

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究（A）  
 研究期間：2006 ～ 2008  
 課題番号：18688016  
 研究課題名（和文）網羅的遺伝子発現解析による新たな哺乳動物卵子体外成熟培養系の開発  
 研究課題名（英文）The study for development of novel mammalian oocyte culture system generated from microarray data base of ovulating process  
 研究代表者  
 島田 昌之（SHIMADA MASAYUKI）  
 広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授  
 研究者番号：20314742

研究成果の概要：本研究は、マウス排卵過程における卵胞内の遺伝子発現を経時的にかつ網羅的に解析し、成長因子、サイトカイン類が発現していること、それらが分泌し作用する仕組みを明らかとした。この成果を元に、哺乳動物において自然免疫系が受精を制御していることを初めて解明し、その機能の不全が体外受精における受精率の低下を引き起こすことを示した。さらには、それぞれの生理活性因子の添加時期を最適化した新規体外成熟培養法を考案した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2007 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2008 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
年度			
年度			
総計	22,900,000	6,870,000	29,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：卵子，排卵，受精，体外成熟培養，マイクロアレイ，遺伝子発現，内分泌

## 1. 研究開始当初の背景

家畜における未成熟卵子の体外成熟培養技術は、卵巣に潜在的に存在する卵子を有効活用することにつながり、経済形質の高い雌個体の効率的利用が可能となる。また、人においては、low responder など卵胞発育障害や排卵不全患者に対する治療法として適用が期待されている。現在の体外成熟培養技術は、FSH や成長因子など経験則的に添加効果が認められた因子を用いることにより、受精可能な第二減数分裂中期にまで卵子の減数分裂を 80%以上進行させることが可能となっている。しかし、その体外受精後の胚盤胞期胚への発達率、移植後の着床率は著しく低

いのが現状である。

一方、実験動物を用いた卵胞発育、排卵機構の解明は、最近の遺伝子欠損マウスを用いた解析やマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析により飛躍的な進歩がみられる。たとえば、排卵期特異的に発現する EGF like factor やプロスタグランジンの重要性が示されてきた。このような、体内の卵胞発育、排卵に関わる因子を網羅的に検出し、その時期特異的に添加する培養法を考案することにより、体内を模倣した培養系が確立されると期待されている。しかし、遺伝子発現のみでなく、その機能を発揮する時期にまで着目し、最適な添加時期を同定するために

必要な基礎的知見の集積は不十分である。

## 2. 研究の目的

卵子は卵胞内に存在し、胞状卵胞は卵胞膜、それを裏打ちする顆粒膜細胞、卵子を数層で覆う卵丘細胞、そして卵子からなる。排卵は、充分発育した胞状卵胞の顆粒膜細胞に、脳下垂体から分泌された LH が作用して、開始される。卵丘細胞や卵子には LH に対する受容体がないことから、顆粒膜細胞から分泌された因子が卵丘細胞や卵子に作用し、ヒアルロン酸を蓄積し、膨化した卵丘細胞層に覆われた第二減数分裂中期の卵子が卵管へと排出される。

そこで、本研究では、顆粒膜細胞が分泌し、卵丘細胞に作用する因子を同定するために、顆粒膜細胞と卵丘細胞を卵胞発育期と排卵期に経時的に回収し、マイクロアレイ解析により発現する遺伝子を網羅的に検出した。そこから明らかとなった因子について、その発現制御機構、分泌制御機構、作用機構についての詳細な検討を実施し、それらの知見を元に、体内の環境を模倣した新たな哺乳動物卵子の体外成熟培養法を考案することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### ①マイクロアレイ解析

3週齢の C57/BL6 雌マウスに eCG と hCG を投与して、卵胞発育と排卵を誘起し、経時的に顆粒膜細胞と卵丘細胞を回収した。Total RNA を抽出し、それをサンプルとした発現解析用のマイクロアレイ解析を定法により実施した。

