

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24688028

研究課題名(和文) 早期生殖能力減退マウスの分子内分泌学的解析と家畜育種マーカーへの応用

研究課題名(英文) The molecular endocrinology analysis of early fertility decline mouse to develop the novel breeding marker of livestock animals

研究代表者

島田 昌之 (Shimada, Masayuki)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：20314742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,700,000円

研究成果の概要(和文)：顆粒膜細胞/ライディッヒ細胞特異的Nrg1欠損マウスの解析を行った。雌では、NRG1は卵丘細胞におけるCa²⁺流入を抑制することで、遺伝子発現と細胞間結合様式を制御していることを見出した。この両者により、卵の成熟時間が排卵されるタイミングに同調され、排卵直後が最適受精タイミングとなっていることが初めて明らかとなった。雄においては、乳児期におけるNRG1がライディッヒ細胞の増殖に必須であり、これが成獣におけるアンドロゲン産生能を決定し、十分なアンドロゲン産生が精子形成のみでなく生殖行動をも担保することが明らかとなった。以上の結果から、NRG1が雌雄成獣の生殖能力決定因子であることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed granulosa cell/leydig cell specific Nrg1 mutant mice to understand the roles of NRG1 in reproductive organs. In female, The expressed NRG1 by granulosa cells acts on cumulus cells to down-regulate Ca²⁺ induction. The regulation is important for not only the induction of gene expression but also the control of cell-cell communication. Both regulatory systems by NRG1 are involved in the timing of oocyte maturation and induction of ovulation. The synchronization induces to adjust the best timing of fertilization to the timing just after ovulation. In male mice, NRG1 is expressed in leydig cells of infant testis. The expression is essential for the proliferation of the cells, which predicts the ability to produce androgen in adult testis. The hyper production of androgen is required for spermatogenesis and sexual behavior. Therefore, we concluded that NRG1 is important factors in both female and male to make a full activity of reproductive organs.

研究分野：動物生産科学

キーワード：生殖 受精 卵巣 精巣

1. 研究開始当初の背景

肉質、成長効率などの経済形質に関わる育種の結果、年間2万Kgを超える乳量のスーパーカウ、高品質の黒毛和牛、5ヶ月で出荷可能な肉豚などを生み出すスーパー種雄(雌)が存在する。これらは、日本の畜産・酪農において、高効率化と品質の差別化をはかり、輸入品との競争に生き残るための切り札となることから、その価値は非常に高い。しかし、豚においては、15匹あまりの産子を産む母豚が平均4産で廃豚となり、種豚の利用期間も3年程度である。それ以上の利用は、約半数の割合で生産性の低下を引き起こす。したがって、両性の早期生殖能力減退の仕組みを解明し、減退が生じ難い種雄(雌)の育種選抜を行う必要がある。

2. 研究の目的

Nrg1 遺伝子欠損マウス(whole body KO mice)は3系統作製されているが、出生直後までに死亡する。したがって、性成熟後の生殖機能の解析には、Cre/LoxPによるconditional KO (*Nrg1cKO*)マウスが必要となる。申請者とRichards博士は、胞状卵胞特異的にCreを発現する*Cyp19a1Cre*マウスを作出した¹³。そこで、Dr.Birchmeierから導入した*Nrg1^{flox/flox}*と交配し、*Nrg1cKO*の作出を昨年度から開始した。その解析は現在進行形であるが、12ヶ月齢で完全不妊を呈する表現系であることが最近になって判明した。さらに、*Nrg1cKO*マウスも、10ヶ月齢から産子が減少した。これは、*Nrg1cKO*では精巢のライディヒ細胞でCreが発現し、そこで*Nrg1*が欠失するためであった。このような現在までの予備的解析結果から、*Nrg1*遺伝子が、性成熟雌の卵巣機能の維持と雄の精子形成能の維持に関わっていることが明らかとなってきた。

