

令和元年6月24日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05017

研究課題名(和文) ノンコーディングRNAに着眼した家畜卵胞発育のエピゲノム制御機構の解明

研究課題名(英文) The epigenetic regulation of follicular development by the expression of non-coding RNA

研究代表者

島田 昌之 (Shimada, Masayuki)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：20314742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：卵胞発育過程の顆粒層細胞における大規模なDNA脱メチル化が、細胞増殖とレチノイン酸依存的に誘導されることを明らかとした。この脱メチル化が発火点となり、ヒストンH3アセチル化が生じる結果、クロマチン構造変化が誘導され、遺伝子発現が誘起されることも示した。この変化に必須な顆粒層細胞の増殖は、個体の加齢に伴う卵巣間質の線維化により抑制されること、顆粒層細胞内のミトコンドリア活性化が必要であることも明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴う妊孕性の低下、感染症や低栄養条件による繁殖障害が家畜やヒトで問題となっている。本研究で明らかとした卵胞発育の分子生物学的理解は、上記が起こる根本原因を解き明かす第一歩となる。本研究で明らかとなった、レチノイン酸がDNA脱メチル化誘導因子であることや細胞増殖のためにミトコンドリアの活性化が必須であるとの知見は、食事(飼養環境)が卵巣機能に直結することを示す研究成果であり、このような知見が繁殖障害や不妊症の予防法開発や治療法の発見につながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：During follicular development process in ovary, about 30% of genome were demethylated in granulosa cells. The demethylation was dependent on cell proliferation and de-novo synthesized retinoic acid. The DNA demethylation switched on the acetylation of histone H3, which changed the morphology of chromatin to open chromatin status. The granulosa cell proliferation that was essential for DNA demethylation was not observed in aged ovary where fibrosis was grown in ovarian stroma. Additionally, we also cleared that the increase of mitochondria activity was required for the cell proliferation in granulosa cells.

This basic information about the molecular mechanisms of follicular development will be contributed for understanding reproductive disorder with increasing age, by inadequate nutrients and by infection and so on. These understandings lead to develop the clinical care to improve infertility.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：卵巣 エピゲノム 顆粒層細胞 遺伝子発現 クロマチン構造

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

### 1. 研究開始当初の背景

【研究の学術的背景 -社会的背景-】家畜の生産性向上に種雌家畜の繁殖形質改善が必要であり、ブタでは産子数、乳房数などの育種改良の結果、年間産子数が 30 頭を超えるまでになっている。しかし、夏期分娩後の受胎率は悪く、通年受胎率は 80%程度にとどまる。さらに、同一系統においても、各農場間で繁殖成績が異なる。また、乳牛の受胎率は 40%程度とさらに低く、乳量・質を高める栄養環境が卵巢機能を低下させていると考えられている。このように暑熱(夏季ストレス)や栄養条件などの環境要因が、遺伝的能力を充分発揮できない家畜生産の限定要因となっている。

#### 【研究の学術的背景 -これまでの研究成果-】

受胎率の低下要因: 申請者は、マウスやブタを対象とした研究を行い、排卵刺激(LH 刺激)を受感した卵胞内で、顆粒層細胞が EGF like factor を発現し、EGFR-ERK1/2 系の活性化を介して、卵丘細胞の機能変化と卵成熟、排卵が誘起されること、卵の減数分裂進行速度と受精能力は、LH により発現する NRG1 に依存することも、卵巢特異的 Nrg1 欠損マウスを作製し、解明した。さらに、卵丘細胞が分泌するケモカイン類は精子を卵近傍に誘引し、受精を促進することを、LH により誘導される卵丘細胞の初期免疫機構という新たな観点から解明した。そして、着床は、排卵後に形成される黄体の分泌物(プロゲステロン)により誘起され、その合成には LH により形成される核内構造体(パラスペックル)や LH により上昇する Ca<sup>2+</sup>濃度依存的カルパイン活性による細胞骨格の構造変化が必須であることも明らかとした。以上のように、これまでの研究成果から、排卵刺激となる LH による一連の細胞機能変化が受精、着床、妊娠に必須であり、LH 低分泌/低感受性が=繁殖障害となりうることを解明してきた。つまり、LH 低反応性を克服するために、LH 反応性の獲得機構を詳細に解析する必要がある。

