

氏 名 (国籍)	史 占 全 (中華人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (獣医)
学 位 記 番 号	獣医博甲第168号
学 位 授 与 年 月 日	平成17年3月14日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学 位 論 文 題 目	Studies on Expression and Regulation of Nerve Growth Factor and Inhibin/Activin in Reproductive Organs of the Female Golden Hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) (雌ゴールデンハムスター (<i>Mesocricetus auratus</i>) 生殖器における神経成長因子およびインヒビン/アク チビンの分泌調節に関する研究)
審 査 委 員	主査 東京農工大学 教授 田 谷 一 善 副査 帯広畜産大学 教授 三 宅 陽 一 副査 岩 手 大 学 教 授 橋 爪 一 善 副査 東京農工大学 教 授 加 茂 前 秀 夫 副査 岐 阜 大 学 教 授 坪 田 敏 男

論 文 の 内 容 の 要 旨

雌の性腺である卵巣の活動は、下垂体前葉から分泌される2つの性腺刺激ホルモンである黄体形成ホルモン (LH) と卵胞刺激ホルモン (FSH) によって調節されている。卵巣は、LH と FSH の作用により、ステロイドホルモン (プロジェステロン、テストステロン、エストロジェン) と糖蛋白質ホルモン (インヒビン、アクチビン) を分泌し、卵管、子宮、膣などの副生殖器の機能を調節する。近年では、このようなホルモンに加えて、卵巣あるいは副生殖器内で生産される成長因子が自己分泌や傍分泌により、それぞれの器官の作用を調節することが明らかにされてきた。

本研究では、雌性生殖機能調節における成長因子の役割を解明する一環として、雌ゴールデンハムスターの生殖器における神経成長因子 (NGF) およびインヒビン/アクチビンの分泌調節に関する研究を行った。

第1章では、緒論として、雌哺乳類の生殖器における成長因子の局所作用、NGF とインヒビン/アクチビンの生理作用等について記述し、本研究の目的を述べた。

第2章では、本研究に共通する実験材料と方法について記述した。

第3章では、卵巣における NGF、NGF リセプター (trkA, p75) およびインヒビン α 、 β A、 β B 鎖の分泌調節についての研究結果を記述した。

NGF および NGF リセプター (trkA と p75) は、各種发育段階の卵胞顆粒層細胞、卵胞膜内膜細胞、卵細胞及び間質細胞と黄体細胞に局在が認められた。インヒビン α 鎖は、各種发育段階の卵胞顆粒層細胞、黄体細胞および間質細胞に局在が認められた。一方、 β A および β B 鎖は、胞状卵胞の顆粒層細胞にのみ局在が認められた。間質細胞における陽性反応は、発情期 (Day 1) に最も強く、発情周期の進行に伴って低下した。

間質細胞における NGF とリセプターおよびインヒビン α 鎖の局在と黄体形成ホルモン (LH) サージとの関係を検討する目的で、黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH) に対する抗血清を発情前期 11 時に投与し、LHRH を免疫学的に中和した。その結果、LHRH 中和群では、LH サージが起こらず排卵が抑制され、間質細胞での NGF、NGF リセプター、インヒビン α 鎖の発現が著しく抑制された。一方、LHRH 抗血清投与後、同日 17 時に、LH 作用を有するヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) を投与した群では、排卵が認められ、間質細胞での NGF、NGF リセプター、インヒビン α 鎖の強い発現が認められた。

第4章では、卵巣間質細胞における NGF とインヒビン α 鎖の発現と LH との関係さをさらに検討する目的で、発情休止期 17 時に hCG 10 IU を投与後経時的に卵巣間質細胞での NGF、NGF リセプターおよびインヒビン α 鎖の発現を調べた結果を記述した。hCG 投与により、正常な発情周期よりも 1 日早い発情前期 (Day 4) に全例が排卵し、卵巣間質細胞での NGF と NGF リセプターおよびインヒビン α 鎖の陽性反応が増強された。以上の結果から、卵巣間質細胞における NGF、NGF リセプターおよびインヒビン α 鎖の発現は、LH により促進されることが明らかとなった。

