

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18771

研究課題名(和文) 卵管内環境をコーディネートするアクチビンA：受精および妊娠成立までの局所作用

研究課題名(英文) Activin A as a coordinator of oviductal environment: local action for successful fertilization and establishment of pregnancy in oviducts

研究代表者

山本 ゆき (Yamamoto, Yuki)

岡山大学・環境生命科学研究科・助教

研究者番号：20645345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物において、受精や初期胚発育が正常に進行するために卵管内の環境は緻密に調節されている。本研究では、局所因子アクチビンAが恒常的にウシ卵管内腔に存在し、上皮細胞がアクチビンAの標的細胞であること、卵管峡部においては受容体の遺伝子発現が排卵日に低下することを見出した。また、培養峡部上皮細胞のアクチビンシグナル伝達を阻害するとアポトーシス誘導因子の遺伝子発現が上昇することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Environment in mammalian oviducts is highly regulated by many endocrine/paracrine/autocrine factors for fertilization and early embryonic development. The present study has revealed that 1) activin A, a local factor, is constantly present in oviductal lumen, 2) oviductal epithelial cells are target of activin A, and 3) mRNA expression of activin receptor is lowest on a day of ovulation in bovine oviduct. In addition, 4) inhibition of activin signal transduction increased pro-apoptotic gene expression in isthmic epithelial cells of bovine oviduct.

研究分野：家畜繁殖 生殖生理学

キーワード：卵管 家畜 アクチビン アポトーシス 上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の卵管内では、受精、初期胚発生、配偶子および胚の輸送といった様々な現象が排卵後わずか 3-4 日の間に進行し、排卵直前には精子が卵管峡部に進入し受精能を獲得する。これらの現象が正常に進行し、妊娠が成立するためには、卵管内環境が緻密に調節されている必要がある。

卵管液中には卵管内環境を調節する様々な因子が存在し、配偶子や初期胚に直接作用するものと、卵管細胞に作用し分泌能やその他の細胞機能を調節することで間接的に受精や初期胚発育に関与するものがある。アクチビン A は胚の分化誘導因子として同定され、他にも下垂体における卵胞刺激ホルモン分泌の促進、細胞の増殖分化刺激、顆粒層細胞の性腺刺激ホルモン受容体発現の増加など多様な作用を発揮する。ウシ卵管においてもアクチビン A の発現は確認されていたが、その作用は明らかでない。近年、ウシの低受胎や早期胚死滅が問題となっておりその改善は急務であるが、妊娠成立に必須の器官である卵管の機能異常に起因する不妊症の情報はない。アクチビン A のウシ卵管内における役割が解明されれば、低受胎改善のための有用な新知見となりうる。

2. 研究の目的

アクチビン A は配偶子、初期胚、卵管細胞と広範囲に作用する可能性が考えられる。本研究では、アクチビン A は卵管内の環境を調節する因子の一つであると仮説を立て、ウシ卵管における局所的役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) ウシ卵管サンプルの採取

岡山県内の食肉センターで採取したウシ卵管を、卵巣ならびに子宮の肉眼的所見により各発情周期ステージ (排卵日: Day 0、黄体初期: Days 2-3、形成期: Days 5-6、中期: Days 8-12、後期: Days 15-17、卵胞期: Days 19-21) に分類した。不要な部分を切除した後に膨大部と峡部に分け、卵管液サンプル (タンパク質解析)、組織サンプル (タンパク質及び遺伝子解析)、単離細胞 (細胞培養実験) をそれぞれ回収し、以下の実験に用いた。

2) 実験デザイン

実験 1: 卵管組織および単離上皮・間質細胞におけるアクチビン関連因子の発現

各ステージの卵管液中において、アクチビン A を構成するインヒビン β A (INHBA) タンパク質を、ウェスタンブロッティングを用いて検出した。また、上皮及び間質細胞を単