### 2. 研究の目的

卵胞は、原始卵胞から発育を開始し、LH 反応性を獲得する排卵前卵胞に発達するまでに、げっ歯類でも数週間、大型家畜やヒトでは数か月を要する。この間に卵を覆う顆粒層細胞の構造変化と増殖、機能変化が生じるが、我々は「卵胞発育期の顆粒層細胞で LH 受容体をコードする *Lhcgr* を含む 1,000 以上の遺伝子が発現上昇し、それらのプロモーター領域に *Lhcgr* 同様の CpG island が高頻度で存在することを明らかとした。このことから、卵胞発育期における大規模かつ選択的なプロモーター領域の DNA 脱メチル化が、卵胞発育期と排卵期特異的な遺伝子発現の ON・OFF を制御するマスターレギュレーターであると仮説立てた。

この DNA の脱メチル化は、脱メチル化されるプロモーター領域それぞれに相補的な *PancRNA* と *Tet2* に依存する能動的脱メチル化と細胞増殖時にメチル化がコピーされない受動的な脱メチル化という二つの仕組みが想定される。顆粒層細胞は卵胞発育期に増殖能が高いことから後者の可能性が高いが、前者の non-coding RNA も多数発現するとの予備検討結果を得ていることから、両者による大規模な DNA 脱メチル化誘起機構が存在するか否かを解明する。これらの結果から、卵胞発育環境とその不全に起因する繁殖障害を解明し、生産性を高める繁殖管理法を開発することを目的とする。

具体的には、上述の仮説を立証するため、直近のターゲットであるブタと卵胞形成や排卵のメカニズムが類似のマウスをモデルとして、飼育環境と低繁殖性との関係を解明し、その知見から至適繁殖環境を同定する画期的な知見を得る。

### 3. 研究の方法

マウスの卵胞発育過程において、顆粒層細胞で脱メチル化される遺伝子群を網羅的に解析するため、次世代シーケンサーを用いてメチル化シーケンスを実施する。得られた解析データは、発現遺伝子の網羅的解析結果(マウス顆粒層細胞のマイクロアレイ解析結果)と比較解析し、プロモーター領域の脱メチル化と遺伝子発現との関係から、真に重要な脱メチル化遺伝子を候補化する。

候補化された遺伝子について、卵胞発育異常を人為的に再現した低レチノール食摂取マウス、卵巢老化モデルマウスや体外培養系(細胞増殖抑制、FSH、テストステロンなどの選択的刺激)により、脱メチル化が誘導されない条件を個々の遺伝子部位のバイサルファイトシーケンス解析により解析する。

これらにより、大規模な脱メチル化が誘導されるか否か、その大規模な脱メチル化誘導に影響する主要因は何かを明らかとする。

明らかとした主要因について、それがどのようにして脱メチル化を引き起こすのかを明確にするため、DNA の脱メチル化とともに遺伝子発現のエピジェネティック制御機構として知られているヒストンアセチル化、およびそれらにより遺伝子発現を ON にする必須条件となる DNA のオープンクロマチン化を解析する。前者は、抗ヒストン H3 アセチル化抗体を用いた Chip アッセイにより解析し、後者は微量の DNase 感受性による DNA 分解度の差からクロマチン構造を推定する。

次に主要因が活性化される仕組みについて（主要因は細胞増殖と DNMT1 発現低下との結果が得られた），細胞増殖は既知の CDK1 や CDK4 の活性化およびサイクリン D2 などの発現だけでなく細胞分裂に必須なミトコンドリア代謝機構に着眼し，ミトコンドリア活性（JC1 染色による FACS 解析），ミトコンドリアにおける遺伝子発現とタンパク質合成機構の解明などを行う．さらに，DNMT1 発現については，その遺伝子発現制御機構について，分子生物学的，内分泌学的解析を行う．

