

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450381

研究課題名(和文) 時期特異的なADAM17基質特異性制御の解明による卵成熟誘導因子の探索

研究課題名(英文) Exploration of oocyte maturation inducing factor by analysis of time-specific regulation of ADAM17 substrate specificity during follicular development and ovulation process.

研究代表者

山下 泰尚 (Yamashita, Yasuhisa)

県立広島大学・生命環境学部・准教授

研究者番号：50452545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は排卵を誘導するEGF-like factorの細胞膜からの遊離にはADAM17が重要であることを見出している。他細胞種においてADAM17は基質特異性が変化することから、ADAM17が誘導する卵胞発育、排卵機構の全容解明を試みた。その結果、卵胞発育時には、FSH受容体発現に重要なTGF- β がターゲットであったことから、優勢卵胞選抜に関与すると考えられた。排卵時には、Neurotensin(NTS)がその活性が制御し、Neuregulinとその受容体の発現を介して卵丘細胞における持続的なERK1/2の活性化が誘導され、卵の卵成熟が誘導されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Previous our study showed the importance that ADAM17 shed the EGF-like factors (Amphiregulin; AREG, Epregrulin; EREG), as known the ovulation and oocyte maturation inducing factor. Since ADAM17 alters its substrate specificity in other cells type, we investigate the mechanism of follicular development and ovulation by the enzyme. In follicular development phase, we investigate that ADAM17 controls secretion of TGF- β in mice. Since previous studies showed that TGF- β induced expression of FSH receptor during follicular development, we assumed that the ADAM17 regulates selection of dominant follicle. In ovulation phase, we reveal that ADAM17 activity is up-regulated by Neurotensin, which induce sustainable activation of ERK1/2 in cumulus cells and meiotic and cytoplasmic maturation of oocyte.

研究分野：動物生産A

キーワード：卵胞発育 排卵 卵成熟 ADAM17

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の卵巣には、数万と言われる卵が存在する。しかし、排卵され受精可能な成熟卵となるのはその一部に過ぎず、ほとんどは受精しても発生しない未成熟な状態で卵巣内に留まる。有用形質を有した家畜の卵巣内に多く存在するこうした未成熟卵を体外で成熟させる体外成熟培養 (IVM) 法は、家畜の品種改良や効率的生産に有効であると考えられるが、成熟卵の作成効率は依然として低い。この原因は、体内で卵が成熟する過程の理解不足に起因すると考えられていることから、改善が必要であった。

卵巣内で未成熟卵を含む卵胞は発育し、十分に発育した卵胞 (ブタでは直径 15mm 程度) から成熟卵が排卵される。通常家畜卵の IVM 時には、発育途中の 4~7mm 程度の卵胞から卵丘細胞卵複合体 (COC) を回収し、培養に用いることから、卵胞発育から排卵過程の IVM 時における再現が重要であると考えられている。

2. 研究の目的

これまでの研究により、排卵刺激 (LH) を受けた卵胞を裏打ちする顆粒層細胞において EGF-like factor が発現するとともに、その切断酵素の ADAM17 が発現すること、ADAM17 の働きにより切り出された EGF-like factor が卵を取り囲む卵丘細胞に作用し、EGFR(ErbB1)-ERK1/2 系を活性化させることにより卵成熟が誘導されることを明らかにしてきた。卵成熟を誘導する ADAM17 には時期特異的な基質特異性が存在することから、卵胞発育、排卵時における ADAM17 が誘導する卵成熟機構の全容を明らかにする目的で研究を行った。

3. 研究の方法

C57BL6 雌マウスに卵胞発育を誘導する PMSG を投与し、48 時間後に排卵を誘導する hCG を投与した。これらの各時間から顆粒層細胞を採取し、mRNA およびタンパク質を抽出した。mRNA は、逆転写の後に qRT-PCR に供試し、タンパク質は Western blotting 解析に供試した。また卵巣の組織切片を作製し、免疫組織化学染色を行った。また、食肉処理上由来の未成熟個体の雌ブタの卵巣から顆粒層細胞、卵丘細胞卵複合体 (COC) を回収し、マウスにおいて明らかになった ADAM17 を制御する因子を添加して体外培養を行い、その家畜における有効性を調べた。

4. 研究成果

ADAM17 の基質特異性を制御する因子としてアダプタータンパク質 (Anxa2、Anxa7、Anxa8) が知られており、マウスを用いて卵胞発育、排卵期における発現を調べたところ、卵胞発育期において高値を示し、ADAM17 活性も著しく高値を示した。卵胞発育期における ADAM17 のターゲットを候補化し、探索

