

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462486

研究課題名(和文) 卵管上皮局在ペプチドによる卵管内腔環境の構築とストレスの関係

研究課題名(英文) Neuropeptide in the rat oviduct: Implications for association with stress

## 研究代表者

江藤 みちる(伊田みちる)(Ida-Eto, Michiru)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80393148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：不妊は大きな社会問題であり、ストレスの関与が指摘されている。研究代表者はストレス関連生理活性ペプチド「マンセリン」が卵管内腔上皮の分泌細胞に存在することを見出した。本研究では、卵管マンセリンの性周期、発達およびストレス環境下での局在について検討した。マンセリンは生後7日のラットでは発現せず、生後14日で卵管内腔の一部に発現していた。成獣ラットでは卵管内腔に広く局在し、性周期やストレス負荷に伴う局在の変化は見られなかった。視床下部の弓状核ではドーパミン神経と共存し、マンセリンが視床下部-下垂体-性腺軸の調節に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The relationship between emotional stress and infertility has been widely accepted. Manserin is distributed in the neuroendocrine system and its expression in the adrenal gland is stress dependent. Recently, I found the localization of manserin in the oviduct of female rats. In this study, I investigated the relationship between manserin and estrus cycle, development or stress condition. Manserin immunoreactivity was detected on the surface of the oviduct at postnatal day 14. Localization of manserin in the oviduct was not changed with estrus cycle or stress. Manserin was colocalized with the dopaminergic neuron marker, tyrosine hydroxylase, at the arcuate nucleus of hypothalamus. These results suggest that manserin may be involved in the regulation of hypothalamus-pituitary-gonad axis.

研究分野：神経科学、解剖学

キーワード：卵管 神経ペプチド ラット ストレス 視床下部 下垂体

## 1. 研究開始当初の背景

日本は少子高齢化時代を迎え、人口増加・出生率の増加は喫緊の課題であるが、高齢出産や不妊が問題となっている。さらに現代はストレス社会であり、無月経や月経前症候群などストレスの関与が疑われているが、その詳細は明らかになっていない。

生理活性ペプチドはエンドセリン、オレキシン、グレリンなどが知られ、病態解明や創薬に広く臨床応用されている。研究代表者の所属研究室は、生理活性ペプチド・マンセリンを発見した (Yajima et al. Neuroreport 2004)、視床下部/下垂体/副腎系 (HPA axis)、甲状腺傍濾胞細胞 (Ohkawara, Ida-Eto et al. Acta Histochem 2013) など分泌細胞、プレシナプス部位 (Ida-Eto et al. J Histochem Cytochem 2012)、血中に局在し、ストレス応答性を持つことから (Kamada et al. Int J Pept Res Ther 2010)、マンセリンは細胞外へ分泌され神経内分泌系に関与すると考えられている。ごく最近、ヒト前立腺癌マーカーになることも明らかになり (Nishikawa, Etoh et al. Urol Oncol 2013)、マンセリンは臨床での利用が期待されている生理活性ペプチドである。

研究代表者は、胚の発生環境である卵管に着目し、マンセリンが卵管上皮の分泌細胞表面に存在することを突き止めた (Ida-Eto et al. Acta Histochem 2014)。この結果はマンセリンの卵管内腔の環境構築への関与を示唆している。卵管の分泌細胞は卵の受精環境や生育環境を整えるための因子を分泌し、その分泌は性ホルモンにより制御されている。さらに性ホルモンはストレスによる影響を受けやすい。しかし、ストレスと卵管分泌細胞に着目した研究はなされていない。よって、マンセリンがストレス応答性を持ち分泌細胞に局在することから、卵管の分泌機構とストレスとの関係を制御しているのではないかと考えた。

そこで本研究は、受精および胚発生の場である卵管内腔環境の向上を目指し、卵管上皮細胞に存在するマンセリンとストレスの関係について明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

