

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06306

研究課題名(和文) 哺乳類卵巣における濾胞選択機構-インヒビンは濾胞閉鎖を誘導するか？

研究課題名(英文) Mechanism of follicle selection in mammalian ovary- Is the selection induced by inhibin?

研究代表者

荻原 克益 (OGIWARA, Katsueki)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：00422006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はマウス濾胞選択の分子機構解明を目指した研究課題である。成長を開始した濾胞のうち大半は途中でアポトーシスにより死滅し、生き残った濾胞のみが排卵される。この排卵される濾胞の選択が濾胞選択である。これまで多くの研究が行われてきたが、今なおその詳細は明らかとなっていない。本研究では濾胞選択(アポトーシス)の抑制作用を持つことが示唆されている薬剤を用いて濾胞選択の解明に取り組んだ。その結果、卵巣内で増加するアクチビンによりエストラジオール(E2)の産生、分泌が誘導されること、またE2がアポトーシスに関与することが示唆された。本研究よりアポトーシスはE2により制御されるというモデルが提唱された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果は未だにその分子機構が解明されていない濾胞選択の分子機構を解明するための大きな一歩となる成果であり、その学術的意義は大きい。また、濾胞選択は良質な卵を選択し排卵させるシステムと考えられていることから少しでも良質な卵を獲得したい畜産分野で積極的に研究が行われている。本研究成果は、これらの分野にも影響を与える成果であり、その意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：The present study aims to elucidate a molecular mechanism of mouse follicle selection. Most primordial follicles that have started growing die by apoptosis, and only the survived follicles are ovulated. Many investigators have studied about it, but the detail is still unclear. The present study was carried out using a hormone substance that is suggested to suppress follicle selection (apoptosis). The results suggest that production and secretion of estradiol 17 $\beta$  (E2) are regulated by Activin-A induced by FSH and that E2 is involved in apoptosis. Based on the results, we propose a model that apoptosis is controlled by E2.

研究分野：生殖生物学

キーワード：濾胞選択 卵巣 アポトーシス エストラジオール インヒビン アクチビン

## 1. 研究開始当初の背景

多くの哺乳類卵巣には成長を開始する前の原始濾胞が多数ストックされており、原始濾胞内には、第一減数分裂前期で停止した卵母細胞が存在する。性的に成熟した個体の卵巣では、何らかの刺激(成長ホルモン様のホルモンと考えられている)により、ストックされている原始濾胞の一部が成長を開始する。その数は種によって様々であるが、どの種においても排卵される数より圧倒的に多くの濾胞が一回の排卵周期で成長を開始する。成長を開始した原始濾胞のうち、大部分はその成長途中でアポトーシスにより死滅し、残った濾胞のみが排卵まで至り、受精可能な卵母細胞が排卵される。この濾胞成長の途中で生き残る濾胞と死滅する濾胞が選別される過程を「濾胞選択」と呼ぶ。産仔数の少ない哺乳類では、少しでも質の良い卵母細胞を提供することで、生まれてきた個体の生存率を少しでも高めようとする戦略を取っており、濾胞選択は質の良い卵母細胞の選別において大きな役割を担っている。

濾胞選択の分子機構を解明する研究の歴史は長く、古くから多くの研究者が濾胞選択の解明に取り組んできた。より良い卵母細胞を大量に得ることを目的に特に畜産分野を中心に研究が精力的に実施されてきたが、今なお、その分子機構の解明には至っていない。近年、マウスを用いた研究も実施され、濾胞選択への関与が示唆された候補因子の遺伝子欠損マウスを用いてその解明を行う研究も実施されているが、そのアプローチでも解明には至っていない。

このような状況から研究代表者らは全く別の解析アプローチが必要であると考えていたが、近年、マウスにおいて一度の排卵で100個程度の卵母細胞の排卵を誘導できる薬剤(Ova)が開発され、研究代表者らはこのOvaを用いることで濾胞選択解明への糸口が得られるのではないかと考えた。一般的に数十個~100個以上の原始濾胞が排卵に向けて成長を開始すると考えられているが、一度の排卵で排卵される卵母細胞は10個程度であり、人工的に排卵を誘導(過排卵誘導)する方法でも20-30個程度である。一方、上記の通りOvaを用いることで、一度の排卵で100個程度の卵母細胞の排卵を誘導できる。この排卵数は成長を開始する濾胞の数に近いことから、Ovaは濾胞選択(アポトーシス)を抑制しているのではないかと推測された。そこで実際に、Ovaを注射したマウス卵巣を用いてTUNEL法を行ったところ、アポトーシス陽性シグナルはほとんど検出されず、Ovaにより濾胞選択が抑制されていることが示唆された。そこで、本研究では濾胞選択機構解明へとヒントを得るために、Ovaの作用機序を解明する研究に取り組んだ。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス濾胞選択の分子機構の解明である。この目的を解明するにあたり、上記薬剤による濾胞選択の抑制機構を解明することが重要と考え、本申請課題では、上記薬剤による濾胞選択の抑制機構の解明を目指して実施された。