したところ、TGF- β が見出された。TGF- β は卵胞発育を誘導する FSH の受容体発現を誘導し、顆粒膜細胞のアポトーシスを抑制することが報告されている分子であることから、卵胞発育期における ADAM17 の活性化は、卵胞退行を抑制しているものと考えられた。

排卵時期において ADAM17 は、AREG、EREG を切断し、卵成熟を促進することを報告してきたが、一方 AREG 単独影響下で卵子を体外培養すると過成熟による卵子の質低下させることも近年報告された。そこで排卵期において、AREG、EREG の分泌後 ADAM17 の働きを抑制する因子が存在すると考えられた。排卵期においては、排卵期後期における ADAM17 の抑制についてマウスを用いて検討し、神経ペプチドの Neurotensin (NTS) を候補化した。NTS の役割を NTS 受容体阻害剤 (SR) を用いて in vivo および in vitro で詳細に解析した結果、排卵期後期において NTS が ADAM17 の抑制制御因子として機能し AREG シグナルの抑制因子であることを新たに見出した。さらに、NTS は AREG 発現後の顆粒膜細胞で発現する EGF-like factor の一種である Neuregulin (NRG1) とその受容体 (ErBb2 および ErBb3) 発現を亢進させた。NRG1 は卵子の過成熟を抑制する因子として報告されている。このことから、排卵前期において ADAM17 は AREG を切断し卵成熟を誘導するが、排卵期後期に NTS により抑制され、NTS により発現する NRG1 へ主要シグナルを移行させことで、卵成熟を誘導することが明らかになった。

さらにブタ COC の IVM 時に NTS を添加して培養することにより、卵丘細胞における卵成熟マーカー (ERK1/2 のリン酸化、*Has2*、*Tnfrap6*、*Ptx3* 発現) が NTS を添加していない区と比べ高値を示し、桑実胚までの卵割率も著しく高値を示し、NTS 添加により排卵期まで ADAM17 活性を維持する新規 IVM 方の開発に成功した。

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)

1. 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; 155:1080-1090.
2. 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: 706-21.
3. Kawai T, Yanaka N, Richards JS, Shimada M. De novo-synthesized retinoic acid in ovarian antral follicles enhances FSH-mediated ovarian follicular cells differentiation and female fertility. *Endocrinology.* 2016; 157: 2160-72
 4. Umehara T, Kawashima I, Kawai T, Hoshino Y, Morohashi KI, Shima Y, Zeng W, Richards JS, Shimada M. Neuregulin 1 regulates proliferation of leydig cells to support spermatogenesis and sexual behavior in adult mice. *Endocrinology.* 2016; 157: 4899-4913.
 5. Shimada M, Yamashita Y, Okazaki T. Development of artificial insemination technique in pig production based on the evidence of physiology and molecular biology in reproductive organs. *Agri-Bioscience Monographs.* 2016: 6; 59-83.
 6. Okamoto A, Ikeda M, Kaneko A, Kishida C, Shimada M, Yamashita Y. The novel pig in vitro maturation system to improve developmental competence of oocytes derived from atretic non-vascularized follicles. *Biol Reprod.* 2016: 95; 7.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 池田真規, 島田昌之, 山下泰尚 健常卵胞と退行卵胞における経時的ステロイドホルモン比較解析とそれを応用した退行卵胞由来ブタ卵の新規 IVM 法の確立 2014 年 3 月 第 118 回日本畜産学会 畜産草地研究所 **(優秀発表賞受賞)**
2. 岡本麻子, 島田昌之, 山下泰尚 Neurotensin は, 排卵時にヒアルロン酸産生を促し, 卵丘細胞の膨潤を促進する 第 55 回日本卵子学会 5 月 兵庫医科大学
3. 岡本麻子, 成田恵菜, 河端茜, 島田昌之, 山下泰尚 卵丘細胞における Neurotensin の EGF 受容体上昇作用とそれが卵丘細胞膨潤と卵成熟に果たす役割 第 107 回日本繁殖生物学会 8 月 帯広畜産大学
4. 永村優, 岡本麻子, 島田昌之, 山下泰尚 ブタ卵丘細胞卵複合体 (COC) の体外培養時における Neurotensin (NTS) の発現とその役割 第 107 回日本繁殖生物学会 8 月 帯広畜産大学

