 受容体 (EDNRA, EDNRB) の局在を検討したところ、EDNs と ECEs は上皮細胞に、また EDNRs は上皮細胞と平滑筋層に局在が確認された。このことから、ウシ卵管では EDN は上皮細胞で産生され、上皮および平滑筋に作用することが示唆された。

2) EDN 産生因子の遺伝子発現

卵管膨大部および峡部組織それぞれの EDNs および ECEs の遺伝子発現量を、排卵周期を通じて測定したところ、膨大部において排卵前後に高かった。そこで、卵巣ステロイドホルモン (エストラジオール-17β, プロゲステロン) が膨大部上皮細胞におけるこれらの因子発現に与える影響を調べたところ、卵巣ステロイドホルモンが EDN 関連因子の遺伝子発現を刺激することが明らかとなった (Fig. 4)。よって、卵管膨大部の EDN は排卵前後に卵巣ステロイドホルモンの影響で産生量が増加し、平滑筋の収縮を増強している可能性が示された。

3. ウシ卵管における部位特異的な一酸化窒素 (NO) 産生制御

一酸化窒素 (NO) は、卵管平滑筋の弛緩を引き起こす³⁾。ウシ卵管上皮細胞では NO 産生酵素 (iNOS) が発現することが確認された。卵管組織における iNOS の遺伝子発現量を測定したところ、膨大部では排卵直後に高かった一方、峡部では排卵直前に低かった。そこで培養上皮細胞を用いて、iNOS 発現に影響を与える因子を膨大部および峡部のそれぞれで探索した。

1) 卵管膨大部上皮細胞における PGs の影響

排卵時には、卵母細胞と一緒に卵液が卵管内に流入する。そこで、北海道畜産試験場にて採取された主席卵胞の卵液中 PGF および PGE₂ の濃度を測定し、その結果を踏まえて上皮細胞への PG 添加実験を行った。その結果、PGF または PGE₂ を添加した 1 時間後の膨大部上皮細胞では iNOS 発現が刺激され、24 時間後には抑制されることが明らかとなった。

2) 卵管峡部上皮細胞におけるエストラジオール17βの影響

排卵直前は、主席卵胞から分泌されるエストラジオール17βの血中濃度が最大になる。そこで、エストラジオール17βが峡部上皮細胞に与える影響を検討した。その結果、エストラジオールは iNOS 発現を有意に抑制することが明らかになり、その抑制効果は、エストロゲン受容体阻害薬によってキャンセルされた。

これらのことから、ウシ卵管において NO 産生制御は部位によって異なることが明らかとなった。膨大部では卵液中 PGs によって NO 産生が刺激され、平滑筋の弛緩が誘導されること、一方峡部では、排卵直前に NO 産生が抑制され、卵管は収縮に傾くことが推察された。

