

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17918

研究課題名（和文）卵巣老化と関連する新規な卵胞貯蔵制御分子の解明

研究課題名（英文）Elucidation of novel aging-related regulators of ovarian follicular reserve

研究代表者

諫山 慧士朗（ISAYAMA, Keishiro）

山口大学・大学研究推進機構・助教

研究者番号：30780887

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：加齢による卵巣機能低下の要因は多様であり、分子メカニズムについて不明な点が多い。本研究は、次世代シーケンスを用いてマウス卵巣の遺伝子発現を網羅的に調べ、加齢で顕著に変化する遺伝子群を抽出、その卵巣機能低下への関与を明らかにすることを目的とした。結果、最も大きな変化を示したのがアルドケト還元酵素をコードする遺伝子であり、その発現量の低下、さらに酵素活性の低下を認めた。アルドケト還元酵素の生殖機能を調べるためにゲノム編集でノックアウトマウスを作成したところ、性周期が野生型と比べて明らかに延長していた。これは性周期を制御する卵巣ホルモンの代謝異常を示唆し、加齢に伴う卵巣機能低下の要因と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴う卵巣機能の低下は、生殖能力の低下をまねくと同時に、卵巣ホルモン分泌の低下により動脈硬化、骨粗しょう症、認知症といった加齢性疾患のリスク要因となる。分子メカニズムを理解することは、少子化の抑制、健康寿命の推進を実現する上で重要である。本研究は、マウスの加齢卵巣でアルドケト還元酵素遺伝子の発現量・機能が顕著に低下することを明らかにし、その遺伝子欠損マウスは性周期が延長することから、ホルモン代謝の異常が示唆された。よって、この酵素は加齢による卵巣機能低下の要因の一つを担っている可能性がある。今後、卵巣のアンチエイジングを実現する上で重要な成果である。

研究成果の概要（英文）：There are various causes in the loss of ovarian function with aging, and many unclear points regarding the molecular mechanism. The purpose of this study was to thoroughly investigate the gene expression of mouse ovaries using a next-generation sequence, to extract a group of genes that markedly change with age, and to clarify their involvement in ovarian function decline. As a result, the gene showing the greatest change was the gene encoding aldoketo reductase, and the expression level of this gene was decreased, and further the enzyme activity was also decreased. When a knockout mouse was created by genome editing to investigate the reproductive function of aldoketo reductase, the estrous cycle was clearly prolonged compared with the wild type. This suggested an abnormal secretion of ovarian hormones that control the estrous cycle, and was considered to be a factor of ovarian function decline with age.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：卵巣老化 アルドケト還元酵素 GONAD法 次世代シーケンサー ゲノム編集

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣老化(女性ホルモン分泌、卵胞発育、排卵における機能低下)はヒトの場合、平均 38 歳前後から加速的に進行し、月経周期の異常、妊娠率の低下が認められる。50 歳付近では卵胞が欠乏し、閉経を迎える。マウスの場合も同様で、48 週齢(約 1 年)付近から卵巣老化が生じ、性周期延長、また妊娠率の低下が認められる。閉経の頃に約 2 年半の寿命を迎える。卵巣寿命を延長するためには、このヒトとマウスに共通する中年期から生じる卵巣老化の進行をいかに緩和するかが鍵であると考えられる。卵巣老化の分子メカニズムが複雑であると考えられる一方で、実際に分子 1 つの操作で卵巣老化進行が大きく変化する可能性が示されている。代表としてフォークヘッド転写因子 FOXO3 過剰発現マウス、またアポトーシス誘導因 BAX 欠損マウスで、結果的に卵胞消費が抑えられ、加齢マウスでも若齢と同レベルの妊娠能力を保持している(Castrillon et al., *Science*, 2003., Perez et al., *Nature Genetics*, 1999.)。逆にグルタチオン合成酵素 GCLM1 欠損マウスでは、酸化ストレスが亢進し、卵巣老化が加速する(Luderer et al., *Endocrinology*, 2015.)。しかしながら、これらの分子が自然に生じる卵巣老化の原因分子かは不明である。

## 2. 研究の目的

本研究は、次世代シーケンスを用いて性周期中のマウス卵巣の遺伝子発現を網羅的に調べ、発現パターンが加齢で顕著に変化する遺伝子群を抽出、ゲノム編集を用いてその卵巣機能低下への関与を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### ・次世代シーケンサー ~ Super SAGE 法 ~

若齢(6 週齢)および加齢(48 週齢)の C57BL/6N マウスを用意し、性周期を同期化するために、5IU PMSG および 5IU hCG を腹腔内投与した。PMSG/hCG 投与後 24h, 48h, 72h, 96h と、平均的な性周期である 4 日間にわたって、卵巣を採取した。Total RNA 抽出し、RNA 純度を確認後、SAGE キットに従って逆転写した。サンプルを識別するバーコード・アダプター配列を付加した後、制限酵素処理によって 3' 側の 27bp 長鎖タグを取得、発現遺伝子ライブラリーを作製した。タグを次世代シーケンサー SOLiD5500 によってリードし、CPM(100 万リードあたりのタグカウント)を遺伝子発現量として用いた。

