

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840117

研究課題名(和文) タキキニンで誘導されるプロスタグランジンによるマウス初期卵胞成長機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the signaling cascades in ovarian follicle growth by tachykinin-induced prostaglandins

研究代表者

青山 雅人 (Aoyama, Masato)

奈良女子大学・理学部・非常勤研究員

研究者番号：60634813

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)：2週齢マウス卵巣において、神経ペプチドの一種、タキキニンが複数のシグナル伝達経路を介してプロスタグランジンH合成酵素(Cox-2)の遺伝子発現を上昇させることを明らかにした。さらに、幾つかのプロスタグランジン(PG)受容体の活性化が、マウス二次卵胞の成長を誘導することも明らかにした。以上の結果から、2週齢マウス卵巣において、TK/COX-2/PG受容体シグナル伝達経路が、ゴナドトロピン非依存期の二次卵胞の成長を促進することが示された。

研究成果の概要(英文)：We verified that a neuropeptide, tachykinin (TK), up-regulates multiple signaling pathways responsible for gene expression of prostaglandin H synthase (Cox-2) in the 2-week old mouse ovaries. Moreover, we revealed that activation of several prostaglandin receptors is involved in the growth of mouse secondary follicles. These results suggest that activation of the TK/Cox-2/prostaglandin pathway up-regulates the growth of secondary follicles that are gonadotropin-independent in the 2-weeks old mouse ovaries.

研究分野：生物学

キーワード：比較内分泌 卵胞成長

1. 研究開始当初の背景

卵巣内での卵胞の正常な成長は種の存続において不可欠な生体機構であり、その全容の解明は内分泌学における最も重要な課題の一つである。哺乳類の卵胞成長過程は、原始～前胞状卵胞までの生殖腺刺激ホルモン(GTH)非依存期と胞状卵胞～排卵までのGTH依存期に大別できる。GTH依存期では、主に視床下部から生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)が下垂体に作用し、そこから分泌されたGTHが胞状卵胞以降の卵胞を刺激すること、および、ステロイドホルモンによるフィードバック機構からなる「視床下部-下垂体-生殖腺軸」(HPG軸)という内分泌系で制御されている。一方、GTH非依存期の卵胞成長制御因子はほとんど不明である。

タキキニン(TK)は哺乳類で多様な生物現象に関与している神経ペプチドであり、生殖内分泌においては、視床下部においてTKサブタイプであるニューロキニンBがキスペプチンと協調してGnRHの分泌を促進することが、近年、明らかになっている(Topaloglu *Mol Cell Endocrinol.* 324, 64-9;2010)。反面、末梢組織である卵巣においてもTKとその受容体遺伝子の発現が報告されているが、その作用は不明であった。申請者は、脊椎動物の共通祖先生物から最後に分岐した尾索動物、カタユレイボヤ(ホヤ)の卵巣において、卵黄タンパク質のプロセッシングに必須なカテプシンD(CTSD)の活性化を介して、TKが卵巣内の卵胞成長を促進することを明らかにした。また、マウスにおいても各TKサブタイプが、GTH非感受性の二次卵胞の顆粒膜細胞に特異的に発現している3種類のTK受容体に直接作用して、前胞状卵胞へ成長させることを見出した。さらに、マウス卵巣へのTK投与時の網羅的遺伝子発現変動解析から、プロスタグランジン(PG)の生合成経路の根幹に位置し、全てのPG合成を律速する酵素であるCOX-2の遺伝子の発現が上昇するという結果を得た。PGは、マウスでは8種類の受容体を介して炎症促進や痛覚伝達などの様々な生理機能を担っている。生殖機能においては、GTH依存段階において、PGE₂がマウスやメダカなどで排卵の促進に、PGF₂αがマウスで黄体退縮にそれぞれ関与していることが明らかになっているのに対し、GTH非依存期のPGの役割は全く知られていない。このように、申請者の研究から、TKに誘導されるCOX-2の活性化を介して生成するPGが、GTH非感受性段階の初期卵胞の成長に極めて重要な役割を果たすことが示唆された。

