

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19316

研究課題名(和文)哺乳類雌の生殖寿命向上に向けたオートファジー誘導による原始卵胞数上方制御法の確立

研究課題名(英文) Establishment of methods to upregulate the number of primordial follicles by activation of autophagy to improve lifelong fertility in mammals

研究代表者

木村 直子(Kimura, Naoko)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：70361277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：出生後54時間までの新生仔期雌マウスに、オートファジー特異的誘導剤Tat beclin 1あるいはxCT阻害剤Sulfasalazineを投与した場合、60時間での原始卵胞数は、それぞれ約1.2倍と約1.1倍に増加した。特にTat beclin 1投与区では、生涯累計産仔数が5匹分高く、13～15ヶ月齢の卵巣内の各発育卵胞数も顕著に高く維持されていた。またTat beclin 1を添加下の新生仔卵巣培養でも、生体と同様の効果が確認された。以上から、新生仔マウスへの人為的オートファジーの促進は、原始卵胞プールを拡大させ、それらは性成熟後も維持され、生涯の妊孕能の向上に繋がるものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎生後期から新生仔初期の卵巣で進行する原始卵胞形成過程の分子機構は、解析手法の難しさや動物モデルが少ないなどから、十分な全容解明には至っていない。本研究の原始卵胞数の上方制御モデルでの解析から、小サイズシストの優勢卵母細胞数が増加することで、卵の生存性が向上し、原始卵胞数の増加に寄与することが示唆された点は、学術的意義と考えられた。また新生仔期に、安全性が高いオートファジー誘導剤の投与により、生体レベルで原始卵胞数を上方制御することで、生涯生殖能の向上に繋がることを実証できた点は、産業動物や希少な雌動物資源の維持と増産の効率化を図る上で、根本的解決に繋がりが得る成果と考えられた。

研究成果の概要(英文)：In mice that received Tat-beclin 1 or Sulfasalazine by 54 h after birth, the primordial follicle numbers were increased by about 1.2 times, 1.1 times, respectively compared with the control group at 60 h. Especially in the 13 to 15 months old mice, the numbers of primordial follicles, the secondary follicles and graafian follicles in the Tat-bec.1 group were also significantly greater than that in the control group. The lifetime total number of offspring in the Tat-bec.1 group was at least 5 pups greater than that in control group, suggesting that the upregulated primordial follicles have a normal developmental potential. We report that an enhancement in autophagy in neonatal mice during the follicle formation period accelerates follicle assembly by promoting oocyte survival. Consequently, the stockpile of primordial follicles expands, leading to an improvement in individual lifelong fertility. This approach could be effective in increasing reproductive ability in other animal species.

研究分野：動物生殖学、動物生殖工学

キーワード：原始卵胞 オートファジー 新生仔 卵巣 生殖能

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の雌では、胎仔期から出生前後までに、卵巣内のほぼ全ての卵原細胞が体細胞分裂を終え、減数分裂を開始し、その過程で原始卵胞として貯蓄される。その後の二次性徴や性周期を制御する性ホルモンの産生や排卵は、貯蓄原始卵胞の一部が卵胞発育へリクルートされることでなされる。したがって雌の生殖能や生殖寿命には、1)卵巣内の貯蓄(残存)原始卵胞数、2)個体加齢で劣化する卵のクオリティ、が大きく関与することが知られており、それらを上方制御するための方法は研究課題になり得ると考えられる。前者について、周産期の原始卵胞プールの確立過程における分子機構は、部分的に明らかにされつつあるが、全容は統一コンセンサスが得られていない。

申請者らは、オートファジー(ATG)の促進により原始卵胞数が上方制御される実験モデルを見出した。本研究では、このモデルを用いて、原始卵胞の形成過程と維持に関わる分子機構の解明を進めるとともに、新生仔期に上方制御された原始卵胞プールが、性成熟後も維持されるのか、その要因についても形態学的、分子学的に解析を行った。

