

令和元年6月26日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20167

研究課題名(和文) 卵巣黄体機能低下とCalpastatinの関係

研究課題名(英文) Relationship between luteinization function and Calpastatin

研究代表者

川島 一公 (Kawashima, Ikko)

国際医療福祉大学・医学部・研究員

研究者番号：40633946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：黄体化には、LH刺激後5.5-9.5時間のCalpainの活性が必要であることが示唆された。Calpain活性が阻害されると、黄体細胞はP4産生細胞にならず、E2産生細胞になった。これは、更年期障害の初期に認められるE2過多と類似していること、Calpainには内因性の阻害タンパク質が存在していることから、加齢マウスと若齢マウスで内因性活性阻害タンパク質の発現を検出し、加齢マウスで優位に高いことを明らかとした。さらに、Calpain1/2の卵巣特異的ノックアウトマウスが通常の妊孕性を有していることから、黄体化にはCalpain familyが複合的に機能していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LH刺激による黄体化は、遺伝子発現によって制御を受けていることが知られていたが、タンパク質の活性が、その細胞の分化を制御していることを示唆することができた。さらに、更年期障害の初期でみられるエストロゲン過多を誘発する可能性が示唆される知見が得られ、排卵刺激後のどの時間でそのイベントが発生しうるかを示すことができた。現在、どのCalpainが重要な機能を示しているかを検証する必要はあるが、更年期障害を緩和するための新たな分子標的が明らかとなったことに社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Our study suggested that luteinization requires the activity of Calpain at 5.5 hours after LH stimulation. It was found that when Calpain activity in Granulosa cells was inhibited during luteinization, luteal cells did not become normal progesterone-producing cells but became Estrogen-producing cells. Since this is a phenotype observed in the early stage of the menopausal disorder, We considered that Calpain activity decreased early in menopause. And our considered that calpastatin, as endogenous calpain inhibitor, was blocked calpain activation. The expression of Calpastatin was detected in aged mice and young mice, and it was clarified that it was predominantly high in aged mice. Furthermore, another group showed that the Calpain 1/2 knockout mice had normal fertility. Therefore, Calpain family (Calpain 1/2 and more) activation induced luteinization from granulosa cells and overexpression of Calpastatin in aged mice may block luteinization.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：黄体化 更年期障害 排卵 Calpain 顆粒層細胞 Calpastatin カルシウム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の卵巣は排卵期に LH シグナルによる Calpain の活性が卵子の物理的な卵巣外への排出 (排卵) の誘起に関与していることを明らかとしてきた。さらに、排卵刺激ホルモンによる顆粒層細胞の黄体化に Calpain の活性が関与していることが示唆されるデータが得られ、Calpain 活性化抑制剤を投与することによって、黄体化を抑制し、排卵刺激後もエストロゲン合成酵素 Cyp19A1 の高発現を維持する形質が認められた。

2. 研究の目的

黄体化に関与している可能性がある Calpain の機能を解析し、更年期障害などに関連があるかを検証すること。

3. 研究の方法

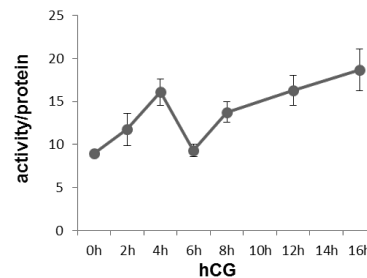
1) 黄体化プロセスにおいて、Calpain の経時的な活性変化を測定した。さらに、Calpain の活性と黄体形成に関与している時間を明らかにするために、抑制作用の半減期が 2 時間と短い Calpain inhibitor を用いて、2 時間毎に投与し、Estrogen 合成酵素 Cyp19a1 と Progesterone 合成酵素の Cyp11a1 の発現調べた。さらに、Cyp11a1 の局在を免疫染色法で検証した。

2) Calpastatin の経時的な遺伝子発現と、若齢マウス、加齢マウスの発現変化とその機能をしらべた。さらに、若齢マウス (3 週齢) と加齢マウス (30 週齢) マウスを用いて Calpastatin の発現量を検証した。

4. 研究成果

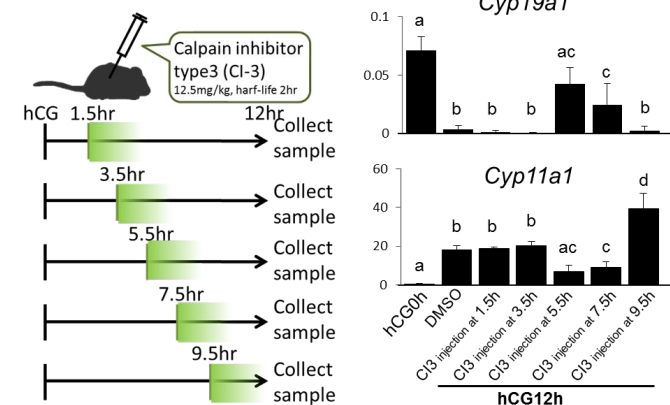
1) 顆粒層細胞の Calpain の活性は、LH 刺激後 (hCG) 4 時間と 16 時間 (CL) がピークだった (図 1)。さらに、Calpain の活性時において、どのタイミングのどの時点が黄体化への起点になっているかを明らかにするために、経時的な活性変化に対し、抑制効果が 2 時間程度持続する抑制剤 (Calpain inhibitor) によって、2 時間ごとに活性を抑制した。その結果、hCG 投与後 12 時間において、排卵刺激ホルモンによって、

