

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：25406
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2019～2021
 課題番号：19K06359
 研究課題名(和文) 鉄が制御する卵胞発育期の体細胞依存的な卵の代謝調節とエピゲノム制御の解明と応用
 研究課題名(英文) Analysis and application of follicular somatic cell-dependent oocyte metabolic regulation and epigenome regulation controlled by iron during follicular development.
 研究代表者
 山下 泰尚 (Yasuhisa, Yamashita)
 県立広島大学・生物資源科学部・准教授
 研究者番号：50452545
 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)：体外成熟培養法(IVM)法は、家畜生産の重要な技術であるが、作出される胚盤胞率が低いことが問題である。卵胞発育時に鉄輸送タンパク質トランスフェリン(TF)が蓄積していたことから、卵胞発育、排卵に重要であると考えられた。そこで卵胞発育期の顆粒層細胞と卵丘細胞でTF受容体(Tfr1)を欠損したマウス(Tfr1KO)マウスを作出し解析を行った。その結果、Fshr受容体の発現をエピジェネティック制御している可能性が見出された。さらにブタ卵丘細胞卵複合体(COC)を用いて、TFを考慮したpreIVM-IVMの2ステップ培養により胚盤胞率が高くなることを明らかにし新規IVM法の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、TFにより供給される鉄は卵胞発育に重要であることを初めて明らかにした。加えて、TFにより供給される鉄は卵胞発育を誘導するために重要なFSHRのエピジェネティック制御に関わる可能性が示されたことから、哺乳動物の卵胞発育を誘導する根幹に関わり学術的意義は高い。また、これまでブタCOCを培養した際の胚盤胞率は20%から高くても30%程度であったが、TFを考慮したpreIVMとIVMを組み合わせた2ステップ培養により49%までその率を向上させたことから、ブタのみならずウシの効率的生産やヒトの高度生殖補助医療にも応用可能であると考えられ、社会的意義の高い成果であると言える。

研究成果の概要(英文)：IVM of COCs is an important for embryo production of domestic animals. In pig, since blastocyst rate following IVF is still low, there is a need to improve the developmental potential of oocyte produced from IVM. Since we previously found the accumulation of transferrin (TF) in developing follicle in pig, it assumed that the TF-Fe3+ is important for follicular development and/or ovulation. To investigate this, we firstly examined the basic role of Tf-Fe3+ on follicular development and ovulation using null mice of granulosa and cumulus cell specific-TF receptor knockout (Tfr1cKO) mice. Tfr1cKO mice failed to follicular development caused by the downregulation of Fshr and Cyp19a1 in granulosa cells. To utilize the knowledge obtained from basic research using Tfr1cKO mice for the development of IVM technique of domestic animals, we developed a two-step culture method as novel IVM combines preIVM and subsequent IVM supplemented with TF-Fe3+, which can efficiently produce blastocyst.

研究分野：動物生産科学，生殖生理学，生殖内分泌学

キーワード：卵胞発育 排卵 卵子成熟 トランスフェリン エピジェネティック制御

1. 研究開始当初の背景

体外成熟培養(IVM)法は、卵胞発育段階の初期胞状卵胞に含まれる未成熟な卵丘細胞卵複合体(COC)から成熟卵を得る技術であり、家畜の効率的生産や品種改良の効率化に応用が期待されている。しかし、IVMによる胚盤胞率は、ブタ、ウシで20%程度と低い。このため、体内の卵子の成熟環境を理解し、それに基づく新たなIVM法の開発が望まれている。

これまでの研究において、我々は、卵胞発育および排卵メカニズムに関する研究を展開しており、卵胞発育期におけるアンドロゲンからエストロゲン産生が誘導されると優勢卵胞へと卵胞選抜されるが、アンドロゲンからコルチゾール産生が誘導されると退行卵胞となること、排卵期にEGF-like factorとその切断酵素が発現することにより卵成熟が誘導されることを報告してきた。これら卵胞発育期から排卵期において卵成熟を誘導する因子は顆粒層細胞や卵丘細胞に受容体を持つことから、顆粒層細胞や卵丘細胞などの体細胞が卵子へ直接あるいは間接的に影響することにより、卵子の成熟が促進されると考えられている。IVM法を用いると胚盤胞率が低い原因の一つは、体内で生じる変化を体外に応用できていない点にあると考えられていることから、これらの時期の顆粒層細胞や卵丘細胞の動的な変化を的確に捉え、IVM法に応用する必要がある。