#### 4. 研究成果

顆粒層細胞における卵胞発育期の大規模な DNA 脱メチル化の網羅的解析

本研究では，抗 5mC 抗体を利用した MeDIP-Seq でメチル化したゲノム領域を網羅解析した．

二次卵胞（SF），胞状卵胞（AF），成熟卵胞（PF）に由来する顆粒層細胞間で比較した結果，成熟卵胞の顆粒層細胞では，各染色体遺伝子の約 30% の遺伝子が脱メチル化され，特にプロモーター領域では 40% 弱の遺伝子でメチル化割合が 50 % 以上低下（脱メチル化）していたことから，体細胞の分化過程でも大規模に脱メチル化が起こることが初めて明らかになった（図 1）．さらに，ステージ別に解析すると，二次卵胞から胞状卵胞にかけて大規模な脱メチル化が生じていた（図 2）．これら遺伝子をオープンソースを用いて機能分類した結果，二次卵胞から胞状卵胞では細胞接着系，胞状卵胞から成熟卵胞では核内の細胞機能変化に関わる遺伝子が多いことが判明した．

脱メチル化される遺伝子の脱メチル化割合が高い Top10 遺伝子について，RT-PCR による遺伝子発現解析を行った結果，いずれも排卵前卵胞の顆粒層細胞，あるいは排卵刺激後の顆粒層細胞で高い発現が検出された．また，既知の顆粒層細胞で発現し，卵胞発育（*Cyp19a1*, *Ccnd2* など）や排卵（*Lhcgr*, *Snap25*, *Areg*, *Pgr* など）に重要な役割を果たし遺伝子群も脱メチル化されていることが確認された．

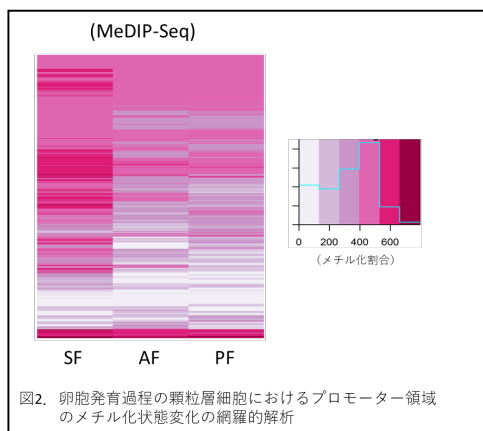
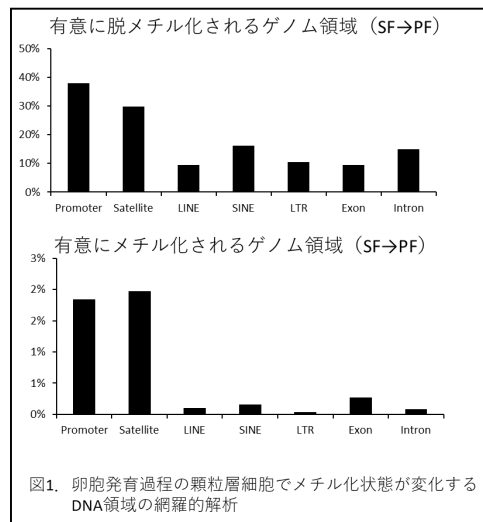
顆粒層細胞の大規模な脱メチル化を誘導する主要因解析