### ②発現解析

マイクロアレイ解析により発現が検出された遺伝子は、real-time PCR 法によりその mRNA 量を定量し、western blotting あるいは免疫蛍光染色法によりそのタンパク質レベルの発現量と局在を検出した。

### ③発現制御機構の解析

eCG 投与したマウスから顆粒膜細胞を回収し、その初代培養系を用いて、リガンド添加実験、あるいは抑制剤添加実験を行い、その発現機構を解明した。さらに、luciferase 遺伝子を用いたレポーターアッセイにより、プロモーター活性測定を行った。

### ④機能解析

顆粒膜細胞の初代培養系においては、同定した因子の添加実験、あるいは、siRNA による mRNA のノックダウン実験を行い、機能解析を行った。

### ⑤体外受精

eCG と hCG を投与したマウスの卵管から排卵卵子を回収し、成熟雄マウスの精巣上体から回収し、前培養を行った精子を用いて、定法に従って、精子と卵子を供培養して、体外受精を行った。

### ⑥ブタ卵子の培養

食肉処理場で採取した未成熟ブタの卵巣から、卵丘細胞卵子複合体 (COC) を回収した。COC は、NCSU37 培地にウシ胎児血清を添加した培地を基本培地として、Estradiol17b, Progesterone, FSH, LH, EGF, IBMX を組み合わせた培地で培養した。成熟培養後、体外受精し、発生培養により胚盤胞期胚への発達率を検討した。

## 4. 研究成果

### ①EGF like factor の発現および修飾機構の解析

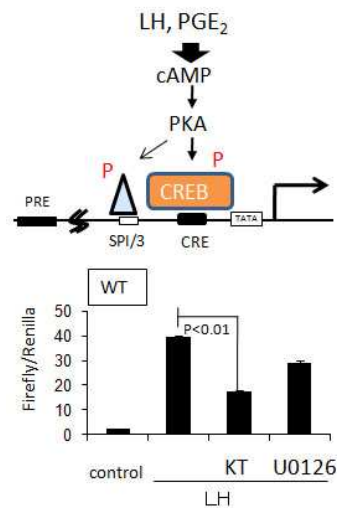


図1. *Areg* mRNA発現機構

排卵刺激ホルモンである LH により、顆粒膜細胞で EGF like factor である Amp-hiregulin (*Areg*), Epiregulin (*Ereg*) の発現が誘起されることが明らかとなった。*Areg* のプロモーター領域の解析から、cAMP responsible element と予想される配列が認められ、レポーターアッセイから cAMP-PKA 系がその活性を制御していることが示された (図 1)。

PGE<sub>2</sub> を合成する酵素である COX-2 をコードする *Ptgs2* 遺伝子を欠失させたマウスでは、*Areg* 遺伝子の発現が有意に低いことも示され、体内および体外共に cAMP 系が *Areg* 遺伝子の発現を制御していることが確認された (論文 10)。

EGF like factor は膜貫通型の前駆体として発現し、修飾酵素である ADAM17 により切断され、標的細胞を刺激可能となる。*Adam17* の発現を解析した結果、排卵刺激に

よりその発現は上昇し、ADAM17の抑制剤であるTAPI2やAdam17のsiRNAによりAREGの遊離が抑制されたことから、排卵過程において、cAMP-PKA系によりEGF like factorは発現し、ADAM17により切断され、標的細胞を刺激することが明らかとなった(論文6)。

### ②EGF like factorによるEGFR-Ras-ERK1/2系の活性化とその意義

EGF like factorは、顆粒膜細胞と卵丘細胞のEGF受容体を活性化し、その結果Rasを介してERK1/2をリン酸化した。顆粒膜細胞特異的に恒常的にRasが活性状態にある変異マウスを作製し、解析した結果、卵胞発育は認められるが、排卵不全を呈した(論文4)。このマウスのマイクロアレイ解析から、ERK1/2を脱リン酸化して不活性化するMKP3が高発現していることが明らかとなり、そのsiRNAによるノックダウン実験からその機能も確認された(図2)。