初期胞状卵胞から後期胞状卵胞まで間、卵胞内の体細胞や卵子は、代謝物の蓄積やメチル修飾を受ける。近年、代謝活性の上昇に伴い蓄積するATPなどのエネルギーとともに蓄積するメチル基供与体(SAM)やアセチル基供与体(Acetyl-CoA)がエピジェネティック制御に関与することが示された。このことから、IVMにより高い発生能を持つ胚を作成するためには、卵胞発育環境において体細胞と卵のコミュニケーションを活性化させ、卵や顆粒膜細胞の代謝能向上とエピジェネティック制御を十分に促進させたIVM法の構築が必要であると考えた。

我々は、独自の研究により卵胞発育期のブタ卵胞液に鉄運搬タンパク質のトランスフェリン(TF)が血中の3倍以上もの高濃度で蓄積することを見出した。さらに卵胞発育期の顆粒層細胞、卵丘細胞特異的TF受容体(TFR1)欠損マウス(*Tfr1^{gc/-}*)を作製した結果、これらのマウスでは卵胞発育能が低下し、卵子の発生能も著しく低下することを明らかにしている。また、マウス顆粒層細胞ではTF依存的に脂質代謝、糖代謝などが活性化し、ATPやメチル基供与体(SAM)が蓄積することを見出している。このことから、卵胞発育期の顆粒層細胞や卵丘細胞ではTF依存的に代謝の向上とエピジェネティック制御が促進されること、この結果、高い発生能を有する卵子が形成されると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、

- *Tfr1*遺伝子をヘテロ欠損した*Tfr1^{gc/+}* (HET) マウスおよび、*Tfr1*遺伝子をホモ欠損した*Tfr1^{gc/-}* (KO) マウスを用いて顆粒層細胞や卵丘細胞において鉄が代謝物向上とエピジェネティック制御を促進し、卵子の発生能が制御されていることを明らかにする
- 鉄により体細胞依存的な代謝能向上とエピジェネティック制御を促した新規IVM法を開発する

これらの検討により鉄が制御する体細胞依存的な代謝向上とエピジェネティック制御を促進し卵子が成熟するメカニズムを明らかにし、基礎研究をIVM開発に応用するトランスレーショナルリサーチを実施する。

3. 研究の方法

マウスを用いた基礎研究（卵胞発育期に蓄積する鉄の生物学的意義）

本研究では、*Cyp19-Cre* マウスと *Tfr1* floxed マウスの交配により、HET マウスおよび KO マウスを作製し研究に用いた。*Tfr1* floxed マウスを Control として用いた。

本研究では、3 週齢および 6 週齢の Control, HET, KO を用いた。まず 6 週齢マウスの性周期を膣垢のギムザ染色により性周期を判定した。一部の 6 週齢の Control, HET, KO 雌を 6 週齢の雄の Control と交配試験を行い、産仔数を調べた。3 週齢の雌の Control, HET, KO に卵胞発育を誘導する eCG を投与し、48 時間後に hCG を投与し排卵を誘導した。血清、卵巣、鉄量をメタロアッセイキットにより測定した。また卵巣から顆粒層細胞を採取し、qRT-PCR 法により卵胞発育マーカー (*Fshr*, *Cyp19a1*, *Ccnd2*) 発現, ELISA 法により卵巣の E2 量の測定を行った。また *Fshr* のプロモーター領域をパイサルファイト処理し、PCR により増幅させた後、プラスミドに組み込みさらに増幅させ、シークエンスを行い、*Fshr* のエピジェネティック制御について検討を行った。

ブタ卵子を用いた応用研究（鉄依存的な卵子成熟機構に着眼した新規 IVM 法の確立）

本研究では、食肉市場由来のブタ卵巣を用いて研究を行った。

TF と結合した鉄 (Fe^{3+}) は、鉄受容因子 (TFR1, DMT1, FT; Ferritin) により細胞内に取り込まれ使用される。ブタ COC を既に確立済みの卵胞発育期 (preIVM) と排卵期 (IVM) を模倣した 2 ステップ IVM 法で培養し、培養前, preIVM 後, IVM 後の卵丘細胞の鉄受容因子群の発現と Fe^{2+} の細胞内局在を調べ、培養条件を最適化した。

