

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16767

研究課題名（和文）卵胞発育におけるFSHR発現制御機構の解明

研究課題名（英文）The regulation of FSHR expression during folliculogenesis

研究代表者

中村 智子（Nakamura, Tomoko）

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40732681

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：卵胞顆粒膜細胞における卵胞刺激ホルモン受容体（FSHR）の発現を誘導する物質として卵子由来のシグナル伝達物質Bone Morphogenetic Protein 15（BMP15）と新規神経ペプチドphenixinの効果と作用機序を解明した。BMP15は、smad経路とnon-smad経路を介してFSHRプロモーター領域のエピジェネティックな修飾に寄与しFSHR発現を促進した。またphenixinはFSHR発現を促進するだけでなく顆粒膜細胞増殖とステロイド産生を促進することを示した。マウス組織培養にて卵胞発育と排卵を誘導することを示し、初めてphenixinの卵巣における働きを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顆粒膜細胞がFSHRを適切に発現することは良質な卵を得るために必須である。卵胞顆粒膜細胞におけるFSHR発現制御機構の解明は、妊孕性の高い良質な卵を多く獲得するための知見を与え、卵胞発育刺激に対するpoor responderへの補助療法開発に役立つ可能性がある。また近年、悪性腫瘍治療前の女性の卵巣凍結による妊孕性温存が臨床応用されているが、癌治療後の自家移植時に、移植組織片に混じった癌細胞をも移植してしまうリスクがある。これはヒト卵胞の完全体外培養系による成熟卵の獲得により解決されうるが、FSHR発現制御機構の解明はこの点にも寄与すると期待される。

研究成果の概要（英文）： Our study elucidated the effects of Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) and the novel neuropeptide phenixin which induces follicle stimulating hormone receptor (FSHR) expression in human granulosa cells. BMP15 elevates FSHR expression in human granulosa cells by epigenetically modifying the promoter region of the FSHR gene through both Smad and non-Smad pathways. Phenixin accelerates granulosa cell proliferation and increases steroid production as well as inducing FSHR expression. Murine ovarian tissue culture showed that phenixin stimulates follicle growth and increases ovulation, thereby describing the role of phenixin in the ovary.

研究分野：産婦人科

キーワード：卵胞発育 FSHレセプター BMP15 phenixin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

晩婚化により生殖医療の需要は増大したが、加齢等による卵巣の反応性低下は poor responder と呼ばれるゴナドトロピン製剤への反応不良者を生み、生殖医療の大きな課題となっている。卵胞は初期のゴナドトロピン (黄体形成ホルモン:LH, 卵胞刺激ホルモン:FSH) 非依存性段階から、卵胞を構成する顆粒膜細胞が FSH 受容体 (FSHR) を発現するようになることでゴナドトロピン依存性発育を獲得し、成熟卵に至る。ゴナドトロピンに正しく反応できない等の為に一排卵周期につき約 1000 個もの卵胞が閉鎖すると考えられている。このように、顆粒膜細胞における FSHR の発現は卵の予後に大きく関与しており、卵胞顆粒膜細胞における FSHR 発現制御機構の解明は、妊孕性の高い良質な卵を多く獲得するための知見を与え、poor responder への補助療法開発へと役立つ可能性がある。また近年、悪性腫瘍治療前の女性の卵巣凍結による妊孕性温存が臨床応用されているが、卵巣転移のリスクのある場合には凍結保存卵巣の自家移植が困難となる。この問題はヒト卵胞の完全体外培養系による成熟卵の獲得により解決されうるが、FSHR 発現制御機構の解明はこの点にも寄与すると期待される。

2. 研究の目的

本研究課題では、ヒト顆粒膜細胞における FSHR 発現制御機構の解明を、DNA メチル化・ヒストンアセチル化のエピジェネティックな修飾と、卵-顆粒膜細胞間のパラクライン因子によるシグナル伝達経路の相互作用から解明することを目的とした。また得られた知見を卵巣組織培養に応用し、体外培養系での効率的な成熟卵の獲得に役立つかどうか検証した。