第5章では、子宮における NGF、NGF リセプター (trkA, p75) およびインヒビン α 、 β A、 β B 鎖の分泌調節についての研究結果を記述した。

NGF と trkA は、子宮の上皮細胞、腺細胞および間質細胞に、p75 は、上皮細胞と腺細胞に局在が認められた。これらの NGF、trkA および p75 の陽性反応は、発情前期 (Day 4) に最も強く認められた。子宮の NGF 含有量は、血中エストラジオール-17 β (E_2) およびプロジェステロン (P) 濃度の高い発情前期に最高値を示した。卵巣摘出ゴールデンハムスターでは、 E_2 と P の単独投与により、NGF とリセプターの染色強度が増加したが、 E_2 の方が P よりも有効であった。

インヒビン α 鎖は、子宮間質細胞に、 β A および β B 鎖は、子宮の上皮細胞、腺細胞および間質細胞に強い陽性反応が認められた。これらの陽性反応は、発情前期に最も顕著であった。卵巣摘出ゴールデンハムスターでは、 E_2 および P 投与によりインヒビン α 、 β A および β B 鎖の染色強度が増加した。インヒビン α 鎖については、 E_2 と P の増強効果が認められた。以上の結果から、子宮における NGF とインヒビン/アクチビンの発現は、 E_2 と P により調節される事実が明らかとなった。

第6章では、卵管における NGF、NGF リセプター (trkA, p75) の発現についての研究結果を記述した。卵管では、NGF、trkA および p75 は、卵管上皮細胞と平滑筋細胞に陽性反応が認められた。これらの陽性反応は、発情周期による変動は認められなかった。また、卵管漏斗部、膨大部、峡部の部位によっても差は認められなかった。

第7章では、胎盤における NGF、NGF リセプター (trkA, p75)、インヒビン α 、 β A、 β B 鎖の発現についての研究結果を記述した。妊娠 12 日のゴールデンハムスター胎盤では、合胞体栄養細胞に NGF、trkA、p75、インヒビン α 、 β A および β B 鎖の局在が認められた。

妊娠中のインヒビンとアクチビンの分泌源を調べる目的で、卵巣、胎盤、子宮の摘出実験を行った。その結果、(1)卵巣摘出群および卵巣+子宮摘出群では、血中インヒビン A とインヒビン B 濃度が低下したが、血中アクチビン A 濃度には変化は認められなかった。(2)胎盤摘出群および子宮摘出群では、血中インヒビン A とインヒビン B 濃度には、変化は認められなかったが、血中アクチビン A 濃度が著しく低下した。以上の結果から、妊娠ゴールデンハムスターでは、卵巣がインヒビン A とインヒビン B を分泌し、胎盤がアクチビン A を分泌することが明らかとなった。

第8章では、泌乳ラットの卵巣間質細胞と乳腺における NGF、NGF リセプター (trkA, p75) およびインヒビン α 、 β A、 β B 鎖の発現についての研究結果を記述した。

NGF、trkA、p75 およびインヒビン α 鎖は、泌乳中の母親の卵巣間質細胞に強い陽性反応を示したが、乳子を除去した母親の卵巣では発現は認められなかった。NGF、trkA、p75、インヒビン α 、 β A および β B 鎖のいずれも、乳腺上皮細胞に陽性反応が認められた。泌乳ゴールデンハムスターでは、泌乳期間中毎日午後に、血中 LH 濃度の上昇が観察され、卵巣では、間質細胞が著しく発達するが、乳子を除去した母親では、このような血中 LH 濃度の上昇は認められないことから、LH が卵巣間質細胞での NGF、NGF リセプターおよびインヒビン α 鎖の発現を促進するものと推察された。