ブタ COC を鉄含有 TF (Holo-TF) 添加, 鉄非含有 TF (Apo-TF) 添加, 無添加 (Control) で 2 ステップ IVM 法により培養し、COC を各時間で回収した。培養前, preIVM 後, IVM 後の COC から卵丘細胞を取り除き、卵丘細胞の Fe^{2+} 局在を FeRhoNox-1 により検出した。また preIVM 後の卵丘細胞の卵胞発育マーカー (*Cyp19a1*, *Ccnd2*) 発現, 増殖マーカー (PCNA) の発現局在, IVM 後の卵丘細胞の卵子成熟マーカー (*Areg*, *Ereg*, *Egfr*, *Has2*, *Tnfrsf25*, *Ptx3*) 発現, COC 直径, 卵子の MII 率を調べた。さらに成熟卵を体外受精に供試し、胚盤胞率を比較した。

4. 研究成果

マウスを用いた基礎研究（卵胞発育期に蓄積する鉄の生物学的意義）

6 週齢の上記メスマウスを用いてまず、膣垢を 12 日間連続採取し、性周期変動を調べた。その結果、Control マウスでは 5.3 ± 0.58 日周期で発情休止期 発情前期 発情期 発情後期 発情休止期の順に正常な発情周期が認められた。HET マウスでは若干発情期が微弱であるものの 6.6 ± 0.50 日周期で発情周期が認められ、この値は Control と有意差は認められなかった。一方 KO マウスでは発情期が極めて微弱であり、Control および HET と比べ 9.0 ± 1.70 日と発情周期が有意に遅延していた (図 1)。

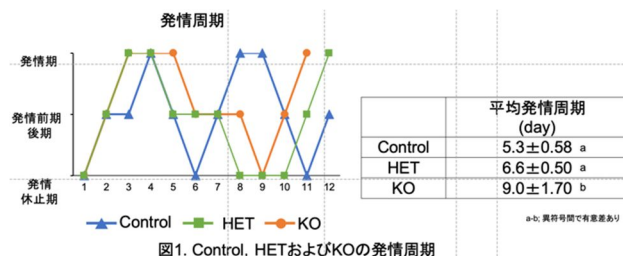


図1. Control, HETおよびKOの発情周期

次に 3 週齢の Control マウス, HET マウスおよび KO マウスを用いて, eCG (FSH 様作用) を投与し卵巣発育を誘導し, 血清及び卵巣を採取し, 鉄濃度を調べた。その結果, 血清鉄量は Control, HET, KO で差が認められなかったが, 卵巣鉄量は Control に比べ HET および KO で有意に低い値を示した (図 2)。

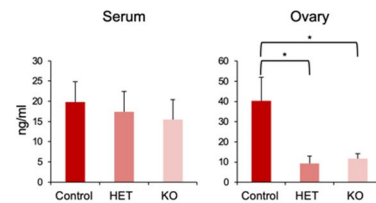


図2 Control, HETおよびKOにおけるeCG投与48時間後の血清および卵巣内鉄濃度
*: 処理区間に有意差あり (p<0.05)

さらに eCG 投与 48 時間後に hCG (LH 様作用) を投与しに排卵を誘導し, 16 時間後の卵巣から COC を採取し, 排卵数と卵成熟率 (MII 率) を調べた。その結果, 排卵数は Control マウスでは 40 個前後認められたが, HET および KO マウスでは有意に排卵数が少なく, また MII 率も同様に Control マウスに比べ HET マウスおよび KO マウスで低い値を示した (Control; 88.75% vs HET; 39.74% vs KO; 22.99) (図 3)。

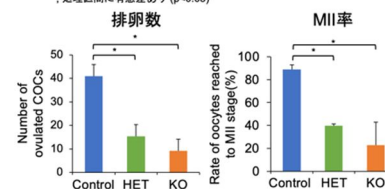


図3 eCGおよびhCGを投与したControl, HETおよびKOマウスの排卵数と卵子のMII率
*: Controlに対して有意差ありp<0.05

次に 6 週齢の Control マウス, HET マウスおよび KO マウスの雌を 6 週齢の Control のオスを用いて 1 ヶ月間の交配試験を行った。その結果, 産仔数は Control では 8.33 匹と高い値を示したが, HET マウスでは 3.25 匹と有意に低下し, KO マウスでは全く産仔を得ることができなかった (図 4)。

