

氏名	小林 芳彦
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第5418号
学位授与の日付	平成28年 9月30日
学位授与の要件	環境生命科学研究科農生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Regulation of micro-environment within the oviduct (卵管内の微細環境調節メカニズム)
論文審査委員	教授 木村 康二      教授 舟橋 弘晃      准教授 若井 拓哉

### 学位論文内容の要旨

短期間に多様な生理現象が起こる哺乳動物卵管内の微細環境は卵管上皮の分泌細胞により整えられる。卵管の分泌機能は卵巣由来の estradiol-17 $\beta$  (E2)ならびに progesterone (P4)に内分泌的に制御される。卵巣ステロイドは prostaglandin (PG) E<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub> $\alpha$ および endothelin-1 (EDN1)などの卵管上皮細胞から分泌される因子の分泌活性を調節する。これら卵管上皮細胞から分泌される因子は、さらに卵管上皮細胞自身に作用し卵管内腔の緻密な環境を生み出す。本研究では第一に、卵管分泌機能制御機構の一端解明を目的として、卵管上皮細胞の分泌する一酸化窒素 (NO)合成に及ぼす卵巣由来因子ならびに卵管由来の EDN1 の影響を検討した。夏季暑熱ストレスがウシ子宮や卵巣の機能に悪影響を及ぼし受胎率を低下させる一方で、卵管機能に及ぼす暑熱ストレスの影響に関して報告はない。本研究では第二に、冬季および夏季のウシ卵管組織における PG 合成酵素発現を比較し夏季において卵管生理機能に及ぼす影響を推察した。1) 排卵周期各期のウシ卵管膨大部および峡部の組織を採取し、内皮型 NO 合成酵素 (eNOS)、誘導型 NOS (iNOS)、estrogen receptor  $\alpha$  (ESR1)、ESR2、P4 receptor、E-prostanoid receptors (PTGER2 および PTGER4) および F-prostanoid receptor mRNA 発現量を検討した。2) 上皮細胞に E<sub>2</sub>、P<sub>4</sub>、PGE<sub>2</sub> または PGF<sub>2</sub> $\alpha$  をそれぞれ添加し iNOS mRNA 発現量を検討した。E<sub>2</sub> (10 nM) を ESR1 または ESR2 それぞれの特異的拮抗剤と、PGE<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) を PTGER2 または PTGER4 それぞれの特異的拮抗剤と組み合わせ添加し、iNOS mRNA 発現量を検討した。3) 上皮細胞の iNOS mRNA およびタンパク質発現に及ぼす EDN1 の影響を検討した。4) 膨大部および峡部組織の EDN 受容体 A (EDNRA) および B (EDNRB) の発現量を検討した。5) 冬季および夏季の卵管組織中 PG 合成酵素発現を比較した。6) 単離した卵管上皮細胞を 38.5°C および 40.5°C で培養した後、培養液中 PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2</sub> $\alpha$  濃度を測定した。1) 卵管膨大部の iNOS mRNA 発現量は排卵日に高かった。一方峡部の iNOS mRNA 発現量は黄体形成期に最も高く、卵胞期に低かった。峡部の ESR1 mRNA 発現量は卵胞期に高かった。2) 峡部上皮細胞の iNOS mRNA 発現量は E<sub>2</sub> によって抑制された。この抑制作用は ESR1 拮抗剤によって低減された。膨大部上皮細胞の iNOS mRNA 発現量は PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2</sub> $\alpha$  によって刺激された。PGE<sub>2</sub> による iNOS 刺激作用は PTGER2 拮抗剤によって抑制された。3) 膨大部上皮細胞において EDN1 は iNOS mRNA およびタンパク質発現を刺激した。4) NO 合成誘導作用を持つ受容体である EDNRB は、膨大部においては排卵後に発現上昇が認められた一方峡部においては有意な変化がなかった。5) 夏季ウシ卵管膨大部組織において、cytosolic PGES (cPGES) mRNA が冬季と比べて高い発現を、carbonyl reductase 1 (CBR1) mRNA は冬季と比べて低い発現を示した。6) 膨大部上皮細胞において高温培養が PGE<sub>2</sub> 濃度のみを刺激した。本研究より、排卵後の卵胞液に含まれる PGs が卵管膨大部の NO 合成を誘導する可能性が示された。一方卵管峡部では排卵前 (卵胞期) に血中濃度の増加する E<sub>2</sub> により NO 合成が抑制されることが示唆された。また卵管上皮由来因子である EDN1 が自己分泌的に NO 分泌を調節すること、さらに排卵後の時期に特に膨大部で NO 分泌を亢進し、卵管内腔の微細環境構築に寄与することが示唆された。夏季において PGE<sub>2</sub> 合成酵素発現の亢進、PGF<sub>2</sub> $\alpha$  合成酵素発現の抑制に起因する PG 分泌バランスの乱れが卵管の収縮・弛緩のバランスを崩し、卵母細胞や初期胚が適切に輸送されず、受胎率の低下を招くことが考えられる。

## 論文審査結果の要旨

哺乳動物の卵管は、卵子と精子が会う受精の場であるとともに、精子の受精能獲得、胚の初期発育の場でもあり、この多様な生理現象のための微細環境を整えているのが卵管上皮からの分泌物である。この卵管の分泌機能の重要性に関わらず、その制御因子についての研究は非常に少ない。本研究では卵管分泌機能制御解明の一端として、1) 卵管上皮細胞の分泌する一酸化窒素(NO)合成に及ぼす卵胞由来ホルモンならびに卵管由来のエンドセリン(EDN)の影響、2) 環境要因(暑熱ストレス)が卵管生理機能に及ぼす影響について検討している。

各発情ステージにおける卵管膨大部および峡部における、NO合成酵素(iNOS)の発現を検討した結果、卵管膨大部では排卵日に、卵管峡部では黄体期に上昇することが示された。また、エストロゲン受容体(ESR1)の発現は峡部では卵胞期で上昇していた。このことから卵管峡部でのiNOS発現がエストロゲンにより抑制される可能性が示唆されたため、エストロゲン(E2)存在下で峡部上皮細胞を培養したところ、iNOSの発現を抑制した。またこの抑制はESR1特異的アンタゴニストの添加により低減された。一方、膨大部のiNOS発現は卵胞期で上昇していたため、排卵後に膨大部に流入する卵胞液中の成分が関与していると仮定し、プロスタグランジン(PG)に注目したところ、PGE2およびPGF2 $\alpha$ の両者がiNOSの発現を刺激することが明らかとなった。次に卵管膨大部のiNOS発現を制御するものとして、卵管上皮細胞が分泌するエンドセリン(EDN)に注目し検討を行った。EDN1は卵管膨大部上皮細胞のiNOS発現を上昇させるとともに、そのレセプター(EDNRB)の発現は排卵後に上昇していることが認められた。さらに卵管機能制御メカニズムがウシの繁殖性にどのように関わっているかを考察するため、受胎率低下を引き起こす暑熱ストレスが上記で卵管のiNOS発現を制御することが示されたPG生産に及ぼす影響について検討した結果、PGE2のみ産生が低下し、PGE2/PGF2 $\alpha$ 比の乱れが卵管機能に障害を及ぼし受胎率低下を招くことが示唆された。以上のことから、本研究では卵管生理機能を内分泌的・局所的に制御する物質だけでなく、環境要因などについても多面的に評価・解明したことは、家畜のみならずヒトの不妊研究の基礎知見として極めて意義深いものである。本学位審査委員会はこれらの成果をまとめた本論文ならびに参考文献を総合的に審査し、本論分が博士学位(農学)に値するものと判断した。