

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05041

研究課題名(和文) 卵管自動能を制御するペースメーカーとその機能発現機構の解明

研究課題名(英文) Generating and regulatory mechanisms of spontaneous contraction of oviducts

研究代表者

山本 ゆき (Yamamoto, Yuki)

岡山大学・環境生命科学研究所・助教

研究者番号：20645345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,300,000円

研究成果の概要(和文)：配偶子および初期胚の卵管内輸送に重要な自発収縮の発生制御機構について、ウシ卵管組織を用いて検討した。卵管組織において自発収縮を引き起こし、その活動性を制御する「ペースメーカー」を探索するため、自発的なカルシウムオシレーションを示すウシ卵管平滑筋細胞の培養系を確立した。カルシウム変動には複数のパターンが認められたことから、自発収縮には複数種類の平滑筋細胞が関与すること、その一部がペースメーカーである可能性が示された。次に卵管組織片を用いて収縮を検出し、収縮発生に重要な電気活動に関与するイオンチャンネルを決定した。さらに、ギャップジャンクションが組織内での刺激伝達に関与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではウシ卵管組織の自発収縮発生制御メカニズムの一端を初めて明らかにした。卵管の平滑筋収縮機能は妊娠の成立に必須であることが知られている。また、ヒトで起こる異所性妊娠(卵管内妊娠)には輸送異常が関与する。今後自発収縮の制御機構を検討することで、卵管の輸送能をターゲットにした家畜の繁殖制御技術や生殖補助医療技術の向上、異所性妊娠の予防法確立に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Spontaneous phasic contraction of mammalian oviducts is essential for the transport of gametes and embryos. We aimed to identify the mechanisms underlying spontaneous contractions in the bovine oviducts. We established the isolation and culture methods for oviductal smooth muscle cells showing spontaneous calcium oscillation to identify the endogenous pacemaker of oviductal contraction. Several dynamics patterns of intracellular calcium were observed. These results suggest multiple types of smooth muscle cell are involved in the spontaneous contraction of oviducts, and some of them might work as a pacemaker. The effects of ion channel and gap junction blockers on contraction of oviduct strips were investigated using the Magnus system. The results demonstrated that several ion channels contribute to the regulation of the contraction, and the signals required for contraction propagate via the gap junction.

研究分野：動物生殖生理学

キーワード：卵管 筋収縮 平滑筋細胞 イオンチャンネル カルシウム変動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、家畜の受胎率低下やヒトの不妊が世界的な課題となっている。卵管の異常は、受精障害・初期胚の卵管内死滅・卵管妊娠などの原因になりうるが、卵管機能研究はアプローチの難しさから他の雌性生殖器官と比べ停滞している。卵管は、配偶子を受精の場へ、初期胚を子宮へと輸送する役割を担う。この輸送能は、絨毛上皮細胞の絨毛運動と、平滑筋の律動的収縮による卵管運動からなる。特に、精子や初期胚が通過する峽部は発達した平滑筋層を有しており、卵管運動が輸送の主力であると考えられる。事実、マウスの卵管峽部の平滑筋収縮を停止させると精子輸送に異常が生じる [Ishikawa ら, 2016]。

卵管運動は排卵前後で活発になる。卵管は心臓や消化管と同様に、外部からの刺激を必要としない律動的自発収縮能「自動能」を有する。自動能は、自発的な脱分極を示す組織内在の「ペースメーカー」により制御されるが、ペースメーカーの異常は心疾患や消化機能障害の原因となる。平滑筋では、ペースメーカー細胞で発生する電気刺激が筋細胞に伝わり、筋細胞内カルシウム濃度が上昇して収縮が発生する。この一連の過程には様々なイオンチャネルが関与することが知られている。

卵管自動能の異常は不妊の原因となりうるが、現在その診断法や治療法は確立されていない。そのため、卵管運動の根源となる律動的自発収縮発生機序の解明が必須である。

2. 研究の目的

ウシ卵管自動能の発生制御機構を解明するため、1) 自動能発生の起源となるペースメーカー細胞の探索、2) 卵管自発収縮に関与するイオンチャネルの探索、3) 組織内刺激伝達メカニズムの検討 について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究に用いたウシ卵管組織は、岡山県内の食肉センターにて採取した。

