

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460315

研究課題名(和文) エストロゲンによる排卵制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of ovulation by estrogen

研究代表者

戸田 勝巳 (Toda, Katsumi)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・准教授

研究者番号：40197893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲンは排卵誘発に必須のステロイドである。エストロゲン合成酵素遺伝子欠損(ArKO)マウスを用いて排卵制御機構を解析した。ArKOマウスの卵巣はFSHに対する感受性が野生型マウスのそれと比べると有意に低いことがわかった。ArKOマウスではFSH刺激前に卵巣内のcAMP量が非常に高いことが、FSHに対する感受性の低下の原因の一つと考えられた。ArKOマウスの排卵誘導効率は約60%であり、野生型マウスの効率と比べると有意に低い。インスリンを投与するとその効率を80%まで改善できることが分った。ArKOマウスの卵巣はインスリンに対する感受性が低下している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Estrogen is an essential steroid hormone for ovulatory induction. Regulatory mechanisms underlying ovulatory induction were analyzed using estrogen deficient (ArKO) mice. Responsiveness of ArKO ovaries to follicle stimulating hormone was significantly lower than that of wild-type (WT) ovaries. This was, in part, attributable to high amounts of cAMP content in ArKO ovaries prior to stimulation of the hormone, compared to that in the WT ovaries. The present study also demonstrated that co-administration of insulin with LH to 17beta-estradiol/FSH-primed ArKO mice significantly improve ovulatory rate than the rate observed in the mice stimulated with LH alone. These results indicate that estrogen keeps cAMP content at a low level before FSH stimulation and the sensitivity to insulin to be high in order to respond properly to ovulatory stimulations.

研究分野：生化学

キーワード：エストロゲン 遺伝子改変マウス アロマトラーゼ 排卵

1. 研究開始当初の背景

卵巣はエストロゲンを合成・分泌する臓器であると共に、自身の機能がその制御下にあるがために、卵巣におけるエストロゲン作用は不明な点が多い。その点で、エストロゲン合成酵素遺伝子欠損マウス (ArKO マウス) は卵巣のエストロゲン作用を解析するには最も優れた、そして唯一の *in vivo* 実験系といえる。エストロゲンは排卵の誘発に必須のステロイドホルモンであることはよく知られている。そして、ArKO マウスは自然な排卵はもとより、卵巣刺激ホルモン (FSH) と黄体化ホルモン (LH) 投与による強制的な誘導によっても全く排卵を起こさない。ところが、ArKO マウスの卵巣を取り出し、そこに野生型マウスの卵巣を移植すると、ArKO マウスは規則的な性周期を示すようになるとともに、妊娠・出産が可能となる。これは ArKO マウスの不妊の原因は、卵巣の機能障害であることを示している。エストロゲン欠乏が原因で起きる排卵障害・不妊の分子メカニズムを明らかにするためには、ArKO マウスに排卵を誘発する実験系の確立が必要と考えた。排卵の誘導には FSH、LH やエストロゲンの他に、プロゲステロン、テストステロン及びプロスタグランジン E₂ の関与が知られている。申請者はこれらの化合物を種々に組み合わせ、種々の濃度で様々な発育時期の ArKO マウスに投与し、排卵を誘導させる必要条件を探索してきた。その結果、未熟 ArKO マウスに再現性良く排卵を誘導できる投与条件を見出すことができた。

2. 研究の目的

ArKO マウスの排卵誘導系を用いて、排卵におけるエストロゲンの生理的役割を解析することが本研究の主題である。多嚢胞性卵巣症候群に代表される排卵障害は不妊の主要な原因であり、その原因の究明は重要な研究課題である。

3. 研究の方法

未熟 ArKO マウス (4 週齢) に下の条件でホルモン投与すると排卵を誘導できる。

第 1 日 17 -estradiol (E₂) (18 mg/kg 体重)