### ・大規模発現データ解析

CPM をもとに若齢または加齢卵巣で 24-48h, 48-72h, 72-96h の時間帯で有意に変動する遺伝子を volcano plot を用いて解析した。さらに加齢で変動しなくなった遺伝子群について IPA pathway 解析ソフトを用いて、どのような遺伝子経路であるか解析した。変動遺伝子は、 $Fold\ cahege > |2|$ 、 $p\text{-value} < 0.05$  を満たす遺伝子と定義した。

### ・mRNA 量定量、免疫組織化学

mRNA 量は、PMSG/hCG 投与後の若齢および加齢卵巣より Total RNA を抽出し、逆転写後、qPCR 法で定量した。また免疫染色ではアルドケト還元酵素 1B ファミリーを認識するとして、ヒト AKR1B10 認識ウサギポリクローナル抗体を用いた。卵巣組織切片上で DAB 法による免疫染色を行った。

### ・卵巣における酵素活性測定、プロスタグランジン含有量測定

PMSG/hCG 投与後 24h の若齢および老齢卵巣において、アルドケト還元酵素 1B の基質 isocapro-aldehyde, 4-HNE に対する酵素活性を比較した。ビーズ破砕によって得られた卵巣クルードを 10 万 g の超遠心にかけて、サイトゾル画分を得た。基質として 1mM isocapro-aldehyde, 4-HNE を、補酵素として NADH を混和した反応液を作製、サイトゾルサンプルを添加後、340nm の吸光波長において NADH 消費速度を測定した。またアルドケト還元酵素 1B1 が合成するプロスタグランジン F2 量を ELISA 法によって測定した。

### ・ゲノム編集によるアルドケト還元酵素遺伝子ノックアウト(KO)個体の作出

妊娠マウスの卵管膨大部にガイド RNA および CAS9 タンパクを注入し、エレクトロポレーションを用いて卵管内の受精卵に対して遺伝子導入した。出産後、サンガーシーケンスによる遺伝子型判定を行い、KO が予想されるゲノム編集個体を選抜した。

・性周期

野生型と K0 マウスについて、膣垢スメア検査により 18 日間にわたって発情ステージを判定した。

#### 4. 研究成果

まず Super SAGE 法による大規模遺伝子発現解析から、加齢の影響は、PMSG/hCG 投与後 24h-48h で最も変動遺伝子数が多い時間帯であることを見出した。24h-48h の時間帯で、若齢では減少遺伝子:141 個, 増加遺伝子:122 個であったのに対し、加齢では減少遺伝子:69 個, 増加遺伝子:34 個で変動遺伝子の数が有意に減少した(カイニ乗検定、 $P < 0.05$ )。加齢で変動が認められなくなった遺伝子群について、ネットワーク解析を行った結果、LH/hCG 応答遺伝子群の応答が加齢で低下していることを認めた。またこれら遺伝子群が有意にアノテーションされる経路は排卵というよりはむしろ卵巣ステロイド合成・代謝関連であった。また補足的に、発現量が増加した加齢遺伝子群に着目したところ、この群の上流制御因子の top は抗酸化ストレスの転写因子 Nrf2 であった。やはり老化における酸化ストレスの影響は大きいものと考えられた。

LH/hCG 応答が最も低下した遺伝子はアルドケト還元酵素をコードする遺伝子であり、再度 PMSG/hCG 投与後 24h-96h の若齢及び加齢卵巣を比較した。PMSG/hCG 投与後 24h の加齢卵巣で、mRNA 量にして 15 倍減少した。また免疫組織化学による解析では、顆粒膜細胞や卵母細胞ではその局在は認められず、莖膜細胞と間質細胞に発現局在しており、加齢でその染色強度の減少を認めた。さらに酵素活性について、4-HNE の代謝活性に変化は認められなかったが、isocaproaldehyde の代謝低下、また PGF2 合成低下を認めた。つまりアルドケト還元酵素 1B の遺伝子発現から酵素機能に至るまで PMSG/hCG に対する応答低下が認められ、さらにそれは莖膜細胞層で生じていることを明らかにした。

着目したアルドケト還元酵素 1B 遺伝子の K0 マウスを作成したところ、興味深いことに、若齢にもかかわらず性周期の平均日数が野生型と比べて 1.5 倍近く延長することを認めた。これは性周期が延長している加齢マウス生殖の内分泌状態を模倣している可能性、また若齢時から卵巣老化が進行している可能性を示唆した。今後の展開として、K0 マウスの内分泌、またアルドケト還元酵素の卵巣ステロイド合成における役割を詳細に解析することにより、卵巣老化の分子メカニズムを明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 諫山 慧士朗
2. 発表標題 次世代シーケンスとGONAD法を用いた卵巣老化における排卵機能低下の原因遺伝子の解明
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国四国支部例会 2019年5月17日
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 諫山 慧士朗
2. 発表標題 加齢に伴って低下する排卵機能に關与する遺伝子の解明—GONAD法によるゲノム編集マウスの作製—
3. 学会等名 第59回日本生化学会中国四国支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 諫山慧士朗
2. 発表標題 加齢によって変動する排卵周期における卵巣遺伝子の網羅的発現解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 諫山慧士朗
2. 発表標題 加齢によって発現が変動した卵巣遺伝子のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第58回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----