- 1) ペースメーカー細胞は自ら脱分極し電気刺激を発生させる細胞であり、それに合わせて細胞内カルシウム変動が確認される。そこで、ウシ卵管平滑筋層の細胞を単離し、自発的なカルシウム変動が起こる培養系を確立した。細胞内カルシウムは Fluo4 を用いて観察した。各細胞の蛍光強度の変動パターンを ImageJ ソフトウェアを用いて解析し、ペースメーカーおよび平滑筋細胞の鑑別手法確立を検討した。
- 2) 5 mm 程のウシ卵管組織を用いて、マグヌス法にて収縮の頻度と振幅を検出した。各イオンチャネルの阻害剤を添加し、その影響を検討した。対象としたイオンチャネルは、カルシウムイオン供給経路：電位依存性カルシウムチャネル(VDCC)、小胞体カルシウム放出チャネル(イノシトール三リン酸受容体:IP3R、リアノジン受容体:RyR)、脱分極誘発：ナトリウムチャネル、クロライドチャネル、再分極および過分極関連チャネル：電位依存性カリウムチャネル(VDKC)およびカルシウム依存性カリウムチャネル(BK、SK)である。
- 3) 2)と同様にマグヌス法を用いて、細胞間結合に関与するギャップジャンクションの阻害剤が卵管組織の自発収縮に与える影響を検討した。

4. 研究成果

1) ペースメーカー細胞の探索

自発的細胞内カルシウム変動は細胞によって異なる頻度やパターンを示した。図 1 において、細胞 a,b は高頻度、細胞 c,d は中程度、細胞 e,f は低頻度の変動を示している。また、細胞 a,b/c,d/e, f はそれぞれ隣接している細胞であるが、一部または完全にカルシウム変動が同調している(網掛け部分) ケースが認められた。

さらに、細胞内カルシウム上昇には 2 種類のパターンが認められた。一つは、短時間(1, 2 秒)かけて細胞の端からもう一方の端へウェーブ状に蛍光強度が上昇し、もう一つは細胞全体で同じタイミングで上昇した。

また、培養プレートにおける細胞密度が低い状態(70%コンフルエント以下)ではほとんど確認できなかったのに対し、コンフルエントの状態では活発な変動を示す細胞の数が増加した。

この結果から、培養系において自発的なカルシウム変動が確認できたものの、変動パターンは多岐に及び、ペースメーカーの同定にまでは及ばなかった。平滑筋細胞自身も自発的変動を示すことから、卵管平滑筋細胞自身が周囲の細胞と協調し、ペースメーカーを行う可能性も考えられる。

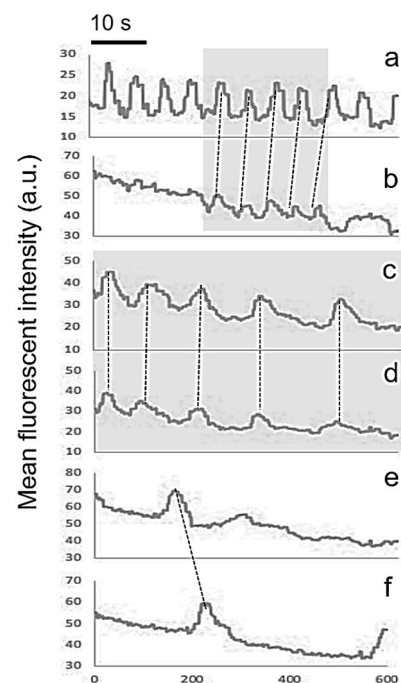


図 1: 培養卵管細胞内カルシウム変動パターン

2) 自発収縮に関するイオンチャネルの検討

カルシウム供給経路の検討 (図2)

VDCC 阻害剤を添加したところ、収縮の振幅が抑制され 15 分後には収縮の検出が不可能となった。一方、小胞体カルシウムチャネルの IP3R 阻害剤と RyR 阻害剤は、それぞれの単独投与では収縮に影響を及ぼさなかったが、同時に阻害すると収縮回数と振幅が減少し、添加後 30 分で収縮の検出が不可能となった。これらの結果から、VDCC を介した細胞外カルシウムの流入と小胞体からのカルシウム放出がどちらも自発収縮に必須であることが示された。

脱分極関連イオンチャネルの検討

ナトリウムチャネル阻害剤は収縮に影響を与えなかったが、クロライドチャネル阻害剤は収縮回数を減少させた。クロライドチャネルは消化管の自発的脱分極発生に必須であることが報告されている。ウシ卵管においても、脱分極の発生に関する可能性が示された。

再分極および過分極関連イオンチャネルの検討

VDCC 阻害は収縮回数および振幅を減少させた。BK 阻害は収縮回数を減少させた一方、BK と SK 阻害ではそれぞれ振幅が増加した。VDCC、BK、SK のいずれも再分極・過分極に関する可能性が示された。

3) 細胞間刺激伝達メカニズムの検討

消化管等において、収縮に必要な電気刺激はギャップジャンクションを通じて細胞間を伝導することが知られている。そこで、ギャップジャンクション阻害剤を作用させたウシ卵管の自発収縮に起こる変化を検討した。その結果、収縮回数および振幅のいずれも有意に減少した。