そこで本研究は、以下の*Nrg1*および生殖機能の解析を目的とした。

Nrg1 遺伝子の生殖機能を維持する機構解明

種雄豚と母豚の分子育種マーカー開発への応用

上記の目的を完結するために、*Nrg1^{flox/flox}; Cyp19a1Cre*マウス(*Nrg1cKO*)マウスの精巢と卵巣機能の詳細な解析を行い、NRG1の標的細胞、その標的シグナル伝達系と標的遺伝子、それらが生殖機能に果たす役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) 網羅的発現遺伝子解析: 6, 12ヶ月齢のWT(野生型)および*Nrg1cKO*マウスのマイクロアレイ解析から、WTから*Nrg1cKO*の発現遺伝子を消去し、NRG1の標的遺伝子を絞り込む。
(2) バイオインフォマティクスによる二次スクリーニング: プロモーター領域の転写因

子結合サイトを予測する。この中から、NRG1が活性化する転写因子(C/EBP, AP1 family等)の結合サイトを持つ遺伝子のみを抽出する。

(3) 発現および局在解析による三次スクリーニング: 卵巣と精巢のmRNAとタンパク質の局在・発現解析を行う。

(4) siRNAによる標的遺伝子の機能解析

顆粒膜細胞および黄体細胞の初代培養系における機能解析: 申請者等が既に確立しているsiRNAのtransfection法により5, 12, 15日、顆粒膜細胞と黄体細胞の初代培養系において標的遺伝子をノックダウンし、その遺伝子発現、細胞増殖・生存、代謝機能への影響を検討する。

精巢の3D組織培養による機能解析: siRNAを遺伝子導入装置を用いて、精巢組織に導入し、小川等の開発した方法で体外培養を行う。培養後の減数分裂進行、精原細胞、精母細胞などの、生存の確認(TUNEL assay)、細胞増殖活性試験を行う。

4. 研究成果

(1) 雌マウスにおける二つの加齢化メカニズムの解析

顆粒膜細胞特異的*Nrg1*欠損マウスの解析を行った結果、一腹産子数の減少が認められた。しかし、過剰排卵モデルにおいて排卵数に野生型マウスとの間に有意差はなかったことから、卵の成熟能や受精能に着眼し研究を遂行した。

過剰排卵系において、排卵を促すhCG投与後の各時間に卵を回収し、その減数分裂進行を観察した結果、*Nrg1*欠損マウスでは、減数分裂再開が早期に誘起され、第二減数分裂中期に野生型マウスのそれに比較して2時間早く到達していた。野生型マウスでは、hCG投与20時間後においても、第二減数分裂中期で停止しているが、*Nrg1*欠損マウスでは18時間以降に自発的に減数分裂が第二減数分裂中期から再開し、一部は前核を形成していた。すなわち、単為発生することが明らかとなった。

このような第二減数分裂中期での停止能が低い卵が、*in vivo*で受精した時、雄性前核と雌性前核からなるべき2前核受精卵の割合が著しく低く、1前核や3前核受精卵が多発していた。このような異常な数の前核は、hCG投与16時間以降に*Nrg1*欠損マウスから回収した卵を用いた体外受精でも頻発したこと、*in vivo*受精においても雄との交配時間をhCG投与から遅らせたとき同様に求められたことから、*Nrg1*欠損マウスの卵は、第二減数分裂中期に到達した直後には正常な受精能を有するが、時間の経過と共に急速に受精能を消失するという、卵の加齢化が促進される表現系を呈することが明確化された。