以上のことから、ウシの卵管では、配偶子および受精

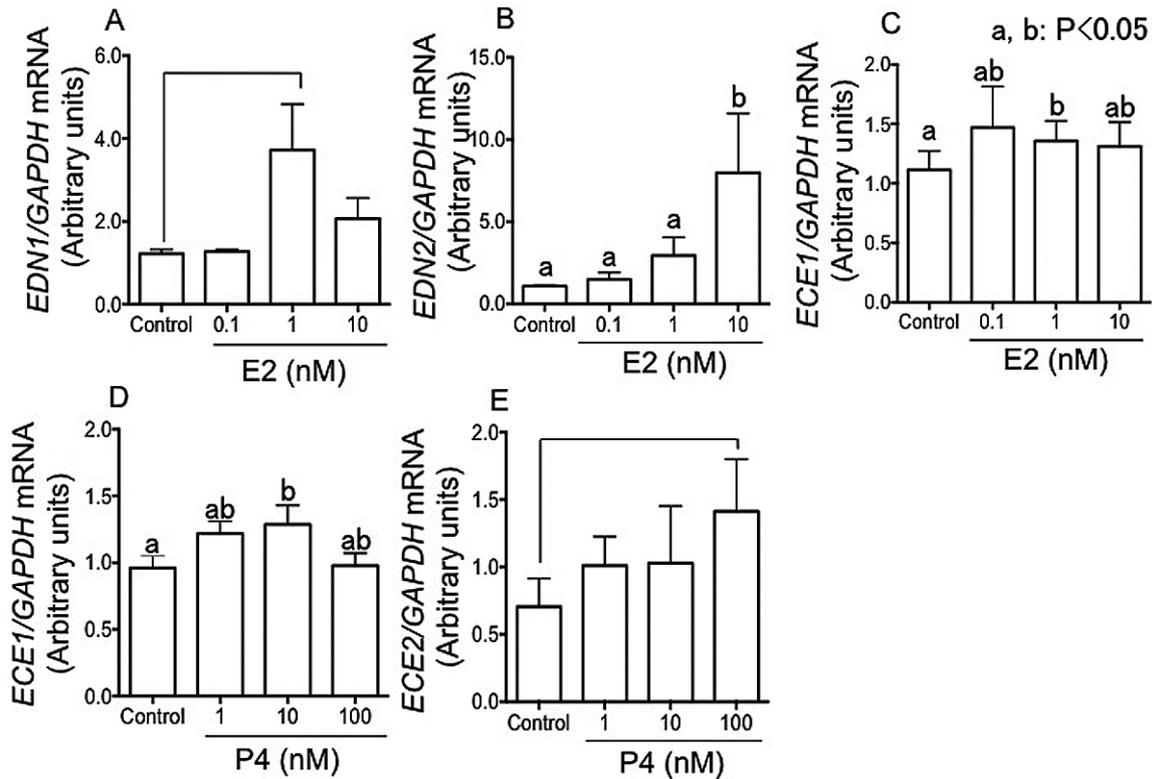


Fig. 4 Effects of estradiol-17 β (E2 ; 0.1, 1, 10 nM) on mRNA expression of endothelin (EDN)1 (A), EDN2 (B), EDN3 (C), EDN converting enzyme (ECE)1 (D) and ECE2 (E) in the cultured epithelial cells of bovine ampullary oviduct. Results were shown as mean \pm SEM, n = 6 oviducts. Different superscript letters indicate significant difference (P < 0.05).

卵の輸送が効率的に進むように、適切な時期および場所において平滑筋収縮弛緩因子の産生が内分泌的および局所的に制御される可能性が示された。卵管の輸送機能は妊娠成立に重要であるにもかかわらず、その制御機構については明らかでない部分が多い。今回明らかにした基礎的知見が、今後家畜やヒトの新たな不妊治療開発に貢献することを期待している。

要 約

配偶子や初期胚の輸送に重要な卵管運動は、平滑筋の収縮弛緩運動によって制御されている。卵管上皮および間質細胞はさまざまな物質を分泌し、卵管機能を調節している。卵管は卵管平滑筋収縮および弛緩因子を分泌し、局所的に卵管運動を制御していると考え、プロスタグランジン F2 α (PGF) およびエンドセリン (EDN) (卵管収縮因子)、PGE2 および一酸化窒素 (NO) (卵管弛緩因子) の産生制御メカニズムを明らかにする目的で研究を行った。排卵周期ステージごとにウシ卵管組織における上記の平滑筋運動制御因子ならびにその産生酵素の発現量を測定した結果、各排卵周期ステージにおける因子の発現量に差があることを確認した。すなわち、卵管局所でのこれら因子の産生は、発情周期に伴う何らかの制御を受けていることが示唆された。次に、ウシの卵管上皮

