

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440167

研究課題名(和文) マウスの卵胞発達ならびに排卵制御におけるRunx3の新規作用の解析

研究課題名(英文) Roles of transcription factor Runx 3 in ovarian follicle development and ovulation in mice

研究代表者

高橋 純夫 (Takahashi, Sumio)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：90144807

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)：本研究は転写因子Runx3の雌マウスにおける役割の解明を目的とした。Runx3遺伝子は、卵胞顆粒膜細胞や排卵制御に関わる視床下部領域において発現していた。雌のRunx3ノックアウトマウスでは、視床下部のKisspeptin遺伝子ならびに卵巣のコレステロール側鎖切断酵素遺伝子の発現が低下していた。Runx3ノックアウトマウスにおいて視床下部の排卵制御機構の不全が示されることから、Runx3は卵巣ホルモンの産生制御と視床下部の排卵制御機構の調節に関わることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study was aimed at clarifying the roles of transcription factor Runx3 in female mice. Runx3 mRNA was detected in the granulosa cells of ovaries, and in the neural cells in hypothalamic areas involved in regulation of ovulation in female mice. In Runx3 knockout female mice, hypothalamic Kisspeptin mRNA and ovarian cholesterol side-chain cleavage enzyme gene mRNA expressions were decreased. Dysfunction of hypothalamic regulatory mechanism of ovulation in Runx3 knockout female mice was demonstrated. These findings clearly suggest that Runx3 was involved in the regulation of ovarian steroid hormone production and hypothalamic ovulatory function.

研究分野：分子内分泌学

キーワード：排卵 卵巣 ステロイドホルモン マウス 成長因子 転写因子

1. 研究開始当初の背景

卵胞の発達から排卵に至る一連の現象は、卵成熟と密接に関連し、その制御機構の解明は生殖生物学における重要課題のひとつである。Runx1、Runx2、Runx3 が知られている。これらの Runx ファミリー転写因子は、様々細胞機能の制御に関与している。卵巣機能制御に関して、Runx1、Runx2 は卵胞に発現し、黄体化に関与していることが知られている(Jo et al., 2004, 2006)。Runx3 は、がん抑制遺伝子であるとされてきたが、卵巣機能制御への関与は全く知られていなかった。我々は Runx3 ノックアウト(Runx3KO)マウスでは無排卵であり不妊であり、卵胞の発達に異常が求められ、Runx3 が卵胞成熟や排卵の制御、卵胞におけるステロイドホルモン産生制御に関与することを世界に先駆けて報告してきた(Sakuma et al., 2008; Tsuchiya et al., 2012)。また、子宮内膜細胞の発情ホルモンによる細胞増殖制御にも Runx3 が関与する可能性を示唆してきた(Sakuma et al., 2008)。しかしながら、卵胞発達や卵巣機能の制御における Runx3 の役割の詳細は全く不明な状況であった。

2. 研究の目的

排卵制御は、視床下部・下垂体系によって担われている。これまでに Runx3KO マウスの卵胞発達に異常が認められ、無排卵であるが、これらの原因が視床下部・下垂体系にあるのか卵巣にあるのかは不明である。そこで、本研究では、視床下部・下垂体系および卵巣における Runx3 遺伝子の発現細胞を明らかにすることならびに、野生型マウスと Runx3KO マウスを用いて、卵巣を摘出し、相互に交換移植して、無排卵の原因を解析する。また、Runx3KO マウスの卵巣において、ステロイド産生に関わる酵素の遺伝子の発現を *in vivo* および顆粒膜細胞の培養系を用いて明らかにする。以上の解析を実施して、卵胞発達ならびにステロイドホルモン産生、視床下部における排卵制御機構における Runx3 の役割を解明することを目的とする。

なお、視床下部における排卵制御に関わる Kisspeptin の発現、とくに視床下部前室周囲核(AVPV)の Kisspeptin 発現に特に注目して、Runx3 の関わりを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)実験動物

