

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 05 月 11 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2009～2011
課題番号：	21590243
研究課題名（和文）	性ホルモンによる卵管上皮線毛運動の調節機構の研究
研究課題名（英文）	Regulation of ciliary beat frequency by sex hormones in ciliary cells of Fallopian tube.
研究代表者	
	中張 隆司 (Nakahari Takashi)
	大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：	20189020

研究成果の概要（和文）：モルモット卵管上皮の線毛運動周波数（CBF）を測定した。CBFは卵巣周期に伴い変化した。CBFは排卵期に上昇し、排卵直後に低下した後徐々に増加し最高値となり、月経期直前に一過性に減少した後、月経期には低下し次のサイクルに入った。このCBF変化は、卵巣周期中のエストロゲンとプロゲステロン濃度の変化により調節されていた。さらに、CBF調節に両ホルモンは拮抗的に働いていた。すなわちエストロゲンはプロゲステロンの効果を抑制し、反対にプロゲステロンはエストロゲンの効果を抑制していた。この抑制効果は、レセプター以降のシグナルレベルで起こっていることが示された。

研究成果の概要（英文）：The ciliary beat frequency (CBF) of guinea pig fimbria during the ovarian cycle was measured by video microscopy using a high-speed camera (500 Hz). A moderate increase in estrogen concentration, [βE_2], maintains a high CBF (15.5Hz) during the ovulation and then a further increase in [βE_2] decreases CBF (13.5 Hz) in the ovulatory phase. In the early and late luteal phase, low [βE_2] and progesterone concentration, [PRG], increase CBF to 17 Hz and 15 Hz, respectively, and in the middle luteal phase, a high [PRG] decreases CBF (~12 Hz). Thus, the CBF of the fimbria was controlled by signals via βE_2 and PRG receptors in guinea pigs. Moreover both βE_2 and PRG antagonized each other in CBF regulation, that is, βE_2 inhibits PRG actions and contrary, PRG inhibits βE_2 actions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：Fallopian tube, cilia, ciliary beat frequency, estrogen, progesterone, egg transport, ovarian cycle, oviduct epithelia

1. 研究開始当初の背景

卵管線毛運動の生理的役割は、線毛無動症 (Kartagener 症候群) の女性に不妊が認められたことから、卵輸送に重要な役割を果たしていると考えられてきた。実際に、ビデオを用いた卵の卵管への取り込みを観察した研究は、卵管漏斗部の外側の線毛運動が卵を卵管腹腔開口部に輸送していることを明らかにしている。ヒト卵管採 explant の線毛運動周波数 (ciliary beat frequency: CBF) を測定した結果は、分泌期の CBF (5.8 Hz) は増殖期 (4.9 Hz) と比較して高いことを示している。一方で、月経周期中、ヒトの卵管の CBF に変化がみられなかったとする報告もある¹⁵⁾。このように、ovarian cycle 中の CBF の変動については、はっきりとした結論は得られていなかった。

2. 研究の目的

卵管粘膜上皮線毛細胞は、 β estradiol (βE_2) と progesterone (PRG) の受容体を発現しており、かつ受容体の発現は ovarian cycle の各時期によって変化している。ヒト卵管 explant において、PRG が CBF を減少させる事が報告されている。これらの結果は、 βE_2 と PRG により CBF が変化する可能性を示唆している。Ovarian cycle 中の CBF 変動を調べるためには、in vivo に近い条件で測定を行うことが必要である。本研究では、我々は ovarian cycle が 16~21 日と長いモルモットを用い、モルモットの卵管採において、ovarian cycle 中の周期的に変化している βE_2 と PRG の卵管採 CBF に及ぼす効果について検討した。

3. 研究の方法

6-8 週齢のメスのモルモットを購入、モルモット標準食と水を与えて飼育した。モルモットは 8 週齢から排卵開始し、12 週齢より定期的に排卵が起こる。12-20 週齢 (500g-800g) のモルモットを用いて、ovarian cycle 中の CBF 変化を調べた。ホルモン投与実験では、10-16 週齢のモルモット (体重 500-700 g) を用いた。

