

# 学位論文要約

氏 名 裕 野 健

題 目 乳牛における卵管局所の性ステロイドホルモンによる卵管上皮分泌機能制御に関する研究

ウシを含む哺乳類の卵管は、受精や初期胚発育に最適な環境を提供する役割を持つ。近年、卵管の機能低下が、乳牛の受胎性低下の要因のひとつとなる可能性が示唆されており、卵管の機能調節機構の解明が求められている。ウシにおいて、卵管内環境を構築する卵管上皮の機能は、性ステロイドホルモンによって制御されることが知られている。しかし、卵管組織中の性ステロイドホルモン濃度やホルモン受容体発現などの基礎的な知見に関しても未だ不明な点が多く残されており、卵管局所の内分泌環境と卵管機能との関連については十分に理解されていない。そこで本研究では、卵管機能の調節機構の解明を目的として、卵管局所の性ステロイドホルモンと卵管上皮の分泌機能との関連を調べた。

第2章では、発情周期中における卵管局所の内分泌環境の特徴を明らかにするために、ホルスタイン種経産牛の屠畜材料を用いて、卵管膨大部および峡部における卵管組織中のエストロゲン ( $E_2$ ) およびプロジェステロン ( $P_4$ ) 濃度と卵管上皮における  $E_2$  および  $P_4$  受容体の遺伝子発現を調べ、発情周期 (Days 19-21 vs 0-1 vs 2-4 vs 5-7) および排卵前卵胞もしくは黄体を有する卵巢との位置関係 (同側 vs 反対側) による比較を行った。発情周期中の卵管組織中  $E_2$  濃度は、Days 19-21 で増加した。また、排卵卵胞と同側の卵管では、反対側の卵管よりも  $E_2$  濃度が高いことが示された。卵管組織中の  $P_4$  濃度は、Days 2-4 および Days 5-7 で増加し、特に黄体と同側の卵管では、反対側の卵管と比較して顕著な増加が見られた。卵管上皮における  $E_2$  および  $P_4$  受容体の遺伝子発現は、卵管組織中ホルモン濃度と関連して、発情周期中で変化することが示された。また、Days 2-4 および 5-7 において、同側と反対側の卵管の間で、受容体の発現に差異が認められた。卵管膨大部と峡部との間で、卵管組織中の  $E_2$  および  $P_4$  濃度にはほとんど差異はみられなかったが、ホルモン受容体の遺伝子発現は、大きく異なっていた。これらのことから、卵管局所の内分泌環境は、発情周期、排卵前卵胞や黄体との位置関係および卵管部位によって異なる特徴を持つことが明らかとなった。

第3章では、第2章で調べた卵管局所の内分泌環境と卵管上皮の分泌機能との関連を検証するために、発情周期中の卵管上皮における分泌タンパク質 (HSP90B1, HSPA5, HSPA8, OVGPI1 および PDIA4) の遺伝子発現を調べた。さらに、Days 19-21 における排卵前卵胞の  $E_2$  産生能が、卵管組織中  $E_2$  濃度と卵管上皮における分泌タンパク質の遺伝子発現に及ぼす影響を評価した。卵管分泌物の遺伝子発現は排卵前後の時期で増加し、特に HSP90B1, HSPA5 および PDIA4 mRNA 発現は、Days 19-21 の卵管膨大部で顕著に増加した。さらに、排卵前卵胞の卵胞液中  $E_2$  濃度が高い群では、 $E_2$  濃度が低い群よりも卵管組織中  $E_2$  濃度および卵管

膨大部における HSP90B1 と HSPA5 mRNA 発現が高かった。これらのことから、排卵前卵胞の  $E_2$  産生に起因する卵管組織中  $E_2$  濃度の増加によって、卵管上皮の分泌タンパク質の産生が促進されることが示唆された。一方で、同側と反対側の卵管の間で、分泌タンパク質の遺伝子発現に差異が見られなかったことから、排卵前卵胞や黄体との位置関係に基づく卵管局所の内分泌環境の差異は、分泌タンパク質の発現には影響しないことが示唆された。また、卵管膨大部と峽部の間で、分泌タンパク質の遺伝子発現に差異が認められたことから、卵管部位によって分泌機能が異なることが示唆された。

第4章では、組織学的手法を用いて、発情周期 (Days 0-1, 2-4, 5-7, 9-13, 15-17, 19-21) における卵管組織中性ステロイドホルモン濃度と卵管上皮の分泌活性との関連を調べた。Periodic acid-Schiff 染色および Alcian blue 染色の結果、卵管膨大部において酸性ムコ蛋白を含む分泌顆粒 (酸性分泌顆粒) が多数認められた一方で、峽部では分泌顆粒がほとんどみられなかった。このことから、膨大部の卵管上皮が高い分泌活性を持つことが示唆された。卵管膨大部の卵管上皮における酸性分泌顆粒は、卵管組織中  $E_2$  濃度が上昇する Days 19-21 から増加する傾向が見られ、排卵後の時期で最も顕著に観察された。その後、卵管組織中  $P_4$  濃度が増加する Days 2-4 から Days 15-17 にかけて酸性分泌顆粒が減少したことから、卵管上皮の分泌活性は卵管局所の  $E_2$  によって促進され、 $P_4$  によって抑制されると考えられた。一方、同側と反対側の卵管の間で、卵管上皮における酸性分泌顆粒の量に差異が認められなかったことから、排卵前卵胞や黄体との位置関係は、卵管上皮の分泌活性に影響しないことが示唆された。

