

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06365

研究課題名(和文) 卵子形成における副腎皮質ホルモンの役割とその調節機構の解明

研究課題名(英文) Study for the functional role of corticosteroids and its regulatory mechanism in oogenesis

研究代表者

手塚 雅文(Tetsuka, Masafumi)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：40311526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では副腎皮質ホルモン作用調節機構のウシ卵巣での存在と、それが卵巣機能や卵子形成、初期胚の発生に与える影響について調べた。その結果、1) 卵巣組織や卵子は副腎皮質由来の糖質/鉱質コルチコイドに常時曝されているだけではなく、局所でそれらの濃度を調節するメカニズムを備えていること、2) これらの組織や細胞は糖質/鉱質コルチコイド受容体を発現しており、副腎皮質ホルモンがそれらを介して黄体化や卵母細胞の成熟に関与していること、3) 卵巣組織には副腎皮質ホルモンと性ステロイドがクロストークする複雑かつ合目的な作用調節機構が存在することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去に多くの研究が積み重ねられてきた性ステロイドホルモンとは違い、副腎皮質ホルモンの生殖生理への関与についてはほとんど明らかにされていない。本研究では恒常性の維持に関与している副腎皮質ホルモンが、周期的な生殖のリズムを生み出す性ステロイドとクロストークしながら卵巣機能調節に関与していることや、卵形成に関与している可能性を示唆した。これらの知見は今まで別々に扱われてきた生殖と生存のためのシステムを結びつけ、生理学に新しい見識を加えると共に、例えばストレス性の不妊などに対処する生殖医療のために必要となる基礎知識を提供すると考える。

研究成果の概要(英文)：The presence of corticosteroid system (i.e., production, reception, action) and its regulatory mechanism were investigated in the bovine ovary and oocyte/early embryo. The results showed that, 1) ovarian tissues and oocyte are not only constantly exposed to adrenal derived corticosteroids (i.e., glucocorticoid and mineralocorticoid) but also able to activate/inactivate them locally, 2) these tissues and cells express receptors for glucocorticoid and mineralocorticoid and through which, corticosteroids regulate ovarian functions, such as promoting luteinization and supporting oogenesis, 3) the ovarian regulatory system of corticosteroids cross-talks with that of sex steroids (i.e., progesterone) and elaborately regulates ovarian functions. These results indicate that the ovarian corticosteroid system is well integrated into the ovarian physiology.

研究分野：繁殖生物学

キーワード：副腎皮質ホルモン 卵巣機能 卵子形成 黄体化

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣は卵子形成の場であり、発生が可能な卵子を産出するための“ゆりかご”として機能する。したがって卵子形成に対するある物質の影響を調べるためには卵とそれをサポートする卵胞の機能を一つの連続した事象として捉える必要がある。卵巣機能が性腺刺激ホルモンや性ステロイド、成長因子など多岐にわたる因子によって調節されることは長年にわたる多くの研究の結果明らかにされている。これらの知見の多くは教科書レベルで一般化されており、それを主幹に日進月歩で新しい知識が付け加えられている。一方、生体機能の維持に根本的なレベルで関与する2つの副腎皮質ホルモン、糖質コルチコイドと鉱質コルチコイドの卵巣生理への関与については報告が極めて限られており、知識体系としては完成から程遠い状態である。生体内で卵巣は胎児期から閉経にいたるまで、常に副腎皮質ホルモンにさらされており、これらのホルモンが卵巣機能の調節に関与している可能性は十分考えられる。またこれまでに糖質コルチコイドにより卵巣機能が促進、もしくは阻害されるという報告もいくつかされている。しかしこれらの研究は単発的なものが多く、体系的な知見が得られたとは言い難い。私たちはこれまでにヒト、ラット、ウシで卵巣における副腎皮質ホルモンの働きとその調節機構について研究に取り組んできた。その結果、卵巣には副腎皮質ホルモンの作用を組織的に調節する系が存在することが明らかになった。またこの系の動態から過去に報告されている知見を整理することで次の様な仮説にたどり着いた。すなわち卵巣には副腎皮質ホルモンを局所で活性化(利用)/非活性化(除去)するシステムが存在し、卵巣組織に発現する受容体を介して卵巣機能を合目的的に調節している、というものである。ヒトやウシでは卵母細胞を卵胞から取り出し体外で成熟(IVM)、受精(IVF)、胚盤胞まで培養(IVC)することで移植可能な初期胚の生産(IVP)が一般的に行われている。また初期の卵胞から発育途上にある卵母細胞と周囲の顆粒層細胞を回収し、IVPが可能になるステージまで培養する技術も開発されている。しかし体内で生産された胚に比べ、これらの胚の質が劣ることから培養条件の改良が急務となっている。現在一般的に使用されている培養系で副腎皮質ホルモンを含むものは無く、副腎皮質ホルモンがIVPに及ぼす影響について系統的に調べた研究もない。また卵子形成の様々な段階にある卵母細胞や卵胞における副腎皮質ホルモン受容体や合成酵素の発現動態も明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は副腎皮質ホルモンが卵子形成や胚発生、卵巣機能に及ぼす生理的影響とその作用メカニズムを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