### (1) 性周期および発生・発達に伴う卵管マンセリンの局在の解明

卵管におけるマンセリンの機能を明らかにするための基礎的研究として、性周期に伴う局在の変化、および発生・発達に伴う局在の変化について明らかにする。

### (2) 卵管マンセリンとストレスとの関係

ストレス負荷ラットを作製し、卵管におけ

るマンセリンの局在の変化を調べることで、ストレスとの関係を明らかにする。

### (3) 視床下部・下垂体のマンセリンとストレスとの関係

哺乳類の生殖機能は視床下部・下垂体の制御を受けている (視床下部/下垂体/性腺軸、HPG axis)。マンセリンは視床下部・下垂体に局在することが既に報告されていることから (Yajima et al. Neuroreport 2004)、ストレス負荷ラットにおける視床下部・下垂体のマンセリンの局在の変化について明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 免疫組織化学

雌 Wistar ラットを 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、卵管・膣・脳・下垂体を摘出した。OCT コンパウンドに包埋して厚さ 12  $\mu$ m の凍結切片を作製し、免疫組織化学を行った。一次抗体としてマンセリンに対する抗体および卵管上皮分泌細胞のマーカーである oviductin に対する抗体、ドーパミン神経のマーカーである Tyrosine Hydroxylase (TH) に対する抗体、各種分泌ホルモンに対する抗体を用いた。蛍光標識した二次抗体を用いて、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。膣は HE 染色を行ったのち、光学顕微鏡で観察し、上皮の形態から性周期の判定を行った。

### (2) ストレス負荷ラットの作製

ラットの飼育ケージに 1.5 cm の深さで水をはり、5 日間飼育した。水は毎日交換した。給餌、給水は通常通り行った。ストレス前後での体重測定、ストレス後の胸腺・脾臓・副腎の重量測定を行い、ストレス負荷の判定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 性周期に伴うマンセリンの局在変化

成獣ラットの性周期は 4 日間であり、発情前期・発情期・発情後期・間期を 1 日ごとに繰り返すのに伴い、ホルモンの濃度や膣上皮の形態が変化することが知られている。

生後 8 週の雌ラットを灌流固定し、卵管と膣の組織切片を作製した。膣の HE 染色を行ったところ、図 1 に示すように膣上皮の形態変化が認められ、既報 (Westwood et al. Toxicol Pathol 2008) に基づいて性周期を同定した。

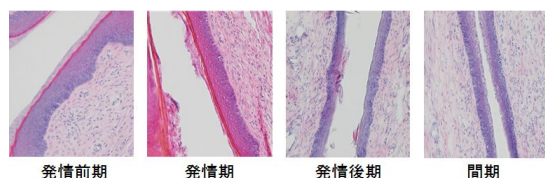


図 1 ラット膣の HE 染色。性周期によって上皮形態が異なる。

卵管におけるマンセリンの局在は、卵管内腔上皮細胞マーカー抗体（織毛細胞： $\alpha$ -tubulin IV、分泌細胞：oviductin）および抗マンセリン抗体を用いて免疫組織化学を行った。マンセリンは卵管峡部の内腔表面にて oviductin と共局在していたが、性周期での局在変化は見られなかった（図 2）。