3. 研究の方法

(1) 卵子由来のシグナル伝達物質 Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) に着目した。不死化ヒト非黄体化顆粒膜細胞株 (HGrC1) を用いて、0-1000 ng/ml の trichostatin A (TSA)、0-500 ng/ml の BMP15、10 μ M の LDN193189 (Alk2,3 アンタゴニスト)、10 μ M の SB203580 (p38 MAPK 阻害剤) を添加し 48 時間培養した。HGrC1 における FSHR 発現を qPCR 及び Western blot 法にて測定し、ChIP analysis にて FSHR プロモーター領域のヒストン修飾と FSHR の転写因子である USF1/2 の結合を調べた。また、BMP15 及びその阻害剤の添加によるヒストンアセチル化トランスフェラーゼ (HAT) 活性や、Smad 1/5/8 と p38 MAPK のリン酸化の変化を調べ、FSHR シグナル伝達の下流にあるアロマトラーゼの発現やエストラジオール産生を評価した。

(2) 視床下部で新規に同定され生殖系系の制御に関与することが報告されているも、卵巣での働きは解明されていなかった神経ニューロペプチド phoenixin にも注目した。まず phoenixin とその受容体 GPR173 のヒト卵巣における発現を免疫染色で調べた。次に HGrC1 を用いて、0-100 nM の phoenixin を添加し 12-24 h 培養した。細胞増殖を MTS assay で評価した。ステロイド合成への影響を調査するため、アロマトラーゼの発現を qPCR で調べ、cAMP response element-binding protein (CREB) のリン酸化を western blot 法で検討し、細胞培養上清中のエストラジオール産生を放射免疫測定にて測定した。また、FSHR・黄体形成ホルモン受容体 (LHR)・アロマトラーゼ等の顆粒膜細胞の分化に関与する遺伝子の発現を qPCR で評価した。GPR173 の siRNA を用いて、phoenixin を阻害し phoenixin の作用阻害実験を行った。さらに 15 日間にわたってマウス卵巣組織培養を行い、phoenixin を添加した際の卵胞面積・排卵数・排卵された卵の成熟度を評価して卵胞発育への影響を調査した。

4. 研究成果

(1) BMP15 に関する成果

BMP15 が HGrC1 での FSHR 発現に及ぼす影響:

TSA と BMP15 添加により、HGrC1 における FSHR 発現は濃度依存性に促進された。TSA 添加時と同様に、BMP15 の添加によって H3K9 のアセチル化が上昇することが ChIP analysis にて示された。また、BMP15 により FSHR プロモーター領域への USF1/2 の結合は増加し、FSHR タンパクの発現の増加を確認した。FSHR タンパクの発現は、BMP15 と LDN193189 および SB203580 の共添加によって減弱した。BMP15 受容体ブロッカーとして働く LDN193189 を BMP15 と共添加すると、FSHR タンパクの発現はコントロールレベルまで抑制された。SB203580 との共添でも同様

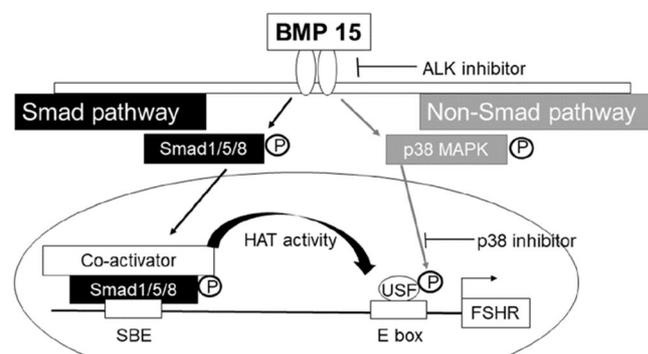


図 1: BMP15 が Smad 経路と non-Smad 経路を介して FSHR 発現を亢進する機序

の抑制が見られたが軽度の抑制にとどまった。

BMP15 が Smad 経路に及ぼす影響：

BMP15 は Smad 1/5/8 のリン酸化を促進し、LDN193189 はこの効果を抑制したが SB203580 は変化を及ぼさなかった。また、BMP15 は HAT 活性を有意に増強させ、LDN193189 はこの効果を抑制したが SB203580 は変化を及ぼさなかった。これらの結果より、BMP15 は Smad 1/5/8 のリン酸化を介して HAT 活性を増強させ、FSHR が発現されやすいようなヒストン修飾をもたらしたと考えられた。

