

## Abstract of Doctoral Thesis

Name Raihana Nasrin Ferdousy

Title: Discoveries of Anti-Müllerian hormone, its receptor, and a role to stimulates synthesis of collagen-specific chaperone HSP47 in bovine oviducts and endometria

(ウシ子宮・卵管におけるアンチミュラーホルモンと受容体、ならびに、コラーゲン特異的シヤペロン HSP47 の合成促進作用の発見)

---

Abstract of thesis:

Fertility decreases during aging in human and bovine females, but the exact pathophysiological mechanisms in the oviducts and uteri are not clarified yet. Anti-Müllerian hormone (AMH) is a glycoprotein that belongs to the transforming growth factor  $\beta$  superfamily. Plasma AMH concentrations can predict the fertility of adult female goats, ewes, cows, and women via unknown physiological mechanisms. This thesis study attempted to clarify whether AMH, and the main receptor for AMH, AMH receptor type 2 (AMHR2) have important roles for the age-related infertility.

In first, I investigated whether the primary receptor for AMH, AMHR2, is expressed in bovine oviducts and endometria. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) detected expression of *AMHR2* mRNA in oviductal and endometrial specimens. Western blotting and immunohistochemistry were performed to analyse AMHR2 protein expression using anti-bovine AMHR2 antibody. Immunohistochemistry revealed robust AMHR2 expression in the tunica mucosa of the ampulla and isthmus, as well as in the glandular and luminal epithelium of the endometrium. The number of AMHR2-positive fibroblasts increased, suggesting the presence of fibrosis in the oviducts and uteri of old cows. *AMHR2* mRNA (measured RT-qPCR) and AMHR2 protein expression in these layers did not significantly differ among oestrous phases in adult Japanese Black (JB) cows ( $P > 0.1$ ). In addition, *AMHR2* mRNA and protein expression in these layers did not differ among old Holsteins (mean ( $\pm$ SEM) age  $91.9 \pm 6.4$  months) and young ( $26.6 \pm 0.8$  months) and old ( $98.8 \pm 10.2$  months) JB cows. Therefore, AMHR2 is expressed in bovine oviducts and endometria.

Other important hormones for endocrinological regulation have paracrine and autocrine roles. Therefore, in the next study, I investigated whether bovine oviducts and endometria produce AMH. RT-PCR and western blotting detected AMH expression in oviductal and endometrial specimens. Immunohistochemistry revealed robust AMH expression in the ampulla and isthmus epithelia, and the glandular and luminal endometrial epithelia (caruncular endometria). The number of AMH-positive fibroblasts increased, suggesting the presence of fibrosis in the oviducts and uteri of old cows. *AMH* mRNA and protein expression in these layers did not significantly differ among

(Appended form No.3)

estrous phases in adult JB heifers ( $p > .1$ ). Furthermore, the expression in these layers also did not differ among Holstein cows ( $93.8 \pm 5.8$  months old), JB heifers ( $25.5 \pm 0.4$  months old), and JB cows ( $97.9 \pm 7.9$  months old). We also compared AMH concentrations in the oviduct and uterine horn fluids among the three groups (measured by immunoassays). Interestingly, the AMH concentration in the oviduct fluid, but not in the uterine horn fluid, of Holstein cows was lower than those in JB heifers and cows ( $p < .05$ ). Therefore, bovine oviducts and endometria express AMH and likely secrete it into the oviduct and uterine fluids.

Collagen, the most abundant extra-cellular matrix in oviducts and uteri, performs critical roles in pregnancies. I hypothesised that the locations and amounts of both denatured collagen and the collagen-specific molecular chaperone 47-kDa heat shock protein (HSP47) in the oviducts and uteri of old cows are different compared with those of young heifers because of repeated pregnancies. Since detecting damaged collagen in tissues is challenging, we developed a new method that uses a denatured collagen detection reagent. Then, we compared damaged collagen in the oviducts and uteri between post-pubertal growing nulliparous heifers ( $22.1 \pm 1.0$  months old) and old multiparous cows ( $143.1 \pm 15.6$  months old). Further, I evaluated the relationship between denatured collagen and HSP47 by combining this method with fluorescence immunohistochemistry. Picro-sirius red staining showed collagen in almost all parts of the oviducts and uteri. Expectedly, damaged collagen was increased in the oviducts and uteri of old cows. However, damaged collagen and HSP47 were not located in the same area in old cows. The number of HSP47-positive fibroblasts increased, suggesting the presence of fibrosis in the oviducts and uteri of old cows. These organs of old cows showed higher HSP47 protein amounts than those of heifers. However, the uteri, but not oviducts, of old cows had lower HSP47 mRNA amounts than those of heifers. These findings revealed the specific location and amounts of denatured collagen and HSP47 in the oviducts and uteri of old cows compared with those of heifers.