離・純粋培養した後にタンパク質を抽出し、アクチビン受容体の構成因子 (ACVR1B, ACVR2A) とシグナル因子 (Smad2/3) の発現の有無を検討した。

実験 2: 卵管組織におけるアクチビン A 及びアクチビン受容体の遺伝子発現

各発情周期ステージの卵管組織から RNA を採取し、定量的 RT-PCR 法によって INHBA, ACVR1B, ACVR2A の mRNA 発現量を解析した。

実験 3: 卵管上皮細胞においてアクチビンシグナルに発現が制御される遺伝子の探索

膨大部及び峡部から単離した上皮細胞を培養し、アクチビン (10 ng/ml)、フォリスタチン (アクチビン A 阻害因子, 10 ng/ml)、SB 431542 (ACVR1B 作用阻害剤, 5 μ M) を単独または組み合わせで添加し、4 時間培養した後に RNA を抽出してアクチビンシグナルに制御される遺伝子を探索した。

3) 統計解析

定量的 RT-PCR は $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法 (実験 2) およびスタンダードカーブ法 (実験 3) にて解析した。多群間における有意差の有無は Kruskal-Wallis test および Dunn's multiple comparisons test (実験 2)、Friedman test および Dunn's multiple comparisons test (実験 3) を用いて解析した。いずれの統計手法においても $P < 0.05$ である場合に統計学的に有意差があるとみなした。

4. 研究成果

実験 1.

1) 卵管液中におけるアクチビン A の検出

膨大部および峡部ともに、全発情周期ステージの卵管液サンプル INHBA の抗体に反応するタンパク質のバンド (26 kDa 付近) が確認された。これより、アクチビン A はウシ卵管において恒常的に存在することが示された。

2) 培養卵管上皮および培養卵管間質細胞におけるアクチビン受容体構成因子とシグナルタンパク質の検出

卵管におけるアクチビン A のターゲットを決定するため、単離した培養上皮および間質細胞におけるアクチビン受容体 (ActR1B, ActR2A) およびシグナルタンパク質 (Smad2/3) の検出を行なった。その結果、卵管上皮細胞ではすべてのタンパク質が検出されたのに対し、間質細胞では明瞭な陽性反応は認められなかった (図 1)。

アクチビン A は上記の因子が協調して機能を発揮することから、ウシ卵管におけるアクチビン A の標的は上皮細胞である可能性が示された。

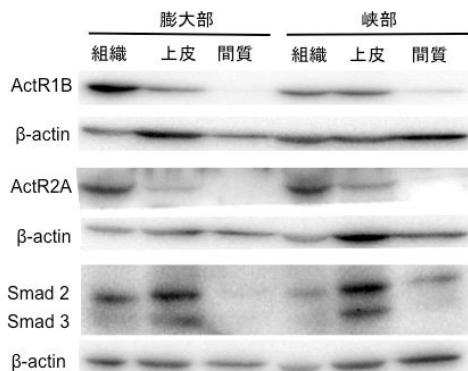


図 1. 卵管上皮および間質細胞におけるアクチビン受容体ならびにシグナル因子 Smad2/3 のタンパク質発現

実験 2:

膨大部組織において、*INHBA* 遺伝子発現は発情周期ステージ間で差が認められなかった。一方峡部組織において、*INHBA* 遺伝子発現は排卵日に黄体期中期および後期と比較して有意に高かった。アクチビン受容体に関して、膨大部では発現に周期的変化は認められなかった一方、峡部においては *ActR2A* 発現が排卵日に黄体期中期と比較して有意に低かった (図 2)。