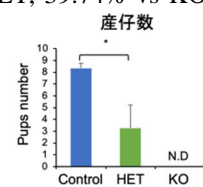


図4 Control, HETおよびKOマウスにおける産仔数
N.D.: Not detected
*: Controlに対して有意差ありp<0.05

次に, Control マウスと KO マウスにおける卵巣発育と排卵に及ぼす影響を調べるために, 3 週齢のこれらのマウスに eCG を投与し 48 時間後に hCG を投与した。eCG 投与 48 時間後の卵巣と hCG 投与 48 時間後の卵巣を採取し卵巣切片を作製し HE 染色し形態を観察すると共に後期胞状卵胞数と異常卵胞巣, 黄体数と異常黄体数を調べた。その結果, eCG 投与後の Control では正常な後期胞状卵胞が認められ, その数は一つの卵胞当たり 13 個程度存在していたが, KO マウスでは有意に低下し, 異常卵胞が多数存在していた。また hCG 投与後の Control の卵胞には黄体が多数存在しており, その数は 25 個程度存在していた。一方 KO マウスでは正常な黄体はほとんど認められず, 黄体内に卵子が取り残された異常黄体が多数存在していた (図 5)。このことから, KO マウスでは卵巣発育に問題が生じその結果, 排卵が誘導できないものと考えられた。

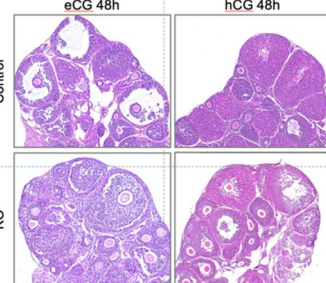


図5 eCG刺激48時間後あるいはhCG刺激48時間後のControlおよびKOの卵巣内景

そこで eCG 投与 12 時間後の顆粒層細胞の卵巣発育マーカー (*Fshr*, *Cyp19a1*) の発現と eCG 投与 48 時間後の培地中の E2 量を測定した。その結果, *Fshr* および *Cyp19a1* 発現は, Control に比べ KO で低い値を示し, 同様に E2 量も KO で低い値を示した (図

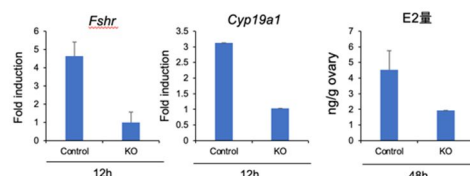


図6 eCGを投与後12時間後あるいは48時間後のControlおよびKOの*Fshr*および*Cyp19a1*発現および培地中E2量

6)。FSHR は, 卵巣発育を誘導するマスターキーであることから, 卵巣発育不全の原因は *Fshr* 発現の低下にあると考えられた。鉄は脱メチル化酵素である TET2 の発現と活性化に重要であることが近年報告された。我々は KO マウスのオスにおいて, TET2 の発現と局在が TFR1 を欠損した細胞で存在しないことを見出している。また当研究グループにおいて近年 TET2 発現は, 卵巣発育期の顆粒層細胞で発現することを報告している (Kawai et al., 2021, *Commun Biol*)。このことから, KO マウスの雌では, 顆粒層細胞で鉄が不足するために TET2 の発現と活性化が十分生じず *Fshr* の脱メチル化が不十分となり, 卵巣発育不全となると考えられた。そこで, 現在 KO マウスの雌の顆粒層細胞において TET2 の mRNA 発現とタンパク質発現を調べると共に *Fshr*

のプロモーターのGpCアイランドにおけるパイサルファイトシークエンスにより *Fshr* のエピジェネティック制御に鉄が関与するかの解析を進めている。

ブタ卵子を用いた応用研究（鉄依存的な卵子成熟機構に着眼した新規 IVM 法の確立）

1-3mm, 4-7mm, 8mm<の 卵胞サイズに分け、顆粒層細胞と卵胞液を採取した。卵胞液中の TF 量は 8mm<の卵胞サイズで著しく高い値を示した (13.5mg/ml)。また TFR1 発現は 4-7mm で最大となり、DMT1 および FT は全ての卵胞サイズで変化せず一様に発現していた (図 7)。

