

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17491

研究課題名（和文）卵巣老化の進行における原因分子候補アルドケト還元酵素の役割解明

研究課題名（英文）Role of the candidate aldoketoreductase in the progression of ovarian aging

研究代表者

諫山 慧士朗（Isayama, Keishiro）

山口大学・大学研究推進機構・助教

研究者番号：30780887

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：これまでマウス卵巣の網羅的な遺伝子発現解析から、老化卵巣でhCG応答とともに間質・莖膜細胞層のアルドケト還元酵素1B7(AKR1B7)の顕著な低下を見出ししていた。AKR1B7を欠損させた若齢マウス卵巣はどのような異常が生じるか解析したところ、RNA-seq解析から脂質合成に異常があることが推測され、実際にリン脂質量やAKT活性の低下を認めた。またリン脂質をリガンドとするSF1の下流遺伝子で発現低下が認められ、下流のプロゲステロン代謝酵素CYP17A1の低下とプロゲステロン 血中濃度増加、さらに性周期の延長を認めた。以上、AKR1B7低下が引き起こす脂質異常が卵巣老化進行に関与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣老化は妊娠能力低下を招くと同時に、卵巣ホルモン分泌異常により動脈硬化、骨粗しょう症、認知症といった加齢性疾患のリスク要因となる。その分子メカニズムを理解することは不妊治療にとって、さらに社会にとっても少子化緩和や健康寿命の増進を実現する上で重要である。本課題では老化卵巣で減少するアルドケト還元酵素1Bが、若い卵巣の脂質およびホルモン合成・代謝に関与していることが分かった。加齢に伴う月経周期や卵胞発育の異常を引き起こす因子の一つであることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：Through comprehensive gene expression analysis of mouse ovaries, we have found that aged ovaries show a significant decrease in aldoketoreductase 1B7 (AKR1B7) in the interstitial/theca cell layer as well as hCG response. Ovaries in AKR1B7-deficient young mice were analyzed to understand what kind of abnormalities occurred during hCG response. Aberrations in lipid synthesis were presumed from RNA-seq analysis, and a decrease in phospholipid content and AKT activity was actually observed. In addition, we observed decreased expression of the downstream gene of SF1, which has a phospholipid ligand, decreased downstream progesterone-metabolizing enzyme CYP17A1, increased blood levels of progesterone, and prolonged estrous cycle. As described above, an aberrations in lipid synthesis due to decreased AKR1B7 was involved in the progression of ovarian aging.

研究分野：生殖生物学

キーワード：卵巣老化 アルドケト還元酵素 ゲノム編集 性周期

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの場合、卵巣老化により30代後半から加速的に卵胞が失われ、50歳付近ではほぼ卵胞が欠乏し、閉経を迎える。閉経に至るまでの卵巣寿命を延長することができれば、今日の晩婚化で進む少子化の緩和が期待できる。さらに閉経がリスク要因となる疾患も先送りにし、閉経後の健康寿命の増進につながることを期待できる。そのため卵巣老化の分子メカニズム理解することが重要である。

我々がこれまでに実施したマウス卵巣の網羅的な遺伝子発現解析から、老化卵巣でのhCG応答低下とともに間質・莖膜細胞層のアルドケト還元酵素 1B7(AKR1B7)が顕著に発現低下することを見出していた。また過去の報告で *Akr1b7* ノックアウトマウスの生殖能力に異常が認められないと結論づけられていたが(*Reproduction*, 2009)、*Akr1b7* は性腺刺激ホルモン LH/hCG に応答する遺伝子にも関わらず、その応答時期の解析がほとんどなく、未だ卵巣機能が不明であることから再評価する必要があった。また我々はマウス系統が限定されないゲノム編集法である i-GONAD 法を採用し、C57BL6 系統より多産で生殖能力の変化が捉えやすいと考えられる ICR 系統を用いて *Akr1b7* 遺伝子を欠損させ、機能解明に取り組んだ。

2. 研究の目的

AKR1B7 を欠損させた若齢マウス卵巣は遺伝子・タンパクレベルや生殖機能にどのような影響が生じるか解析し、卵巣老化進行における AKR1B7 の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