*Nrg1*は、卵ではなく顆粒膜細胞で排卵刺激直後に発現し、卵丘細胞に作用してErbB2/3

を活性化することから、卵の減数分裂速度を調整し、かつ受精能力を十分に担保する NRG1 依存的な卵丘細胞機能の解明を試みた。

卵の減数分裂再開が早期化していた時間であり、かつ NRG1 が発現する hCG 投与 2 時間後において、卵丘細胞を回収し、網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、hCG 投与前に比較して 1,000 以上の遺伝子発現が野生型および *Nrg1* 欠損マウスで検出され、その中の 200 以上が *Nrg1* 欠損マウスでさらに 2 倍以上発現が増強されていた。一方、*Nrg1* 欠損マウスで発現が減退する遺伝子は 10 程度であった。そこで、なぜ 200 以上の遺伝子が過剰発現するのかについて探求するため、それら遺伝子のプロモーター領域を探索した結果、88%のそれらにおいて Sp1 結合サイトあるいは CRE サイトが認められた。これまでの研究成果から、CRE サイトや SP1 結合サイトをプロモーター領域に有する遺伝子は、顆粒膜細胞や卵丘細胞において PKA 系により発現が誘起され PKC 系によりそれが増強されることを示してきたことから、*Nrg1* 欠損マウスの卵丘細胞における PKA と PKC 活性測定を行った。その結果、PKA 活性に野生型マウスとの間に結い差は認められなかったが、PKC 活性が hCG 投与後に異常上昇することが示された。

卵丘細胞における PKC 系の異常な活性上昇と卵の減数分裂再開の促進との関係について、卵の減数分裂再開が卵丘細胞からの減数分裂再開抑制因子の流入遮断により生じること、これが卵丘細胞と卵子間のギャップジャンクション閉鎖に起因すること、ギャップジャンクション閉鎖は connexin-43 のリン酸化により誘起されることに着目し、PKC による connexin-43 のリン酸化を検証した。その結果、予想通り、卵丘細胞における PKC の connexin-43 リン酸化が *Nrg1* 欠損マウスで増強されていた。

さらに、この PKC 系の異常活性化を誘起するメカニズムを追求し、EGF 様成長因子が EGFR を介して Ca²⁺流入を促進し、それが PKC を活性化させること、NRG1 が Ca²⁺流入を抑制することも明らかとした。

最後に、卵の体外成熟培養系において、NRG1 添加が、*Nrg1* 欠損マウス由来の卵の減数分裂早期化と受精能の早期減退を抑制することを明らかとした。

この NRG1 の卵加齢化抑制作用について、ブタにおいても検討した結果、排卵過程の顆粒膜細胞に NRG1 が発現し、体外成熟培養系への添加により卵の成熟能が亢進したことから、NRG1 が動物種を問わず、卵の加齢化抑制因子であることが明確化された。

(2) NRG1 による雄生殖能力担保

雌において LH 依存的に顆粒膜細胞で発現する NRG1 は、雄においても LH の標的細胞であるライディッヒ細胞で発現することが明

らかとなった。さらに、この発現機構を詳細に検討した結果、NRG1 は胎児ライディッヒ細胞ではなく、成獣ライディッヒ細胞の newly formed ステージ以降に発現し、それは GnRH アンタゴニストにより消失し、hCG 投与により回復することが明らかとなった。すなわち、NRG1 は LH により newly formed 以降の成獣ライディッヒ細胞で発現することが明確化された。

この NRG1 の役割を解明するため、成獣ライディッヒ細胞特異的に *Nrg1* が欠損する *Nrg1^{fllox/fllox};Cyp19a1Cre* マウスをモデルにその詳細を解明した。その結果、ライディッヒ細胞は mature に状態にまで分化すると増殖能を消失し、newly formed ステージまでに成獣精巣におけるライディッヒ細胞数が決定されるが、*Nrg1* 欠損によってライディッヒ細胞数の野生型マウスのそれに比較して有意な減少が認められた。さらに、newly formed ライディッヒ細胞において PCNA 陽性細胞数が少ないこと、いずれのステージにおいても TUNEL 陽性細胞数が増加することから、NRG1 がライディッヒ細胞の増殖と生存の両者に関与することが示された。

Nrg1 欠損によりライディッヒ細胞数が少ない精巣では、テストステロン産生が減退し、精子形成の尾部伸長期に異常が生じる結果、精巣上に蓄えられる正常精子数が著しく減少していた。この精子は、運動速度も低下し、体外受精能も低く、交尾をしても産子数の減退を引き起こすことが示された。さらに、交尾行動そのものも、野生型マウスと比較して異常を呈していた。