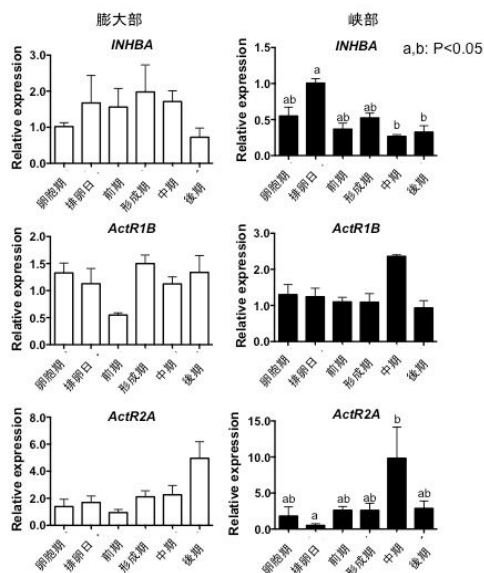


図 2: 各発情周期ステージにおける膨大部及び峡部組織における *INHBA*, *ActR1B*, *ActR2A* の遺伝子発現

以上より、峡部では排卵日にアクチビン A の産生が上昇する一方で卵管上皮細胞における感受性が低下する可能性が示された。

実験 3:

さまざまな細胞機能に關与する遺伝子発現を解析したところ、峡部上皮細胞において、フォリスタチン単独およびアクチビン A との組み合わせ、ならびに SB431542 単独添加によって *BCL2* (抗アポトーシス因子)/*BAX* (アポトーシス促進因子) の遺伝子発現の比が有意に減少した (図 3)。

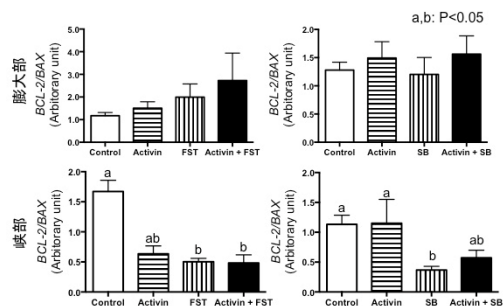


図 3. アクチビン A およびフォリスタチンまたは SB431542 が胸部上皮細胞の *BCL-2/BAX* 比に与える影響

まとめ:

以上より、ウシ卵管峡部においてアクチビン A は恒常的に存在し、上皮細胞が標的細胞であることが示された。また、峡部におけるアクチビン A 産生量は排卵日で最も多くなる可能性が示された一方、卵管峡部組織における受容体遺伝子発現量の結果から、上皮細胞のアクチビン A に対する感受性は排卵日に最も低くなると考えられた。培養上皮細胞を用いた実験では、アクチビンの作用を阻害すると *BCL-2/BAX* が低下しアポトーシスの促進に傾くことが示唆された。卵管胸部上皮細胞では、黄体期初期にアポトーシス細胞の数が增加することが確認されている (未発表データ)。排卵日にアクチビンの感受性が低下した細胞において、アポトーシスが誘導されやすくなるのかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 山本ゆき、伊藤さやか、小林芳彦、木村康二、奥田潔、ウシ卵管峡部上皮細胞におけるアクチビンシグナルによるアポトーシス制御、日本繁殖生物学会第 109 会大会、平成 28 年 9 月 13 日、麻布大学 (相模原、神奈川)

2. Yuki Yamamoto, Sayaka Ito, Yoshihiko Kobayashi, Koji Kimura, Kiyoshi Okuda, Activin A and follistatin are possible regulators for cyclic apoptosis of bovine oviductal epithelium, 49th Annual Meeting of Society of Study for Reproduction, 平成 28 年 7 月 19 日、San Diego (アメリカ)

3. 山本ゆき、小林芳彦、小林 宙、木村康二、奥田 潔、ウシ卵管内における局所調節因子アクチピンの標的細胞、日本繁殖生物学会第 108 会大会、平成 27 年 9 月 18 日、宮崎大学 (宮崎、宮崎)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 ゆき (YAMAMOTO, Yuki)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・助教

研究者番号：20645345

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

奥田 潔 (OKUDA, Kiyoshi)

木村 康二 (KIMURA, Koji)