本研究の結果から、成長因子である NGF とインヒビン/アクチビンは、雌ゴールデンハムスターの生殖器に広く分布することが判明した。NGF については、2 種類のリセプターもほとんどの器官で同一細胞に存在することから、NGF とインヒビン/アクチビンは、傍分泌あるいは自己分泌の様式により生殖器の機能調節に関与しているものと推察された。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究では、雌性生殖機能調節における成長因子の役割を解明する一環として、雌ゴールデンハムスターの生殖器における神経成長因子 (NGF) およびインヒビン/アクチビンの分泌調節に関する研究を行った。

1. 卵巣における NGF、NGF リセプター (trkA, p75) およびインヒビン/アクチビン α 、 β A、 β B 鎖の分泌調節

NGF および NGF リセプター (trkA と p75) は、各種発育段階の卵胞顆粒層細胞、卵胞膜内膜細胞、卵細胞及び間質細胞と黄体細胞に局在が認められた。間質細胞における陽性反応は、発情期 (Day 1) に最も強く、発情周期の進行に伴って低下した。インヒビン α 鎖は、各種発育段階の卵胞顆粒層細胞、黄体細胞および間質細胞に局在が認められた。一方、 β A および β B 鎖は、健全な泡状卵胞の顆粒層細胞にのみ局在が認められた。

間質細胞における NGF とリセプターおよびインヒビン α 鎖の局在と黄体形成ホルモン (LH) サージとの関係を検討する目的で、黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH) に対する抗血清を発情前期 (Day 4) 11 時に投与し、LHRH を免疫学的に中和した。その結果、LHRH 中和群では、LH サージが起こらず排卵が抑制され、間質細胞での NGF、NGF リセプター、インヒビン α 鎖の発現が著しく抑制された。一方、LHRH 抗血清投与後、同日 17 時に、LH サージの代わりにヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) を投与した群では、排卵が誘起され、間質細胞での NGF、NGF リセプター、インヒビン α 鎖の強い発現が認められた。

卵巣間質細胞におけるNGFとインヒビン α 鎖の発現とLHとの関係をさらに検討する目的で、発情休止期 (Day3) 17時にhCG 10 IUを投与後経時的に卵巣間質細胞でのNGF、NGFリセプターおよびインヒビン α 鎖の発現を調べた。その結果、hCG投与により、正常よりも1日早いDay 4に全例が排卵した。hCG投与後6時間、12時間および18時間で卵巣間質細胞にNGFとNGFリセプターの陽性反応が、また、hCG投与後12時間および18時間にインヒビン α 鎖の陽性反応が増強された。

泌乳ハムスターでは、泌乳期間中毎日午後、血中LH濃度の上昇が観察され、卵巣では、間質細胞が著しく発達するが、乳子を除去した母親では、このような血中LH濃度の上昇は認められない。NGF、trkA、p75およびインヒビン α 鎖は、泌乳中の母親の卵巣間質細胞に強い陽性反応を示したが、乳子を除去した母親の卵巣では発現は認められなかった。

以上の結果から、卵巣間質細胞におけるNGF、NGFリセプターおよびインヒビン α 鎖の発現は、LHにより促進されることが明らかとなった。

II. 子宮におけるNGF、NGFリセプター (trkA, p75) およびインヒビン α 、 β A、 β B鎖の分泌調節

NGFとtrkAは、子宮の上皮細胞、腺細胞および間質細胞に、p75は、上皮細胞と腺細胞に局在が認められた。これらのNGF、trkAおよびp75の陽性反応は、Day 4に最も強く認められた。子宮のNGF含有量は、血中エストラジオール-17 β (E_2) およびプロゲステロン(P)濃度の高いDay4に最高値を示した。卵巣摘出ハムスターでは、 E_2 とPの単独投与により、NGFとリセプターの染色強度が増加したが、 E_2 の方がPよりも有効であった。 E_2 とPの併用投与では、NGFの染色強度が増加したが、trkAとp75には変化が認められなかった。

インヒビン α 鎖は、子宮間質細胞に、 β A および β B鎖は、子宮の上皮細胞、腺細胞および間質細胞に強い陽性反応が認められた。これらの陽性反応は、Day4に最も顕著であった。卵巣摘出ハムスターでは、 E_2 およびP投与によりインヒビン α 、 β A および β B鎖の染色強度が増加した。インヒビン α 鎖については、 E_2 とPの増強効果が認められた。