BALB/c 系統の雌マウスをもちいた。Runx3KO マウスは、遺伝子標的法により作出したマウスを用いた(Li et al., 2002)。

(2)In situ hybridization による Runx3 遺伝子発現細胞の同定

卵巣の凍結切片を作成し、Runx3 のアンチセンス RNA プローブを用いて Runx3 mRNA 細胞を同定した。なお、プローブはディゴキシゲニンで標識した。

(3) mRNA の real-time PCR による解析

RNA は組織から TRIsure 試薬により抽出し、PrimeScript RT-PCR システムにより逆転写し、SYBRGreen システムを用いて Real-time PCR 法により定量した。

(4) 卵巣の交換移植実験

野生型マウスと Runx3 KO マウスより、麻酔下で卵巣を摘出し、それぞれの卵巣を宿主個体の腹側皮下に移植した。なお、野生型卵巣の Runx3 KO マウス皮下への移植、Runx3 KO 卵巣の野生型マウス皮下への移植、Runx3 KO 卵巣の Runx3 KO マウス皮下への移植等の実験を実施し、発情周期を観察するとともに、移植 17 日後に移植卵巣を摘出し、組織学的に排卵の有無を、黄体の形成を指標として解析した。

4. 研究成果

(1) Runx3 遺伝子の発現細胞

In situ hybridization 法により Runx3 mRNA 発現細胞を解析した。卵巣では、発達中の胞状卵胞から成熟した卵胞の顆粒膜細胞に発現が認められた。黄体には発現していなかった。RT-PCR 法により視床下部や単離した卵胞顆粒膜細胞に Runx3 mRNA が発現していることをはじめて明らかにした。Runx1 mRNA と Runx2 mRNA は発達した胞状卵胞の顆粒膜細胞と黄体細胞に発現することが既に報告されているので (Jo et al., 2004, 2006)、Runx3 は、Runx1 や Runx2 よりも卵胞発達の早期から顆粒膜細胞に発現し、卵胞発達に関与することが示唆された。また、視床下部でも Runx3 mRNA が発現することがわかったが、発現領域や発現細胞の種類は同定できなかった。しかしながら、Runx3 mRNA が検出されたことから、Runx3 が視床下部における排卵制御に関与することが推察される。

(2) 卵巣交換移植による Runx3KO マウスにおける排卵障害の回復

Runx3KO マウスは無排卵であるが、その原因は不明であった。そこで、野生型マウスと Runx3KO マウスを用いて、それぞれの卵巣を摘出し、相互に皮下に交換移植し、その後 17 日間における発情周期の回復ならびに、排卵の有無を黄体形成により調べた。野生型マウスの卵巣を野生型の宿主に移植すると、観察期間中 2.2 回の発情周期があり、移植卵巣には黄体が観察され、排卵が誘起されていた。また、Runx3KO マウスの卵巣を野生型宿主に移植すると、2.2 回の発情周期があり、黄体も観察され排卵が誘起されていた。ところが、野生型マウスの卵巣を Runx3KO マウスの宿主に移植したところ、観察期間中には発情周期は認められず、移植卵巣には黄体形成もなく、排卵がないことがわかった。以上の結果から、Runx3KO マウス由来の卵巣であっても、

野生型マウスの宿主では排卵が可能であることがわかった。この結果より Runx3KO マウスにおける無排卵は、視床下部の排卵制御機構の不全に由来することが示唆された。

(3) Runx3KO マウスにおける視床下部 Kisspeptin mRNA 発現の低下

マウス視床下部の前室周囲核(AVPV)の Kisspeptin は、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 分泌を促進して、黄体形成ホルモン (LH) サージならびに排卵を誘起する。Runx3KO マウスの AVPV の Kisspeptin mRNA は減少していたが、その一方弓状核の Kisspeptin mRNA は増加していた。このことは、視床下部の Kisspeptin 分泌調節に Runx3 が関与することを示唆している。AVPV の Kisspeptin mRNA の現象が、GnRH 分泌の低下と関係があると考えられる。