Therefore, I discovered the AMH, AMHR2 expression in several important layers of oviducts and uteri, and I discovered the increased AMH, AMHR2, and HSP47 in the fibroblasts after aging. However, still role of AMH, AMHR2 in oviducts and uteri were not clarified yet. Therefore, in the next study, I hypothesized that AMH stimulate HSP47 expression in fibroblast and epithelium. I cultured uterine fibroblasts and epithelial cells obtained from heifers. Then, I treated the cells with recombinant with increasing concentrations (0, 1, 10, or 100 ng mL<sup>-1</sup>) of AMH. Then, HSP47 expression was measured by western blotting. AMH stimulated ( $P < 0.05$ ) HSP47 expression in epithelial cells but not in fibroblasts. Therefore, these findings suggested the role of AMH to cause the abnormal high HSP47 expression in the oviducts and uteri of old cows.

In conclusion, this thesis discovered the AMH and AMHR2 in bovine oviducts and uteri, which have important roles for collagen synthesis via HSP47.

(About 800 words in English)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Ferdousy Raihana Nasrin
審査委員	主 査：山口大学・教授 角川博哉
	副 査：山口大学・教授 高木光博
	副 査：鹿児島大学・准教授 安藤貴朗
	副 査：山口大学・教授 佐々木直樹
	副 査：山口大学・教授 日下部健
題 目	Discoveries of Anti-Müllerian hormone, its receptor, and a role to stimulates synthesis of collagen-specific chaperone HSP47 in bovine oviducts and endometria (ウシ子宮・卵管におけるアンチミュラーホルモンと受容体、ならびに、コラーゲン特異的シャペロン HSP47 の合成促進作用の発見)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>婦人や雌ウシなどでは、加齢に伴い妊孕性が低下し不妊になるが、その発症機構には不明点が多く、特に卵管や子宮での病理機構には不明な点が多い。Anti-Müllerian hormone (AMH) は Transforming growth factor (TGF)-<math>\beta</math> ファミリーに属するタンパクである。メカニズムは不明だが、ウシ、ヤギ、ヒツジ、婦人などでは、血中 AMH 濃度は妊孕性と密接な関係を有する。そこで本学位論文は、AMH、ならびに、その受容体である AMHR2 が、卵管や子宮で発現しているか、また加齢に伴いそれらの発現量に違いが生じるかなどを明らかにすることにした。</p> <p>最初に RT-PCR 法により、未経産雌牛の卵管や子宮での AMHR2 の mRNA の発現を発見した。次に、AMHR2 の N 末端の細胞外領域に対する独自抗体を作製し、未経産雌牛の卵管や子宮での AMHR2 のタンパク発現をウエスタンブロット法により発見した。さらに同抗体を用いた蛍光免疫染色法を実施し、卵管の膨大部・狭部の粘膜層、ならびに、子宮内膜、子宮腺部が AMHR2 を発現していることを発見した。さらに AMHR2 陽性の線維芽細胞が加齢後の卵管や子宮で増殖していることを発見した。黒毛和種の未経産牛における、これらの部位における AMHR2 の mRNA やタンパクの発現量は性周期の間に変化が認められないことを、リアルタイム PCR 法とウエスタンブロット法により明らかにした。さらに加齢後ホルスタイン種雌ウシ (91.9<math>\pm</math>6.4 ヶ月齢)、黒毛和種の未経産牛 (26.6<math>\pm</math>0.8 ヶ月齢)、黒毛和種加齢後雌牛 (98.8<math>\pm</math>10.2 ヶ月齢) の間に群間差が無いことも明らかにした。</p> <p>これまでに多くの重要なホルモンは、標的細胞自身により合成、分泌され、パラクライン・オートクラインの機構で重要な役割を担っていることが知られている。そして離れた場所に位置する臓器から分泌され血流を介して到達、作用する、エンドクライン作用と協調作用を発揮する。</p>	