これらの異常は、いずれもテストステロンの投与により回復したことから、NRG1 はライディッヒ細胞数の担保を介して、テストステロン合成能力を決定し、それにより成獣における正常な生殖能力を引き起こすことが明確化された。

(3) NRG1 により制御される Calpain の役割

雌雄ともに正常な配偶子形成に必須である NRG1 の下流因子を探索した結果、Ca²⁺-PKC 系が同定され、その役割を解明したが、Ca²⁺にはそのほかにも多様な役割があることが知られている。我々は、Ca²⁺による Calpain 活性上昇が卵丘細胞の膨潤に必須であることを報告している。そこで、NRG1 と Calpain 活性との関係について検討した。その結果、*Nrg1* 欠損マウスでは、hCG 投与後の顆粒膜細胞における Calpain 活性が野生型に比較して有意に高いことが示された。さらに、Calpain 抑制剤投与が、卵の早期の減数分裂再開を遅延させることを示したことから、Calpain 遺伝子欠損マウスを作成し、その役割を解析した。

顆粒膜細胞では Calpain1 と Calpain2 が発現することから、*Capn1^{-/-};Capn2^{fllox/fllox};Cyp19a1Cre* マウスを作成し、その表現系解析を行った。その結果、

予想通り，卵の減数分裂再開遅延と第二減数分裂中期への到達時間の延長が認められた．これは，減数分裂速度の速い順から，Nrg1 欠損，野生型，Calpain 欠損マウスとなっており，当初の予想が的中していた．この減数分裂の遅延は，排卵時には卵の減数分裂ステージが第一減数分裂中期であることとなり，それにより正常受精ができず，その受精卵が発生しないという低受精能となった．したがって，hCG 投与 20 時間後に回収した卵を体外受精に供することによって，正常受精を誘起させることが示された．

さらに，Calpain 欠損マウスでは，ギャップジャンクション構成因子である connexin-43 の分解が生じなくなっていることを突き止めたことから，EGFR による Ca²⁺-PKC によるリン酸化だけでなく，Ca²⁺-Calpain によるその分解も卵の減数分裂速度を調整することが明確化され，この最適活性値をもたらす NRG1 の重要性が再度示される結果となった．