(4) Runx3KO マウスにおける卵巣ステロイドホルモン合成酵素遺伝子の発現の低下

Runx3KO マウス卵巣におけるステロイドホルモン合成に關与する遺伝子の mRNA 発現を Real-time PCR により調べた。卵巣刺激ホルモンや黄体刺激ホルモン受容体、Star 遺伝子の mRNA 発現に変化がなかった。ところが、コレステロール側鎖切断酵素遺伝子 (Cyp11a1) の mRNA 発現が低下していた。他のステロイド合成酵素遺伝子の mRNA 発現に変化はなかったが、Cyp11a1 遺伝子の発現低下により、estradiol の産生低下がおきていると考えられる。このことから、Runx3 は Cyp11a1 遺伝子の発現制御に關与することが示唆される。Cyp11a1 は主に、卵巣莢膜細胞に発現しているが、Cyp11a1 mRNA 発現が低下し、発現細胞数も減少していることがわかった。Runx3 mRNA は卵巣顆粒膜細胞に発現しているため、Runx3 欠損によって顆粒膜細胞機能が低下し、その結果莢膜細胞の Cyp11a1 遺伝子の発現が低下した可能性も考えられる。今後卵巣内における顆粒膜細胞と莢膜細胞の相互作用を、Runx3 に着目して詳細に解析していく必要がある。特に、Runx3KO により、発現が低下する成長因子を解析する。

Runx3KO マウスの子宮は退化し、性ステロイドホルモンの分泌低下が推察されるので (Sakuma et al., 2008)、estradiol の分泌が低下していることが示唆されているが、本研究の Cyp11a1 遺伝子の発現低下と一致している。Runx3KO マウスにおける estradiol の分泌低下により、視床下部の Kisspeptin 産生の低下がおきている可能性も考えられる。

(5) Runx3KO マウス卵巣におけるアクチビンとインヒピン遺伝子の発現

卵巣顆粒膜細胞には、アクチビンとインヒピンが発現している。これらの成長因子のサブユニット遺伝子の発現を Real-time PCR で解析したところ、Runx3KO マウス卵巣では Inha、Inhba、Inhbb の各 mRNA が低下して

いた。そこで、各遺伝子の mRNA 発現を in situ hybridization 法により解析した。野生型マウス卵巣では Inhbb mRNA は 1 次卵胞から胞状卵胞の顆粒膜細胞に発現していたが、Runx3KO マウス卵巣では、発達初期の小型の卵胞では Inhbb mRNA の発現は低下していた。他の遺伝子の mRNA 発現に変化はなかった。これらの結果より Runx3 は Inhbb 遺伝子の発現に關与することが推察される。アクチビンやインヒピンは視床下部・下垂体機能のみならず卵巣内で作用することが知られている。Cyp11a1 遺伝子の発現制御に Inhbb 遺伝子が關与する可能性が考えられる。

(6) Inhbb 遺伝子の発現制御の解析

卵巣腫瘍細胞株 OV3121 細胞を用いて、Inhbb 遺伝子のプロモーター解析をおこないプロモーター領域を解析した。Runx3 の応答領域があることがわかった。今後、Runx3 が Inhbb 遺伝子の転写に關与することを、Runx3 の強制発現や pull-down 実験などにより解析する。

(7) 成果の国内外への位置づけ

Runx1、Runx2 は卵巣の卵巣顆粒膜細胞において黄体形成ホルモンによって発現が促進され、卵巣の黄体化に關与することが報告されている (Jo et al., 2004, 2006)。本研究成果は、Runx3 は卵巣形成の比較的早い段階から発現し、ステロイドホルモンの産生制御の調節に關わり、発情ホルモンの分泌に關与することをはじめ示唆する報告であり、生殖内分泌学的に重要な知見を提供できた。Jo et al. の報告とあわせて、卵巣発達における転写因子 Runx ファミリーの役割を明瞭に示すことができたと考えられる。

(8) 今後の展望

視床下部に Runx3 mRNA が発現することがわかったため、Runx3 発現細胞種を同定することが必要である。あわせて、視床下部において Runx3 が關与する遺伝子を同定していく。

卵巣顆粒膜細胞において Runx3 が關与する遺伝子を同定する。また、Runx3 は他の転写因子や核内受容体と相互作用して遺伝子の転写制御をおこなっているため、Runx3 と相互作用するタンパク質を解析する必要がある。

本研究により Runx1、Runx2、Runx3 の 3 転写因子が卵巣機能の制御に關与することがわかった。Runx3 は、卵巣発達の初期から機能し、卵巣発達の最終段階で、Runx1 と Runx2 が機能することが推察されたため、これら遺伝子の卵巣内における発現制御について研究を進めることが今後の課題である。