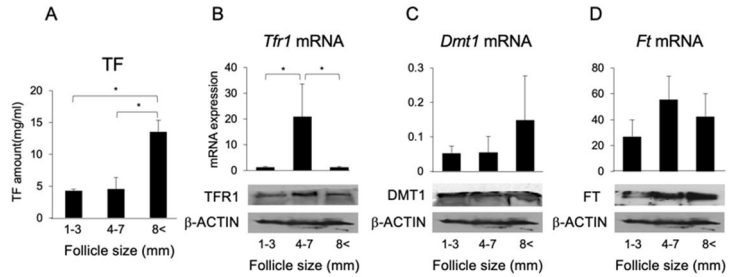


図7. 異なる卵胞サイズにおける卵胞液のTF量(A), 顆粒層細胞のTFR1(B), DMT1(C)およびFT(D)のmRNAおよびタンパク質発現
*: 処理区間に有意差あり(p<0.05)

4-7mm の卵胞から採取した顆粒層細胞を 15 分間、TF 無添加区(Control), TF 添加区, FSH+TF 添加区で培養し、培養後の鉄の細胞内局在を FeRhoNox-1n により検出した。その結果、Control 区に比べ TF 区で蛍光像は増加したが、FSH+TF 区ではその蛍光像はさらに増加した (図 8)。

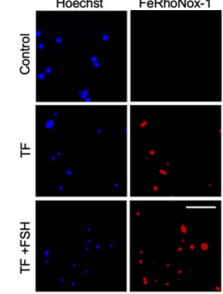


図7. Control, TF, FSH+TFで顆粒層細胞を15分間培養した時の細胞内の鉄の局在
Scale bar = 50 μm

● 卵胞発育環境を模倣した preIVF 法の開発

低容量 FSH(100ng/ml)を添加した preIVM 培地に TF を添加していない区(Control), 鉄包含 TF(Holo-TF)を添加した区(Holo-TF), 鉄非包含 TF(Apo-TF)を添加した区(Apo-TF)でブタ COC を 12 時間培養した。培養後の卵丘細胞の卵胞発育マーカー (*Ccnd2*, *Cyp19a1*) の発現を調べると共に、培養後の培地中 E2 量を測定した。その結果、Control および Apo-TF では卵胞発育マーカーの遺伝子発現は低い値を示したが、Holo-TF ではこれらの値は高い値を示した。また培養後の増殖細胞を PCNA 染色により調べたところ、PCNA 陽性細胞数は Holo-TF で多く認められ、Control および Apo-TF では低い値を示した。

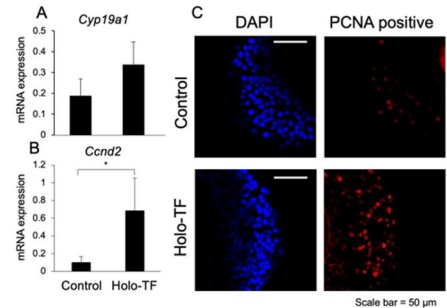


図8. ブタCOCをControl, Holo-TF添加培地で12時間培養したときの卵丘細胞の卵胞発育マーカーの発現(A, B)と増殖細胞の局在(C)
Scale bar = 50 μm

● 新規 IVF 法の開発

PreIVF 時には Holo-TF を添加すると卵丘細胞の卵胞発育マーカーの発現増加と細胞増殖が促進されたことから、次の実験では、Holo-TF で preIVM を行った COC を続けて排卵期を模倣した高濃度 FSH(1mg/ml)+EGF(1ng/ml)を添加した培地に Holo-TF 無添加区(Control)と Holo-TF 添加区(Holo-TF)で培養し、卵子成熟マーカーの遺伝子発現と卵丘膨化、卵子成熟率(MII 率)を調べた。その結果、Control に比べ、Holo-TF 添加区では全ての値が低い値を示した (図 9)。さらに IVF 後の胚盤胞率は、Control 区が Holo-TF 区に比べ有意に高い値を示した (図 10)。

