

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06436

研究課題名(和文)ウシ抗ミュラー管ホルモンの繁殖生理制御分子としての役割

研究課題名(英文) Roles of bovine anti-Mullerian hormone as a regulatory molecule in reproductive physiology

研究代表者

平山 博樹 (Hirayama, Hiroki)

東京農業大学・生物産業学部・教授

研究者番号：60390861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、卵胞の顆粒層細胞の機能制御分子として知られる抗ミュラー管ホルモン(AMH)が、ウシの黄体および子宮内膜上皮細胞にも局在することを明らかにした。黄体組織ではAMHとその受容体は黄体細胞で検出され、AMHの活性部位であるC末端側のペプチドの量が黄体ステージによって有意に変動した。これらから、AMHが黄体機能の制御に何らかの役割を果たすものと考えられた。また、子宮内膜の上皮細胞においてもAMHとその受容体が共局在しており、その濃度は卵巣組織と高い相関を示したことから、子宮内膜のAMHシグナルが主要なAMH産生組織である卵胞のAMH分泌量によって内分泌機構で制御されていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウシの人工授精による受胎率は近年大きく低下しており、我が国のみならず先進国では共通の問題となっている。本研究は、妊娠の成立と維持に重要な役割を果たす黄体と子宮内膜におけるAMHシグナルの存在を示した点に意義があると考えられる。AMHは、多能性サイトカインであるTGF-スーパーファミリーに属しており、本研究の成果はAMHシグナルが黄体や子宮内膜の機能制御に関与することを示唆している。今後の研究によりAMHの新たな役割が解明され、ウシの繁殖成績の向上や新たな繁殖管理技術の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that anti-Mullerian hormone (AMH), a regulatory molecule in granulosa cells of the ovary, localizes in the corpus luteum and endometrium in cattle. In luteal tissue, both AMH and its specific receptor (AMHR2) were detected in luteal cells. The concentration of the C-terminal region of AMH, which is an active region binding to the receptor, increased after the mid-stage compared to the developmental stage. These findings suggest that AMH plays a role in the functional regulation of bovine luteal cells. Additionally, AMH and AMHR2 were found to co-localize in endometrial epithelial cells. The concentration of AMH in the endometrial tissue was significantly correlated with its concentration in the ovarian cortex. These results suggest that AMH signaling may be regulated by the amount of AMH secretion from ovarian tissue through an endocrine mechanism.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ウシ AMH 卵巣 黄体 子宮内膜

## 1. 研究開始当初の背景

ウシの胎子期に形成される原始卵胞の数(卵巣予備能)は個体差が大きく、出生後次第に減少する。卵巣予備能は、超音波画像診断で測定した胞状卵胞数(Antral follicle count: AFC)や胞状卵胞の顆粒層細胞から分泌される抗ミュラー管ホルモン(AMH)の血中濃度から推定できる。近年、この卵巣予備能の多寡が繁殖能力の指標として注目されている。卵巣予備能の高い個体は人工授精による受胎率が高く、胚死滅や繁殖障害が少ない(Ribeiro et al., 2014 J Dairy Sci 97:6888-6900; Jimenez-Krassel et al., 2015 J Dairy Sci 98:3036-3045)。このことから、卵巣予備能が受胎性に影響を及ぼすメカニズムの解明は、ウシの受胎能力改善のための新たな知見となると期待される。

AMHはトランスフォーミング増殖因子(TGF)- $\beta$ スーパーファミリーに属する糖タンパクであり、細胞増殖、細胞死、細胞分化など多様な生理機能を持つと推測される。AMHは卵巣予備能の有用なバイオマーカーとして盛んに研究されている一方で、繁殖生理に直接関わる機能性分子としての役割は必ずしも明らかではない。卵巣では、胞状卵胞から分泌されたAMHが周辺の原始卵胞の活性化を抑制し、卵巣予備能の急激な低下を防ぐことがわかっている。ところが、高AMH個体は活性化後の前胞状卵胞の発育が良好で、結果的にAFCが多くなる。このことから、前胞状卵胞の発育段階ごとにAMHの役割を解明する必要がある。さらに、排卵後の顆粒層細胞は妊娠の成立に必須の黄体へと変化するが、AMHと黄体形成や黄体機能の関係は研究されておらず、その解明が求められる。