以上の結果から、子宮におけるNGFとインヒビン/アクチビンの発現は、 E_2 とPにより調節される事実が明らかとなった。

III. 卵管におけるNGF、NGFリセプター (trkA, p75) の発現

卵管では、NGF、trkA および p75は、卵管上皮細胞と平滑筋細胞に陽性反応が認められた。これらの陽性反応は、発情周期による変動は認められなかった。また、卵管漏斗部、膨大部、峡部の部位によっても差は認められなかった。以上の結果から、NGFは卵管においても何らかの生理作用を有するものと推察された。

IV. 胎盤及び乳腺におけるNGF、NGFリセプター (trkA, p75)、インヒビン α 、 β A、 β B鎖の発現

妊娠12日のハムスター胎盤では、合体栄養細胞にNGF、trkA、p75、インヒビン α 、 β A および β B鎖の局在が認められた。

妊娠中のインヒビンとアクチビンの分泌源を調べる目的で、卵巣、胎盤、子宮の摘出実験を行った。その結果、(1)卵巣摘出群および卵巣+子宮摘出群では、血中インヒビンAとインヒビンB濃度が低下したが、血中アクチビンA濃度には変化は認められなかった。(2)胎盤摘出群および子宮摘出群では、血中インヒビンAとインヒビンB濃度には、変化は認められなかったが、血中アクチビンA濃度が著しく低下した。以上の結果から、妊娠ハムスターでは、卵巣がインヒビンAとインヒビンBを分泌し、胎盤がアクチビンAを分泌することが明らかとなった。

NGF、trkA、p75、インヒビン α 、 β A および β B鎖のいずれも、乳腺上皮細胞に陽性反応が認められた。以上の結果から、ハムスターでは、胎盤と乳腺においてもNGFとインヒビン/アクチビンが何らかの生理作用を有するものと推察された。

本研究の結果から、成長因子であるNGFとインヒビン/アクチビンは、雌ハムスターの生殖器に広く分布することが判明した。NGFについては、2種類のリセプターもほとんどの器官で同一細胞に存在することから、NGFとインヒビン/アクチビンは、傍分泌あるいは自己分泌の様式により生殖器の機能調節に関与しているものと推察された。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分に価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Expression of nerve growth factor (NGF), and its receptors trkA and p75 in ovaries of the cyclic golden hamster (*Mesocricetus auratus*) and the regulation of their production by luteinizing hormone
著 者 名 : Shi, Z., Jin, W., Watanabe, G., Suzuki, A.K., Takahashi, S. and Taya, K.
学術雑誌名 : Journal of Reproduction and Development
巻・号・頁・発行年 : 50 (6) : 605-611, 2004

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Inhibin B regulating follicle stimulating hormone secretion during testicular recrudescence in the male golden hamster
著 者 名 : Jin W, Herath, C.B., Yoshida, M., Arai, K.Y., Saita, E., Shi, Z., Ren, L., Watanabe, G., Groome, N.P. and Taya, K.
学術雑誌名 : Journal of Andrology
巻・号・頁・発行年 : 23 (6): 845-853, 2002
- 2) 題 目 : NMDA receptor antagonists reduce restraint-induced release of prolactin in male rats
著 者 名 : Liu, J.X., Du, J.Z., Asai, S., Shi, Z., Watanabe, G. and Taya, K
学術雑誌名 : Neuroendocrinology Letters
巻・号・頁・発行年 : 24 (6): 435-439, 2003
- 3) 題 目 : A new alternative method for superovulation using passive immunization against inhibin in adult rats
著 者 名 : Ishigame, H., Medan, M.S., Watanabe, G., Shi, Z., Kishi, H., Arai, K.Y. and Taya, K.
学術雑誌名 : Biology of Reproduction
巻・号・頁・発行年 : 71 (1): 236-243, 2004