モルモットは pentobarbital sodium (Nembual 60-70 mg/kg) を腹腔内投与により麻酔した後、ヘパリン処理をした注射器を用いて心臓から採血 (12 ml) し、屠殺した。直ちに、両側卵巣と卵管採を一塊摘出し、洗浄し保存した (4 °C)。採取した血液は直ちに、4000 rpm (3000 g) で 10 分間遠心分離し、血球成分を分離した後、血漿はホルモン濃度測定まで凍結保存した (-20 °C)。血漿中の βE_2 濃度と PRG 濃度は、それぞれ Estradiol-EIA kit (No. 582251, Cayman, Ann Arbor MI 48108, USA) と Progesterone-EIA

kit (No. 582601, Cayman) を用いて測定した。

Ovarian cycle の "day" は、成熟雌モルモット (12-20 週齢、500-800g) の膣開口により決定した。膣開口後から膣スメアーを観察し、角化上皮から白血球主体に変わった日を排卵日翌日と判定した。

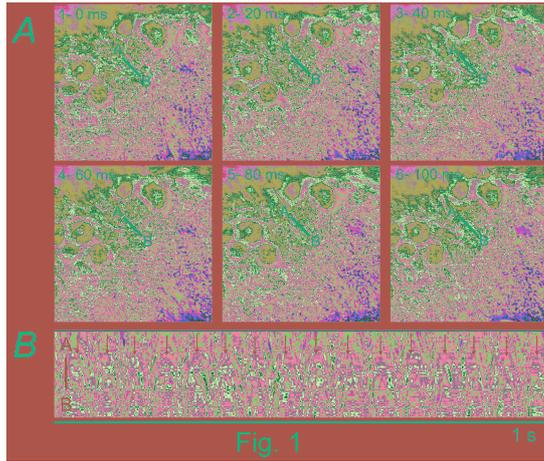
βE_2 と PRG の CBF に対する効果を調べるために、 βE_2 -benzoate (βE_2B) と medroxy PRG (mPRG) を steroid solution に溶解し、4 日間もしくは 1.5 日間皮下投与した。水分量を体重の 80 % としてこれらの試薬の投薬量を決定した。この実験では、6 匹のモルモットを同一のケージで 2 週間以上飼育した後、ホルモン投与を行った。ホルモン投与時の ovarian cycle の "day" は一定ではなかった。4 日間投与の実験では、 βE_2B または mPRG を 1 日に 1 回 (PM 8:00) に 4 日間連続して皮下投与を行い、5 日目 (AM 9:00) に屠殺し実験を行った。1.5 日間投与では、 βE_2B または mPRG を 1 日目 (PM 8:00)、2 日目の (AM 9:00 と PM 8:00) に皮下投与し、3 日目 (PM 9:00) に屠殺し実験を行った。例えば、 βE_2B を 4 mg/day/kg-water 投与した実験では、少なくとも 3~4 日の間隔を空けて 3~4 匹のモルモットを用いて実験した。同じ日に同じ実験を行うことはなかった。試薬の効果がなければ、CBF は ovarian cycle 中に分泌されている βE_2 と PRG 濃度変化の影響を受けて変動するが、 βE_2B と mPRG の投与が有効であれば、CBF は一定の値に収斂すると予想される。

摘出した卵管採を実体顕微鏡下で 1 - 2 mm に細切し、微小灌流チャンバー (30 μ l, 32 \times 6 \times 0.15 mm) にセットした。このチャンバーを倒立型光学顕微鏡 (model T2000, Nikon, Tokyo) 上の stage (37°C で保温) にセットし、接続した高速度カメラで (FASTCAM-512PCI, Photoron Ltd, Tokyo) 線毛運動をビデオ画像として記録した。灌流速度は 300 μ l/min で流した。両側卵管採から 25~30 カ所を選び、500Hz で 2 秒間ビデオ録画した。得られた画像は画像解析ソフト (DIPP-Motion 2D, DITECT, Tokyo) を用い、1 つの画像につき任意の 10 細胞を選び、その細胞表面の輝度変化から CBF を計算した。1 匹のモルモットの卵管採の 250~300 細胞から得られた CBF を平均して、個体の CBF とした。卵管採は採取してから 3 時間以内に実験に使用した。