発情周期にあわせて生じる子宮内膜リモデリングは卵巣ホルモンや増殖因子による制御を受け、その異常は不受胎の大きな要因となる(Scolari et al., 2017 Reproduction 153:49-61)。ヒトでは、卵巣と同じくミュラー管由来組織である子宮内膜でAMH特異的受容体(AMHR2)が発現しており、子宮内膜は分泌型AMHの生理作用の影響を受けると推測されている(Wang et al., 2009 Fertil Steril 91:1195-1203)。さらに、ヒトの子宮がん細胞や子宮内膜症の病巣ではAMHの自己分泌が上昇し、細胞増殖を抑制する。このことから、組織リモデリングの代表的な制御因子のひとつであるTGF- $\beta$ と類似した構造を持つAMHが、子宮内膜リモデリングなどの機能制御に役割を果たすことが強く示唆され、その解明が求められる。

## 2. 研究の目的

本研究は、AMHの繁殖機能制御分子としての役割を見だし、AMHシグナルを活用した新たな受胎性向上技術を開発することを最終的な目的とし、以下の3点の研究に取り組んだ。

- (1) AMHがウシ前胞状卵胞発育に及ぼす影響を明らかにする。
- (2) ウシ黄体におけるAMHシグナル伝達経路の存在を明らかにする。
- (3) 子宮内膜におけるAMHシグナル伝達経路の存在を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 組織内AMH濃度

本研究では、食肉処理場由来の雌性生殖器を用い、同一個体の卵巣皮質、黄体および子宮内膜のAMH濃度をELISA法で測定した。

### (2) 前胞状卵胞の発育に対するAMHの作用

食肉処理場由来の卵巣からの前胞状卵胞の採取は、Ito et al. (2000 In Vito Cell Dev Biol

36:235-240; 2002 Biol Reprod 67:1099-1105) の方法に従った。採取した二次卵胞はコラーゲンゲルを用いた 3D 培養を行い、20ng/ml インスリンを添加した無血清条件下で 12 日間培養した。ヒト組換え AMH の添加濃度は、100ng/ml とした。卵胞発育は、3 日毎の直径計測により評価した。

### (3) 黄体における AMH シグナル伝達経路

食肉処理場由来の卵巣から黄体組織を採取した。黄体ステージは、排卵日を Day 0 として初期 (Day 2-3)、形成期 (Day 5-7)、中期 (Day 9-12)、後期 (Day 14-17) および退行期 (Day 19-21) に分類した。黄体における AMH および AMHR2 の局在は、蛍光免疫組織化学で分析した。各黄体ステージにおける組織内 AMH 量は、ウェスタンブロッティングで分析した。

### (4) 子宮内膜における AMH シグナル伝達経路

食肉処理場由来の子宮から子宮内膜組織を採取した。発情周期は、黄体ステージに従い、初期 (Day 2-3)、形成期 (Day 5-7)、中期 (Day 9-12)、後期 (Day 14-17) および退行期 (Day 19-21) に分類した。子宮内膜組織における AMH 量はウェスタンブロッティングで分析した。

## 4. 研究成果

### (1) 組織内 AMH 濃度

卵巣皮質における組織内 AMH 濃度は、黄体、子宮内膜宮阜および子宮内膜宮阜間部に比較して有意に高かった (図 1)。黄体は子宮内膜宮阜および子宮内膜宮阜間部に比較して組織内 AMH 濃度が高い傾向を示したが、これらの組織間に有意差は認められなかった。この結果は、卵巣の顆粒層細胞が AMH の主要な産生組織であるという既存の報告と一致した (Iwase et al., 2013)。本研究で使用した ELISA キットでは、活性型アイソフォームの AMH が検出される。ウシの黄体および子宮内膜組織における活性型 AMH の検出は、本報告が初となる。