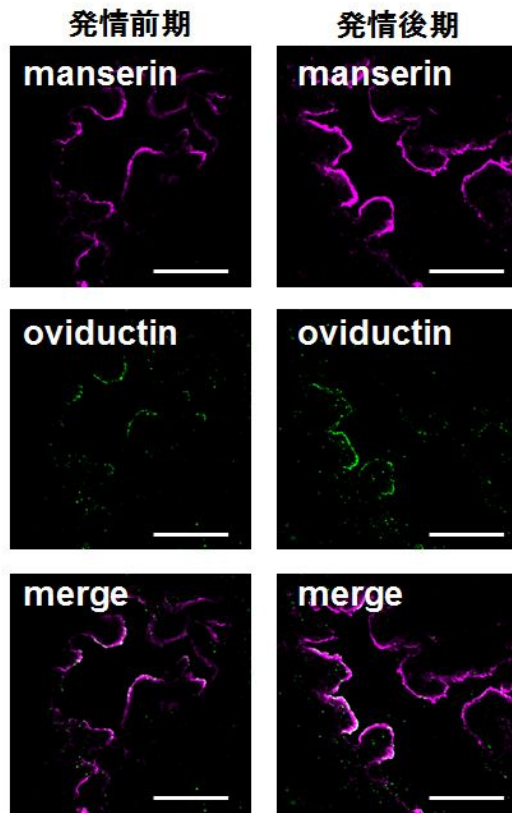


図 2 発情前期および発情後期における卵管マンセリンの局在。マンセリンの局在をマゼンタ、oviductin の局在を緑、両者を重ね合わせたものを示した。スケールバー、100  $\mu$ m。

### (2) 発生・発達に伴うマンセリンの局在変化

生後 7 日および 14 日の雌ラットを灌流固定し、マンセリンおよび oviductin に対する抗体を用いて免疫組織化学を行った。生後 7 日ではマンセリンは卵管内腔に局在せず、生後 14 日で卵管内腔の一部にマンセリンの局在が見られた（図 3）。

以上の結果から、ラット卵管においてマンセリンは発達に伴って発現が増加し、成獣におけるマンセリンの発現は性周期に依存しないことが示された。

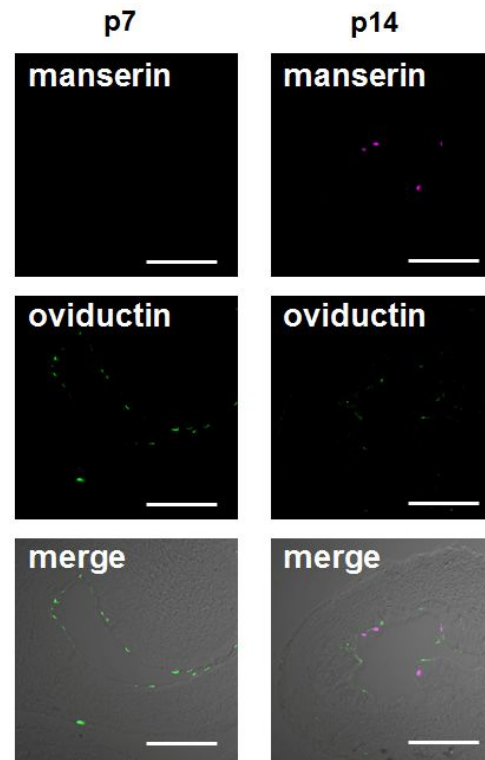


図 3 生後 7 日および 14 日における卵管マンセリンの局在。マンセリンの局在をマゼンタ、oviductin の局在を緑、両者と微分干渉像を重ねたものを示した。スケールバー、100  $\mu$ m。

### (3) ストレス負荷に伴うマンセリンの局在変化

マンセリンは副腎においてストレス応答性を示すことがこれまでに明らかになっている（Kamada et al. Int J Pept Res Ther 2010）。卵管に局在するマンセリンがストレス応答性を示すのかを明らかにするため、ストレス負荷ラットを作製した。通常飼育（コントロール）と比較して、ストレスラットでは体重の増加が抑制されていた。（図 4）