2. 研究の目的

以上の背景から、申請者は、(1) COX-2の卵巣内での局在、(2) COX-2発現上昇とGTH非依存期の卵胞の成長との関係、(3) 同卵胞成長を制御するPGサブタイプ種を決定することにより、TKを起点とするGTH非依存期卵胞の成長機構を解明し、これまでほとんど

不明だったGTH非依存期卵胞成長の制御因子とその作用メカニズムを体系的に明らかにすることを構想した。

3. 研究の方法

(1) COX-2の局在解析を市販の抗体を用いた卵巣組織切片の免疫染色により行った。またTKやTK受容体との二重免疫染色も併せて行った。

(2) 三次元培養法を用いて、(1)でCOX-2が発現していたステージの卵胞にCOX-2阻害剤を投与し、その影響を観察した。また、TK投与からCOX-2の発現と活性化までのシグナル伝達経路をそれぞれの伝達因子阻害剤を用いて詳細に解析した。

(3) RT-PCR法によりPG合成酵素やPG受容体サブタイプの遺伝子発現解析を行うことで、2週齢マウス卵巣組織内において標的とする受容体を絞り込んだ。

(4) (3)の結果から、RT-PCR法により発現が確認された、PG合成酵素により合成されるPGサブタイプの定量、および、PG受容体サブタイプの卵巣内における局在解析を行った。PGサブタイプの定量には、LC ESI-MS/MSを用いた。また、PG受容体サブタイプの局在は、2週齢マウス卵巣組織切片の免疫染色により決定した。

(5) マウス卵胞の三次元培養系を用いて、COX-2阻害剤投与条件下での、各PG受容体サブタイプアゴニスト投与などによって、卵母細胞、卵胞成長における、それぞれのPGの役割を調査した。

4. 研究成果

(1) 2週齢マウス卵巣内におけるCOX-2の局在解析

マウスTK受容体であるNK-1、-2、-3のアゴニストを卵巣組織に投与すると、COX-2の遺伝子発現が上昇することが、マイクロアレイとリアルタイムPCR解析の結果から明らかになっている。卵巣組織内におけるCOX-2作用部位の特定には局在解析が必要不可欠である。そのため、2週齢マウス卵巣組織切片を用いた免疫染色により、COX-2の局在解析を行った。その結果、COX-2は二次卵胞の顆粒膜細胞に局在することが明らかになった。また、これらはマウスのTK、および、その受容体とも共局在していた(図1)。

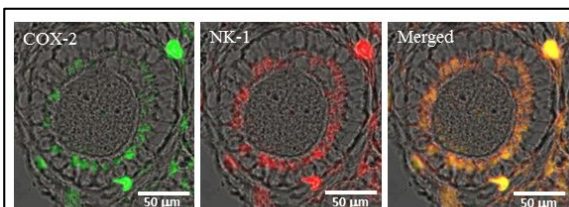


図1 2週齢マウス卵巣内におけるCOX-2の局在

(2) COX-2 阻害剤が 2 週齢マウスの卵胞成長に与える影響の解析

三次元培養系を用いて、マウス二次卵胞に COX-2 選択的阻害剤を投与したところ、卵母細胞と卵胞の成長が強く阻害された。一方、COX-1 選択的阻害剤では成長は阻害されなかった (図 2)。

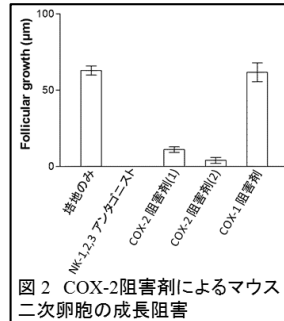


図 2 COX-2 阻害剤によるマウス二次卵胞の成長阻害

2 週齢マウス卵巣器官培養系および三次元培養系での、幾つかのシグナル伝達因子阻害剤の投与により、COX-2 の遺伝子発現が無投与時と比較して、転写レベルで下方制御を受けること、および、二次卵胞の成長が著しく阻害されることが明らかになった。