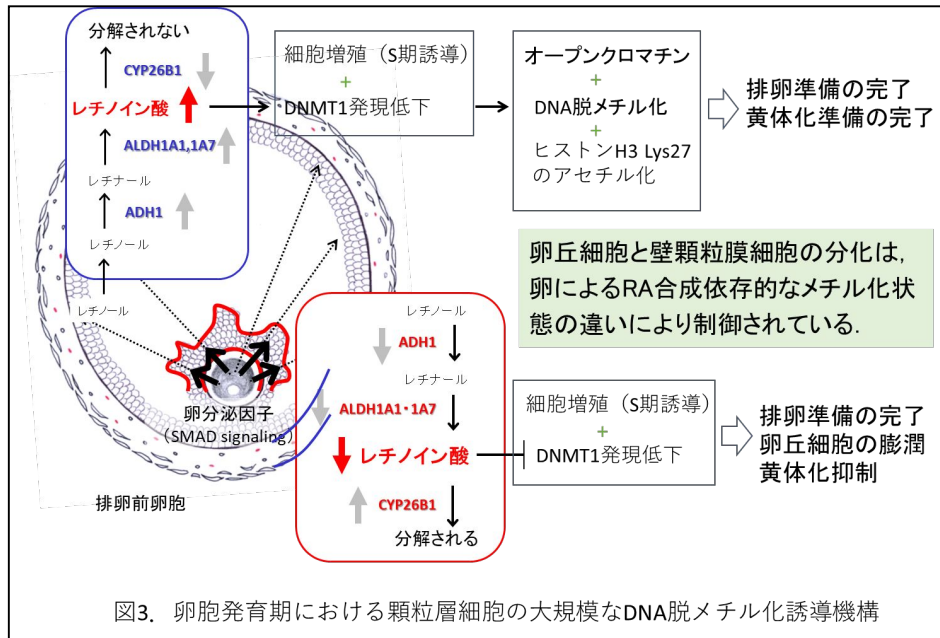
LH 受容体発現が低下する低レチノール摂取マウスを用いて，DNA の脱メチル化解析を行った結果，低レチノール食摂取により *Lhcgr* プロモーター領域だけでなく，他の脱メチル化サイトも高メチル化状態が維持されていた．そこで，メチル化維持および脱メチル化誘導に関与する因子群の発現変化を解析した結果，低レチノール摂取により顆粒層細胞でメチル化維持酵素 *Dnmt1* 発現が高値を維持するのに対して，*Tet2* 発現の誘導が認められなかった．この結果から，細胞増殖時におけるメチル化のコピーがされにくくなることと，TET2 による能動的な脱メチル化誘導の両者が関与している可能性が示された．一方，卵巣老化モデルマウス（加齢により排卵刺激への感受性が低下するマウス）では，卵巣間質の線維化という外的要因により顆粒膜細胞の増殖抑制が生じる結果，*Lhcgr* 発現が低下していた．

そこで，顆粒層細胞の体外培養系を用いて，細胞増殖抑制剤の添加効果を検証した結果，細胞増殖抑制剤が DNA のメチル化状態を維持し，*Lhcgr* 発現を低下させた．さらに，卵分泌因子である BMP family が Smad 系を介してレチノイン酸合成を抑制し，その結果レチノイン酸依存的な DNMT1 発現低下が起こらなくなることも明らかとなった．これらの結果から，卵胞発育過程の顆粒層細胞の増殖，それによる卵から直径が遠ざかることが顆粒膜細胞の排卵刺激感受性獲得（大規模な DNA 脱メチル化）に必須であることが明らかとなった（図 3）．

細胞増殖期における大規模な DNA 脱メチル化機構の解明

プロモーター領域の脱メチル化は，転写開始点近傍のみでなく遠位にもみられた．このような遠位における DNA 脱メチル化は，スーパータンジェントといわれる DNA 構造の変化と密接な関係にあると報告されている．そこで，ヒストン H3 アセチル化抗体を用いた Chip アッセイとオープンクロマチン解析を行い，顆粒膜細胞における分化過程の DNA 構造変化の解明を試みた．その結果，卵胞発育期に発現する遺伝子では，プロモーター領域の脱メチル化とヒストンアセチル化は同時に起こり，その時クロマチンもオープン化していた．しかし，排卵刺激後に発現上昇する遺伝子では，DNA の脱メチル化は排卵刺激前に生じていたが，ヒストンアセチル化は