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6件)

Fumiya Ojima, Yuka Saito, Yukiko Tsuchiya, Daichi Kayo, Syusuke Taniuchi, Maho Ogoshi, Hiroshi Fukamachi, Sakae Takeuchi, Sumio Takahashi Runx3 Transcription Factor Regulates Ovarian Functions and Ovulation in Female Mice J. Reprod. Dev., 62:479-486 (2016) (査読有)
DOI: 10.1262/jrd.2016-005

Yuki Ogo, Shusuke Taniuchi, Fumiya Ojima, Sayo Hayashi, Itsuo Murakami, Yuka Saito, Sakae Takeuchi, Toshiyuki Kudo, and Sumio Takahashi IGF-1 Gene Expression Is Differentially Regulated by Estrogen Receptors α and β in Mouse Endometrial Stromal Cells and Ovarian Granulosa cells J. Reprod. Dev., 60: 216-223 (2014) (査読有)
DOI: 10.1262/jrd.2013-085

〔学会発表〕(計15件)

小島史也, 泰山浩司, 御輿真穂, 竹内 栄, 高橋純夫 activinおよびinhibin遺伝子発現制御における転写因子 Runx3 の役割 第41回日本比較内分泌学会大会, 北里大学(神奈川) 2016年12月10日

Gu, T., Ojima, F., Aizawa, S., Ogoshi, M., Takeuchi, S., Takahashi, S. Postnatal changes of Runx transcription factor gene expression in mouse ovaries

第40回日本比較内分泌学会大会 JMSアステールプラザ (広島) 2015年12月12日

Hayashi, S., Ojima, F., Aizawa, S., Ogoshi, M., Takeuchi, S., Takahashi, S. Expression of insulin-like growth factor 1 mRNA in granulosa cells of mouse ovarian follicular cells

第40回日本比較内分泌学会大会 JMSアステールプラザ(広島) 2015年12月12日

小島史也, 加用大地, 松崎佑也, 御輿真穂, 泰山浩司, 竹内 栄, 高橋純夫 雌マウスの排卵制御機構における転写因子 Runx3 の役割

日本動物学会第86回新潟大会朱鷺メッセ (新潟) 2015年9月17日

小島史也, 斉藤優佳, 土家由紀子, 御輿真穂, 竹内 栄, 高橋純夫

Runx3 deletion decrease *Inhbb* mRNA expression in granulosa cells of immature follicles in mice 第39回日本比較内分泌学会大会 基礎生物学研究所(岡崎) 2014年11月8日

小島史也, 斉藤優佳, 土家由紀子, 御輿真穂, 竹内 栄, 高橋純夫 転写因子 Runx3 によるマウス卵胞顆粒膜細胞機能の制御 日本動物学会第85回仙台大会東北大学(仙台) 2014年9月13日

Ojima F, Saito Y, Tsuchiya Y, Inagaki K, Nakamura E, Otsuka F, Ogoshi M, Takeuchi S, Takahashi S. Runx3 regulates ovulation and steroidogenesis in granulosa cells in mice 16th International Congress of Endocrinology, 2014年6月23日, Chicago(米国)

〔図書〕(計1件)

鷺谷いづみ, 高橋純夫編, 培風館, 基礎生物学, (2016) 240頁 (pp.1-3, pp. 115-124)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biol.okayama-u.ac.jp/cccr/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 純夫 (TAKAHASHI, Sumio)
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号: 90144807

(3)連携研究者

深町 博史 (FUKAMACHI, Hiroshi)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号: 70134450

(4)研究協力者

竹内 栄 (TAKEUCHI, Sakae)
佐久間 敦子 (SAKUMA, Atsuko)
土家 由起子 (TSUCHIYA, Yukiko)
斉藤 優佳 (SAITO, Yuka)
小郷由貴 (OGO, Yuki)
小島 史也 (OJIMA, Fumiya)
林 紗代 (HAYASHI, Sayo)
加用 大地 (KAYO, Daichi)
前川 哲弥 (MAEKAWA, Tetsuya)

顧 婷婷 (GU, TinTin)