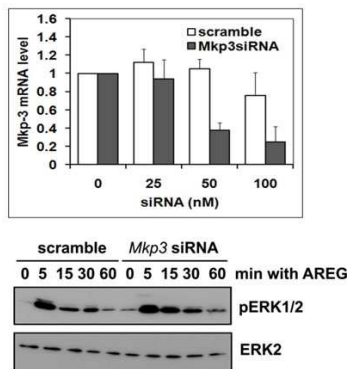


図2. MKP3によるERK1/2調節機構

次に、顆粒膜細胞特異的にERK1/2遺伝子を欠損させたERK1<sup>-/-</sup>, ERK2<sup>flox/flox</sup>; Cyp19a1Cre miceを作製した(論文1)。その結果、卵胞発育は正常であったが、LH刺激後においても発情期が持続し、排卵が認められず、黄体形成もまた完全に抑制されていた。さらなる解析の結果から、ERK1/2がCEBPを介して、Estradiol 17bを代謝させるSult1e1を発現させ、StarやCyp11a1を発現させることによりProgesteroneを生産するという、発情期から排卵期への転換を制御するキーファクターであることが明らかとなった。

以上の結果から、LH刺激により、cAMP-PKA系によるAreg遺伝子の発現、ADAM17による修飾作用により、顆粒膜細胞からオートクライン的に顆粒膜細胞自身に、あるいはパラクライン的に卵丘細胞に作用し、EGFRを介して、Ras-ERK1/2-CEBP系が活性化され、排卵期から排卵期へと移行することが明らかとなった。

### ③新たなEGF like factorであるNeuregulin

#### (Nrg1)の発現とその作用

EGF受容体family(ErbB family)は、EGFRであるErbB1, リガンド結合部位を持たないErbB2, 神経細胞で発現が高値であることが報告されているErbB3とErbB4がある。卵胞発育・排卵期の卵胞内におけるこれらの発現をwesternblotting解析した結果、EGFRのみでなく、ErbB2とErbB3もまた高い発現が認められた(図3)。ErbB3のリガンドをマイクロアレイ解析のデータベースから検索した結果、Neuregulin 1(Nrg1)が認められた。

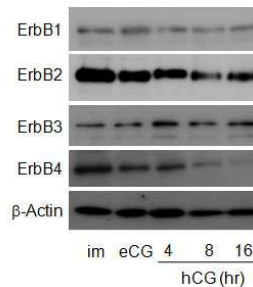


図3. ErbB familyの発現変化

Nrg1は、排卵刺激2時間後から発現が上昇し、ADAM19による切断が生じ、分泌型が卵胞液中に遊離されていた。NRG1単独の添加は、卵丘細胞と顆粒膜細胞のPI 3-kinase-PKB系を活性化させ、AREGとNRG1の同時投与により、ERK1/2系が著しく活性化されることが明らかとなった。

NRG1の添加は、15遺伝子の発現を有意に増加させ、その中にはSphingosine 1 kinaseが含まれていた。Sphingosine 1 kinaseは、Sphingosine 1 phosphateを産生し、これは卵子のGPR3を介して、卵子減数分裂再開を遅延させることも明らかとなった。

体内においては、NRG1はAREGと同様に生産され、両者が相乗的にERK1/2を介して顆粒膜細胞の黄体化と卵丘細胞の膨化を促進し、卵子の減数分裂の再開時期を調節していることが示唆された。

#### ④サイトカイン類の発現と分泌、その作用

マイクロアレイ解析の結果から、多くのサイトカイン類が排卵期に発現していることが明らかとなった。サイトカイン類は、膜貫通部を持たないためエキソサイトーシスにより分泌されていると考えられる。実際に、顆粒膜細胞にはエキソサイトーシスに関わるSNARE構成因子、SNAP25, Syntaxin family, Synaptotagmin familyが発現していた。