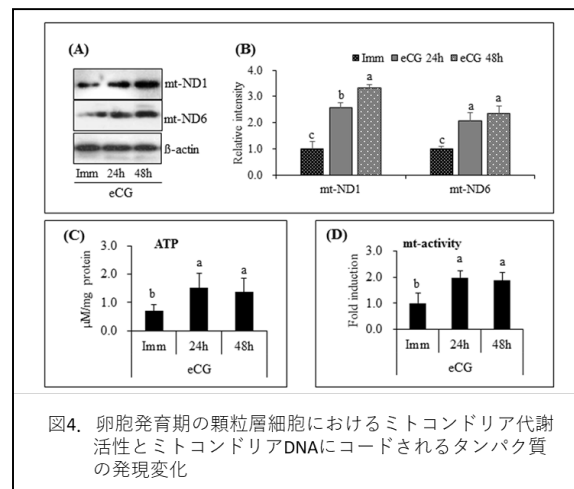




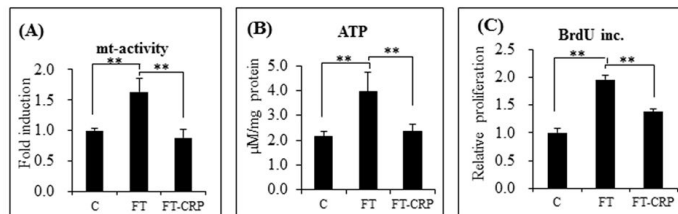
見られず、クロマチン構造もクローズであった。それが、排卵刺激によりヒストンアセチル化が起こり、クロマチン構造の変化も誘導された。この結果から、DNAの脱メチル化が発火点となるが、その後のヒストンアセチル化酵素の制御機構の際により遺伝子の発現時期が決定されると考えられた(図3)。

顆粒層細胞の増殖とミトコンドリア代謝機構との関係

細胞増殖にはエネルギーが必要である。このエネルギーとなるATPは、解糖系と電子伝達系により合成されることから、グルコース無添加、低グルコース培地および高グルコース培養液を用いて顆粒層細胞を培養した。その結果、いずれの培養条件においてもFSH刺激によりミトコンドリアの膜電位活性とATP産生が活性化されることが明らかとなった。In vivoにおいてもFSH製剤投与後の顆粒膜細胞でミトコンドリアの代謝活性は上昇し、その時、ミトコンドリアの遺伝子発現とタンパク質合成も活性化していた(図4)。そこで、ミトコン



ドリア特異的な翻訳抑制剤を用いてミトコンドリアのセントラルドグマと増殖との関係を解析した結果、ミトコンドリアDNAがコードする電子伝達系酵素群の発現と翻訳が持続的なATP産生と細胞増殖に必須であることが明らかとなった(図5)。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

1. Hoque SAM, Kawai T, Zhu Z, Shimada M. Mitochondrial Protein Turnover Is Critical for Granulosa Cell Proliferation and Differentiation in Antral Follicles. J Endocr Soc. 査読有 3(2), 2019 pp.324-339. doi: 10.1210/js.2018-00329.
2. Kitasaka H, Kawai T, Hoque SAM, Umehara T, Fujita Y, Shimada M. Inductions of granulosa cell luteinization and cumulus expansion are dependent on the fibronectin-integrin pathway during ovulation process in mice. PLoS One. 査読有 13(2), 2018 e0192458. doi: 10.1371/journal.pone.0192458