5. 主な発表等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

- Ikeda C, Fujita Y, Shitanaka M, Ishii R, Horikawa M, Negishi H and Shimada M. Timing of First Cleavage of the Human Embryo Predicts a Successful Pregnancy by Assisted Reproductive Technologies: A Retrospective Study *Journal of Mammalian Ova Research* 32(1):49-56. 2015 doi: <http://dx.doi.org/10.1274/jmor.32.49> (査読有り)
- Okabe A, Hiramatsu R, Umehara T, Fujita Y, Shimada M. The expression and roles of semaphorin type 3C in granulosa cells during the luteinization process. *J. Mamm. Ova Res.*, 2014, 31(1):31-39. doi: <http://dx.doi.org/10.1274/jmor.31.31> (査読有り)
- Yamashita Y, Okamoto M, Ikeda M, Okamoto A, Sakai M, Gunji Y, Nishimura R, Hishinuma M, Shimada M. Protein kinase C (PKC) increases TACE/ADAM17 enzyme activity in porcine ovarian somatic cells, which is essential for granulosa cell luteinization and oocyte maturation. *Endocrinology*. 2014, 155(3):1080-90. doi:10.1210/en.2013-1655. (査読有り)
- Kawashima I, Umehara T, Noma N, Kawai T, Shitanaka M, Richards JS, Shimada M. Targeted disruption of Nrg1 in granulosa cells alters the temporal progression of oocyte maturation. *Mol Endocrinol*. 2014 28(5):706-21. doi:10.1210/me.2013-1316. (査読有り)
- Nakagawa S, Shimada M, Yanaka K, Mito M, Arai T, Takahashi E, Fujita Y, Fujimori T, Standaert L, Marine JC, Hirose T. The lncRNA Neat1 is required for corpus luteum formation and the establishment of pregnancy in a subpopulation of mice. *Development*. 2014 141(23):4618-27. doi: 10.1242/dev.110544. (査読有り)
- Shimada M, Mihara T, Kawashima I, Okazaki T. Anti-Bacterial Factors Secreted From Cumulus Cells of Ovulated COCs Enhance Sperm Capacitation During In Vitro Fertilization. *Am J Reprod Immunol*. 2013, 69(2), 168-179 doi: 10.1111/aji.12024 (査読有り)
- Yazawa T, Kawabe S, Kanno M, Mizutani T, Imamichi Y, Ju Y, Matsumura T, Yamazaki Y, Usami Y, Kuribayashi M, Shimada M, Kitano T, Umezawa A, Miyamoto K. Androgen/androgen receptor pathway regulates expression of the genes for cyclooxygenase-2 and amphiregulin in periovulatory granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2013 Apr 30;369(1-2):42-51. doi: 10.1016/j.mce.2013.02.004. (査読有り)
- Okazaki T, Shimada M. New strategies of boar sperm cryopreservation: development of novel freezing and thawing methods with a focus on the roles of seminal plasma. *Anim Sci J*. 2012 Sep;83(9):623-9. doi: 10.1111/j.1740-0929.2012.01034.x. (査読有り)
- Kawashima I, Liu Z, Mullany LK, Mihara T, Richards JS, Shimada M. EGF-like factors induce expansion of the cumulus cell-oocyte complexes by activating calpain-mediated cell movement. *Endocrinology*. 2012 Aug;153(8):3949-59. doi: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2012-1059> (査読有り)
- Richards JS, Liu Z, Kawai T, Tabata K, Watanabe H, Suresh D, Kuo FT, Pisarska MD, Shimada M. Adiponectin and its receptors modulate granulosa cell and cumulus cell functions, fertility, and early embryo development in the mouse and human. *Fertil Steril*. 2012 Aug;98(2):471-9. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.04.050 (査読有り)
- Okazaki T, Akiyoshi T, Kan M, Mori M,

- Teshima H, Shimada M 2012 Artificial insemination with seminal plasma improves the reproductive performance of frozen-thawed boar epididymal spermatozoa. *J Androl.* 2012 Sep;33(5):990-8. doi: 10.2164/jandrol.111.015115 (査読有り)
12. Kawai T, Mihara T, Kawashima I, Fujita Y, Ikeda C, Negishi H, Richards JS, Shimada M. 2012 Endogenous acetaldehyde toxicity during antral follicular development in the mouse ovary. *Reprod Toxicol.* 2012 Jun;33(3):322-30. doi: doi:10.1016/j.reprotox.2012.01.001(査読有り)

[学会発表](計 20 件)