前課題で ICR 系統 *Akr1b7* 欠損マウスは受精卵に対して卵管でゲノム編集する方法 i-GONAD 法で作出した。その表現型を産仔数、性周期、排卵、排卵卵子について解析した。また老化卵巣で特に変化が認められていた PMSG/hCG 投与後 24h で卵巣や血清を採取し、卵巣切片の組織学的観察、RNA-seq 解析、ウエスタンブロット解析、免疫組織化学、ELISA や HPLC による血中ホルモン濃度測定を実施した。

4. 研究成果

生殖機能に関する表現型解析の結果、過去の報告と同様に産仔数と排卵数に異常は認められなかったが、過排卵後の卵子成熟率において M2 期に達していない未成熟卵の増加や、また性周期の発情休止期が延びることにより WT に比べてサイクル日数が 1.5 倍程度延長することが認められた。

卵巣切片の組織学的観察の結果、8 週齢時点では WT と欠損マウスの間で、卵胞の発育段階である原始、一次、二次、胞状、また黄体の数に変化は認められなかった。一方で、16 週齢時点になると原始卵胞が欠損マウスで有意に減少した。これまでの研究で原始卵胞数は老化で減少することを認めているが、欠損マウスではその減少が加速することを示唆していた。

RNA-seq の結果、欠損マウスで減少する遺伝子群のネットワーク解析から脂質合成を中心に異常があることが推測され、またタンパクレベルでリン脂質量や AKT 活性の低下を認めた。近年、AKR1B10 や AKR1B8 のリン脂質合成における機能が示唆されており、AKR1B7 においても同様の機能があると考えられた。また補足的に hCG 投与後 24h の卵巣における AKR1B ファミリーの遺伝子発現レベルは *Akr1b7* が最も高く、*Akr1b3*、8、10 と比較して 10-100 倍以上高かった。よって hCG 投与後のリン脂質合成に対する AKR1B7 欠損の影響は、他の AKR1B ファミリーによる補償が不十分であることを示唆していた。

さらに RNA-seq の結果で、リン脂質等をリガンドとする核内受容体 NR5A1 の標的遺伝子群の発現低下を認めていた。詳細に解析すると、特に NR5A1 標的遺伝子であるプロゲステロン代謝酵素 CYP17A1 が発現低下し、その代謝産物である 17-ヒドロキシプロゲステロンも低下、そしてプロゲステロン血中濃度増加が認められた。この結果を裏づけるように、RNA-seq のネットワーク解析では AKR1B7 欠損で増加する遺伝子群の上流制御因子 TOP2 にプロゲステロンが挙がった。その他の卵巣ステロイドホルモンであるエストロゲンやアンドロゲンの測定も行ったが、変化は認められなかった。欠損マウスの性周期が延長する表現型は、このプロゲステロンの代謝低下によるプロゲステロン蓄積が招いた結果であると考えられた。

免疫組織化学の結果から、卵巢局在は AKR1B、NR5A1、CYP17A1 が同じ莢膜・間質細胞に、また活性化 AKT は顆粒層細胞や卵子に局在することを認めた。*Akr1b7* 欠損により NR5A1 に変化を認めなかったが、他は卵巢に占める陽性領域の割合が有意に低下していた。これらのことは莢膜・間質細胞層における AKR1B7 低下によってリン脂質の供給が低下し、NR5A1 の転写活性や AKT 活性が低下したことを示唆した。

以上まとめると、莢膜・間質細胞層の AKR1B7 発現低下が引き起こす脂質合成の異常が NR5A1 転写活性や AKT 活性の低下、またプロゲステロン代謝低下を招き、結果的に原始卵胞の消費加速、卵子の成熟率低下、また性周期を延長することで卵巢老化進行に関与すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	水上 洋一 (Mizukami Yoichi)	山口大学・大学研究推進機構総合科学実験センター・教授 (15401)	
研究協力者	渡邊 健司 (Watanabe Kenji)	山口大学・大学研究推進機構総合科学実験センター・助教 (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