Sanp25は、Progesterone receptor遺伝子欠損マウス(PRKO mice)において発現が低値であり、PR拮抗剤がサイトカインの分泌を抑制することが、培養後の培地の抗体アレイ解析から明らかとなった。さらに、SNAP25はCa<sup>2+</sup>依存的にSynaptotagmin1と結合すること、Snap25のsiRNAによるノックダウンがサイトカイン類の分泌を有意に抑制することから、サイトカイン類は制御系エキソ

サイトーシスにより分泌されていることが解明された(論文8).

排卵期にもっとも分泌されていたIL6について、添加実験を行った結果、卵丘細胞の膨化を促進し、卵子の発生能も向上させた(論文2).

#### ⑤卵丘細胞の自然免疫機能と受精の関係

排卵後の卵丘細胞には、特異的に自然免疫に関わるTLR familyが発現していた。

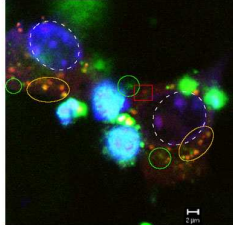


図4. 卵丘細胞の食作用

青: Topo3核  
赤: Lysosome tracker: Lysosome  
緑: FITC: Bacteria

TLR2はグラム陽性菌の構成因子を、TLR4はグラム陰性菌のLPSを認識することから、これら特異的リガンドの添加実験を行った。その結果、マクロファージと同様にNFkB系が活性化され、サイ

トカイン類の発現分泌が促進された。さらに、FITC標識した不活化グラム陰性菌を排卵COCと培養した結果、卵丘細胞は食作用により細菌を取り込み、phagosomeを形成した(図4)。すなわち、排卵されたCOCは卵管が感染環境であるとそれを認識し、除去する機能を有することが初めて明らかとなった(論文7,9)。

TLR2とTLR4は、組織の障害における細胞外マトリクスの切断を認識することが示され、卵丘細胞に発現するTLRsにおいても、受精時の細胞外マトリクスの分解を認識すると仮説立てた。

卵丘細胞は、ヒアルロン酸合成酵素で最も長鎖を合成するHAS2を発現し、分子量100万以上のヒアルロン酸を合成することが明らかとなった。これが、受精時には精子の分泌するヒアルロニダーゼにより分子量が10万程度にまで分解されていた。

分子量15万以下の短鎖ヒアルロン酸(HA)を添加した結果、卵丘細胞のNFkB系は活性化され、サイトカイン類の発現・分泌が誘起された。この反応は、TLR2あるいはTLR4に対する中和抗体により有意に抑制されたことから、卵丘細胞に発現するTLRsは受精過程に生産される短鎖HAにより活性化されることが示された。さらに、この中和抗体は、

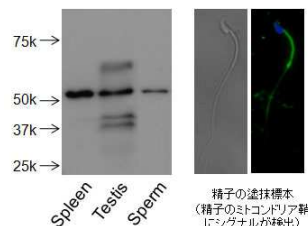


図5. CCR3の発現

体外受精における受精率を低下させた。

この受精率の低下のメカニズムを解析するため、卵丘細胞がTLRsにより

発現・分泌するサイトカイン類と精子に発現する受容体に着目した(図5)。その結果、卵丘細胞が発現するCCL5が、精子のCCR3に結合することが明らかとなった。

CCR3は精子のミトコンドリア鞘に局在し、Ca<sup>2+</sup>の流入を介して精子タンパク質のチロシン残基をリン酸化し、その結果受精能獲得を誘起させることが示された。

以上の結果から、卵丘細胞間に蓄積した長鎖HAは精子のヒアルロニダーゼにより分解され、短鎖HAとなり、卵丘細胞のTLR2とTLR4を刺激して、CCL5を発現・分泌し、それが精子のCCR3を刺激する結果、精子は受精能を獲得して卵子内に進入可能となることが初めて明らかとなった(論文5,7)。