1. 島田昌之 加齢に伴う卵巣機能低下が及ぼす卵成熟への影響 日本受精着床学会, 東京都, 2015 年 11 月 26 日 教育講演
2. M Shimada, The innate immune functions of male and female germ cells. 第 108 回 日本繁殖生物学会大会, 宮崎市, 2015 年 9 月 20 日(ワークショップ Novel concepts of immune system for regulating early pregnancy: Attack or tolerance?)
3. Shimada M. The dramatic changes cumulus cell functions during ovulation process impact meiotic progression and fertilization ability of oocyte. 14th International symposium of Immunology of Reproduction, Varna, Bulgaria, 2015 年 6 月 26 日 特別招請講演
4. 島田昌之 顆粒膜細胞が分泌する局所因子による卵丘細胞の機能的変化と卵成熟制御 第 60 回 日本生殖医学会学術講演会, 横浜市, 2015 年 4 月 26 日(シンポジウム 招請講演)
5. 島田昌之, ブタ精子の運動性制御機構の解析とそれを基にした精子凍結/液状保存法の開発, 農研機構動物衛生研究所「ブタの繁殖衛生セミナー」, 特別講演, つくば市, 2014 年 11 月 21 日
6. 川合智子, 島田昌之 日本受精着床学会 世界体外受精記念賞「卵胞発育期における LH 受容体発現のレチノイン酸を介したエピジェネティック制御機構」東京都, 2014 年 7 月 31 日
7. Shimada M. Cumulus cells are essential mediators of LH induced ovulation stimuli from granulosa cells to the oocyte. 3ed World Congress of Reproductive Biology, Edinburgh, UK, 2014 年 9 月 4 日 招請講演
8. 島田昌之, 卵胞発育におけるエピジェネティック制御, 生殖バイオロジー東京シンポジウム, 東京都, 2014 年 7 月 27 日 招請講演
9. Kawai T, Shimada M Retinoic acid regulates methylation of the promoter and expression of Lhcgr granulosa cells during follicular development, Annual meeting of society for the study of reproduction, USA, 2014 年 7 月 20 日
10. Umehara T, Shimada M. The abnormal estrus cycle in aged granulosa-cell-specific Nrg1 KO mice, USA, 2014 年 7 月 20 日
11. 島田昌之, 遺伝子改変(欠損)マウスの解析から体外成熟培養, 体外受精系を考える, 日本卵子学会学術講演会, 教育講演, 神戸市, 2014 年 5 月 18 日
12. 島田昌之, 加齢に伴う卵巣機能低下・作用の解析と対処法, 日本受精着床学会生涯研修コース, 教育講演, 東京都, 2014 年 3 月 2 日
13. 島田昌之, 精子の運動性制御機構の解析とそれを基にした精子凍結/液状保存法の開発, 北海道生殖医学会学術講演会, 特別講演, 札幌市, 2014 年 2 月 15 日
14. 島田昌之, マウスモデルにおける雌個体の加齢による卵巣機能の低下 - 解毒作用の低下の可能性 -, 日本 IVF 学会, シンポジウム, 横浜市, 2013 年 9 月 8 日 招請講演
15. 島田昌之, 排卵期の卵丘細胞で活性化する Calpain 2 - その活性化機構と排卵, 卵成熟への役割 -, 日本病態プロテアーゼ学会, ワークショップ, 大阪府, 2013 年 8 月 16 日, 招請講演
16. Shimada M. Targeted disruption of neuregulin 1 in granulosa cells reveals an important role in oocyte maturation in vivo. Annual meeting of society for the study of reproduction, Montreal, Canada, 2013 年 7 月 25 日
17. 島田昌之, 二つの意味の卵の老化と卵巣の老化, 日本抗加齢医学会総会, シンポジウム, 横浜市, 2013 年 6 月 28 日, 招請講演
18. M Shimada The immune cell-like functions of cumulus cells during ovulation and fertilization process, International Society for Reproductive Immunology Meeting, Boston, 2013 年 6 月 1 日, 招請講演
19. 島田昌之, 新たな顆粒膜細胞の分泌因子 NRG1 の卵成熟に果たす役割, 日本内分泌学会, シンポジウム, 仙台市, 2013 年 4 月 27 日, 招請講演
20. M Shimada The role of cumulus cells in meiotic resumption and oocyte maturation International Ovarian Conference, Taipei, Taiwan, 2013 年 3 月 9 日 招請講演

[図書](計 2 件)

1. Richards JS, Liu Z, Shimada M. Ovulation, Knobil and Neill's Physiology of Reproduction 4th Edition, Chapter 22, 997-1022, 2014, 出版社 Academic Press
2. Shimada M. Regulation of oocyte meiotic resumption by somatic cells. Oocyte Physiology and Development in Domestic Animals, 35-54, 2013, Editor, R.L. Krisher, 出版社 Wiley-Blackwell

6 . 研究組織

(1)研究代表者

島田 昌之 (SHIMADA MASAYUKI)
広島大学・大学院生物圏科学研究科・
准教授
研究者番号： 2 0 3 1 4 7 4 2