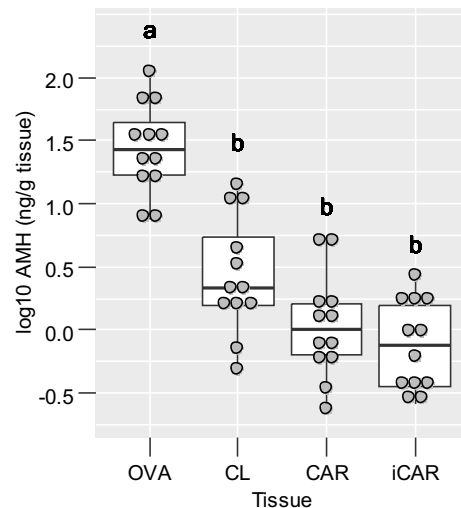


図 1 ウシ組織における活性型 AMH 濃度  
OVA: 卵巣皮質 CL: 黄体 CAR: 子宮内膜宮阜  
iCAR: 子宮内膜宮阜間

### (2) 前胞状卵胞の発育に対する AMH の作用

AMH 添加区における培養 6 日目以降の卵胞直径は、対照区に比較して有意に減少した。(図 2)。AMH 添加区における培養 12 日目の卵胞直径は、0 日目に比較して有意に減少した。

AMH は、マウス二次卵胞の発育を抑制する一方で、カニクイザルおよびラットの二次卵胞の発育を促進した (Durlinger et al., 2001; Mcgee et al., 2000; Xu J et al., 2017)。ウシでは、これまでに二次卵胞の発育に対する AMH の作用は報告されていない。本研究では、AMH はマウスの場合と同様にウシの二次卵胞の発育を抑制することが示唆された。

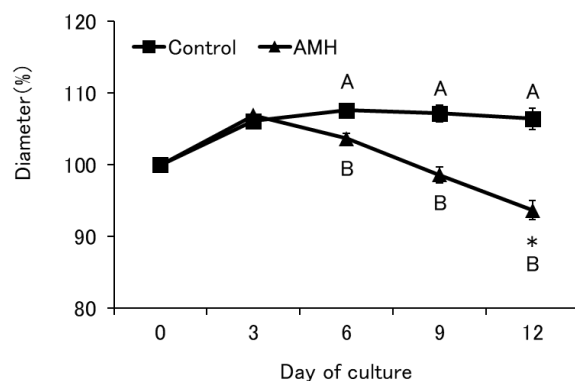


図 2 ウシ二次卵胞の体外発育に対する AMH の作用

### (3) 黄体における AMH シグナル伝達経路

ウシ黄体では、発情周期を通して黄体細胞における AMH と AMHR2 の共局在が認められた (図 3)。AMH の N 末端領域 (AMH<sub>N</sub>) の量は、黄体ステージの間で変化しなかった (図 4)。しかし、C 末端領域 (AMH<sub>C</sub>) の量は、形成期以降に増加し、後期に最高値を示した。

これらの結果から、ウシ黄体細胞では AMH シグナルの伝達経路が存在することが示唆された。AMH は前駆体として生産された後に酵素で切断され、AMH を安定化させる AMH<sub>N</sub> と受容体への結合能を有する AMH<sub>C</sub> とに分かれる。黄体ステージの変化に伴う AMH<sub>C</sub> 量の変化は、AMH シグナルが黄体細胞の機能制御に関与することを示唆した。

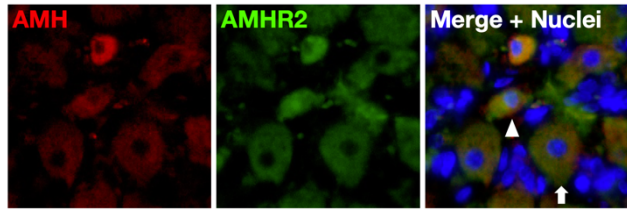


図 3 ウシ黄体における AMH および AMHR2 局在  
矢印：大型黄体細胞 矢頭：小型黄体細胞

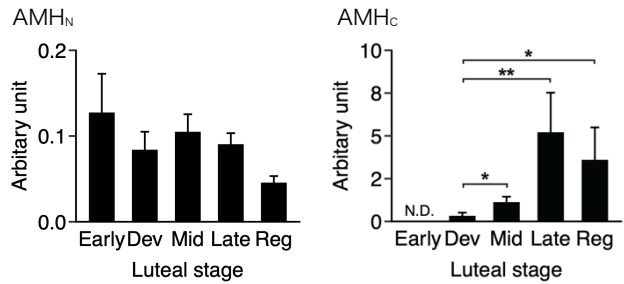


図 4 ウシ黄体のステージと AMH 量の関係  
Early: 初期 Dev: 形成期 Mid: 中期 Late: 後期 Reg: 退行期

### (4) 子宮内膜における AMH シグナル伝達経路

子宮内膜における AMH 量は黄体中期で高くなる傾向を示したものの、発情周期を通して大きな変動はなかった (図 5)。子宮内膜の AMH 量は個体差が大きく、AMH<sub>N</sub> ( $r=0.799$ ,  $P<0.001$ ) および AMH<sub>C</sub> ( $r=0.886$ ,  $P<0.001$ ) とともに卵巣皮質の AMH 量と高い相関を示した。AMH<sub>N</sub>、AMH<sub>C</sub> および AMHR2 は、いずれも子宮内膜および子宮腺の上皮細胞で検出された (図 6)。