本研究では以下の方法を用いて実験を行った。

- 1) 小卵胞を多く含む卵巣皮質を固定、切片を作成し免疫組織化学により副腎皮質ホルモン関連因子がどの発育段階のどの細胞で発現するか確認する。
- 2) 卵丘卵子複合体(COC)を副腎皮質ホルモンの存在下でIVMに供し、糖質コルチコイドと鉱質コルチコイドの作用がどの様に調節されているのか、MRやHSD11B2のアンタゴニストを用いて明らかにする。
- 3) COCを副腎皮質ホルモンの存在下でIVMに供し、その後の受精率、発生率に与える影響を検証する。
- 4) 卵胞から細胞を採取し、in vitroで黄体化させることで、副腎皮質ホルモン合成酵素や受容体の発現動態とそのメカニズムを明らかにする。またこれらのアゴニストやアンタゴニストを用いて、副腎皮質ホルモンが卵胞・黄体の生理機能に与える影響を明らかにする。

#### 4 . 研究成果

##### ウシの卵母細胞は卵子形成のすべてのステージで鉱質コルチコイドの標的細胞である

微小卵胞の培養系を確立し、副腎皮質ホルモンの卵胞発育への関与を調べる一環として、原始卵胞から胞状卵胞までの各発育ステージで免疫組織化学により鉱質コルチコイド受容体(MR)の所在を確認した。原始卵胞から胞状卵胞までの全てのステージで、卵母細胞の細胞質に高いMRの発現が認められた。MRは活性型鉱質コルチコイドであるアルドステロンだけではなく、活性型糖質コルチコイドであるコルチゾールによっても活性化される。よって鉱質コルチコイドの標的器官ではコルチゾールをコルチゾンへと変換するHSD11B2が発現しておりMRを保護している。そこでHSD11B2の発現を免疫組織化学により確認したところ、MRとほぼ同様な発現パターンが認められた。MRの発現は受精後4細胞期まで認められたが、その後ほぼ消失し胚盤胞期でも認められなかった。以上のことからウシの卵母細胞は卵子形成のすべてのステージで鉱質コルチコイドの標的細胞であるが、受精後間もなくそうではなくなることが示唆された。

小卵胞でMRが発現していることを利用して、卵巢皮質内での微小卵胞の分布を調べた。微小卵胞のほとんどが原始卵胞、もしくは一次卵胞であり卵巢表面から1mm以内の皮質内に存在していた。特に原始卵胞の70%、一次卵胞の60%が卵巢表面から200-600mmの深さに存在していたことから、微小卵胞を採取する際には卵巢表面を薄く剥ぐようにすると良いことが示唆された。

##### ウシの卵母細胞はHSD11B2によってコルチゾールを非活性化することでMRが非特異的に活性化されるのを防ぐ

高濃度のコルチゾールによって卵母細胞の成熟が阻害されることが知られているがそのメカニズムは不明であった。卵母細胞には糖質コルチコイド受容体(GR)は発現していないことから、コルチゾールがMRを介して作用しているかをMRの特異的ブロッカーを用いて検証した。その結果、コルチゾールの阻害効果が抑制されたことから、コルチゾールがMRを介して作用していることが明らかになった。阻害剤によりHSD11B2の活性を抑制するとコルチゾールへの耐性が低下した。以上のことから卵母細胞には糖質コルチコイドの存在下で鉱質コルチコイドの選択的作用を可能にする機構が存在することが明らかになった。

##### IVMへの副腎皮質ホルモンの添加は初期胚の発生率に影響を与えない

成熟期間中の副腎皮質ホルモンが受精、およびその後の発生に与える影響についてIVM/IVF/IVCの系を用いて調べた。排卵前の卵胞液中に存在すると思われる濃度のコルチゾール(100ng/ml)とアルドステロン(500pg/ml)のIVM培地への添加は、卵割率、桑実胚率、胚盤胞率に明確な影響は与えなかった。

##### ウシの黄体化顆粒層細胞ではコルチゾールとP4が互いを調節することで黄体化を促進する

ウシ黄体における副腎皮質ホルモン合成およびその効果を調べるために顆粒層細胞細胞を採取し、in vitroで黄体化させる系を用いて一連の実験を行った。プロゲステロン(P4)からコルチゾール/アルドステロンへの合成を仲介する2つの酵素(CYP21A2, CYP11B1)の発現はほとんど認められず、これらのホルモンの合成も認められなかった。一方で黄体化した細胞では糖質コルチコイド活性化酵素HSD11B1とGRの発現が比較的高いレベルで認められた。非活性化酵素HSD11B2やMRの発現は低かった。高濃度のP4によりHSD11B1の発現とコルチゾンからコルチゾールへの変換が阻害された一方、HSD11B2の発現が上昇した。コルチゾールの培地への添加

は P4 合成を仲介する 2 つの酵素 (CYP21A1, HSD3B1) の発現と P4 の合成を増加させると共に、黄体化の初期マーカーである PTX3、VNN2、RGS2 の発現を増加させた。以上のことから顆粒層細胞ではコルチゾールが黄体化を促進すること、およびコルチゾールと P4 の間に互いを調節するフィードバック機構が存在することが明らかになった。

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 2件）

1. 著者名 Tetsuka M, Tanakadate M	4. 巻 8
2. 論文標題 Activation of HSD11B1 in the bovine cumulus-oocyte complex during IVM and IVF.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocr Connection	6. 最初と最後の頁 1029-1039
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/EC-19-0188.	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 Mukangwa M, Takizawa K, Aoki Y, Hamano S, Tetsuka M.	4. 巻 66
2. 論文標題 Expression of genes encoding mineralocorticoid biosynthetic enzymes and the mineralocorticoid receptor, and levels of mineralocorticoids in the bovine follicle and corpus luteum.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 75-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2019-127.	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mukangwa M, Tetsuka M
2. 発表標題 Gene expression of mineralocorticoid producing enzymes and receptor, and levels of aldosterone in the bovine follicle and CL
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会 OR1-22
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
---------------------------	-----------------------	----

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