4. 研究成果

1. 卵管採の CBF 測定: 顕微鏡下に、モルモット卵管採の線毛運動を高速度カメラ (500 Hz) を用いて観察した。顕微鏡下に観察された卵管採の線毛運動を Fig. 1A に示している。線毛細胞上に line A-B を引き、画像処理し line 上の輝度の経時変化を表すことで周波

数が測定できる (Fig. 1B)



測定された周波数のヒストグラムを Fig. 2 に示している。Fig. 2A は estradiol benzoate (βE_2B , 40mg/day/kg-water) で処理し

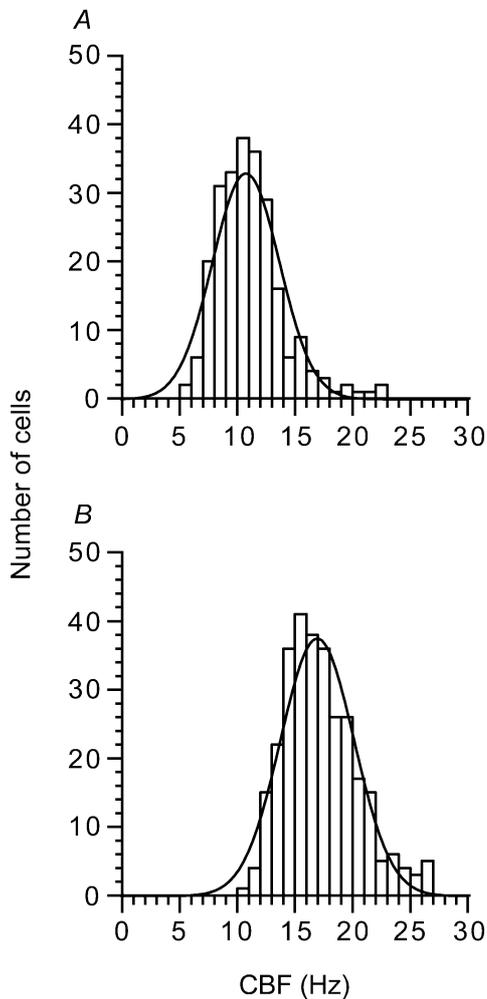


Fig. 2

たモルモット卵管采の CBF (10.8 Hz, n=250) を Fig. 2B は ICI-182,780 と mifepristone で処理した卵管采の CBF (17.3 Hz, n=280)

を示してい

る。CBF の変化は Fig. 2 に示すように測定される。

2. 卵巣周期中の CBF 変化: Fig. 3 に ovarian cycle 中の CBF (Fig. 3A) と血漿 βE_2 濃度と PRG 濃度 (Fig. 3B) を示している。血漿 βE_2 濃度と PRG 濃度から ovarian cycle の各時期を決定した。 βE_2 濃度の上昇開始から最高濃度に達するまでを卵胞期、その後、 βE_2 濃度が低下し PRG 濃度が増加を始める期間を排卵期、PRG 濃度が一過性に上昇している期間を黄体期、その後、新しい卵胞期が始まるまでを休止期とした。卵胞期の始め (βE_2 濃度が 30 から 70 $pg \cdot ml^{-1}$ に増加) では、CBF は 10 Hz から 14 Hz へ上昇したが、卵胞期の終わり (βE_2 が 150 $pg \cdot ml^{-1}$) では、CBF は 10.5 Hz に減少した。引き続き排卵期と黄体期では、CBF はわずかに増加して 12 Hz となった。黄体期につづく休止期では、CBF は再び 15 Hz まで上昇した後、卵胞期直前の低値 (11 Hz) になった。そして、次の ovarian cycle が始まった。このように、ovarian cycle 中の CBF 変化は血漿 βE_2 濃度と PRG 濃度と関係があ