BMP15 が non-Smad 経路に及ぼす影響：

BMP15 は p38 MAPK のリン酸化を促進し、LDN193189 はこの効果を抑制したが SB203580 は抑制しなかった。BMP15 は USF1 のリン酸化を促進したが、LDN193189 も SB203580 もこの効果を抑制した。

即ち、BMP15 は、smad 経路を介してヒストンアセチル化を促進し、non-smad 経路を介して FSHR の転写因子である USF を活性化することにより FSHR 発現を促進した（図 1）。

(2) Phoenixin に関する成果

ヒト卵巣における Phoenixin と GPR173 の発現：

免疫染色法にてヒト卵巣における Phoenixin と GPR173 の発現の有無を確認した。Phoenixin と GPR173 は原始卵胞では発現を認めなかったものの、一次卵胞以降の卵胞顆粒膜細胞で発現しており、卵胞発育とともに発現は増強した。

Phoenixin が顆粒膜細胞の増殖とステロイド合成に及ぼす影響：

Phoenixin は HGrC1 の増殖を時間と濃度依存性に促進した。また phoenixin は、顆粒膜細胞の主要な機能であるステロイド合成に関連する遺伝子の発現を濃度依存性に促進した。Phoenixin は HGrC1 において GPR173 とアロマトラーゼの発現を亢進し、アロマトラーゼ活性を制御すると報告されている CREB のリン酸化を促進して、培養上清中のエストラジオール産生を増加させた。

卵胞発育関連遺伝子の発現に及ぼす影響：

HGrC1 に Phoenixin を添加培養することにより、FSHR・LHR・kit ligand (KITL) 等、卵胞発育に関連する遺伝子の発現が上昇し、natriuretic peptide C (NPPC) の発現が抑制された。KITL とは、原始卵胞から一次卵胞への成長を誘導し、一次卵胞以降の卵子を増大させる因子であり、NPPC とは、卵の成熟を抑制する因子である。即ち、phoenixin 添加により卵胞発育を促進する遺伝子群の発現が亢進したと考えられた。

Phoenixin シグナル伝達における GPR173 の関与：

受容体 GPR173 の siRNA を HGrC1 に添加培養したところ、phoenixin による FSHR・LHR・KIT 遺伝子の発現促進作用と natriuretic peptide C (NPPC) の発現低下作用は抑制された。したがって顆粒膜細胞において phoenixin の作用は GPR173 を介することが示された。

マウス卵巣組織培養における phoenixin の卵胞発育促進効果：

ヒト卵巣と同様にマウス卵巣においても、卵胞の発育とともに phoenixin と GPR173 の発現は増強していた。Phoenixin 刺激による卵胞発育を評価するため、タイムラプス法を用いてマウス卵巣組織培養を行った。培養開始 1 週間では、phoenixin 添加による違いは見られなかった。しかし培養 9 日目以降、phoenixin 100 nM を添加培養した卵巣組織では有意に卵胞発育の促進が見られた（図 2）。また、phoenixin 100 nM

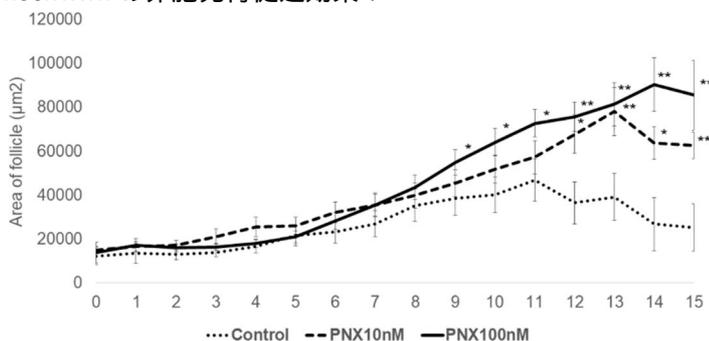


図 2：Phoenixin が卵胞発育に及ぼす影響

を添加した 2 日後より、培養上清中のエストラジオール産生は有意に増加した。さらに phoenixin 添加により排卵数も有意に増加し、排卵された卵が成熟卵である確率が有意に増加した。

