

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660212

研究課題名(和文)哺乳動物の黄体組織消滅機構の解明

研究課題名(英文)Study on the mechanisms of corpus luteum disappearance during luteolysis

研究代表者

奥田 潔 (Okuda, Kiyoshi)

岡山大学・その他の研究科・教授

研究者番号：40177168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：多くの哺乳動物において排卵後の卵巣に形成される黄体は、形成と消失(退行)を繰り返す一過性の内分泌器官である。本研究はウシにおける黄体退行機構にリンパ管を介した黄体細胞の卵巣外への移動が含まれていることを明らかにした。また、黄体細胞流出には黄体細胞自身が分泌する細胞外基質分解酵素群(MMPs)が重要であり、黄体細胞におけるMMPs発現は黄体退行誘導因子であるPGF2およびIFNによって制御されていることを示した。

研究成果の概要(英文)：In mammals, corpus luteum (CL), formed after ovulation on ovary, is endocrine organ which repeats formation and regression (luteolysis). This study revealed that luteolysis mechanism involve outflow of luteal cells from the CL to lymphatic vessels. We suggested that matrix metalloproteinases (MMPs), which degrade extracellular matrix, secreted by luteal cells have important roles to achieve outflow of luteal cells, and showed that MMPs expression in luteal cells is regulated by PGF2 and IFNG inducing luteolysis.

研究分野：生殖生理学

キーワード：構造的黄体退行 黄体細胞 リンパ管 MMPs

1. 研究開始当初の背景

多くの哺乳類において、排卵後の卵巣には妊娠の成立と維持を担うプロゲステロンを分泌する黄体が形成される。非妊娠時の黄体の消失（黄体退行）は次の排卵を誘起するために必須であり、黄体を短時間で消失させることは哺乳類が効率的に繁殖の機会を得る上で重要な生殖戦略である。これまでに黄体退行機構に関する多くの研究が成されてきたが、“極めて短い時間”で一つの組織が消失する機構は未だ明らかでない。本研究は、黄体組織消失（構造的黄体退行）機構における「未知の経路」の存在を明らかにすることを目的に実施された。

2. 研究の目的

先行研究において黄体を有する卵巣由来のリンパ液中に黄体細胞を見出したことから、本研究では「哺乳類に共通したリンパ管を介した黄体退行機構が存在する」という仮説を立てその証明を試みた。具体的には以下の4点を達成することに集約される。

- 1) 発情周期を通じたリンパ液中の黄体細胞数の変化の解析
- 2) 人為的に誘導した黄体退行における黄体細胞流出現象の検証
- 3) げっ歯類における黄体細胞流出現象の検証
- 4) 黄体細胞流出メカニズムの解明

3. 研究の方法

上記の4点についてそれぞれ以下のように実施した。

- 1) 食肉処理センターにおいてウシ卵巣から走行するリンパ管を屠畜直後に結紮し、リンパ液中に含まれる黄体細胞を観察・カウントした。また卵巣の肉眼的所見により、黄体初期・形成期・中期・後期・退行期にそれぞれ分類し、各周期間におけるリンパ液中の黄体細胞数を比較検討した。また、リンパ液中に含まれる黄体

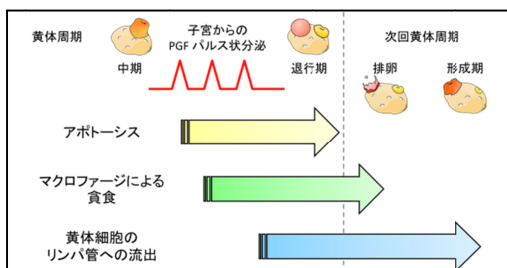
細胞が採取したリンパ管上流に形成された黄体から流出したものであることを証明するため、黄体組織切片を作成し黄体細胞マーカー（ 3β -HSD）抗体およびリンパ管マーカー（LYVE-1）抗体を用いた免疫組織化学的検証を実施した。

- 2) 畜産現場ではプロスタグランジン F₂ α (PGF) 製剤を投与することで人為的に黄体退行・次回排卵を誘起する方法が広く用いられている。そこでウシ臨床獣医師の協力の下、生体を用いた実験を実施した。中期黄体を有するウシ複数頭について、開腹手術により卵巣から走行するリンパ管内へカテーテルを挿入した。閉腹後、PGF 製剤もしくはリンゲル液（対照区）を投与し黄体退行を誘起した。カテーテルから卵巣由来のリンパ液を経時的に採取し、リンパ液中に含まれる黄体細胞数の推移を解析した。
- 3) GFP 発現マウスの卵巣を野生型マウスに移植し、野生型マウスのリンパ管およびリンパ節への GFP 発現細胞の流出を試みた。
- 4) 黄体退行時に黄体組織中における matrix metalloproteinases (MMPs) 発現が増加することから、MMPs による細胞接着の崩壊（組織からの脱接着）が黄体細胞流出に重要である可能性がある。本研究では黄体細胞を単離培養し、黄体退行誘導物質として知られる PGF、インターフェロン γ (IFNG) および腫瘍壊死因子 (TNF) が黄体細胞における MMPs mRNA 発現に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

- 1) 黄体細胞が黄体退行期にリンパ管へ流出すること、また流出した黄体細胞は生存

していることを明らかにした。また、リンパ管を介した黄体細胞の流出が最も活発になる時期は、黄体組織が卵巣上から完全に消滅する時期と一致したことは、卵巣-黄体組織におけるリンパ管の役割を明らかにする上で重要な知見である。以上の成果は、「黄体退行は黄体細胞のアポトーシスならびにマクロファージの貪食によって達成される」と説明されてきた生殖生理学の常識を打ち破る非常にインパクトのある発見であった(下図)。



これらの研究成果は 2013 年にカナダ・モントリオールにおいて開催された第 46 回 Meeting of the Society for the Study of Reproduction においても発表された。また同成果は国際的な総合科学雑誌である *PLOS ONE* (インパクトファクター: IF=3.53) に掲載された。

- リンパ管へカテーテルを挿入するためには卵巣および子宮の一部を切開創から体外へ引き出す必要が見込まれたため、過去の妊娠・出産により子宮周辺の靭帯が伸展している経産牛が実験に供された。しかしながら作業に十分な術野を確保することは難しく、リンパ管へのカテーテルの挿入は困難を極めた。また、リンパ管を可視化することを目的に組織染色色素である 0.01% エバンスブルーを黄体に注射した。しかし生体において黄体の血流量は予想外に多く、染色色素は急速(注射後 2-3 分以内)に消失した。そのため、リンパ管の視認およびカテーテルの挿入は困難であった。結果的に適切なカ

テーテルの留置が達成できず採取されたリンパ液は極少量であり、リンパ液に含まれる黄体細胞数変化の経時的な解析は不可能であった。

- 本実験は共同実験者である名古屋大学・井上直子博士によって実施された。名古屋大学において管理・飼育されている全身に GFP を発現したマウスから卵巣を摘出し、同卵巣の野生型マウスへの移植が実施された。本実験ではドナーマウス卵巣から走行するリンパ管とレシピエントマウスのリンパ管を連結させる必要があるが、リンパ管は静脈ほど平滑筋によって十分に支持されていないため脆く、リンパ管の連結手術は困難であった。そのため本移植術では手技によるリンパ管の連結が達成できず、治癒に伴うリンパ管再形成によるリンパ節との連絡を期待し実験を続行した。しかしながら、他臓器や腹壁への癒着が発生し、期待通りの結果は得られなかった。
- PGF および IFNG が黄体細胞における *MMPs* mRNA 発現を制御することが明らかになった。その中でも *MMP-1* mRNA 発現を強く刺激し、これは黄体組織中の *MMP-1* 発現が退行期に急激に上昇することと一致する。*MMP-1* は黄体における主要な細胞外基質であるコラーゲンタイプ 1 を分解すること、実験的な *MMP-1* の黄体組織への還流によって黄体細胞が還流液中へ出現することから、黄体細胞の組織からの脱接着に *MMP-1* が深く関与していることが示唆された。本研究成果は 2014 年に帯広で開催された第 107 回 日本繁殖生物学会において発表された。

(総括) 畜産現場において黄体退行を目的と

した PGF 製剤の投与は日常的な処置であるが、黄体が消失する仕組みは謎であった。本研究によりリンパ管を介した黄体細胞の流出を見出し、さらにその流出量が退行期に多いという結果は PGF 製剤による急速な黄体退行メカニズムの有力な説明となる。本研究成果は臨床獣医師を対象としたシンポジウム等で示され、大きな反響を得た。生体を用いた科学的な検証は未実施ではあるものの、PGF 製剤投与時に黄体マッサージを併用することは黄体細胞のリンパ管への速やかな排出を促し、短時間かつ確実に黄体退行を誘導できる可能性が高い。

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 1 件)

1. Abe H, Al-zi'abi MO, Sekizawa F, Acosta TJ, Skarzynski DJ, Okuda K. Lymphatic involvement in the disappearance of steroidogenic cells from the corpus luteum during luteolysis. *PLOS ONE*, 2014; 9 (2) (doi: 10.1371/journal.pone.0088953.) 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Hironori Abe, Mohamad Omar Al-zi'abi, Fumio Sekizawa, Dariusz J. Skarzynski, Tomas J. Acosta, Kiyoshi Okuda. Outflow of luteal cells from corpus luteum via lymphatic vessels during luteolysis in cow. 46th Annual, Meeting of the Society for the Study of Reproduction, モントリオール・カナダ, ポスター発表 (2013 年 7 月) 査読有
2. 阿部 洋典, 奥田 潔. ウシ黄体細胞における matrix metalloproteinases (MMPs) 発現および発現調節因子の検討. 日本繁殖生物学会 第 107 回大会, 帯広市, 発表番号: OR2-8 (2014 年 8 月)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

岡山大学プレスリリース

http://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id162.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥田 潔 (OKUDA KIYOSHI)

研究者番号: 40177168

岡山大学・環境生命科学研究科・教授

(2)研究分担者

井上 直子 (INOUE NAOKO)

研究者番号: 90377789

名古屋大学・農学部・特任助教