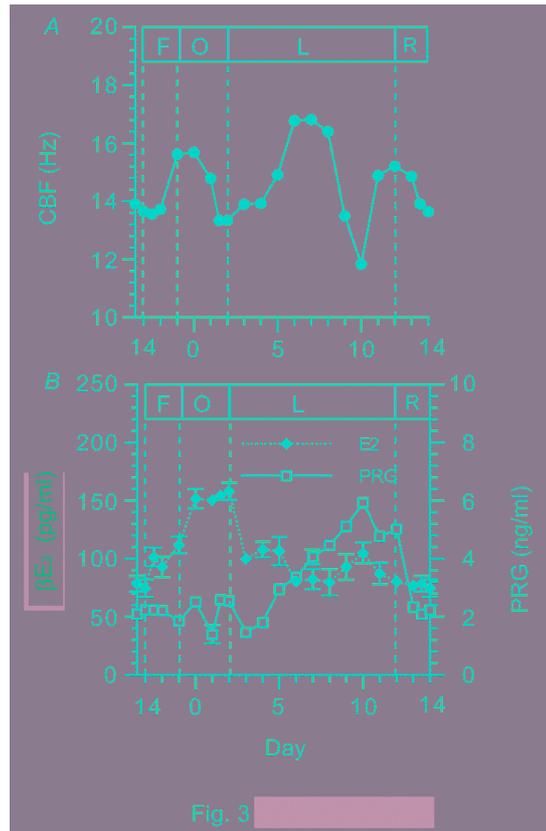


Fig. 3

るように見える。このことを確かめるために、 βE_2B と mPRG の投与実験を行った。

3. βE_2B と mPRG の効果: steroid solution に溶かした βE_2B を 1.5 日間皮下投与した。0.4 mg/day/kg-water 以下の低濃度 βE_2B 投

与では、各実験の CBF は一定の値に収斂しなかった ($p < 0.0001$ by ANOVA、図中“↓”)。このことは、投与した bE_2B が CBF に対して効果がなく、生殖周期と共に変動する内因性の βE_2 か PRG が CBF を調節していると考えられる (Fig. 4A)。しかし、4 mg/day/kg-water 以上の濃度の βE_2B 投与では、CBF は一定の値に収斂し、個々の値に有意差が認められなかった ($p > 0.63$ by ANOVA)。比較的 low 濃度の βE_2B (4 mg/day/kg-water) 投与時に、CBF は 14.8 ± 0.4 Hz ($n=3$) と高く、一方で、高濃度の βE_2B (40 mg/day/kg-water) 投与時では、CBF は 11.7 ± 0.3 Hz ($n=3$) と低かった。 bE_2 を用いて同様な実験を行ったが、400 mg/day/kg-water のように高い濃度を投与しても、CBF は一定の値に収斂しなかった ($p < 0.0001$ by ANOVA)。このことは、投与した βE_2 は CBF に対する効果がないことを示している (Fig. 4C)。

ICI-182,780 を 1.5 日間皮下投与した (2 mg/day/kg-water)。ICI-182,780 を単独投与した時、CBF は 12.0 ± 0.3 Hz ($n=3$) と低かった。 βE_2B (4 mg/day/kg-water) を加えた時、CBF は 12.6 ± 0.5 Hz ($n=4$) であり、 βE_2B (40 mg/day/kg-water) を加えた時も、CBF は 12.6 ± 0.1 Hz ($n=3$) であった。このように、ICI-182,780 は CBF を約 12 Hz に減少させ、さらに、 βE_2B による CBF 変化も消失させていた (Fig. 4B)。

steroid solution に溶かした mPRG を 4 日間皮下投与した。0.4 mg·day⁻¹·kg-water⁻¹ 以下の低濃度 mPRG 投与では、個々の CBF は一定値とならず、個々の値に有意差が認められた ($p < 0.0001$ by ANOVA、図中“↓”) (Fig. 5A)。このことは、投与した mPRG は CBF に対して効果がなく、生殖周期と共に変動する内因性の bE_2 か PRG が CBF を調節していると考えられる。しかし、4 mg/day/kg-water 以上の濃度の mPRG 投与では、CBF の値は一定の値に収斂し、個々の値に有意差は認められなかった ($p > 0.17$ by ANOVA)。高濃度の mPRG は、CBF を約 12.5 Hz と一定に保った。mPRG (4 mg/day/kg-water) 投与時、CBF は 12.5 ± 0.2 Hz ($n=3$)、mPRG (40 mg/day/kg-water⁻¹) 投与時、CBF は 12.7 ± 0.1 Hz ($n=3$) であった。PRG を用いて同様な実験を行ったが、結果に差は認められなかった。