の結果から、2 週齢マウス卵巣の二次卵胞の顆粒膜細胞では、NK-1,-2,-3 の活性化により、複数のシグナル伝達経路の活性化を介して COX-2 の発現が上昇するという経路の存在が明らかとなり、本経路の活性化が二次卵胞の成長に重要な役割を果たしていることが示された。

(3) 2 週齢マウス卵巣における PGG₂/PGH₂ の下流の PG 受容体サブタイプの種類を特定

COX-2 はアラキドン酸から PGG₂/PGH₂ を生合成し、さらに PGH₂ から各組織特異的な PG サブタイプの合成酵素が 5 種類の PG サブタイプを生合成する。マウスには 8 種類の PG 受容体サブタイプが存在するが、2 週齢のマウス卵巣での発現プロファイルは不明である。RT-PCR 法により、マウス卵巣における各 PG およびその受容体サブタイプ遺伝子の発現解析を行った結果、2 週齢マウス卵巣には、3 種類の PG サブタイプ合成酵素の遺伝子と 3 種類の PG 受容体サブタイプの遺伝子が発現していることが明らかになった (図 3)。

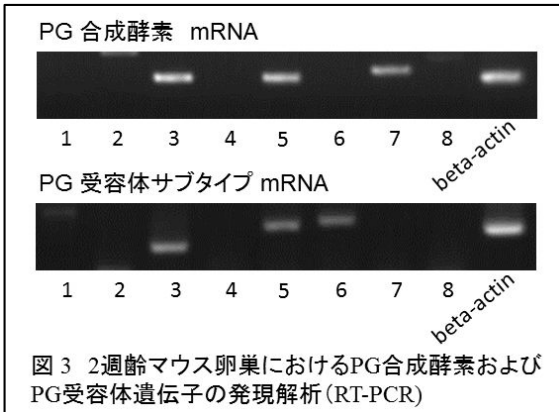


図 3 2 週齢マウス卵巣における PG 合成酵素および PG 受容体遺伝子の発現解析 (RT-PCR)

(4) 2 週齢マウス卵巣内における PG サブタイプの定量、PG 受容体サブタイプの局在解析

LC ESI-MS/MS により、卵巣組織内における PG サブタイプの定量を行った結果、幾つかの PG サブタイプが検出された。また、NK-1,-2,-3 アンタゴニスト、もしくは、COX-2

阻害剤を投与すると、そのうち 2 種類の PG サブタイプの組織内濃度が低下することが明らかになった (図 4)。

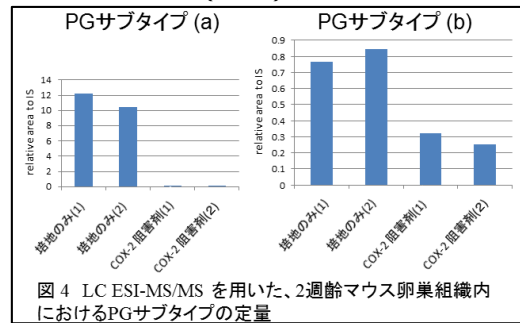


図 4 LC ESI-MS/MS を用いた、2 週齢マウス卵巣組織内における PG サブタイプの定量

免疫染色の結果、3 種類の PG 受容体サブタイプが、いずれも 2 週齢マウスの二次卵胞に発現していることが明らかになった。

の結果から、これらの PG および受容体サブタイプが、二次卵胞の成長に極めて重要な役割を果たしていることが示唆された。

(5) 各 PG 受容体サブタイプの作用解析

(4) の実験から、2 週齢マウスの卵巣に発現していることが明らかになっている 3 種類の PG 受容体サブタイプのアゴニストを、三次元培養系を用いて COX-2 阻害剤投与条件下で、2 週齢マウスの二次卵胞にカクテル投与した結果、アゴニストカクテル無投与条件下と比較して、二次卵胞の成長が促進されることが明らかになった。