## 3. 研究の方法

### (1) 次世代シーケンスによる網羅的な解析

3週齢メスマウスにeCGまたはOvaを注射し、48時間後の卵巣からRNAを抽出、RNA-seq解析を行った。発現に差のあった遺伝子のうち、細胞の生存に関与する遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、ステロイドホルモン関連遺伝子などに注目し、RT-qPCR法により発現量の定量を行った。

た。

#### (2) ステロイドホルモンの定量

3 週齢メスマウスに eCG または Ova を注射し、12、48 時間後の卵巣抽出液および血中内の estradiol-17 $\beta$  (E2)とテストステロン量を ELISA により定量した。

#### (3) Cyp19a、inhibin- $\alpha$ 、inhibin- $\beta$ a、inhibin- $\beta$ b タンパク質の検出

3 週齢メスマウスに eCG または Ova を注射し、12、48 時間後の卵巣抽出液を用いて、Cyp19a、inhibin- $\alpha$ 、inhibin- $\beta$ a、inhibin- $\beta$ b タンパク質の検出を Western blot 法で行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 次世代シーケンスによる網羅的な解析

Ova による濾胞選択の抑制機構を解明するにあたり、まず始めに eCG または Ova を注射したマウスの卵巣内で発現量に差のある遺伝子の探索を行った。RNA-seq 解析の結果から、恒常性維持に關与する遺伝子や細胞死に關連する遺伝子、ホルモン關連遺伝子、浸潤、細胞間コミュニケーションに關連する遺伝子の発現量に差があることが明らかとなった。これらのうち、細胞死に關連する遺伝子、ホルモン關連遺伝子に注目してさらに詳細な解析を行ったところ、Cyp19a (aromatase)遺伝子を含むステロイドホルモン産生遺伝子の発現に有意な差が確認された。

#### (2) ステロイドホルモンの定量

RNA-seq 解析の結果からステロイドホルモン産生遺伝子の発現に有意な差が確認されたので、次に、eCG または Ova を注射したマウス卵巣および血中内の estradiol-17 $\beta$  (E2)とテストステロン量を ELISA 法により定量した。その結果、注射 12 時間後および 48 時間後において Ova を注射したマウス血中内 E2 量が eCG を注射したマウスと比較して有意に増加していることが明らかとなった。また、血中 E2 量同様、卵巣内の E2 量も Ova を注射したマウス卵巣内において有意に増加していた。なお、テストステロンについては、有意な増減は確認できなかった。以上の結果から、E2 が濾胞選択に關与する可能性があることが示唆された。

#### (3) Cyp19a、inhibin- $\alpha$ 、inhibin- $\beta$ a、inhibin- $\beta$ b タンパク質の検出

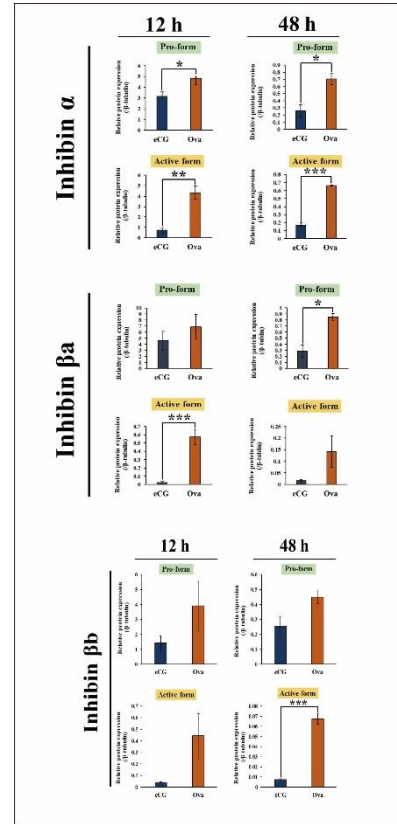
(2) の結果から E2 量の有意な増加が確認できたので、次に、E2 産生に關与する重要なステロイドホルモン産生遺伝子である Cyp19A(aromatase)の発現を調べた。eCG または Ova を注射したマウス卵巣を用いて、RT-qPCR と Western blot 解析を行った。その結果、注射 12 時間および 48 時間後において mRNA およびタンパク質発現は eCG を注射したマウスと比較して有意に増加していることが判明した。以上から、Ova の作用により卵巣内 Cyp19A の発現量が増加し、その結果、E2 量の増加が引き起こされたと考えられる。