2. 研究の目的

申請者らは、新生仔マウスに一定期間の授乳制限により ATG を促進したところ、原始卵胞数が増加することを見出した。しかしこのモデルでは、授乳制限によるダメージのために性成熟後まで正常発育する個体が得られにくく、その後の生殖能の評価が困難であった。本研究では、生体投与で安全性が報告されてる ATG 薬剤、このほか周産期前後の胎仔(新生仔)体内の生理的变化を引き起こす因子に注目した薬剤を新生仔に投与し、原始卵胞数の変化、その後の生殖能について評価し、貯蓄原始卵胞数の上方制御法の確立と、雌個体の生殖寿命延伸の可能性を検証した。

3. 研究の方法

- 1)新生仔マウスへの薬剤投与による原始卵胞数の上方制御の検証として、(1) 効果的薬剤の検討(ATG 特異的誘導剤 Tat-beclin 1、xCT 特異的阻害剤スルファサラジンなど)、(2)効果的投与時期の検討(出生後 60 時間まで、出生後 60 時間以降)を行った。
- 2)原始卵胞数が上方制御された性成熟後の雌マウスについて、生涯の繁殖能のほか、若齢期(2ヶ月齢)および老齢期(13~15ヶ月齢)における(1)排卵数、(2)各発育ステージの卵胞数、(4)卵の体外発生能などを評価した。
- 3)ATG 特異的誘導剤 Tat-beclin 1 を投与した新生仔マウスの卵巣組織の形態学的変化について、原始卵胞の分化や卵胞生存のマーカーとなり得るタンパク質の発現を調査し、評価した。また卵巣器官培養系に Tat-beclin 1 を添加し、生体と同様の効果がみられるか検証した。当研究室では、周産期前後の分化過程にある卵巣器官培養系がないため、まず培養系の立ち上げから行った。

4. 研究成果

新生仔期雌マウスに ATG 特異的誘導剤 Tat-beclin 1 を出生後 54 時間まで連続投与したところ、60 時間での原始卵胞数は対照区より 1.2~1.5 倍有意に高くなった(図 1)。卵母細胞特異的タンパク質 MVH と基底膜構成タンパク質 Laminin を指標とする蛍光免疫染色でも、(原始卵胞を含む)単一卵母細胞数が有意に増加していることが確認された。Tat-beclin1 投与区の卵巣では、ウェスタンブロッティングによる ATG マーカー LC3B の顕著な発現増加と、アポトーシスマーカー

(Caspase3, 9)の発現減少傾向がみられた。さらに出生後 120 時間での TUNEL 法と DNA 断片化マーカーである γ H2A.X による細胞死の検出では、減少傾向がみられた。

