

## 研究レポート

## ウマ子宮胎盤組織におけるアクチビン受容体の発現

木村優希<sup>1,2)</sup>・佐々木基樹<sup>1,2)</sup>・渡邊謙一<sup>1,3)</sup>・Pramod DHAKAL<sup>2,4,6)</sup>・佐藤文夫<sup>2,5)</sup>・田谷一善<sup>2,4)</sup>・南保泰雄<sup>1-3)</sup>

## 要約

アクチビンはウマの子宮腺から分泌され、ウマの妊娠成立および維持に必要な役割を果たしている。本研究では7頭の妊娠馬(妊娠88、120、161、269、290、331、335日)の子宮胎盤組織について、アクチビン受容体のタイプIA/BおよびIIA/Bの発現を、免疫組織化学的手法を用いて探索した。採取した子宮胎盤組織は4%のパラホルムアルデヒドを用いて固定し、研究に用いた。その結果、アクチビン受容体の4種類全てが子宮内膜上皮、子宮腺、胎盤栄養膜、および子宮平滑筋に妊娠期間を通して発現していることが判明し、ウマの子宮胎盤組織においてアクチビンが作用している可能性が考えられた。

## はじめに

胎盤は妊娠中に発達する重要な内分泌器官であり[13]、胎子の発達を支えるエストロゲンや、子宮の収縮性を抑えるプロゲステロンの分泌が知られている[1、17]。近年、ウマを含む数種類の動物において、アクチビンというホルモンが注目されるようになってきた[2、9、11]。

アクチビンとはトランスフォーミング増殖因子(TGF)- $\beta$ ファミリーに属する糖タンパク質ホルモンであり、2つの $\beta$ サブユニットが結合して構成され、主にアクチビンA( $\beta$ A+ $\beta$ A)、アクチビンAB( $\beta$ A+ $\beta$ B)、およびアクチビンB( $\beta$ B+ $\beta$ B)の3種類に分類される[7、12]。ヒトにおいて、胚および子宮胎盤組織から産生分泌されたアクチビンAは、着床準備、胚および胎盤の発達、子宮の免疫反応の調整などの妊娠維持に重要な作用を、オートクライン/パラクライン様式にて担っている[8、9、11、

19]。

アクチビン受容体(Activin Receptor: ActR)は、細胞膜貫通型のセリン-スレオニンキナーゼ活性型の受容体で、主にActR IA、IB、IIA、IIBの4種類が知られている[7、18、23]。アクチビンはまずII型受容体に結合し、I型受容体を動員する。続いて、I型受容体をリン酸化して活性型とし、細胞内シグナルを伝達することでアクチビンの作用が発現される[7、18]。ウマの子宮胎盤組織において、アクチビンAが産生分泌されている可能性が近年報告されているものの[2、25、26]、ActRに関する報告はなされていない。

ウマの繁殖において胚死滅および胎子喪失は非常に大きな問題であり、これらを最小限に抑える有効な方法の確立が望まれる。子宮胎盤機能を良好に保つことは正常な妊娠を維持するためには必要不可欠であることから、妊娠期の子宮胎盤機能

<sup>1)</sup>Kimura Yuki, Sasaki Motoki, Watanabe Kenichi, Nambo Yasuo: 帯広畜産大学獣医学研究部門

<sup>2)</sup>Kimura Yuki, Sasaki Motoki, DHAKAL Pramod, Sato Fumio, Taya Kazuyoshi, Nambo Yasuo: 岐阜大学大学院連合獣医学研究科

<sup>3)</sup>Watanabe Kenichi, Nambo Yasuo: 帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター

<sup>4)</sup>DHAKAL Pramod, Taya Kazuyoshi: 東京農工大学農学部

<sup>5)</sup>Sato Fumio: 日高育成牧場

<sup>6)</sup>DHAKAL Pramod: (現所属) Animal Science Research Center, Division of Animal Science, University of Missouri

本論文は、J. Equine Sci. 2018, 29(2): 33-37に掲載されたものを一部改変し、和訳したものである。

に關係するアクチビンの作用部位を解明することは臨床繁殖上、有用な研究と考えられる。本研究では子宮胎盤組織で重要な役割を担っているアクチビンに注目し、ウマの子宮胎盤組織および子宮平滑筋におけるActRの局在性を、免疫組織化学的手法を用いて探索することを目的とした。