続いて、Cyp19A 発現が増加する理由について調べた。卵巣顆粒膜細胞において Activin が Cyp19a の発現を制御するという報告があったことから、Activin およびその阻害的役割をもつ Inhibin の発現を調べた。今回は、Activin および Inhibin の構成タンパク質である Inhibin- $\alpha$ 、Inhibin- $\beta$ a、Inhibin- $\beta$ b についてその発現を調べた。これらのタンパク質は、前駆体(不活性型)として

発現し、必要な時期に切断され活性化されることで機能することから、前駆体 (pro-form) と活性型 (active form) の両方の検出を行い、発現量の差を定量化した。その結果が右図である。Inhibin- $\alpha$  は前駆体、活性型ともに Ova を注射したマウス卵巣において有意に増加していた。Inhibin- $\beta$  は Ova 注射後 12 時間の卵巣において活性型が有意に増加していた。一方、前駆体は 48 時間後に有意に増加していた。Inhibin- $\beta$  は Ova 注射後 48 時間の卵巣において活性型が有意に増加していた。以上の結果から、Activin および Inhibin として機能する活性型の発現量が Ova を注射したマウス卵巣において増加していることが明らかとなり、これらの因子が Cyp19a 発現の制御に関与することが示唆された。

#### 今後の展開

今回の研究により、卵巣内で増加する Activin により E2 の産生、分泌が誘導され、その E2 によりアポトーシスが抑制されるという仮説が提唱できた。今後は、Activin が E2 を誘導するメカニズムや誘導された E2 がどのようにして濾胞選択を抑制するのか、その分子メカニズムを解明する研究を行うことが必要となる。



## 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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi T., Hagiwara A., Ogiwara K.	4. 巻 157
2. 論文標題 Follicle rupture during ovulation with emphasis on recent progress in fish models. (review)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/REP-18-0251.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi T., Hagiwara A., Ogiwara K.	4. 巻 461
2. 論文標題 Prostaglandins in teleost ovulation: A review of the roles with a view to comparison with prostaglandins in mammalian ovulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol. Cell. Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 236-247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mce.2017.09.019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ogiwara K., Takahashi T.	4. 巻 8(3)
2. 論文標題 Nuclear Progesterone Receptor Phosphorylation by Cdk9 Is Required for the Expression of Mmp15, a Protease Indispensable for Ovulation in Medaka.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8030215.	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 Hagiwara A., Ogiwara K., Sugama N., Yamashita M., Takahashi T.	4. 巻 288
2. 論文標題 Inhibition of medaka ovulation by gap junction blockers due to its disrupting effect on the transcriptional process of LH-induced Mmp15 expression.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gen. Comp. Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2019.113373.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi T., Ogiwara K.	4. 巻 19: 254
2. 論文標題 Roles of melatonin in the teleost ovary: A review of the current status.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpa.2021.110907.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 渡邊弥也、中瀧直己、竹尾透、荻原克益
2. 発表標題 マウス濾胞選択における17 $\beta$ -estradiolの関与
3. 学会等名 第90回日本動物学会大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 萩原茜、荻原克益、山下正兼、行俊由仁、高橋孝行
2. 発表標題 メダカ排卵前濾胞におけるGAP結合の排卵に対する役割
3. 学会等名 第89回日本動物学会札幌大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荻原克益、渡邊弥也、中瀧直己、竹尾透
2. 発表標題 マウス卵巣における濾胞選択に関する因子の網羅的解析
3. 学会等名 第89回日本動物学会札幌大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 萩原克益、萩原茜、洲鎌なつ、山下正兼、高橋孝行
2. 発表標題 Gap junction blockersによるメダカ排卵の阻害 LH誘導性の排卵酵素MT2-MMPの発現誘導におけるGap junctionの関与
3. 学会等名 第91回日本動物学会大会(オンライン)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------