#### ⑥新規体外成熟培養法

上記のマウスを用いた基礎的検討から、以下のような培養系を考案した(論文3)。

1. FSH+ Estradiol 17bを添加した培地でブタCOCを培養し、卵丘細胞の増殖とEGFRの発現を誘導する。
2. 新たな培地に移し、LHとEGFを添加して、卵丘細胞の膨潤と卵子の成熟を促す
3. NRG1を添加して、卵丘細胞の生存率を向上させ受精に備える

FSHあるいはEstradiol 17b単独では、卵丘細胞の増殖活性に影響はなかったが、両者を添加することによりBrdUの取り込み量は有意に増加し、細胞増殖に関わるCyclin D2の発現も促進された。この条件で、20時間培養することにより、5層以上の卵丘細胞層に覆われたCOCへと発達した。

このCOCをLHとEGFを添加した培地に移した結果、卵丘細胞の膨潤は著しく促進され、Ptgs2などの排卵刺激直後に認められる遺伝子発現もまた有意に上昇した。しかし、排卵の後期に卵丘細胞で認められる3b-Hsdの発現に影響はなかった。

この3b-Hsd mRNAの発現は、NRG1の添加により有意に上昇し、卵丘細胞が正常に機能し、かつ卵子は受精可能な第二減数分裂中期に進行した。このCOCを体外受精に用いた結果、受精率に差は認められなかったが、胚盤胞期胚にまで到達した卵子の割合は、40%以上と高い値が認められ、体内の環境変化を模倣した新規培養法の効果が明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

1. Fan HY, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS.

- ERK1/2 in ovarian granulosa cells are critical for female fertility. *Science*, 324, 938-941, 2009, 査読あり
2. Liu Z, de Matos DG, Fan HY, Shimada M, Palmer S, Richards JS. IL6: an autocrine regulator of the mouse cumulus cell-oocyte complex expansion process. *Endocrinology*, doi:10.1210/en.2008-1532, 2009, 査読あり
  3. Kawashima I, Okazaki T, Noma N, Nishibori M, Yamashita Y, Shimada M. Sequential exposure of porcine cumulus cells to FSH and/or LH is critical for appropriate expression of steroidogenic and ovulation related genes that impact oocyte maturation in vivo and in vitro. *Reproduction*, vol. 136 (1), 9-21, 2008, 査読あり.
  4. Fan HY, Shimada M, Liu Z, Cahill N, Noma N, Wu Y, Gossen J, Richards JS. Somatic Expression of *K-ras<sup>G12D</sup>* in mouse ovary causes defects of follicle development and ovulation. *Development*, vol. 135 (12), 2127-2137, 2008, 査読あり.
  5. Shimada M, Yanai Y, Okazaki T, Noma N, Kawashima I, Mori T, Richards JS. Hyaluronan fragments generated by sperm-secreted hyaluronidase stimulate cytokines/chemokines production via TLR2 and TLR4 pathway in cumulus cells of ovulated COCs, which may enhance fertilization. *Development*, vol. 135 (11), 2001-2011, 2008, 査読あり.
  6. Yamashita Y, Kawashima I, Yanai Y, Nishibori M, Richards JS, Shimada M. Hormone-induced expression of TACE/ADAM17 protease impacts porcine cumulus cell oocyte complex expansion and meiotic maturation via ligand activation of the EGF receptor. *Endocrinology*, vol.148, 6164-6175, 2008, 査読あり.
  7. Richards JS, Liu Z, Shimada M. The Immune-like Mechanisms in Ovulation. *Trend Endocrinol Metab*, vol. 19 (6), 191-196, 2008, 査読あり.
  8. Shimada M, Yanai Y, Okazaki T, Yamashita Y, Sriraman Y, Wilson MC, Richards JS. Synaptosomal associated protein 25 (Snap25) gene expression is hormonally regulated during ovulation and is involved in cytokine/chemokine exocytosis from granulosa cells. *Mol Endocrinol*, vol.21(10) 2487-2502, 2007, 査読あり.
  9. Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Richards JS. Induced expression of pattern recognition receptors (PRRs) in cumulus oocyte complexes (COCs): Novel evidence for immune-like functions during ovulation. *Mol Endocrinol.*, vol. 20, 3228-3239, 2006, 査読あり.
  10. Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Richards JS. Paracrine and autocrine regulation of EGF-like factors in cumulus oocyte complexes (COCs) and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 (Ptgs2) and progesterone receptor (Pgr). *Mol Endocrinol.*, Vol.20 (6), 1352-1365, 2006, 査読あり.