すなわち、phoenixin とその受容体 GPR173 はヒト卵巣において顆粒膜細胞に主に発現され、細胞増殖の亢進、ステロイド合成の誘導、及び卵胞発育を促進する作用を持つことが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Xuan Phuoc Nguyen, Tomoko Nakamura, Satoko Osuka, Bayasula Bayasula, Natsuki Nakanishi, Yukiyo Kasahara, Ayako Muraoka, Shotaro Hayashi, Takashi Nagai, Tomohiko Murase, Maki Goto, Akira Iwase, Fumitaka Kikkawa	4. 巻 158
2. 論文標題 Effect of the neuropeptide phoenixin and its receptor GPR173 during folliculogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/REP-19-0025	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 Ken Shimizu, Tomoko Nakamura, Bayasula, Natsuki Nakanishi, Yukiyo Kasahara, Takashi Nagai, Tomohiko Murase, Satoko Osuka, Maki Goto, Akira Iwase, Fumitaka Kikkawa	4. 巻 36
2. 論文標題 Molecular mechanism of FSHR expression induced by BMP15 in human granulosa cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Assisted Reproduction and Genetics	6. 最初と最後の頁 1185-1194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10815-019-01469-y	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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 清水顕、岩瀬明、吉田沙矢子、村岡彩子、林祥太郎、仲西菜月、永井孝、邨瀬智彦、大須賀智子、中村智子、後藤真紀、吉川史隆
2. 発表標題 BMP15 がFSHRを誘導する機序の解明
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Xuan Phuoc Nguyen, Tomoko Nakamura, Shotaro Hayashi, Ayako Muraoka, Natsuki Nakanishi, Yukiyo Kasahara, Takashi Nagai, Tomohiko Murase, Satoko Osuka, Maki Goto, Akira Iwase, Fumitaka Kikkawa
2. 発表標題 The effect of neuropeptide Phoenixin on folliculogenesis
3. 学会等名 第63回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	Xuan Phuoc Nguyen, Akira Iwase, Tomohiko Murase, Umida Ganieva, Ying Qin, Bayasula, Ken Shimizu, Satoko Osuka, Tomoko Nakamura, Maki Goto, Fumitaka Kikkawa
2. 発表標題	Directive Action of Neuropeptide Phoenixin and Its Receptor GPR173 During Folliculogenesis
3. 学会等名	Society for Reproductive Investigation 65th Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Xuan Phuoc Nguyen, Tomoko Nakamura, Tomohiko Murase, Umida Ganieva, Ying Qin, Bayasula, Ken Shimizu, Satoko Osuka, Maki Goto, Akira Iwase, Fumitaka Kikkawa
2. 発表標題	Neuropeptide phoenixin (PNX) and its novel receptor GPR173 induce COX-1/COX-2 expression and PGE2 production through CREB signaling pathway
3. 学会等名	European Society of Human Reproduction and Embryology 34th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Hayashi S, Nakamura T, Murakami M, Miyake N, Muraoka A, Kasahara Y, Nakanishi N, Nagai T, Murase T, Osuka S, Goto M, Kikkawa F
2. 発表標題	Suppression of gonadotropin sensitivity and steroidogenesis in human granulosa cells by endometriotic stroma cells
3. 学会等名	第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Xuan Phuoc Nguyen, Nakamura T, Osuka S, Bayasula, Muraoka A, Hayashi S, Nakanishi N, Kasahara Y, Murase T, Goto M, Iwase A, Kikkawa F
2. 発表標題	Expressions and Effects of Phoenixin and Its Receptor GPR173 During the Human Menstrual Cycle
3. 学会等名	67th Society for Reproductive Investigation Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年	2019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
研究協力者	岩瀬 明 (Iwase Akira)		
研究協力者	バヤソラ (Bayasula)		