第 4 日 E₂+ PMSG (25IU/mouse) - FSH 代替品

第 5 日 E₂

第 6 日 hCG (25 IU/mouse) - LH 代替品

しかしながら、誘導率は 60% 前後であり、排卵数も野生型マウス (WT マウス) のそれと比べると極端に少ない。排卵は PMSG 刺激を受けた卵巣に hCG が作用すると誘導されるので、2 つの段階に分けて解析した。

(1) PMSG 刺激によるシグナル伝達に及ぼすエストロゲンの解析

4 週齢の野生型マウス

無処理又は 5 ユニット (U) の PMSG を腹腔内注射 (ip) し、20 分後、1 時間後、または 4 時間後に卵巣を摘出した (各 5 匹)

4 週齢の ArKO マウスに以下の処理をほどこした (各 5 匹)。

	第 1 日	第 4 日	卵巣摘出時
Group 1	none	none	
Group 2	none	5U PMSG	20 分後
Group 3	none	5U PMSG	60 分後
Group 4	none	5U PMSG	4 時間後
Group 5	none	25U PMSG	20 分後
Group 6	none	25U PMSG	60 分後
Group 7	none	25U PMSG	4 時間後
Group 8	E ₂	E ₂	20 分後
Group 9	E ₂	E ₂	60 分後
Group 10	E ₂	E ₂	4 時間後
Group 11	E ₂	E ₂ & 5U PMSG	20 分後
Group 12	E ₂	E ₂ & 5U PMSG	60 分後
Group 13	E ₂	E ₂ & 5U PMSG	4 時間後
Group 14	E ₂	E ₂ & 25U PMSG	20 分後
Group 15	E ₂	E ₂ & 25U PMSG	60 分後
Group 16	E ₂	E ₂ & 25U PMSG	4 時間後

リン酸化タンパク質の解析

刺激投与 20 分、60 分後の卵巣は 1 匹分ずつ 50 μ l の 50mM Tris/0.1mM EDTA/0.1mM EGTA/0.1% SDS (pH7.6) 中で超音波によって破壊し、卵巣懸濁液を作成した。

一定量の卵巣懸濁液 (12 μ g) を SDS/PAGE-Electro-Blotting 後、以下の抗体でリン酸化を指標にシグナル伝達分子の活性化の経時的変化を解析した。AKT, CREB, p38 \square MAPK, ERK1/2 抗体とそのリン酸化型特異抗体。

mRNA 発現の解析

刺激投与前及び 4 時間後の各マウスの卵巣から総 RNA を調製した。一部の RNA はマイクロアレーを使って、網羅的に遺伝子発現の差を解析した。また、PMSG によって転写が制御される遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法で定量した。

(2) hCG 刺激によるシグナル伝達に及ぼすエストロゲンの解析

シグナル伝達関連分子のリン酸化の解析

WT マウス: PMSG (5U) を投与 4 8 時間後、hCG (5U) を投与し、その 60 分後に卵巣を摘出した。

ArKO マウス : Group 14/16 の処方 で処理した 4 8 時間後のマウスに 25U の hCG を ip し、6 0 分後に卵巣を摘出した。さらに、インスリンの作用を解析するために、hCG 投与時にインスリンを同時に投与した。これらの卵巣から卵巣懸濁液を調製し、シグナル伝達関連分子のリン酸化を SDS/PAGE-Electro-Blotting 法で解析した。

排卵関連遺伝子群の解析

PMSG/hCG (± インスリン) 投与し、4 時間後に卵巣を摘出し解析した。各マウスの卵巣から総 RNA を調製し。排卵に関連する遺伝子群の初連量をリアルタイム PCR 法で定量した。

インスリンの排卵誘導への効果の解析

排卵の有無は hCG (± インスリン) 投与して、15 時間後に卵管膨大部にある卵の数を実体顕微鏡下で数えた。

(3) 高脂肪食下で飼育した雌マウスの排卵機能の解析

妊娠した野生型マウスを高脂肪食で飼育した。出産後も同餌で飼育し続け、雌仔マウスが 4 週齢に達した時点で、卵巣機能を解析した。排卵誘導に対する反応性と、排卵関連遺伝子群の発現量を定量し、通常食で飼育したマウスの結果と比較し、高脂肪食の影響を評価した。