また、それぞれ 1 種類ずつのアゴニストを投与した場合は、どのサブタイプを投与してもほとんど成長はなかった。一方、2 種類ずつをカクテル投与した場合には、成長が促進される組み合わせとされない組み合わせがあった (図 5)。

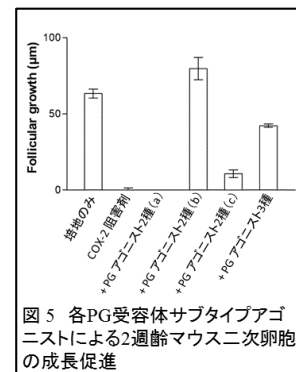


図 5 各 PG 受容体サブタイプアゴニストによる 2 週齢マウス二次卵胞の成長促進

以上の結果から、我々はマウス卵巣において、TK が PG 生合成経路の活性化を介して、ゴナドトロピン非依存期の卵胞である二次卵胞の成長を促進するという新しい機構を明らかにした。

現在、この TK 作動性の COX-2 活性化を介した PG による二次卵胞機構が、実際に生体内でも機能しているのかを明らかにするため、マウス TK 受容体のコンディショナルダブルノックアウトマウスを用いた実験を続行中である。

以上の研究に関しては、現在、投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

(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 5 件)

1. Mikata Y., Takekoshi A., Kizu A., Nodomi Y., Aoyama M., Yasuda K., Tamotsu T., Konno H., Burdette SC.
“8-TQEN (N,N,N0,N0-tetrakis(8-quinolylmethyl)-ethylenediamine) analogs as fluorescent cadmium sensors: strategies to enhance Cd²⁺-induced fluorescence and Cd²⁺/Zn²⁺ selectivity.”
RSC Adv, 4 (25), 12849-12856. (2014) **査読有**
2. Mikata Y., Takeuchi S., Konno H., Iwatsuki S., Akaji S., Hamagami I., Aoyama M., Yasuda K., Tamotsu S., Burdette SC.
“Bis(2-quinolylmethyl)ethylenediaminediacetic acids (BQENDAs), TQEN-EDTA hybrid molecules as fluorescent zinc sensors.”
Dalton Trans, 43 (26), 10013-22. (2014) **査読有**
3. Satake H., Aoyama M., Sekiguchi T., Kawada T.
“Insight into molecular and functional diversity of tachykinins and their receptors.”
Protein Pept Lett. 20 (6), 615-627 (2013) **査読有**
4. Satake H., Matsubara S., Aoyama M., Kawada T., Sakai T.
“GPCR heterodimerization in the reproductive system: functional regulation and implication for biodiversity.”
Front. Endocrinol. 4:100. doi: 10.3389/fendo.2013.00100. (2013) **査読有**
5. Kado M., Kishimoto M., Tamotsu S., Yasuda K., Aoyama M., Shinohara K.
“Imaging of fine structures of cellular organelles in hydrated biological cells by

a soft x-ray microscope combined with a fluorescence microscope.”

Proc. of SPIE, 8849, 88490C1-7 (2013)

査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 青山雅人, 川田剛士, 伊丹沙織, 安田恵子, 佐竹炎 「タキキニンとはマウス二次卵胞の成長を促進する」 日本動物学会第 84 回大会 9.26-28, 2013 (岡山)
2. 青山雅人, 川田剛士, 伊丹沙織, 保智己, 安田恵子, 佐竹炎 「マウスにおいてタキキニンは二次卵胞成長を促進する」 第 40 回日本神経内分泌学会学術集会・第 38 回日本比較内分泌学会大会 10.24-26, 2013 (宮崎)

〔図書〕(計 1 件)

1. Kawada T., Aoyama M., Sakai T., Satake H.
“Structure, Function and Evolutionary Aspects of Invertebrate GnRH and their Receptors.” In: "Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH): Production, Structure and Functions". Editor: Eric Scott-Sills.
Nova Science Publishers, Inc. ISBN: 978-1-62808-472-6. (2013) **査読有**

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

青山 雅人 (AOYAMA MASATO)

奈良女子大学・理学部・非常勤研究員

研究者番号：60634813

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：