3. Kawai T, Richards JS, Shimada M. The Cell Type-Specific Expression of Lhcgr in Mouse Ovarian Cells: Evidence for a DNA-Demethylation-Dependent Mechanism. *Endocrinology*. 査読有 159(5), 2018 pp. 2062-2074. doi: 10.1210/en.2018-00117.
4. Umehara T, Kawai T, Kawashima I, Tanaka K, Okuda S, Kitasaka H, Richards JS, Shimada M. The acceleration of reproductive aging in Nrg1flox/flox ;Cyp19-Cre female mice. *Aging Cell*. 査読有 16(6), 2017 pp.1288-1299. doi: 10.1111/ace1.12662.
5. Kawai T, Yanaka N, Richards JS, Shimada M, De Novo-Synthesized Retinoic Acid in Ovarian Antral Follicles Enhances FSH-Mediated Ovarian Follicular Cell Differentiation and Female Fertility. *Endocrinology*. 査読有 , 157 (5) , 2016, pp. 2160-2172. doi: 10.1210/en.2015-2064
6. Umehara T, Kawashima I, Kawai T, Hoshino Y, Morohashi KI, Shima Y, Richards JS, Shimada M. Neuregulin 1 Regulates Proliferation of Leydig Cells to Support Spermatogenesis and Sexual Behavior in Adult Mice. *Endocrinology*. 査読有 157(12), 2016 pp.4899-4913. 10.1210/en.2016-1478
7. Okamoto A, Ikeda M, Kaneko A, Kishida C, Shimada M, Yamashita Y. The Novel Pig In Vitro Maturation System to Improve Developmental Competence of Oocytes Derived from Atretic Non-Vascularized Follicle. *Biol Reprod*. 査読有 95(4), 2016, pp.1-16. doi: 10.1095/biolreprod.116.138982.

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 島田昌之 加齢に伴う卵巣機能低下の原因探索, 日本受精着床学会, 招待講演, 2018年8月, 千葉市
2. 島田昌之 卵胞発育ステージに合わせた IVM, 日本受精着床学会, 招待講演, 2018年8月, 千葉市
3. 島田昌之 卵胞発育過程における大規模な DNA 脱メチル化による排卵準備, 日本受精着床学会, 招待講演, 2018年8月, 千葉市
4. Shimada M. The aging ovary: restriction of follicle growth by abnormal endocrine functions and ovarian stromal matrix fibrosis. 15th International Symposium of Immunology of Reproduction, 招待講演, June 14-16, 2018, Varna, Bulgaria
5. 島田昌之 Neuregulin1 による雌雄配偶子形成メカニズム, 日本内分泌学会学術集会, 招待講演, 2018年4月, 宮崎市
6. 島田昌之 加齢に伴う卵胞発育不全(ローレスポンダー)の原因探索とその治療戦略 第27回臨床内分泌代謝 Update「性腺」招待講演 2017年11月, 神戸市
7. 島田昌之 高FSH/高LHがもたらす卵巣皮質の繊維化による2次卵胞発育不全 日本生殖医学会学術集会, 招待講演, 2017年11月, 下関市
8. 島田昌之 卵巣の老化と卵成熟障害, 日本受精着床学会 招待講演 2017年7月, 米子市
9. Umehara T, Shimada M. Creatine enhances sperma capacitation and is associated with successful in vivo and in vitro fertilization in mice. 50th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, USA, 2017.
10. Kawai T, Shimada M. CYP26b-1induced degradation of retinoic acid is essential for the differentiation of trophoblast cells. 50th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, USA, 2017.
11. 島田昌之 多嚢胞性卵巣症候群における内分泌破綻, 第69回日本産科婦人科学会学術講演会, 招待講演, 2017年4月, 広島市
12. 島田昌之 採卵されてしまった未受精卵を如何に培養するか? 日本受精着床学会 招待講演 2016年9月, 軽井沢
13. Kawai T, Richards JS and Shimada M. Cell type-specific demethylation of LH Receptor (Lhcgr) promoter regions facilitates FSH mediated induction of Lhcgr in murine granulosa cells of preovulatory follicles. 49th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, USA, 2016
14. Umehara T, Zeng WX, Richards JS and Shimada M. LH-induced NRG1 is essential for adult Leydig cell proliferation in the infant testis that determines androgen production and spermatogenesis in adult male mice. 49th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, USA, 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：星野由美

ローマ字氏名：Yumi Hoshino

所属研究機関名：広島大学

部局名：大学院生物圏科学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：10451551

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：JoAnne S. Richards

ローマ字氏名：

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。