および間質細胞の純粋培養系を独自に開発し、*in vitro* の細胞生理機能の解析を行った。平滑筋収縮弛緩因子の産生メカニズムに関与する因子として、卵巣ステロイドホルモン、腫瘍壊死因子 (TNF), lysophosphatidic acid (LPA) などの因子が培養卵管細胞に与える影響を検討した結果、これらの因子が卵管上皮および間質細胞における平滑筋収縮弛緩因子またはその産生酵素の発現を制御することを明らかにした。よってウシの卵管では、平滑筋収縮弛緩因子の産生が内分泌的および局所的に制御され、卵管運動を制御する可能性が示された。

謝 辞

本研究遂行の際には、岡山県食肉センター、津山市食肉処理センター、北海道畜産試験場、ポーランド科学アカデミーに多大なご協力を賜りました。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Priyadarsana, M., Wijayagunawardane, B. and Miyamoto, A. : Endothelin-1 system in the bovine oviduct : a regulator of local contraction and gamete transport. *J. Cardiovas. Pharmacol.* **44**, Suppl. 1, 51 (2004)
- 2) Rosselli, M., Imthurn, B., Macas, E., Keller, P. J. and Dubey, R. K. : Endogenous nitric-oxide modulates endothelin-1 induced contraction of bovine oviduct. *Biochem. Biophysic.*

- Res. Commun. **201**, 143-148. (1994)
- 3) Siemieniuch, M. J., Woclawek-Potocka, I., Deptula, K., Okuda, K. and Skarzynski, D. J. : Effects of tumor necrosis factor- α and nitric oxide on prostaglandins secretion by the bovine oviduct differ in the isthmus and ampulla and depend on the phase of the estrous cycle. *Exp. Biol. Med.* **234**, 1056-1066 (2009)
 - 4) Szostek, A. Z., Siemieniuch, M. J., Deptula, K., Woclawek-Potocka, I., Majewska, M., Okuda, K. and Skarzynski, D. J. : Ovarian steroids modulate tumor necrosis factor- α and nitric oxide-regulated prostaglandin secretion by cultured bovine oviductal epithelial cells. *Domest. Anim. Endocrinol.* **41**, 14-23 (2011)
 - 5) Okuda, K., Kito, S., Sumi, N. and Sato, K. : A study of the central cavity in the bovine corpus-luteum. *Vet. Rec.* **123**, 180-183 (1988)
 - 6) Kobayashi, Y., Wakamiya, K., Kohka, M., Yamamoto, Y. and Okuda, K. : Summer heat stress affects prostaglandin synthesis in the bovine oviduct. *Reproduction*, **146**, 103-110 (2013)
 - 7) Yamamoto, Y., Kobayashi, Y. and Okuda, K. : Purified culture systems in bovine oviductal stromal cells. *J. Reprod. Dev.* **60**, 73-77 (2014)
 - 8) Okuda, K., Miyamoto, Y. and Skarzynski, D. J. : Regulation of endometrial prostaglandin F₂ α synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* **23**, 255-264, (2002)
 - 9) Wijayagunawardane, M. P. B., Miyamoto, A., Cerbito, W. A., Acosta, T. J., Takagi M. and Sato, K. : Local distributions of oviductal estradiol, progesterone, prostaglandins, oxytocin and endothelin-1 in the cyclic cow. *Theriogenology*, **49**, 607-618 (1998)
 - 10) Woclawek-Potocka, I., Komiyama, J., Saulnier-Blache, J. S., Brzezicka, E., Bah, M. M., Okuda, K. and Skarzynski, D. J. : Lysophosphatic acid modulates prostaglandin secretion in the bovine uterus. *Reproduction*, **137**, 95-105 (2009)
 - 11) Wijayagunawardane, M. P. B., Miyamoto, A., Taquahashi, Y., Gabler, C., Acosta, T. J., Nishimura, M., Killian, G. and Sato, K. : In vitro regulation of local secretion and contraction of the bovine oviduct : stimulation by luteinizing hormone, endothelin-1 and prostaglandins, and inhibition by oxytocin. *J. Endocrinol.*, **168**, 117-130 (2001)