## 材料及び方法

### 動物:

研究には北海道の日本中央競馬会(JRA)日高育成牧場にて飼養されていた7頭の妊娠したサラブレッドを用いた(9-20才、平均±標準偏差:13.1±3.7才)。組織採取時の各馬の妊娠日数は88、120、161、269、290、313、335日であった。なお、最終交配日を妊娠0日と定義した。これらの馬は健康体で安楽殺されたか、疝痛などの繁殖に關係する疾患以外の理由により安楽殺された。安楽殺はメドミジン(5µg/kg)の静脈内投与後に、チオペンタールナトリウムおよび塩化スキサメトニウムの混合物を過剰投与して実施した。子宮平滑筋を含む子宮胎盤組織を即座に採取し、4%パラホルムアルデヒドを用いて固定後、エタノールにて脱水し、パラフィンに包埋した。本研究における安楽殺および組織採取を含む研究計画は、JRA日高育成牧場動物倫理委員会にて承認された。

### 免疫化学組織学的染色:

包埋された組織を4µmに薄切し、スライドガラス(MAS-GP type A, S9904, 松浪硝子工業株式会社、大阪、日本)上に乗せてプレパラートを作製した。免疫組織化学的染色はImmPRESS Reagent Kit (Vector® Antigen Unmasking Solution H-3300, Vector Laboratories, Inc., CA, U.S.A.)を用いて実施した。キシレンおよびエタノールを用いて脱パラフィン、再水和後、内因性ペルオキシダーゼを0.3% $H_2O_2$ /メタノールと反応させて失活させた(室温、30分)。抗原は1%クエン酸緩衝液(Vector® Antigen Unmasking Solution H-3300, Vector Laboratories, Inc.)に浸漬し、オートクレーブ処理して抗原を賦活化させ、リン酸緩衝液(PBS; 0.01M, pH7.4)にて洗浄した。2.5%Normal Horse Serum (ImmPRESS Reagent Kit, Vector

Laboratories, Inc.)を用いてインキュベートしてブロッキング処理した後(室温、30分)、PBSにて洗浄した。その後一次抗体を0.5% TritonX-100/PBS (PBS-Triton)で希釈したものと反応させた(一晩、4°C)。使用した一次抗体および希釈倍率は以下のとおりである:抗ヒトActR IAヤギポリクローナル抗体(1:320, ab115301, Vector Laboratories, Inc.)、抗ヒトActR IBウサギポリクローナル抗体(1:480, ab64813, Vector Laboratories, Inc.)、抗ヒトActR IIAマウスモノクローナル抗体(1:160, ab76940, Vector Laboratories, Inc.)、抗ヒトActR IIBウサギモノクローナル抗体(1:320, ab134082, Vector Laboratories, Inc.)。翌日、PBSにて洗浄後、それぞれの一次抗体の免疫動物に応じて、以下の二次抗体と反応させた(室温、30分);抗ヤギIg (ImmPRESS Reagent Kit peroxidase, MP-7405, Vector Laboratories, Inc.)、抗ウサギIg (ImmPRESS Reagent Kit peroxidase, MP-7401, Vector Laboratories, Inc.)、抗マウスIg (ImmPRESS Reagent Kit peroxidase, MP-7402, Vector Laboratories, Inc.)。PBSにて洗浄後、NovaRED (SK-4800, Vector Laboratories, Inc.)を用いて顕微鏡下で反応させ、免疫部位を可視化した。再度PBSにて洗浄後、Mayer's hematoxylinを用いてカウンター染色し、エタノールにて脱水、キシレンにて透徹し、封入材(MGK-S, 松浪硝子工業株式会社)を用いて封入した。ネガティブコントロールには一次抗体の代わりにPBS-Tritonを用いた。さらに、各組織サンプルに対してヘマトキシリン-エオジン染色(HE染色)を実施した。

## 結果

免疫組織化学的手法により検索したActRの4種類(ActR IA, IB, IIA, IIB)全てに対して、子宮内膜上皮細胞、子宮腺上皮細胞、胎盤栄養膜細胞、および子宮平滑筋における染色性が、妊娠88日から335日にかけて確認された(図1、代表として妊娠88日および335日を示している)。全てのサンプルにおいて染色部位に違いは確認されず、染色の強さについても顕著な違いは認められなかった。一次抗体を用いないコントロールは染色されなかった(図1)。