Mifepristone を steroid solution に溶

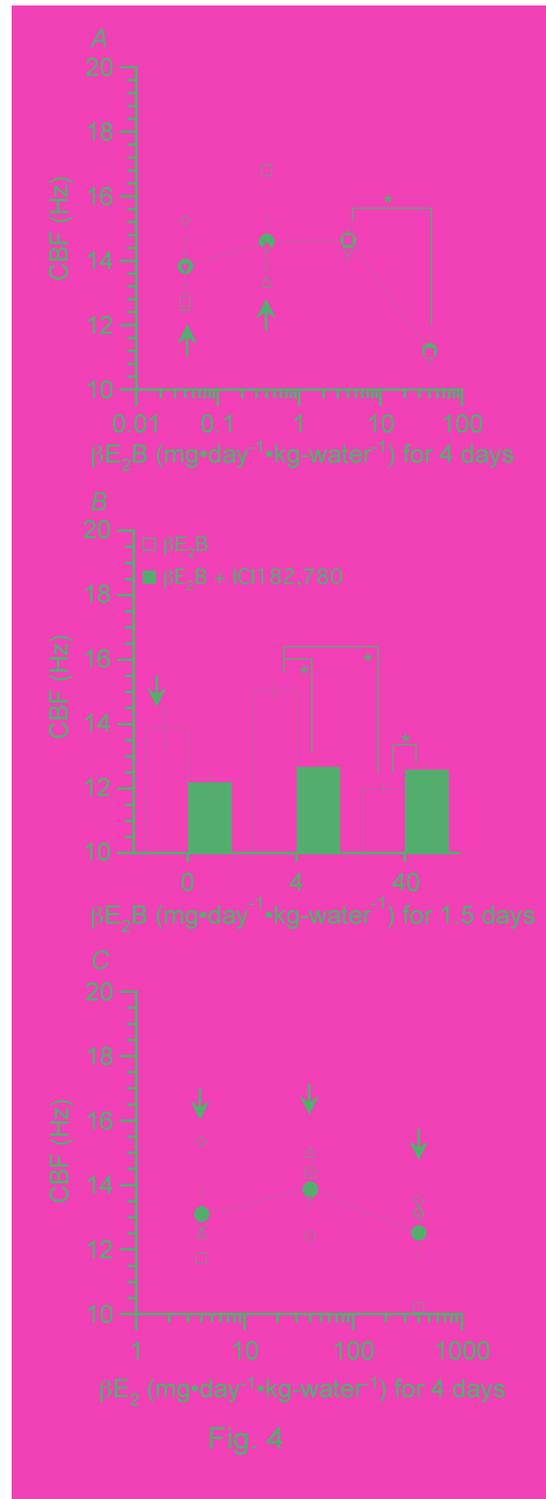


Fig. 4

かして 1.5 日間皮下投与した (200 mg/day/kg-water)。Mifepristone 単独投与した時の CBF は 15.3 ± 0.2 Hz ($n=3$) であった。さらに、mPRG (4 mg/day/kg-water) を加えた時の CBF は、 15.6 ± 0.1 Hz ($n=3$) であった。このように、mifepristone の投与により mPRG による CBF の低下は消失した (Fig. 5B)。