図1 経時的なCalpain活性変化



Calpain の活性は有意に増加すること、さらに、排卵刺激ホルモン 5.5 あるいは 7.5 時間目に CI- を投与したマウスで Estrogen 合成酵素 Cyp19a1 の発現が有意に高かった。さらに、Progesterone 合成酵素の Cyp11a1 の合成酵素の発現も同様に 5.5 と 7.5 時間で投与したマウスで発現が有意に低下した。一方で hCG 投与 9.5 時間で CI- を

図2 Calpain inhibitorを用いたin vivo試験



投与したマウスではこれらの現象が認められず、黄体化していると考えられた。また Cyp11a1

遺伝子に関しては未投与区と比較して有意に高い値を示したことから、9.5 時間以降は逆に Calpain 活性が黄体化を阻害している可能性が示唆された (図 2)。

さらに、持続的な黄体機能への影響を検討するために、hCG 投与後 24 時間後の卵巣組織を調べたところ、hCG 投与後 5.5 時間に CI- 投与のマウスは、Cyp11a1 陽性細胞が顕著に少なく (図 3) 未排卵卵胞が認められ、一部の卵胞はシスト状になっていた。一方で、hCG 投与後 9.5 時間後に CI を投与したマウス卵巣では、Cyp11a1 陽性細胞が未投与マウスと同程度であった (図 3)。

2) Calpastatin は LH 刺激から発現が増加し、hCG 投与後 16 時間で発現が最大になっていた。これらは図 2 の Calpain 活性が 9.5 時間以降では Calpain 活性抑制が逆に黄体化を促進するという結果に連動している。さらに、Calpastatin の発現を排卵期の若齢マウスと高齢マウスで比較したところ、有意に Calpastatin の発現が高齢マウスで高いことが明らかとなった (図 4)。これらの結果は、加齢によって排卵期に Calpain の活性が阻害され、その際に黄体化が阻害され、その結果エストロジェンの恒常的な分泌に繋がっているのではないかと考えられた。

一方で、Calpain の活性に主要な Calpain 1、2 ノックアウトマウスの知見を情報収集した結果、産子を得ることが可能な形質であることが明らかとなったことから、Calpain1/2 以外の Calpain family や、Calpain 抑制剤で同様に抑制されるユビキチンが黄体化に関与している可能性が浮上した。今後、排卵期に関与しているそれらの酵素類を突き止め、酵素活性と排卵・黄体に関わる機序を解明し、更年期障害等の内分泌異常の原因と治療法の発見を進める。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Ozawa Y, Watanabe K, Toda T, Shibuya S, Okumura N, Okamoto N, Sato Y, Kawashima I, Kawamura K, Shimizu T. 2018, Heterosis extends the reproductive ability in aged female mice. *Biology of Reproduction*

DOI: 10.1093/biolre/iory260

Kawashima I, Kawamura K. 2018, Regulation of follicle growth through hormonal factors and mechanical cues mediated by Hippo signaling pathway. *Systems Biology in Reproductive Medicine*

DOI: 10.1080/19396368.2017.1411990

図3 Progesterone合成能の検討
hCG投与後24時間における卵巣組織

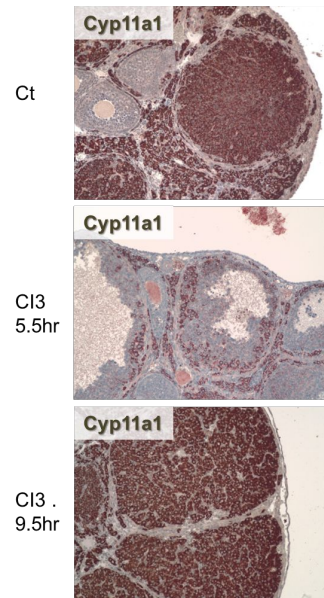
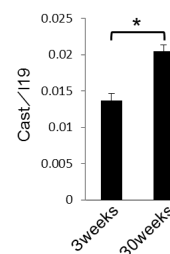


図4 若齢マウスと高齢マウスの
Calpastatin発現変化



Umehara T, Kawai T, Kawashima I, Tanaka K, Okuda S, Kitasaka H, Richards JS, Shimada M. 2017, The acceleration of reproductive aging in Nrg1flox/flox ;Cyp19-Cre female mice. *Aging Cell*
DOI: 10.1111/ace1.12662

Kawashima I, Kawamura K, 2017, Disorganization of the germ cell pool leads to primary ovarian insufficiency, *Reproduction*
DOI: 10.1530/REP-17-0015

Umehara T, Kawashima I, Kawai T, Hoshino Y, Morohashi KI, Shima Y, Zeng W, Richards JS, Shimada M. 2016, Neuregulin 1 Regulates Proliferation of Leydig Cells to Support Spermatogenesis and Sexual Behavior in Adult Mice. *Endocrinology*
DOI: 10.1210/en.2016-1478

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

研究代表者のみ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。