5. 池田真規, 清垂咲美, 門川真諭, 島田昌之, 山下泰尚 健常卵胞のステロイドホルモン培養環境が退行卵胞由来 COC のアポトーシスに及ぼす影響 第 107 回日本繁殖生物学会 帯広畜産大学
6. 岡本麻子, 門川真諭, 池田真規, 島田昌之, 山下泰尚 ブタの卵胞発育時のプロゲステロン (P4) 代謝酵素・AKR1C1 の発現と卵成熟への役割 2015 年 3 月 第 119 回日本畜産学会 宇都宮大学 **(優秀発表賞受賞)**
7. 岡本麻子, 池田真規, 島田昌之, 山下泰尚 顆粒膜細胞の CYP11B1 発現依存的なコルチゾール産生が引き起こす卵胞退行メカニズム 2015 年 5 月 第 56 回日本卵子学会 宇都宮大学 **(学術奨励賞受賞)**
8. 河端茜, 内橋しづき, 島田昌之, 山下泰尚 Transferrin-Fe³⁺ は顆粒層細胞と卵丘細胞の機能性を亢進し, 卵胞発育を誘導する 第 108 回日本繁殖生物学会
9. 岡本麻子, 金子亜絵理, 池田真規, 島田昌之, 山下泰尚 プロゲステロン代謝抑制が誘導するブタ卵胞選抜メカニズム 第 108 回日本繁殖生物学会
10. 岡本麻子, 金子亜絵理, 池田真規, 島田昌之, 山下泰尚 プロゲステロン代謝酵素依存的に蓄積するコルチゾールとその卵胞退行への影響 2016 年 3 月 第 121 回日本畜産学会 日本獣医生命科学大学
11. Transferrin (TF)-Fe³⁺ により誘導されるブタ卵の減数分裂再開抑制とその卵の発生に及ぼす影響 2016 年 3 月 第 121 回日本畜産学会 日本獣医生命科学大学
12. 岡本麻子, 末永麻優子, 島田昌之, 山下泰尚 排卵時の顆粒膜細胞で発現する Neurotensin は ADAM17 活性を亢進し, 卵丘細胞の EGF 受容体-ERK1/2 系の持続的活性化を誘導する 2016 年 5 月 第 57 回日本卵子学会 新潟大学
13. 山下泰尚 卵子成熟・排卵過程の顆粒膜細胞及び卵丘細胞に発現する神経ペプチド・Neurotensin による EGF 受容体活性維持制御 2016 年 5 月 第 57 回日本卵子学会 新潟大学 招請講演
14. 久田尚人, 久尾俊輔, 島田昌之, 山下泰尚 TF-Fe³⁺ がマウスの造精機能および精子機能に及ぼす影響 2016 年 9 月

本繁殖生物学会 麻布大学

研究者番号：

15. 岡本麻子, 永村優, 島田昌之, 山下泰尚
ブタ卵丘細胞に発現する Neurotensin
(NTS) は EGF 受容体 (EGFR) の発現
を亢進し, EGFR-ERK1/2 系の持続的活
性化を誘導する 2016 年 9 月日本繁殖
生物学会 麻布大学 (**優秀発表賞受賞**)

(4) 研究協力者
()

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[https://www.facebook.com/%E7%9C%8C%E7%A
B%8B%E5%BA%83%E5%B3%B6%E5%A4%A7%E5%AD%A
6%E7%94%9F%E5%91%BD%E7%92%B0%E5%A2%83%E
5%AD%A6%E9%83%A8%E5%8B%95%E7%89%A9%E7%9
4%9F%E6%AE%96%E7%94%9F%E7%90%86%E5%AD%A
6%E7%A0%94%E7%A9%B6%E5%AE%A4-4164864717
50325/](https://www.facebook.com/%E7%9C%8C%E7%A
B%8B%E5%BA%83%E5%B3%B6%E5%A4%A7%E5%AD%A
6%E7%94%9F%E5%91%BD%E7%92%B0%E5%A2%83%E
5%AD%A6%E9%83%A8%E5%8B%95%E7%89%A9%E7%9
4%9F%E6%AE%96%E7%94%9F%E7%90%86%E5%AD%A
6%E7%A0%94%E7%A9%B6%E5%AE%A4-4164864717
50325/)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 山下泰尚
(YASUHISA YAMASHITA)
県立広島大学 生命環境学部 生命科学科
准教授
研究者番号：50452545
- (2) 研究分担者 島田昌之
(MASAYUKI SHIMADA)
広島大学 大学院生物圏科学研究科 陸域
動物生産学講座 教授
研究者番号：20314742

(3) 連携研究者
()