(別紙様式第 10 号)

そこで卵管や子宮の標的細胞自身が、AMH を合成しているか、その合成量には、性周期、ならびに、年齢・品種の違いが影響するかを調べた。まず RT-PCR 法や AMH の C 末端に対する抗体を用いて、未経産雌牛の卵管や子宮において AMH が発現していることを発見した。また多重蛍光免疫染色法も実施し、卵管の膨大部・狭部の粘膜層、ならびに、子宮内膜、子宮腺部が AMH を発現していることも発見した。さらに AMH 陽性の線維芽細胞が加齢後の卵管や子宮で増殖していることも発見した。卵管の膨大部・狭部の粘膜層、ならびに、子宮内膜、子宮腺部における AMH の mRNA やタンパクの発現量は、性周期の間に変化しないことを、リアルタイム PCR 法とウエスタンブロット法により明らかにした。また加齢後ホルスタイン種雌ウシ (93.8±5.8 ヶ月齢)、黒毛和種の未経産牛 (25.5±0.4 ヶ月齢)、黒毛和種加齢後雌牛 (97.9±7.9 ヶ月齢) の間に群間差が無いことも明らかにした。一方、卵管液や子宮液に分泌された AMH 濃度をイムノアッセイ法で測定し、これら三群間で比較したところ、加齢後ホルスタイン種雌ウシの卵管液中の AMH 濃度が、他の 2 群よりも低いことを発見した ( $P < 0.05$ )。以上のことから、卵管や子宮は AMH を発現し、その一部は卵管液や子宮液に分泌されていることが解明された。

コラーゲンは、卵管や子宮で最も量が多い細胞外マトリックスであり、婦人の妊孕性に影響することが明らかになってきた。そこで変成コラーゲン、ならびに、コラーゲン特異的分子シャペロンである HSP47 の、卵管・子宮における量や存在部位には、未経産牛と妊娠分娩を反復した加齢後の雌ウシの間で差異があるという仮説を調べた。最初に、変成コラーゲンに特異的に結合するプローブを凍結組織切片に用いる独自の変成コラーゲンの可視化法を開発した。次に同法を応用して、黒毛和種の未経産牛 (22.1±1.0 ヶ月齢) と加齢後雌牛 (143.1±15.6 ヶ月齢) の間で比較した。さらに変成コラーゲンと HSP47 に対する蛍光免疫染色法を組み合わせた方法による比較も実施した。ピクロシリウスレッド染色によりコラーゲンは、卵管・子宮のほぼ全ての部位に存在することを明らかにした。変成コラーゲンは、加齢後の卵管・子宮で増加していた。しかし HSP47 と変成コラーゲンの存在部位は異なっていた。HSP47 陽性の線維芽細胞が加齢後の卵管や子宮で増殖していることが観察され、線維症化していると考えられた。卵管や子宮の HSP47 の蛋白量は、加齢牛で未経産牛より多かった。しかし子宮の HSP47 の mRNA 量は、加齢牛で未経産牛より少かった。したがってコラーゲン特異的分子シャペロンである HSP47 の、卵管・子宮における量や存在部位には、未経産牛と妊娠分娩を反復した加齢後の雌ウシの間で差異があることを解明した。

これらの結果から、加齢後の卵管・子宮の重要部位における AMH と AMHR2 の発現が発見された。また加齢後の卵管・子宮では、AMH、AMHR2、HSP47 に陽性の線維芽細胞の増殖が観察された、しかし未だ、卵管・子宮における AMH や AMHR2 の役割は不明である。そこで AMH は子宮の粘膜上皮細胞や線維芽細胞に作用し HSP47 発現を刺激するという仮説について検証した。最初にこれらの細胞の培養法を独自に確立した。次に培養液に AMH(最終濃度 0, 1, 10, 100 ng/mL)を添加して、HSP47 発現量をウエスタンブロット法により測定した。その結果、AMH は粘膜上皮細胞における HSP47 発現量を有意に増加させた ( $P < 0.05$ )。

本学位論文の研究により、ウシの卵管・子宮で、AMH、ならびに、その受容体 AMHR2 が発現していることが発見され、さらに加齢に伴う不妊の発症機構の中で AMH や AMHR2 が重要な役割を担っていることが発見された。

以上により本論文は、博士 (獣医学) の学位論文として十分な価値を有するものと審査員一同は判定した。