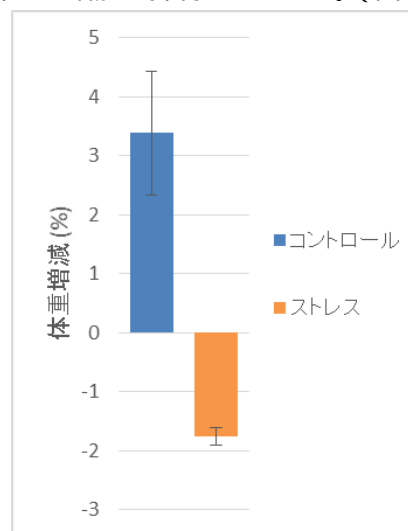


図 4 ストレス前後での体重の増減。実験開始時を 100% として、5 日後の体重の増減を示した。ストレス群では体重が減少していた。



さらに、胸腺と脾臓の重量の減少（図5）が見られた。以上から、ストレスを受けていることが確認できた。

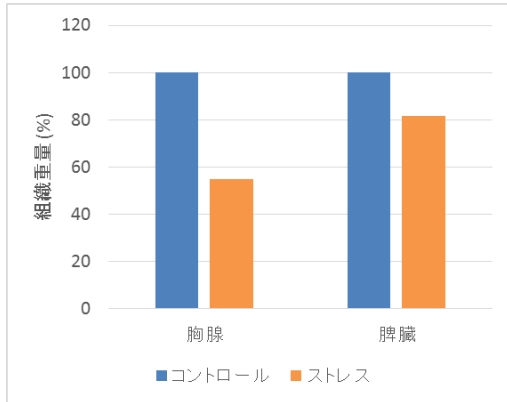


図5 ストレス前後での胸腺と脾臓の重量増減。実験開始時を100%として、5日後の重量を示した。ストレス群では胸腺・脾臓ともに減少していた。

#### (4) ストレス負荷ラットにおける卵管マンセリンの局在

ストレス負荷ラットにおける卵管マンセリンの局在について、マンセリンおよびoviductin に対する抗体を用いて免疫組織化学を行った。その結果、ストレスとコントロールでマンセリンおよびoviductinの局在に変化は見られなかった（図6）。

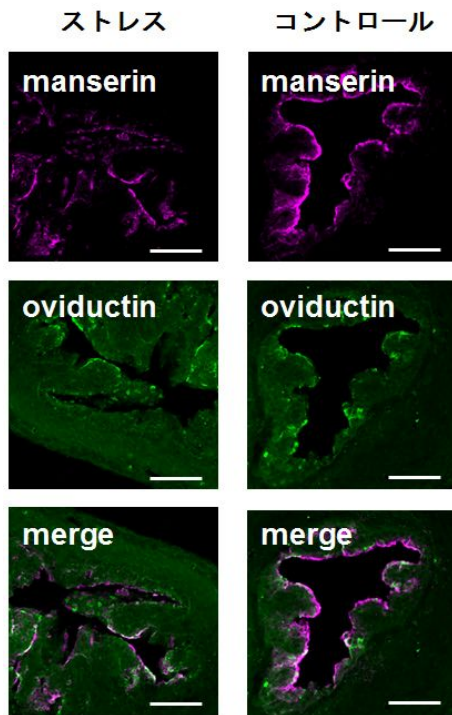


図6 ラット卵管マンセリンの局在。ストレス、コントロールともに発情前期。マンセリンの局在をマゼンタ、oviductinの局在を緑、両者を重ねたものを示した。スケールバー、50 μm。

#### (5) 性周期に伴う視床下部および下垂体のマンセリンの局在

視床下部および下垂体に局在するマンセリンが性周期による制御を受けるのかを明らかにするため、マンセリンおよび各種マーカー抗体を用いて免疫組織化学を行った。

マンセリンは下垂体前葉および視床下部の正中隆起、弓状核で局在が認められた。弓状核においては、マンセリンは Tyrosine Hydroxylase (TH) 陽性のドーパミン神経細胞を取り囲むようにして局在していた（図7）。下垂体前葉においては広く局在が認められ、プロラクチンなどの各種ホルモンマーカー抗体を用いて細胞の同定を行っているところである。