本研究の結果から、牛卵管膨大部の卵管上皮は高い分泌活性を持つことが示され、その分泌機能は卵管局所の性ステロイドホルモンによって制御されることを明らかにした。また、卵管上皮の分泌機能の制御には、卵巣内構造物との位置関係よりも発情周期中の卵管局所内分泌環境の変化が重要であると考えられた。

# 学 位 論 文 要 約

氏 名 HAZANO, Ken

題 目 Studies on Regulation of Secretory Function of Oviductal Epithelium by Local Sex Steroid Hormones in Dairy Cows  
(乳牛における卵管局所の性ステロイドホルモンによる卵管上皮分泌機能制御に関する研究)

Oviduct in mammal plays important roles in establishment of suitable environment for fertilization and early embryonic development. Decreased oviductal function has been suggested as a factor in reducing the conception rate of dairy cows, emphasizing the necessity of elucidation of the regulatory mechanism of the bovine oviductal function. Although bovine oviductal functions are regulated by sex steroid hormones, detail of the local oviductal endocrine milieu and its involvement in the oviductal function are poorly understood. The objective of this study was to elucidate the regulatory mechanism of the bovine oviductal function. The relationship between the oviductal endocrine milieu and the secretory function of the oviductal epithelium was investigated in dairy cows.

In chapter 2, to characterize the oviductal local endocrine milieu during periovulatory phase, estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) and progesterone (P<sub>4</sub>) concentration in oviductal tissues and the gene expression of hormone receptors in the oviductal epithelium were examined using samples of Holstein cows collected at a slaughterhouse. Furthermore, effects of estrous cycle (Days 19 to 21 vs. 0 to 1 vs. 2 to 4 vs. 5 to 7) and oviductal side to preovulatory follicle or corpus luteum (ipsilateral vs. contralateral) on the oviductal hormone concentrations and gene expression were examined in the ampulla and isthmus. The increase of the oviductal E<sub>2</sub> concentration and the higher E<sub>2</sub> level in the ipsilateral oviduct than in the contralateral oviduct were observed on Days 19 to 21. The oviductal P<sub>4</sub> concentration increased on Days 2 to 4 and 5 to 7 and especially, the drastically high P<sub>4</sub> levels was observed in the ipsilateral oviduct compared with the contralateral oviduct. The gene expression of hormone receptors in the oviductal epithelium changed in the dependent manner of oviductal hormone concentration during estrous cycle. In addition, the mRNA expression of hormone receptor differed between the ipsilateral and contralateral oviduct on Days 2 to 4 and 5 to 7. There were differences in the mRNA expression of hormone receptor between the ampulla and isthmus, but not in the oviductal hormone concentration. These results indicated that the local endocrine environment of the bovine oviduct had different characteristics depending on the estrous cycle, the oviductal side (ipsilateral vs. contralateral), and the oviductal region (ampulla vs. isthmus).

In chapter 3, to examine the relationship between the oviductal local endocrine milieu and the oviductal secretory function, the gene expression of secretory proteins (HSP90B1, HSPA5, HSPA8, OVGPI1, and PDIA4) in oviductal epithelium was investigated during the estrous cycle. In addition, effects of the E<sub>2</sub> production activity of the preovulatory follicle on the oviductal E<sub>2</sub> concentration and the mRNA expression of secretory proteins were verified on Days 19 to 21. The gene expression of

secretory proteins increased on immediately before and after ovulation and especially, the conspicuously high levels of HSP90B1, HSPA5, and PDIA4 mRNA expression were observed on Days 19 to 21. Present results showed that the oviductal E<sub>2</sub> concentration and mRNA expression of HSP90B1 and HSPA5 in the epithelium of the ampulla were higher in the cows with high follicular E<sub>2</sub> concentration than those with low follicular E<sub>2</sub> concentration on Days 19 to 21. These results suggested that high E<sub>2</sub> production activity of preovulatory follicle increased the oviductal E<sub>2</sub> concentration, resulting in promoted mRNA expression of secretory protein in the oviductal epithelium. In this study, there was no difference in mRNA expression of secretory protein between ipsilateral and contralateral oviduct. This suggests that the oviductal side does not affect expressions of secretory protein in the oviductal epithelium. Besides, the gene expression of secretory protein differed between the ampulla and isthmus, indicating difference in the secretory activity between oviductal regions.

In chapter 4, the relationship between the local endocrine milieu and the oviductal secretory function were investigated during the estrous cycle (Days 0 to 1, 2 to 4, 5 to 7, 9 to 13, 15 to 17, and 19 to 21). Periodic acid-Schiff and Alcian blue staining showed that the oviductal epithelium included a lot of secretory granules including acid mucoprotein in the ampulla but not in the isthmus, indicating that the ampulla has higher secretory activity than the isthmus. The content of the secretory granules in the oviductal epithelium gradually increased from Days 19 to 21 to Days 0 to 1 and then, decreased from Days 2 to 4 to Days 15 to 17. Therefore, it was suggested that the secretory activity of oviductal epithelium was promoted by E<sub>2</sub> and suppressed by P<sub>4</sub>. Since there was no difference in the content of the secretory granules in the oviductal epithelium between the ipsilateral and contralateral oviducts, the oviductal side may not affect the secretory activity of the oviductal epithelium.

This study revealed that the secretory function of the bovine ampulla was regulated by the local endocrine milieu. Furthermore, it was suggested that changes in the local endocrine milieu during the estrous cycle are more important for the regulation of the secretory function than the oviductal side.