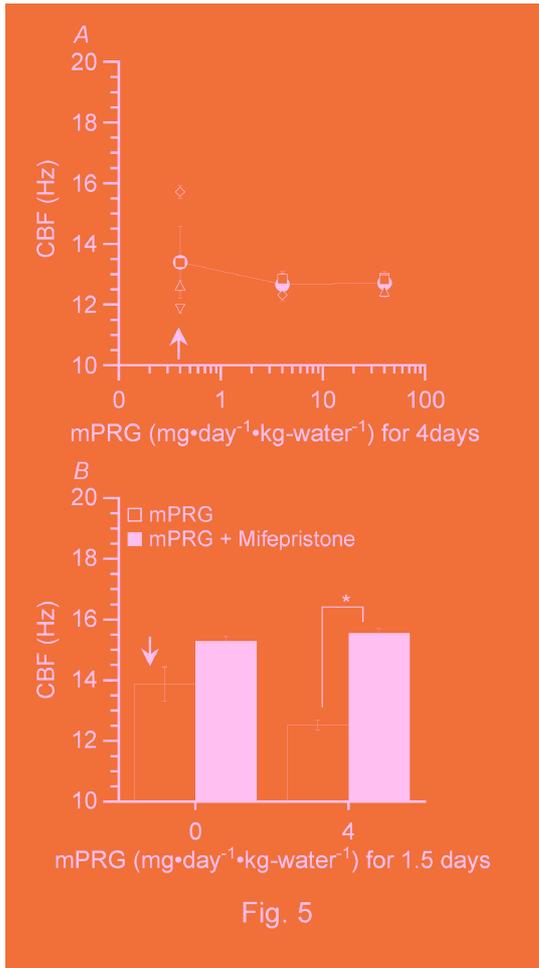


Fig. 5

今回の研究で、卵巣周期の各時期にみられた CBF 変化は βE_2B と mPRG を皮下投与することにより再現された。

これまで、排卵中から排卵後に卵輸送のために CBF が上昇していると一般的に考えられてきた。ヒトの卵管を用いた実験では分泌期に CBF がわずかに上昇することを報告している。しかし、今回の結果はこれまでの予想と異なっていた。今回の結果では、排卵期から黄体期にかけて CBF は 12 Hz と比較的強く保たれていた。低い CBF を保つことで、輸送中に卵に加わる物理的な刺激を最小限にし、卵を安静に保つことで受精の機会を増やしているのかもしれない。また、精子が卵管内を上行しやすくしている可能性も考えられる。一方で、休止期あるいは増殖期にみられる高い CBF は卵管粘膜を清潔に保つ役割を果たしている可能性がある。実際に、卵管線毛運動の障害は、不妊症や子宮外妊娠、卵管粘膜の感染のような病的状態を引き起こす可能性があるという報告がある。このように、卵管の粘膜上

皮の線毛運動は、卵管の宿主防御機構として必要な役割を果たしていることが考えられる。

4. βE_2 と PRG の相互作用：一方で、 βE_2B と mPRG の同時投与は、CBF を 17.8 Hz に上昇させた。排卵が起こっていない性的に未成熟なモルモット、あるいは、 βE_2 と PRG の受容体阻害薬の同時投与もどのように高い CBF を維持した (Fig. 6)。これらのことは、 βE_2 と PRG に相互作用があり、互いに抑制している可能性を示唆している。

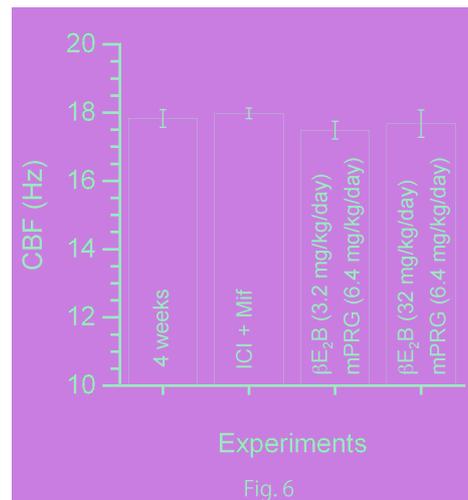


Fig. 6

このことを確かめるために、 βE_2B あるいは、mPRG で前処理 (1.5 day) した後に βE_2B と mPRG を同時に投与した (Fig. 7)。 βE_2B (Fig. 7A) あるいは、mPRG の前処理 (Fig. 7B) は、 βE_2B と mPRG を同時に投与した時に観察された CBF の上昇を消失させ、 βE_2B あるいは、mPRG 前処理により収斂した CBF から変化しなかった。このことは、卵管 CBF 調節において、 βE_2 と PRG は拮抗的に働き、互いの効果を抑制していることが明らかとなった。一方で、 βE_2 と PRG 投与時のレセプター発現を調べた結果は、レセプターの発現を抑制しているのではないことが示された。これらの結果から、レセプター以降のシグナル経路での抑制が起こっていることが示された。抑制のメカニズムについては、今後の研究課題として残っている。