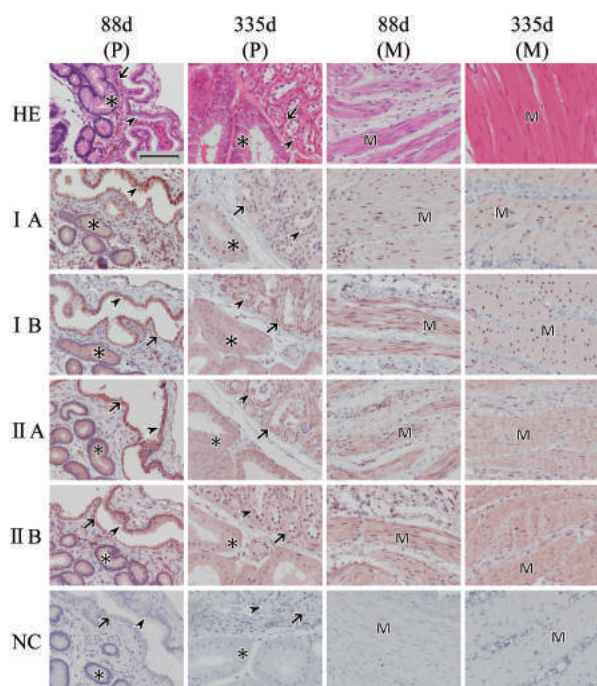


図1

妊娠88日(88d)および335日(335d)のサラブレッドにおける子宮腺(\*),子宮内膜上皮(→),胎盤栄養膜(▶),子宮平滑筋(M)の免疫組織化学的染色の結果。組織は抗ActR IA, IB, IIA, IIB抗体を用いて染色してある。P,胎盤領域;M,子宮筋層。HE,ヘマトキシリン-エオジン染色。IA, ActR IA; IB, ActR IB; IIA, ActR IIA; IIB, ActR IIB; NC, 陰性コントロール。全て同じスケールで撮影し,スケールバーは100 $\mu$ mを示す。

## 考察

本研究では免疫組織化学的手法によって、妊娠馬の子宮内膜上皮、子宮腺、胎盤栄養膜、および子宮平滑筋においてActR IA, IB, IIA, IIBの染色性が確認され、これらの組織に4種類のActRが発現していることが示唆された。つまり、これらの組織でアクチビンの胎盤形成、ステロイドホルモン産生分泌などの作用が発揮されていると考えられた。これはウマの生殖器におけるActRの発現についての初めての報告である。

ActRはヒツジ[10]やラット[5]の子宮内膜、子宮腺、栄養膜外胚葉に発現している。これらに基づくと、本研究で確認されたウマの子宮内膜上皮、子宮腺、胎盤栄養膜におけるActRの発現は十分に考えられる結果である。本研究におけるActRの発現パターンには、妊娠88日から335日にかけて顕著な違いは認められず、アクチビンの作用調整にはActRの発現パターンよりもリガンドの濃度の方がより重要であると推察された。

ヒトでは子宮胎盤組織からアクチビンAが産生

される[8,9,15]。妊娠25日のウマでは子宮内膜管腔上皮および子宮腺上皮におけるアクチビン $\beta$ Aサブユニットの発現が報告されている[26]。本研究ではActRが子宮腺上皮に確認されたことから、子宮腺にて産生されたアクチビンAは、同部位のActRに結合し、先行研究[10]で考察されているような子宮腺の発達制御に関与していると推察された。

本研究ではActRの発現が胎子および母体胎盤にて確認され、ウマの胎盤組織においてアクチビンAがActRに結合し、妊娠150日までにおこる胎盤形成[21]などの重要な作用を担っていることが推測された。この推測は、ウマの子宮胎盤組織におけるアクチビン $\beta$ AサブユニットのmRNAが、妊娠後期よりも妊娠中期に多いことをNorthern blot analysisによって明らかにした先行研究[25]からも支持される。しかし、ウマの妊娠130日から312日にかけて、アクチビン $\beta$ A鎖は子宮腺上皮に局在しており、胎盤微小葉や胎子栄養膜、母体子宮内膜組織には発現しない[2,25]。つまり、先行研究で考察されているように[2]、アクチビンAは子宮腺から組織内を拡散して胎盤組織のActRに結合する可能性が考えられた。