これらの結果から、AMH が子宮内膜における上皮系細胞の機能制御に関与することが示唆された。また、子宮内膜の AMH 量は卵巣由来の AMH によって内分泌機構で制御されると考えられた。卵巣由来の AMH 量は個体差が大きいことから、今後の研究によって AMH 産生能力と子宮内膜機能の関係を明らかにする必要がある。

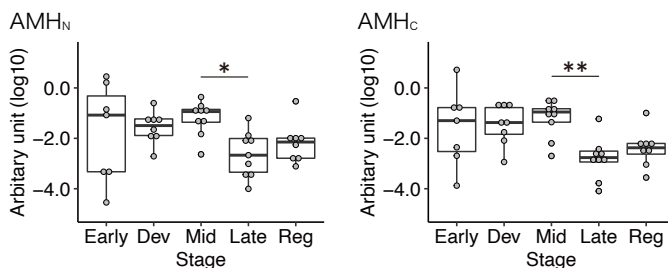


図 5 発情周期に伴う子宮内膜における AMH 量の変化  
Early: 初期 Dev: 形成期 Mid: 中期 Late: 後期 Reg: 退行期

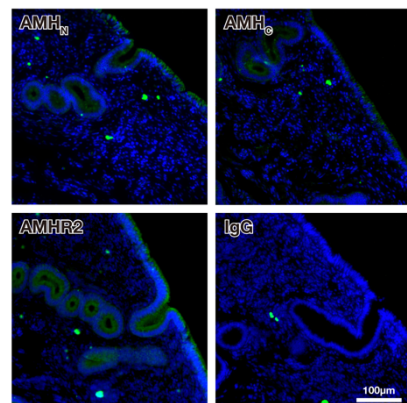


図 6 子宮内膜における AMH および AMHR2 の局在

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水野琉瑠, 作本亮介, 澤井健, 古山敬祐, 大久保倫子, 相馬幸作, 平山博樹
2. 発表標題 ウシ黄体における抗ミューラー管ホルモン量と発情周期の関係
3. 学会等名 日本繁殖生物学会第116回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水野琉瑠, 石上彩葉1, 作本亮介, 大久保倫子, 相馬幸作, 平山博樹
2. 発表標題 培養ウシ黄体細胞におけるトランスフォーミング増殖因子- スーパーファミリーの作用
3. 学会等名 日本繁殖生物学会第117回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 石上彩葉, 水野琉瑠, 大久保倫子, 相馬幸作, 平山博樹
2. 発表標題 抗ミューラー管ホルモンがウシ子宮内膜上皮細胞の上皮間葉系転換に及ぼす影響
3. 学会等名 日本繁殖生物学会第117回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木美玲, 神崎野道2, 小野楓美花2, 山口凜, 澤井健, 大久保倫子, 相馬幸作, 平山博樹
2. 発表標題 ウシ卵巢皮質および子宮内膜における抗ミューラー管ホルモン濃度
3. 学会等名 第4回北海道牛受精卵移植研究会研究発表大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木美玲, 神崎野道, 小野楓美花, 山口凜, 澤井健, 大久保倫子, 相馬幸作, 平山博樹
2. 発表標題 ウシ子宮内膜に存在する抗ミュラー管ホルモンおよびその受容体の量的特徴
3. 学会等名 日本繁殖生物学会第115回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口凜, 作本亮介, 松浦馨, 澤井健, 古山敬祐, 大久保倫子, 相馬幸作, 平山博樹
2. 発表標題 ウシ黄体における抗ミュラー管ホルモンおよび受容体発現
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	澤井 健  (Sawai Ken)  (90390864)	岩手大学・農学部・教授   (11201)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	作本 亮介  (Sakumoto Ryosuke)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・研究推進室長   (82111)	
研究 協力者	古山 敬祐  (Koyama Keisuke)	大阪公立大学・大学院 獣医学研究科・准教授   (24405)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------