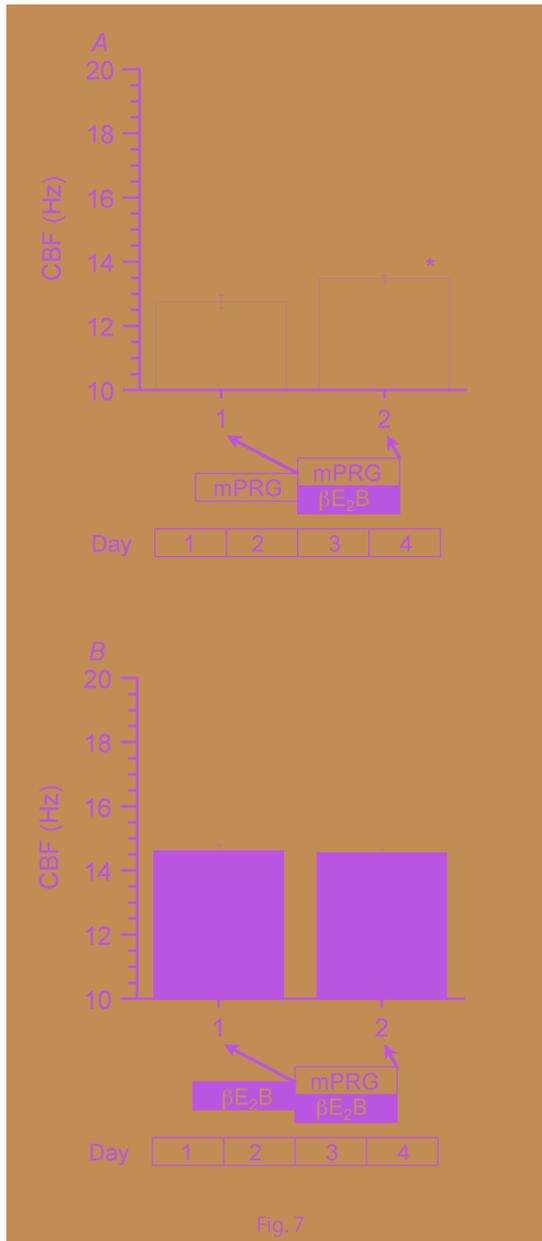


Fig. 7

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. A Nishimura, K Sakuma, C Shimamoto, S Ito, T Nakano, E Daikoku, M Ohmichi, T Ushiroyama, M Ueki, H Kuwabara, H Mori, T Nakahari Ciliary beat frequency controlled by estradiol and progesterone during ovarian cycle in guinea pig Fallopian tube. *Exp. Physiol* 95: 819-828, 2010.
2. Nakahari T, Nishimura A, Shimamoto C, Sakai A, Kuwabara H, Nakano T, Tanaka S, Kohda Y, Matsumura H, Mori H. The

regulation of ciliary beat frequency by ovarian steroids in the guinea pig Fallopan tube: interactions between oestradiol and progesterone. *Biomed Res* 32: 321-328, 2011

3. 西村歩, 中張隆司, 島本史夫. モルモット卵管上皮線毛運動の卵巣周期に伴う変化: Estrogen と progesterone による線毛運動周波数の調節. *大阪医科大学雑誌* 68: 113-121, 2009.
4. 中張隆司. 生体防御バリアーとしての上皮機能の活性化因子の研究: 卵管線毛運動の卵巣周期による変化-エストロゲンとプロゲステロンによるコントロール. *大阪医科大学雑誌* 68: 63-64, 2009.

他 英文 7, 邦文 3 件

[学会発表] (計 14 件)

1. Nishimura A, Nakahari T. Changes in ciliary beat frequency during ovarian cycle. 36th IUPS, Kyoto, 2009.
2. Nakahari T, Nishimura A. Regulation of ciliary beat frequency by ovarian steroids. 36th IUPS, Kyoto, 2009.
3. Nakahari T, Nishimura A. Regulation of ciliary beat frequency by sex hormones in guinea pig Fallopian tube: interactions between estrogen and progesterone. EB2009, New Orleans, USA, 2009
4. Nishimura A, Nakahari T. CBF changes in relation to the phase of ovarian cycle in guinea pig Fallopian tube: effects of estrogen and progesterone. EB2009, New Orleans, USA, 2009.

他 10 件

[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

中張 隆司 (Nakahari Takashi)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 20189020