アクチビンAはヒトの胎盤においてプロジェステロンやエストラジオールの産生分泌を刺激する[11]。ウマの胎盤は妊娠100日頃までプロジェステロン、妊娠後半にはエストロジェンの供給源となる[1]。この期間はウマの子宮腺にアクチビン $\beta$ A鎖が発現する時期と一致しており[2,25]、子宮腺由来のアクチビンAが胎盤のActRに結合し、ウマのホルモン産生分泌を刺激していると推察された。

ヒトの局所的なアクチビンA[4]およびラットの血中アクチビンA[6]は子宮平滑筋を標的とし、収縮性を抑制する[4]。本研究では妊娠期間を通して子宮平滑筋に4種類のActRが発現していたことが確認され、アクチビンが妊娠期間中に子宮平滑筋に作用し、オキシトシンによって刺激される[14]子宮平滑筋の収縮性調整に関与しているものと推論された。アクチビンはウシの黄体化顆粒膜細胞におけるオキシトシン産生を抑制する[22]。ウマにおいて、オキシトシンは子宮内膜から産生さ

れるが[1,3]、アクチビンによるオキシトシン産生抑制機構が子宮胎盤組織にも存在している可能性はある。このようにアクチビンは、子宮平滑筋への直接的な作用およびオキシトシン産生抑制という間接的作用を介して、子宮平滑筋の収縮性を抑制していると推察された。

アクチビンは主に、局所的に産生されオートクライン/パラクライン様式によって作用を発現する[7]。しかし、妊娠後期のヒトにおいて、アクチビンは内分泌因子としての生物学的活性を持つと考えられている[11]。ウマにおいても同様に、アクチビンAはオートクライン/パラクライン因子としてのみではなく、妊娠後期には内分泌因子として活性を持ち、本研究にて確認された子宮胎盤組織のActRに結合している可能性が考えられる。子宮腺に加え、ヒト[20]、ブタ[24]、ヤギ[23]、ラット[16]の卵巣はアクチビンAの産生源として知られる。しかし、ウマのActRの局在性、アクチビンの産生源、アクチビンの作用の関係を考察するには不明な点が多い。本研究では免疫組織化学的染色のみを実施しており、ActRおよびアクチビンAサブユニットを標的としたPCRやELISAなど、他の手法を用いた追加研究が、本研究結果およびアクチビンの作用メカニズムを確認するためには必要不可欠である。

結論として、妊娠馬の子宮内膜上皮、子宮腺、胎盤栄養膜、および子宮平滑筋にActRのIA、IB、IIA、IIBの4種類が妊娠期間を通して発現していることが明らかとなり、子宮胎盤組織においてアクチビンが作用していることが推察された。ウマの胚死滅、流産、早産の予防法確立のためにさらなる研究が望まれる。

## 引用文献

1. Allen, W.R. 2001. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction*. 121: 513-527.
2. Arai, K.Y., Tanaka, Y., Taniyama, H., Tsunoda, N., Nambo, Y., Nagamine, N., Watanabe, G., and Taya, K. 2006. Expression of inhibins, activins, insulin-like growth factor-I and steroidogenic enzymes in the equine placenta. *Domest. Anim. Endocrin.* 31: 19-34.
3. Aurich, C. 2011. Reproductive cycles of horses. *Anim. Reprod. Sci.* 124: 220-228.
4. Ciarmela, P., Wiater, E., and Vale, W. 2008. Activin-A in myometrium: characterization of the actions on myometrial cells. *Endocrinology* 149: 2506-2516.
5. Debiève, F., Hinck, L., Biard, J. M., Bernard, P., and Hubinont, C. 2005. Activin receptor expression and induction of apoptosis in rat blastocysts in vitro. *Hum. Reprod.* 21: 618-623.
6. Draper, L.B., Chong, H., Wang, E., and Woodruff, T.K. 1997. The uterine myometrium is a target for increased levels of activin A during pregnancy. *Endocrinology*. 138: 3042-3046.
7. Ethier, J.F., and Findlay, J.K. 2001. Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. *Reproduction*. 121: 667-675.
8. Florio, P., Cobellis, L., Luisi, S., Ciarmela, P., Severi, F.M., Bocchi, C., and Petraglia, F. 2001. Changes in inhibins and activin secretion in healthy and pathological pregnancies. *Mol. Cell. Endocrinol.* 180: 123-130.
9. Florio, P., Luisi, S., Ciarmela, P., Severi, F.M., Bocchi, C., and Petraglia, F. 2004. Inhibins and activins in pregnancy. *Mol. Cell. Endocrinol.* 225: 93-100.
10. Hayashi, K., Carpenter, K.D., Gray, C.A., and Spencer, T.E. 2003. The activin-follistatin system in the neonatal ovine uterus. *Biol. Reprod.* 69: 843-850.
11. Jones, R.L., Stoikos, C., Findlay, J.K., and Salamonsen, L.A. 2006. TGF- $\beta$  superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction*. 132: 217-232.
12. Knight, P.G., and Glister, C. 2001. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction*.