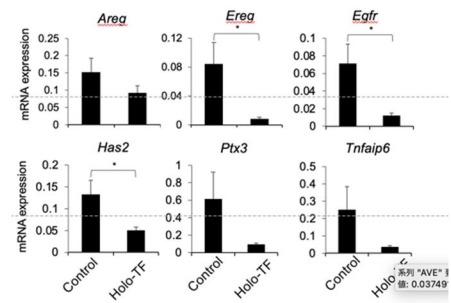


図9. Holo-TF添加培地でpre-IVM後のブタCOCをControl, Holo-TF添加培地で15時間培養したときの卵丘細胞の卵子成熟マーカーの発現

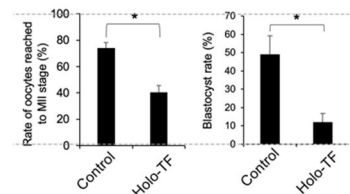


図10. Holo-TF添加培地でpre-IVM後のブタCOCをControl, Holo-TF添加培地で48時間培養したときの卵子のMII率(A)とIVF後の胚盤胞率(B)
*: p<0.05

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tonai S, Kawabata A, Nakanishi T, Lee JY, Okamoto A, Shimada M, Yamashita Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Iron deficiency induces female infertile in order to failure of follicular development in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 475-483
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2020-074	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 Umehara T, Tsujita N, Goto M, Tonai S, Nakanishi T, Yamashita Y, Shimada M.	4. 巻 91
2. 論文標題 Methyl-beta cyclodextrin and creatine work synergistically under hypoxic conditions to improve the fertilization ability of boar ejaculated sperm.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13493.	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 Nakanishi T, Okamoto A, Ikeda M, Tate S, Smita M, Kawamoto R, Tonai S, Lee JY, Shimada M, Yamashita Y.	4. 巻 27
2. 論文標題 Cortisol induces follicle regression, while FSH prevents cortisol-induced follicle regression in pigs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Human Reproduction	6. 最初と最後の頁 gaab038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/molehr/gaab038.	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 Nakanishi T, Tanaka R, Tonai S, Lee JY, Yamaoka M, Kawai T, Okamoto A, Shimada M, Yamashita Y.	4. 巻 162
2. 論文標題 LH Induces De Novo Cholesterol Biosynthesis via SREBP Activation in Granulosa Cells During Ovulation in Female Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 bqab166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endo/bqab166.	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9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山下泰尚
2. 発表標題 排卵期の卵巣局所で発現するコレステロール新規合成遺伝子の発現とその破綻による排卵
3. 学会等名 第四回日本胚移植研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 藤内慎悟，河端茜，島田昌之，山下泰尚
2. 発表標題 マウスにおける鉄欠乏は卵胞発育不全による雌性不妊を引き起こす
3. 学会等名 第23回日本IVF学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 岡本麻子，島田昌之，山下泰尚
2. 発表標題 NeurotensinはERK1/2系の持続的リン酸化を促進し排卵を誘起する
3. 学会等名 第23回日本IVF学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 中西寛弥，田中里沙，島田昌之，山下泰尚
2. 発表標題 顆粒膜細胞で発現上昇するSREBP1は，排卵期のプロゲステロン産生に必須である
3. 学会等名 第23回日本IVF学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 中西寛弥, 田中里沙, 山下泰尚
2. 発表標題 マウス卵巣におけるコレステロール新規合成制御因子の発言とその役割
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 岡本麻子, 李周蓮, 山下泰尚
2. 発表標題 マウス卵管においてNeurotensin依存的に発現するLipocalin2は精子運動生を亢進する
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 藤内慎悟, 川端茜, 成田恵菜, 山下泰尚
2. 発表標題 卵巣発育期特異的な卵巣-肝臓における新規コミュニケーションの存在と意義
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 中西寛弥, 藤内慎悟, 山岡愛実, 岡本麻子, 川合智子, 島田昌之, 山下泰尚
2. 発表標題 排卵刺激後のINSIG消失に伴うSREBPの転写活性亢進は排卵に必須である
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 中西寛弥, 岡本麻子, 島田昌之, 山下泰尚
2. 発表標題 FSHが誘導するコルチゾール代謝亢進による卵胞選抜メカニズムの解明
3. 学会等名 第129回日本畜産学会
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 平山琢二, 須田義人, 山下泰尚, 佐藤勝祥, 浅野桂吾, 水口亜樹, 山中麻帆, 瀬戸隆弘, 中川敏法, 紺屋直樹, 馬場保徳	4. 発行年 2022年
2. 出版社 サンライズ出版	5. 総ページ数 100
3. 書名 新 家畜生産学入門	

〔産業財産権〕

〔その他〕

第129回日本畜産学会にて優秀発表賞受賞

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
研究分担者	島田 昌之 (Shimada Masayuki) (20314742)	広島大学・統合生命科学研究科(生)・教授 (15401)	

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