[学会発表] (計 10 件)

1. 田畑慧・Fan HY・Richards JS・下中麻奈美・野々口耕介・渡辺浩彦・森崇英・島田昌之，顆粒膜細胞特異的 ERK1/2 遺伝子欠損マウスを用いた LH サージによる卵胞内エストロゲン濃度低下が誘起する排卵機構の解析，第 50 回日本哺乳動物卵子学会大会，東京，2009/5/8
2. 川島一公・田畑慧・野間紀孝・岡崎哲司・島田昌之，ブタ成熟卵子の発生能向上に果たす Neuregulin 1 の役割，第 110 回日本畜産学会大会，藤沢，2009/3/28
3. 下中麻奈美，田畑慧，Fan HY，Richards JS，島田昌之，ERK1/2 系が顆粒層細胞の排卵期特異的な遺伝子発現を誘起する，第 4 回日本生殖再生医学会，東京，2009/3/15
4. 下中麻奈美，Richards JS，島田昌之，排卵過程の顆粒層細胞における Amphiregulin (AREG) 発現制御機構の解析，第 13 回日本生殖内分泌学会大会，大阪，2008/11/30
5. Shimada M，Kawashima I，Okazaki T，Yamashita Y，Sequential exposure of porcine cumulus cells to FSH and LH is critical for appropriate expression of steroidogenic and ovulation related genes that impact oocyte maturation *in vivo* and *in vitro* 41<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, Cona, Hawaii, USA 2008/5/25
6. 野間紀孝・Fan HY・Richards JS・島田昌之，*LSL/Kras<sup>G12D</sup>;Cyp19Cre* マウスを用いた EGF like family が誘起する卵子成熟機構の解析，第 49 回日本哺乳動物卵子学会大会，名古屋，2008/5/13
7. 島田昌之，柳内嘉在，西松恵子，Richards JS，西堀正英，排卵過程の顆粒層細胞における SNAP25 により制御されるホルモン分泌機構，第 12 回日本生殖内分泌学会大会，東京，2007/10/18
8. 島田昌之，柳内嘉在，岡崎哲司，Richards JS，受精過程に分解されるヒアルロン酸は，卵丘細胞の Toll-like receptor を介してケモカインを分泌させ，精子の受精能獲得を誘起させる，第 25 回日本受精着床学会，仙台，2007/8/30
9. Shimada M，Yanai Y，Okazaki T，Richards JS. Activation of Toll-like receptors 2 and 4 on cumulus cells of ovulated cumulus oocyte complexes stimulates production of cytokines/chemokines that can induce sperm capacitation leading to successful fertilization, 40<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, San Antonio, USA, 2007/7/26
10. Shimada M，Hernandez-Gonzalez I，Gonzalez-Robanya I，Richards JS. During ovulation pattern recognition receptors (PRRs) characteristic of immune cells are induced in cumulus oocyte complexes (COCs) to confer immune cell-like functions 39<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, Omaha, USA, 2006/7/31

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/seisyoku/framepage%20shimada.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 昌之 (SHIMADA MASAYUKI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授  
研究者番号：20314742

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者