- 121: 503–512.
13. Morresey, P.R. 2011. The Placenta. pp. 84–95. In: *Equine Reproduction*, Vol. 1, 2nd ed. (McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner D. D. eds.), Wiley-Backwell, Ames.
  14. Morresy P.R. 2011. Oxytocin, Inhibin, Activin, Relaxin and prolactin. pp. 1679–1686. In: *Equine Reproduction*, Vol. 1, 2nd ed. (McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner D. D. eds.), Wiley-Backwell, Ames.
  15. Muttukrishna, S., Child, T.J., Groome, N.P., and Ledger, W.L. 1997. Source of circulating levels of inhibin A, pro alpha C-containing inhibins and activin A in early pregnancy. *Hum. Reprod.* 12: 1089–1093.
  16. Ogawa, K., Kurohmaru, M., Shiota, K., Takahashi, M., Nishida, T., and Hayashi, Y. 1991. Histochemical localization of inhibin and activin alpha, beta A and beta B subunits in rat gonads. *J. Vet. Med. Sci.* 53: 207–212.
  17. Ousey, J.C. 2004. Peripartal endocrinology in the mare and fetus. *Reprod. Domest. Anim.* 39: 222–231.
  18. Pangas, S.A., and Woodruff, T.K. 2000. Activin signal transduction pathways. *Trends. Endocrin. Met.* 11: 309–314.
  19. Rabinovici, J., Goldsmith, P.C., Librach, C.L., and Jaffe, R.B. 1992. Localization and regulation of the activin-A dimer in human placental cells. *J. Clin. Endocr. Metab.* 75: 571–576.
  20. Roberts, V. J., Barth, S., el-Roeiy, A. and Yen, S. S. 1993. Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocr. Metab.* 77: 1402–1410.
  21. Samuel, C.A., Allen, W.R., and Steven, D.H. 1975. Ultrastructural development of the equine placenta. *J. Rep. Fer. S.* 23: 575–578.
  22. Shukovski, L., and Findlay, J.K. 1990. Activin-A inhibits oxytocin and progesterone production by preovulatory bovine granulosa cells in vitro. *Endocrinology.* 126: 2222–2224.
  23. Silva, J.R.V., Van den Hurk, R., Van Tol, H.T.A., Roelen, B.A.J., and Figueiredo, J.R. 2004. Gene expression and protein localization for activin-A, follistatin and activin receptors in goat ovaries. *J. Endocrinol.* 183: 405–415.
  24. Van den Hurk, R., and Van de Pavert, S. A. 2001. Localization of an activin/activin receptor system in the porcine ovary. *Mol. Reprod. Dev.* 60: 463–471.
  25. Yamanouchi, K., Hirasawa, K., Hasegawa, T., Ikeda, A., Chang, K.T., Matsuyama, S., Miyazawa, K., Sawasaki, T., Tojo, H., Tachi, C., and Takahashi, M. 1997. Equine inhibin/activin  $\beta$  A-subunit mRNA is expressed in the endometrial gland, but not in the trophoblast, during pregnancy. *Mol. Reprod. Dev.* 47: 363–369.
  26. Zhang, H., Nagaoka, K., Imakawa, K., Nambo, Y., Watanabe, G., Taya, K., and Weng, Q. 2013. Expression of inhibin/activin subunits in the equine uteri during the early pregnancy. *Reprod. Domest. Anim.* 48: 423–428.