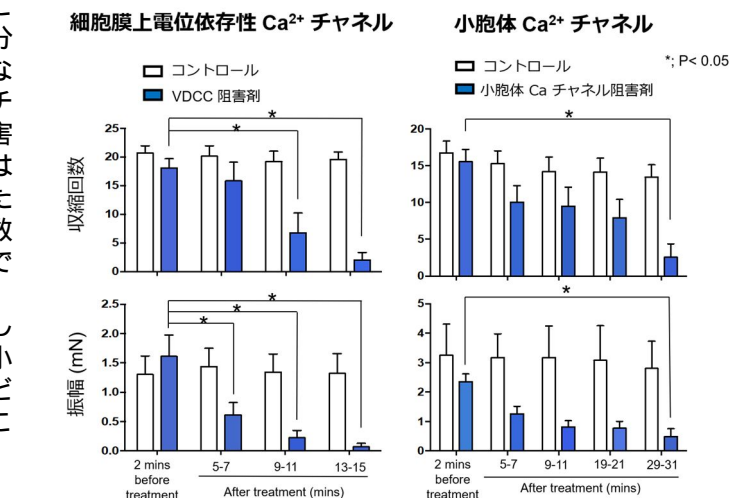


図2：ウシ卵管組織収縮に与えるカルシウムチャネル阻害剤の影響

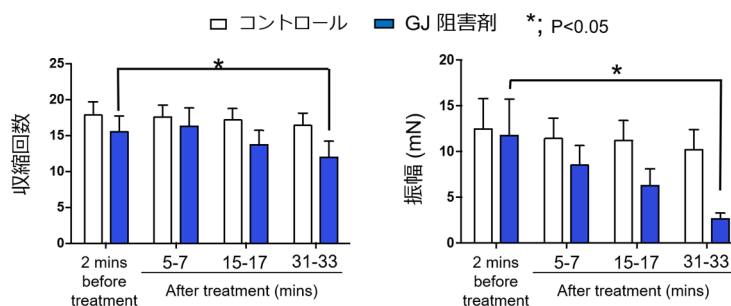


図3：ウシ卵管自発収縮に与えるギャップジャンクション阻害剤の影響

本研究は、ウシ卵管組織の自発収縮発生制御メカニズムの一端を初めて明らかにした。卵管の自発収縮機構は過去にマウスで主に検討されており、消化管同様のペースメーカー細胞の存在が示されている。しかし本研究では、マウスとウシでは卵管自発収縮のメカニズムが異なる点を示唆している。本研究は当初卵管ペースメーカーの同定を目的の一部に入れていたが、自発的カルシウム変動の結果から、平滑筋細胞自身がその機能を持つ可能性が考えられた。

さらに今後自発収縮の制御機構を検討することで、卵管の輸送能をターゲットにした家畜の繁殖制御技術や生殖補助医療技術の向上にも貢献することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshimoto Yuka, Nishie Takumi, Ito Sayaka, Kobayashi Yoshihiko, Yamamoto Yuki, Okuda Kiyoshi, Kimura Koji	4. 巻 84
2. 論文標題 Adrenomedullin regulates the speed of oviductal fluid flow in cattle	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 712~718
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mrd.22852	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Sayaka, Yamamoto Yuki, Kimura Koji.	4. 巻 47
2. 論文標題 Analysis of ciliogenesis process in the bovine oviduct based on immunohistochemical classification.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 1003-1012
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-019-05192-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Yuki, Ito Sayaka, Okuda Kiyoshi, Kimura Koji	4. 巻 -
2. 論文標題 Involvement of activin signal pathway in cyclic apoptosis of the oviductal isthmic epithelium in cows	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.theriogenology.2020.05.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 山本ゆき、黒川真帆、小川泰司、木村康二
2. 発表標題 ウシ卵管自発収縮に関するイオンチャンネルと平滑筋細胞内カルシウム変動の解析
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Yamamoto, Maho Kurokawa, Taiji Ogawa, Koji Kimura
2. 発表標題 Evaluation of the ion channel functions in phasic spontaneous contraction and characterization of Ca ²⁺ oscillation in bovine oviduct cultured smooth muscle cells
3. 学会等名 51st Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Yamamoto, Taiji Ogawa, Maho Kurokawa and Koji Kimura
2. 発表標題 Calcium and chloride ion current responsible for spontaneous contractions of bovine oviduct
3. 学会等名 The 4th World Congress of Reproductive Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本ゆき、黒川真帆、木村康二
2. 発表標題 ウシ卵管培養平滑筋細胞におけるカルシウムオシレーション制御メカニズムの探索
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Yamamoto, Maho Kurokawa, Taiji Ogawa, Koji Kimura
2. 発表標題 Generating mechanisms for spontaneous rhythmic contraction of bovine oviducts
3. 学会等名 4th International Conference on Endometritis in Cows and Mares and joint Polish-Japanese Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本ゆき、黒川真帆、小川泰司、木村康二
2. 発表標題 卵管自発収縮にかかわるイオンチャネルと培養平滑筋細胞内カルシウム変動
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019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
研究協力者	木村 康二 (Kimura Koji)	岡山大学・環境生命科学研究科・教授 (15301)	