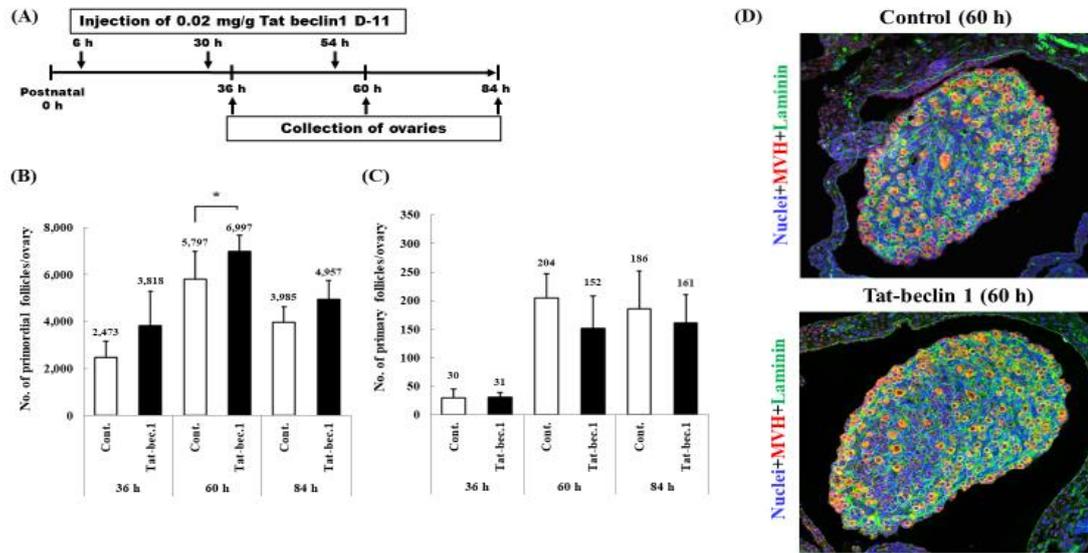


図 1. (A) : 新生仔雌マウスへの Tat-beclin 1 の投与時間. (B) : 投与マウス卵巣の連続切片の HE 染色による原始卵胞数の評価. (C) : 投与マウス卵巣の連続切片の HE 染色による一次卵胞数の評価. (D) : 卵母細胞マーカー(MVH)および基底膜マーカー(Laminin)による組織蛍光免疫染色像.

Tat-beclin1 投与区の性成熟後の出産率は、対照区に比べ、2 および 6 ヶ月齢では差がなかったが、10 ヶ月齢以降で高い傾向がみられた。投与区の平均産仔数は、2、6 および 10 ヶ月齢のいずれでも有意に高く、12 ヶ月齢でも高い傾向がみられた。4 産目までの累計産仔数は、約 5 匹分高くなった (Table 1)。

Table 1. Fertility in 2, 6, 10 and 12 months old mice from Control and Tat-beclin1 groups.

Experimental groups	n=	Body weight (mean±SD)	Delivering rate (%)	No. of offspring (mean±SD)	
2 months	Control	22	19.8 ± 1.2	95.5(21/22)	5.2 ± 2.5 ^a
	Tat-beclin 1	24	20.1 ± 1.2	100(24/24)	6.6 ± 1.4 ^b
6 months	Control	19	26.4 ± 1.5	100(19/19)	7.0 ± 2.6 ^a
	Tat-beclin 1	21	26.3 ± 1.4	100(25/25)	8.6 ± 1.4 ^b
10 months	Control	19	28.4 ± 1.3	68.4(13/20)	4.7 ± 1.9 ^a
	Tat-beclin 1	20	28.3 ± 1.4	80(16/20)	6.6 ± 1.9 ^b
12 months	Control	9	28.9 ± 2.1	44.4(4/9)	3.8 ± 0.4
	Tat-beclin 1	11	28.4 ± 1.1	54.5(6/11)	5.7 ± 1.8

^{a,b} : Values with difference superscript letters are significantly different at the same age (P<0.05).

Tat-beclin1 投与区の老齢個体(13~15 ヶ月齢)の卵巣では、総卵胞数、原始卵胞数、2 次卵胞数、グラーフ卵胞数が、対照区より有意に高く、他の卵胞でも高い傾向がみられた (図 2)。老齢個体(13~15 ヶ月齢)にホルモンによる過排卵処理を行い、排卵前の胞状卵胞から卵子を採取し、体外成熟を行ったところ、対照区の採卵数が 3.6 個に対し、Tat-beclin1 投与区では 6.3 個と顕著に高く、正常な紡錘体形態を有する MII 期卵の割合も高かった。以上から、新生仔期の ATG 誘導により拡大した卵胞プールは、性成熟後も老齢期まで維持され、その卵胞発育は正常であり、その結果、雌個体の生涯の生殖能が向上したものと考えられた。

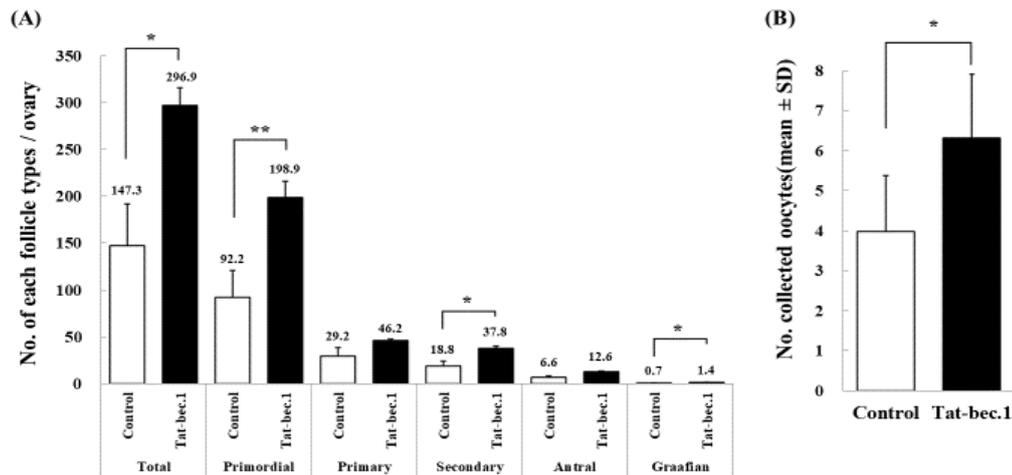


図2. (A): 13~15ヶ月齢での Tat-beclin 1 投与マウス卵巣の連続切片の HE 染色による各発育ステージの卵胞数の評価. (B): 13~15ヶ月齢で過排卵処理後、回収された排卵前の卵子数.

一方、新生期卵巣培養系で出生直後の C57BL/6J 系あるいは ICR 系マウスの卵巣を、Tat-beclin 1 5~20 μ M 添加下で 3 日間培養後、連続切片で卵胞数を評価したところ、いずれの系統でも 10 μ M 添加区で、原始卵胞数が顕著に高くなり、生体投与と同様の効果が認められた。現在、3 日間以降も継続培養を行い、二次卵胞への発育能を検討している。

新生仔への ATG の促進によって原始卵胞形成が促進する分子機構を明らかにするために、まず卵母細胞特異的タンパク質 MVH と基底膜構成タンパク質 Laminin を指標とする蛍光免疫染色により、シスト内卵母細胞の集約とシストの早期断片化について、実験区間で比較検討した。卵母細胞シスト内の卵数が 2 - 4 個のものを小サイズ、5 - 8 個のものを中サイズ、9 個以上のものを大サイズとして分類し、経時的な変化を調査したところ、いずれの実験区でも、大、中、小サイズのシスト数は同様に減少していた。このことから、ATG の促進により原始卵胞形成が促進される過程では、少なくともシストの早期断片化は起こっておらず、各サイズのシスト内卵母細胞の集約過程で、生き残る優勢卵子が増えることで、結果的に形成される原始卵胞数が増加することが考えられた。これらの詳細な分子機構については、今後も解明を進める。

一方、xCT トランスポーター遺伝子欠損雌マウスの新生仔では、卵巣内のオートファジー活性が高く、原始卵胞数が約 1.2 倍高く、一次卵胞数は顕著に低いことが明らかとなった。これらには、酸化ストレスシグナル経路の亢進や細胞内アミノ酸量の変化を介した mTOR の抑制が関与していることを見出した。これらの結果を踏まえ、野生型新生仔雌マウスに xCT 特異的阻害剤であるスルファサラジン(SSZ)を出生後 54 時間までに投与し、60 時間で卵巣内卵胞数を評価した。対照区と比較し、SSZ 投与区では、原始卵胞数の増加傾向がみられ、一次卵胞数は減少傾向がみられた。しかし、性成熟後の生殖能に顕著な差はみられず、SSZ 投与により増加した原始卵胞数は、その後維持されていないことが考えられた。

以上、本研究では、マウス新生仔期に、安全性の高い ATG 誘導剤の投与により、貯蓄原始卵胞数が上方制御され、それらが性成熟後も維持されることで、生涯生殖能が向上することを実証した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ishii N, Homma T, Watanabe R, Kimura N, Ohnishi M, Komayashi T and Fujii J	4. 巻 19
2. 論文標題 A heterozygous deficiency in protein phosphatase Ppm1b results in an altered ovulation number in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 MOLECULAR MEDICINE REPORTS	6. 最初と最後の頁 5353-5360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2019.10194.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Watanabe R, Kimura N	4. 巻 64
2. 論文標題 Non-suckling starvation of neonatal mice promotes primordial follicle formation with activation of ovarian autophagy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Reprod Dev.	6. 最初と最後の頁 89-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2017-126.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hamashima S, Homma T, Kobayashi S, Ishii N, Kurahashi T, Watanabe R, Kimura N, Sato H, Fujii J	4. 巻 51
2. 論文標題 Decreased reproductive performance in xCT-knockout male mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Free Radic Res.	6. 最初と最後の頁 851-860
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10715762.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ishii N, Homma T, Lee J, Mitsuhashi H, Yamada K, Kimura N, Yamamoto Y, and Fujii J	4. 巻 102
2. 論文標題 Ascorbic acid and CoQ10 ameliorate the reproductive ability of superoxide dismutase 1-deficient female mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 102-115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioz149.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe R, Sasaki S, Kimura N	4. 巻 102
2. 論文標題 Activation of autophagy in early neonatal mice increases primordial follicle number and improves lifelong fertility.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 399-411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz179.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計27件(うち招待講演 2件/うち国際学会 7件)

1. 発表者名 渡辺連, 佐藤英世, 木村直子
2. 発表標題 xCT遺伝子欠損雌マウスの高い卵胞備蓄能とxCT阻害剤の投与による卵胞数制御の試み
3. 学会等名 日本卵子学会第59回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺連, 佐々木将, 木村直子
2. 発表標題 新生仔期のオートファジーの誘導は原始卵胞の形成を促進し卵巣予備能を高める
3. 学会等名 第36回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ren Watanabe, Hideyo Sato, Naoko Kimura
2. 発表標題 High ovarian reserve in cystine-glutamate transporter gene deficient mice.
3. 学会等名 51th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺連, 佐々木将, 木村直子
2. 発表標題 新生仔マウスのオートファジーの促進は原始卵胞プールを拡大し生殖能を高める
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木将, 渡辺連, 木村直子
2. 発表標題 新生仔マウスにおける卵母細胞シストの形態学的評価
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮島理央, 横田裕也, 小原瑞歩, 木村直子
2. 発表標題 マウス初期胚の発生能に及ぼす培地へのmi RNA阻害剤添加の影響
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村直子
2. 発表標題 哺乳類雌の生殖寿命延伸に向けたアプローチ：原始卵胞プールの上方向制御と老齢個体卵のレスキュー培養
3. 学会等名 第33回日本生殖免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木将, 渡辺連, 小原瑞歩, 木村直子
2. 発表標題 新生仔期卵巢内のオートファジー活性化による原始卵胞形成過程の形態学的解析
3. 学会等名 第33回日本生殖免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木瑞穂, 小原太樹, 藤井順逸, 木村直子
2. 発表標題 PP1の発現動態を指標とする染色体異数性発生機序の解析および異数性低減培養系の検討
3. 学会等名 第58回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石井実佳, 石塚美咲, 藤井順逸, 木村直子
2. 発表標題 マウス卵の紡錘体形態に及ぼす加齢あるいは酸化ストレスの影響の違いの検証
3. 学会等名 第58回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ren Watanabe, Naoko Kimura
2. 発表標題 Starvation and exogenous autophagy inducer increases the number of primordial follicles at neonatal period.
3. 学会等名 50th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡部友香, 高橋素子, 宮田哲, 藤井順逸, 木村直子
2. 発表標題 卵初期発生過程におけるグルクロン酸抱合機構の解明と高発生能培地への応用～アルデヒド還元酵素遺伝子欠損マウス卵の解析から～
3. 学会等名 第35回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小原太樹, 鈴木瑞穂, 藤井順逸, 木村直子
2. 発表標題 SAC因子Mps1の発現動態を指標とした酸化ストレスによる染色体異数性発生機序の解明
3. 学会等名 第35回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ren Watanabe, Naoko Kimura
2. 発表標題 Starvation and exogenous autophagy inducer increases the number of primordial follicles at neonatal period.
3. 学会等名 4th World Congress of Reproductive Biology. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mizuho Suzuki, Taiki Ohara, Junichi Fujii, Naoko Kimura
2. 発表標題 Effect on N-acetyl-L-cysteine for chromosome aneuploidy of oocytes from SOD1 deficient mice.
3. 学会等名 4th World Congress of Reproductive Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuka Okabe, Motoko Takahashi, Satoshi Miyata, Junichi Fujii, Naoko Kimura
2. 発表標題 Glucuronidation is involved with early embryonic development in vitro.
3. 学会等名 4th World Congress of Reproductive Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mika Ishii, Misaki Ishizuka, Mizuho Suzuki, Naoko Kimura
2. 発表標題 Effect on NAD ⁺ precursor in aged mice oocytes matured in vitro on spindle morphology and developmental ability.
3. 学会等名 4th World Congress of Reproductive Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡辺連, 佐藤英世, 木村直子
2. 発表標題 xCT遺伝子欠損雌マウスの高い備蓄卵胞数の要因解明とそれらを利用した卵胞数制御の試み
3. 学会等名 日本畜産学会第124回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々木将, 八木橋美里, 梅野拳, 小原瑞歩, 木村直子
2. 発表標題 新生仔雌マウスへのオートファジー促進による原始卵胞数増加機構の解明と卵巣培養系での効果
3. 学会等名 第57回東北生殖医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sho Sasaki, Mozuho Obara, Ken Umeno, Ren Watanabe, Naoko Kimura
2. 発表標題 Autophagy activation increase primordial follicle number with raising oocyte viability
3. 学会等名 14th World Congress of the International Society for Immunology of Reproduction (第14回国際生殖免疫学会大会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横田裕也, 小原瑞歩, 木村直子
2. 発表標題 マウスへの複合的な慢性ストレス条件の構築と雌生殖能への影響
3. 学会等名 日本畜産学会126回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小原瑞歩, 梅野拳, 佐々木将, 木村直子
2. 発表標題 マウスの原始卵胞形成過程におけるコルチゾール経路の関与
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅野拳, 木村直子.
2. 発表標題 マウスの原始卵胞形成過程におけるTNF- の関与
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木将, 小原瑞歩, 梅野拳, 渡辺連, 木村直子
2. 発表標題 新生仔マウスのオートファジーの活性化はシスト内卵母細胞の集約を促進し原始卵胞形成を促す
3. 学会等名 第69回東北畜産学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八木橋美里, 佐々木将, 渡辺連, 木村直子
2. 発表標題 新生仔マウス卵巣の培養におけるオートファジー誘導剤添加の検討
3. 学会等名 第69回東北畜産学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村直子
2. 発表標題 哺乳類卵の酸化障害と老化～低減する添加剤の検討
3. 学会等名 第34回平成不妊研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木将, 梅野拳, 小原瑞歩, 渡辺連, 木村直子
2. 発表標題 マウス新生仔期のオートファジー活性化による原始卵胞数増加メカニズムの解明
3. 学会等名 第60回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 渡辺連、佐々木将、木村直子	4. 発行年 2018年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 3
3. 書名 BIO Clinica, Vol.33, No.7, 40-43	

〔産業財産権〕

〔その他〕

山形大学農学部動物機能調節学分野紹介（トピックスおよび研究業績のページに記載） https://www.tr.yamagata-u.ac.jp/~animal-reprod./

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
---------------------------	-----------------------	----