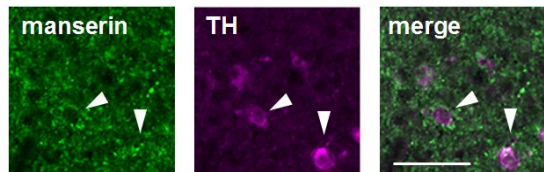


図7 ラット弓状核マンセリンの局在。マンセリンを緑、THを紫、両者を重ねたものを示した。矢頭はTH陽性のドーパミン神経細胞を示す。スケールバー、50 μm。

本研究により、卵管の内腔に局在しているマンセリンは発達に伴って増加し、成獣では内腔に豊富に存在していることが明らかになった。生後14日ではマンセリンの発現が見られたが、成獣と比較するとその発現は非常に少なかった。したがって、性成熟に伴う変化については、生後14日から成獣の間で、より多くの成長段階について検討を行う必要がある。

また、性周期による卵管マンセリンの局在変化は見られなかった。Oviductinについても性周期による変化は見られなかったことから、膣や子宮内膜と比較すると卵管は性周期に伴う上皮の影響をあまり受けない可能性が考えられる。

ストレス負荷ラットを作製し、体重増加の抑制、ストレスの指標である胸腺・脾臓の重量の減少、萎縮が観察されたことから、ラットがストレスを受けていることは明らかであったが、卵管マンセリンの局在変化も見られなかった。卵管においては、マンセリンはストレスの影響を受けないと考えられた。今後、別のストレスも検討する必要があると考えられる。

視床下部/下垂体/性腺軸 (HPG axis) において、マンセリンは視床下部弓状核のドーパミン神経細胞周辺に局在していた。このドーパミン神経は下垂体のプロラクチンの分泌を制御していることが知られている。現在、下垂体におけるマンセリン発現細胞の同定を進めており、マンセリンが視床下部/下垂体/性腺軸の制御に関わっている可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Ida-Eto M, Hara N, Ohkawara T, Narita M. Mechanism of auditory hypersensitivity in human autism using autism model rats. *Pediatrics International*, 59: 404-407, 2017. (査読有り)  
DOI: 10.1016/j.acthis.2013.11.009

Ohkawara T, Ida-Eto M, Narita M. Analysis of brain serotonin content following viral infection in timed-pregnant and developing rat - Implications for maternal viral infection in the causes of SIDS. *The Journal of Japan SIDS Research Society*, 16: 3-7, 2016. (査読有り)

Ohkawara T, Katsuyama T, Ida-Eto M, Narita N, Narita M. Maternal viral infection during pregnancy impairs development of fetal serotonergic neurons. *Brain & development*, 37: 88-93, 2015. (査読有り)  
DOI: 10.1016/j.braindev.2014.03.007

〔学会発表〕(計10件)

江藤みちる、原奈央、大河原剛、成田正明。自閉症における音源定位の障害の可能性 - 自閉症モデルラットを用いた解析 - 。第122回日本解剖学会総会・全国学会集、2017年3月28日～30日、長崎大学医学部(長崎県長崎市)

江藤みちる 女性がリードする SIDS 研究。第23回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会学術集会、2017年3月17日～18日、津アストホール(三重県津市)

江藤みちる、大河原剛、成田正明。自閉症診察において「音がどの方向から聞こえてくるかわかりますか」という質問は、聞いてみる価値があるかもしれない～動物実験の結果より。第46回日本小児神経学会東海地方会、2017年1月28日、名古屋大学医学部(愛知県名古屋市)

江藤みちる、原奈央、大河原剛、成田正明。自閉症モデルラットにおける上オリーブ核の形態学的解析 - 自閉症と聴覚過敏や音源定位との関連 - 。第121回日本解剖学会総会・全国学会集、2016年3月28日～30日、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

江藤みちる、大河原剛、成田正明。呼吸の化学受容器“頸動脈小体”と SIDS 病態は関

連があるか。第21回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会学術集会、2015年3月6日～7日、松本市中央公民館(長野県松本市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

江藤 みちる(伊田 みちる)  
(IDA-ETO, Michiru)

三重大学・医学系研究科・助教  
研究者番号: 80393148

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし