

氏名	久世 真理子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第5243号
学位授与の日付	平成27年 9月30日
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Roles of steroid hormones in bovine endometrial prostaglandin synthesis (ウシ子宮内膜における prostaglandin 合成に及ぼすステロイドホルモンの役割に関する研究)
論文審査委員	教授 奥田 潔 教授 齋藤 昇 准教授 木村 康二

### 学位論文内容の要旨

排卵後の卵巣に形成される黄体は妊娠の成立と維持に必須の progesterone (P4) を分泌する一過性の内分泌器官であり、妊娠が不成立の際、子宮内膜で合成・分泌される prostaglandin (PG) F<sub>2</sub>α (PGF) により黄体が退行することで次の発情が回帰する。一方、胚の存在下において estradiol-17β (E2) の刺激を受けて子宮内膜から分泌される黄体保護因子の PGE2 は PGF の黄体退行作用を阻害することで妊娠を維持する。様々な動物種においてステロイドホルモンが PGs の重要な調節因子であると考えられている。黄体由来のステロイドホルモンである P4 は子宮内膜における oxytocin (OT) receptor 発現を抑制することで OT による PGF 分泌を抑制し、中期黄体の維持に作用することが報告されている。さらに副腎皮質由来のステロイドホルモンである glucocorticoid (GC) は活性酵素 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11BHS1) により活性型 GC (cortisol: Cr) へと触媒され、子宮内膜において間質細胞特異的に PGF 産生を抑制することが示されている。しかし、子宮内膜の PG 産生に関わる P4 および GC の作用メカニズムは明らかにされていない。本研究はウシ子宮内膜における PGs 産生調節メカニズム解明の一端として、ウシ子宮内膜における PGs 合成に及ぼすステロイドホルモンの作用機序を明らかにすることを目的とした。

P4 の作用経路には核内受容体 (nuclear P4 receptor; PGR) と結合し標的遺伝子の転写を活性化する経路、膜受容体と結合することでシグナル伝達経路を活性化し転写因子の合成を誘導する経路が存在する。ウシ子宮内膜上皮ならびに間質細胞における PGs 合成に及ぼす P4 の影響を調べる目的で、培養細胞に P4 (1-100 nM) を添加し 24 時間後の培養上清中 PGF および PGE2 濃度および PG 合成酵素 (phospholipase A2: PLA2, cyclooxygenase-2: COX2) 発現量を測定した。P4 は間質細胞における PGF および PGE2 産生ならびに PLA2 および COX2 mRNA 発現を抑制する一方、上皮細胞における PGE2 産生を刺激した。次に、膜受容体に特異的に結合する BSA-conjugated P4 (P4-BSA:1-100 nM) を培養細胞に添加し 24 時間後の培養上清中 PGs 濃度を測定した。P4-BSA は上皮細胞のみに作用し PGs 合成を刺激した。さらに、排卵周期を通じた P4 受容体発現を調べたところ、PGR 発現は黄体期と比較し卵胞期に高い値を示した。一方、膜受容体発現は排卵周期を通じて変化しなかった。これらのことから、ウシ子宮内膜における PGs 産生に及ぼす P4 の作用は細胞種により異なり、その異なる作用経路を介して子宮内膜における PGs 産生を厳密に調節する可能性が示された。

ウシ子宮内膜における排卵周期を通じた Cr の PGF 抑制作用を調べる目的で、排卵周期を通じたウシ子宮内膜における GC receptor α (GC-Rα) 発現を調べたところ、GC-Rα 発現は黄体中期および後期に他の周期と比較して有意に高かった。受容体の発現量と Cr の作用が相関するか調べるために、黄体中期および卵胞期の子宮内膜に 10 nM Cr を添加し 4 時間後の培養上清中 PGF 濃度を測定したところ、Cr は黄体中期における PGF 産生を有意に抑制したが、卵胞期ではその作用は見られなかった。次に GC-Rα 発現調節因子を明らかにする目的で間質細胞に Cr および P4 ならびに E2 を添加し 24 時間後の細胞内 GC-Rα 発現量を測定した。GC-Rα 発現は Cr ならびに E2 により抑制され、P4 により増加した。このことから、黄体由来の P4 は子宮内膜における GC-Rα 発現を刺激することで Cr の PGF 抑制作用を強めることが示された。

本研究により、排卵周期を通じて変動する血中ステロイドホルモンが子宮内膜における PGs 合成を厳密に制御することでウシ黄体の維持および退行に関与する可能性が示された。

## 論文審査結果の要旨

本論文は、ウシ子宮内膜における prostaglandin (PG) 制御機構を解明するための基礎的研究として実施された以下の実験の成果をまとめたものである。

ウシ子宮内膜における PG 産生調節メカニズム解明の一端として、1) ウシ子宮内膜上皮および間質細胞における PG 合成に及ぼす progesterone (P4) の影響ならびにその作用経路、2) ウシ子宮内膜における排卵周期を通じた cortisol (Cr) の PGF 抑制作用について検討した。ウシ子宮内膜間質細胞において P4 は PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF) および PGE<sub>2</sub> 産生ならびに PG 合成酵素である *phospholipase A2 (PLA2)* および *cyclooxygenase-2 (COX-2)* mRNA 発現を抑制した。一方、子宮内膜上皮細胞において P4 は PGE<sub>2</sub> 産生を刺激した。膜受容体特異的に結合する BSA-conjugated P4 (P4-BSA) は上皮細胞における PGF および PGE<sub>2</sub> 産生を刺激した。さらに、排卵周期を通じた P4 受容体発現を調べたところ、PGR 発現は黄体期と比較し卵胞期に高かった。一方、膜受容体発現は排卵周期を通じて変化しなかった。これらのことから、ウシ子宮内膜における PGs 産生に及ぼす P4 の作用は細胞種により異なり、その異なる作用経路を介して子宮内膜における PGs 産生を厳密に調節する可能性が示された。子宮内膜における glucocorticoid receptor  $\alpha$  (GC-R $\alpha$ ) 発現は黄体中期に高かった。さらに黄体中期および卵胞期の子宮内膜における Cr の作用を調べたところ黄体中期のみ低濃度の Cr でも強い PGF 抑制作用を示した。GC-R $\alpha$  の発現は P4 により刺激され、estradiol-17 $\beta$  および Cr により抑制された。このことから、黄体由来の P4 は子宮内膜における GC-R $\alpha$  発現を刺激することで Cr の PGF 抑制作用を強めることが示された。

本研究により、排卵周期を通じて変動する血中ステロイドホルモンが子宮内膜における PGs 合成を厳密に制御することでウシ黄体の維持および退行に関与する可能性が示された。これらの知見はウシ子宮内膜における PG 合成制御による新規の生殖制御技術を開発するための基礎資料として極めて意義深いものである。本学位審査会は、これらの成果をまとめた本論文の内容および参考文献を総合的に審査し、本論文が博士学位 (農学) に値するものと判断した。