

氏名 (本 (国) 籍)	碓 野 健 (大阪府)		
主指導教員氏名	帯広畜産大学 教授 松 井 基 純		
学位の種類	博士 (獣医学)		
学位記番号	獣医博甲第581号		
学位授与年月日	令和3年3月15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	帯広畜産大学		
学位論文題目	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		
審査委員	主査	帯広畜産大学 教授	南 保 泰 雄
	副査	帯広畜産大学 教授	松 井 基 純
	副査	岩手大学 教授	高 橋 透
	副査	東京農工大学 教授	田 中 知 己
	副査	岐阜大学 教授	村 瀬 哲 磨

学位論文の内容の要旨

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ことが知られており、ウシの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明らかになっている。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。本学位論文において、学位申請者は、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を調べた。ホルスタイン種経産牛の屠畜材料を用い、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) およびプロゲステロン (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巣との位置関係 (同側 vs 反対側) による比較を行った。卵管組織中 E_2 濃度は、Days 19-21 で増加した。排卵卵胞と同側の卵管では、反対側に比べ 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、発情周期中で変化し、卵管組織中ホルモン濃度と関連することが示された。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。以上の成績から、申請者は、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を示した。

第3章において、第2章で明らかにし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, OVGP1 および PDIA4）の遺伝子発現を調べた。次に、Days 19-21 における排卵前卵胞の卵胞液中 E_2 濃度が、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。卵管分泌タンパク質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。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。一方、排卵前卵胞や黄体と同側あるいは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は見られなかった。以上の成績から、申請者は、排卵前卵胞の E_2 産生に起因する卵管組織中 E_2 濃度の増加により、卵管上皮の分泌タンパク質の産生が促進されることを明らかにした。さらに、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を示した。

第4章では、申請者は、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明らかにするために、Periodic acid-Schiff 染色および Alcian blue 染色を用いた組織学的手法により、発情周期（Days 0-1, 2-4, 5-7, 9-13, 15-17, 19-21）における卵管上皮の分泌顆粒を観察した。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）が多数認められたが、卵管峡部では分泌顆粒がほとんどみられなかった。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。排卵前卵胞や黄体と同側あるいは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は認められなかった。以上の成績から、申請者は、膨大部の卵管上皮が高い分泌活性を持つことを明らかにし、そ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推察した。さらに、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を示した。

本学位論文は、ウシの卵管膨大部の卵管上皮は高い分泌活性を持つことが示し、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、排卵前卵胞や黄体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ことを示した。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、ウシ卵管機能の制御機構の解明を目的として、卵管局所の内分泌環境と卵管上皮の分泌機能との関連について、内分泌学的、分子生物学的および組織学的な手法を用いて解析した研究である。

第2章では、卵管組織中のエストロゲン (E_2) およびプロゲステロン (P_4) 濃度、卵管上皮におけるこれらのホルモン受容体の遺伝子発現が、発情周期や排卵前卵胞および黄体との位置関係に依存して変化することを示した。このことから、ウシ卵管局所の内分泌環境は、発情周期および卵巣内構造物との位置関係により異なる特徴を持つことが明らかにされた。

第3章では、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明らかにするために、卵管上皮における分泌タンパク質の発現を調べた。卵管上皮で産生される分泌タンパク質であるHSP90B1, HSPA5およびPDIA4の遺伝子発現は、卵胞期の卵管膨大部で顕著に増加し、卵管組織中のE₂濃度と正の相関が認められた。さらに、排卵前卵胞の卵胞液中E₂濃度が高い群では、低い群よりも卵管組織中E₂濃度が高く、卵管膨大部におけるHSP90B1とHSPA5 mRNA発現が高いことが示された。これらの知見から、排卵前卵胞のE₂産生に起因する卵管組織中E₂濃度の増加が、卵管上皮の分泌タンパク質の産生を亢進することが明らかにされた。

第4章では、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明らかにするために、組織学的手法を用い、発情周期中の卵管上皮に存在する分泌顆粒を観察した。酸性ムコ蛋白を含む分泌顆粒（酸性分泌顆粒）が、卵管膨大部で多数存在したが、峡部ではほとんどみられなかった。膨大部の卵管上皮における酸性分泌顆粒は、卵管組織中E₂濃度の上昇とともに、卵胞期に増加する傾向が見られ、排卵後に最も顕著に観察された。その後、卵管組織中P₄濃度が増加する黄体形成期から黄体期にかけて酸性分泌顆粒が減少した。これらの知見から、膨大部の卵管上皮は高い分泌活性を持ち、卵管局所のE₂によって促進され、P₄によって抑制されることが推察された。

本研究により、ウシの卵管膨大部の卵管上皮は高い分泌活性を持ち、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が明らかになった。これらの知見はウシの繁殖生理学の進展に寄与するものであり、今後のウシの繁殖成績改善につながる基礎的な情報として期待される。

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価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Local sex steroid hormone milieu in the bovine oviduct ipsilateral and contralateral to preovulatory follicle or corpus luteum during the periovulatory phase
著 者 名 : Hazano, K., Haneda, S., Kayano, M. and Matsui, M.
学術雑誌名 : Domestic Animal Endocrinology
巻・号・頁・発行年 : 74: 106515, 2021

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Possible roles of local oviductal estradiol-17β in luteal formation phase on the function of bovine oviductal epithelium
著 者 名 : Hazano, K., Haneda, S., Kayano, M. and Matsui, M.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 81(12):1817-1823, 2019
- 2) 題 目 : Effects of hCG administration on corpus luteum development and plasma sex steroid hormone concentration in beef heifers differ according to the locational relationships of the original corpus luteum and the first-wave dominant follicle

著者名 : Hazano, K., Haneda, S., Kayano, M., Miura, R. and Matsui, M.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 82(8):1219-1225, 2020