4 . 研究成果

(1) 排卵のシグナル伝達の解析—エストロゲンの欠乏した ArKO マウスの卵巣は卵巣刺激ホルモン (FSH) に対する感受性が野生型マウスの感受性と比べると有意に低いことが分かった。野生型マウスは FSH 刺激によって卵巣内の cAMP 量が急激に増加する。ところが、ArKO マウスの卵巣には FSH 刺激前に既に非常に高い cAMP 量が検出できた。エストロゲン欠乏は卵巣内の cAMP 量を増加させ、FSH に対する感受性を低下させると考えられる。

(2) 排卵効率の改善—ArKO マウスの排卵誘導条件下の誘導効率は約 6 0 % である。野生型マウスの FSH/LH 投与による排卵誘導の効率 (1 0 0 %) と比べると有意に低い。この効率を高める条件を探し、その根拠を解析すれば、排卵制御機構の一端を明らかにできると考えた。種々の化合物—インスリン、プロスタグランジン E2、レプチンなどを投与した結果、インスリンが ArKO マウスの排卵効率を有意に改善させることが分かった。エストロゲン欠乏の卵巣はインスリンに対する感受性

が低下している可能性が考えらる。

(3) 肥満と排卵の相関関係の解析—妊娠した野生型雌マウスを妊娠 15 日目から高脂肪食で飼育した。そして、高脂肪食の母親によって育てられた仔マウスを 4 週齢時に解析した。血中の中性脂肪量は通常食で飼育した雌仔マウスのそれと比べて、顕著に増加していた。高脂肪食飼育の野生型マウスに PMSG/hCG 投与によって排卵を誘発したところ、排卵効率と排卵数は食餌条件では影響を受けないことが分かった。すなわち、妊娠後期から思春期にかけて高脂肪食を摂取し続けても正常な排卵機能が維持されると考えられた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Katsumi Toda, Yoshihiro Hayashi, Masafumi Ono, Toshiji Saibara. Characterization of ovarian responses to equine chorionic gonadotropin of aromatase-deficient mice with or without 17 β -estradiol supplementation. *Endocrinology* 157 (2016) 2093-2103. 査読有り doi: 10.1210/en.2015-1701

Katsumi Toda, Yoshihiro Hayashi, Masafumi Ono, Toshiji Saibara. Co-administration of insulin with a gonadotropin partly improves ovulatory responses of estrogen-deficient mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* 411 (2015)177-186. 査読有り doi:10.1016/j.mce.2015.04.027

Tsunehiro Ochi, Kensuke Munekage, Masafumi Ono, Takuma Higuchi, Masayuki Tsuda, Yoshihiro Hayashi, Nobuto Okamoto, Katsumi Toda, Shuji Sakamoto, Jude A. Oben, Toshiji Saibara. PNPLA3 is involved in hepatic fatty acid and triglyceride metabolism through XBP1 and modulation of endoplasmic reticulum stress in mice. *Hepatology Research* 2015 Sep 8. 査読有り doi: 10.1111/hepr.12587.

Katsumi Toda, Yoshihiro Hayashi, Atsuko Yamashita, Masaru Okabe, Masafumi Ono, Toshiji Saibara. Aromatase-null mice expressing enhanced green fluorescent protein in germ cells provide a model system to assess estrogen-dependent ovulatory responses. *Transgenic Research*

(2014)23:293-302. 査 読 有
doi:10.1007/s11248-013-9771-y

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

戸田 勝已 (TODA, KATSUMI)
高知大学・教育研究部医療学系基礎医学
部門・准教授
研究者番号：4 0 1 9 7 8 9 3