

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861346

研究課題名(和文) 加齢マウスにおけるCNPの卵巣発育促進とその機構に関する研究

研究課題名(英文) Mechanism of follicle development using CNP on aging mice

研究代表者

佐藤 可野 (YORINO, SATO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員

研究者番号：00511073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣発育には卵巣刺激ホルモン(FSH)が必要だが、FSH受容体発現が低下不妊患者においてはFSH刺激による卵巣発育誘起に抵抗性を示す。我々はCNP(natriuretic peptide type C)が、FSHの下流で顆粒膜細胞内cGMP増加を介して卵巣発育を促進することを見出した。そこで本研究では、FSH抵抗性患者の卵巣刺激に対するCNPの臨床応用を目標として、CNPの下流シグナルを探索・同定し、CNPによる卵巣発育促進作用の分子基盤を解明すること、さらにFSH抵抗性患者モデルとして加齢マウスにおけるCNPの卵巣発育促進効果を明らかにし、得られた卵子の質を評価した。

研究成果の概要(英文)：Follicle growth is necessary follicle stimulate hormone. However FSH low responder or aging woman patients resist follicle growth by FSH stimulation. We found CNP induce follicle development acting through cGMP increasing under FSH. In this study, we identified candidate of CNP downstream and clarified molecular mechanism of follicle development. Furthermore, we evaluated oocyte quality of aging model mice.

研究分野：生殖医学

キーワード：卵巣発育 aging

1. 研究開始当初の背景

女性は加齢に伴い妊孕性が低下する。本邦では女性の晩婚化が急速に進んでおり、そのため加齢を原因とする不妊患者が急増している。現在多くの不妊治療において、卵胞発育を誘起するための卵巣刺激は、主にFSH/hMG製剤を用いて行われている。しかしながら高齢婦人ではFSH受容体発現が低下しているために、FSH/hMG製剤を用いた卵巣刺激に対して低応答となり卵胞発育に障害をきたすと考えられている。また poor responder とよばれ、FSH受容体の異常など加齢以外の原因により、FSHに対し抵抗性を示す不妊患者も同様に卵胞発育不全を引き起こす。これらの患者においては、FSH刺激以外の卵胞発育誘起法の開発が臨床成績の向上のため求められている。

C型ナトリウム利尿ペプチド(natriuretic peptide type C, CNP)は22アミノ酸残基からなるナトリウム利尿ペプチドファミリーの一つであり、特異的受容体であるNPRBに結合して生物学的作用を示す。他のナトリウム利尿ペプチドファミリーと異なり、直接的ナトリウム利尿作用を示さないことが特徴である。申請者らは、FSH刺激によりCNPが顆粒膜細胞で産生され、NPRBを発現する顆粒膜細胞にオートクライン経路により作用し、cGMPを産生することで卵胞発育を促進することを明らかにした(Sato et al. Mol Endocrinol 2012: 図1)。CNPはFSH刺激により卵巣顆粒膜細胞における発現が増加し、FSHと相加効果を示すことから、FSHの下流で卵胞発育を促進するシグナルの1つと考えられる。我々はさらに、マウスへのCNP単独投与により、二次卵胞の発育が促進され、排卵卵子が増加することを示した(Sato et al. Mol Endocrinol 2012)。これらの事から高齢婦人患者の卵胞発育促進剤としてCNPが機能するかもしれない。CNPは高齢婦人患者のようなFSH抵抗性患者において、FSHとは独立して卵胞発育を誘起できる可能性が考えられる。そこで、本研究ではFSH受容体の発現が低下している加齢動物モデルを用いて、CNPによる卵胞発育誘起の分子基盤を明らかにしながら、その発育促進効果をFSHと比較しながら明らかにし、CNP刺激により得られた卵子の正常性を検証することを目的とする。

2. 研究の目的

FSH抵抗性患者の卵巣刺激へのCNPの臨床応用を最終目標として、加齢動物モデルを用いてCNPの卵胞発育促進効果について、本研究期間内に以下のことを明らかにする。

DNAマイクロアレイを用いてCNPの下流シグナルを探索し、cGMPに関与するハブ遺伝子を網羅的に同定する。さらに同定した候補因子の細胞内機能について解析し、CNPの卵胞発育促進作用の分子基盤について明らかにする。

加齢マウスにおけるCNPによる卵胞発育誘起について、FSHと比較しながら決定する。さらに卵胞発育促進作用が認められた場合、得られた卵子の質について体外受精・胚移植を用いて評価する。

正常卵胞においてCNPは顆粒膜細胞で産生され、その受容体であるNPRBが発現する顆粒膜細胞に作用する。NPRB受容体はGuanylyl cyclase domainを有し、cGMPを産生する。一方、cGMPはマウス卵胞発育を促進することから、申請者らはCNPはcGMP産生介して卵胞発育を促進すると考え、卵胞培養及び卵巣体外培養においてCNPが卵胞発育促進効果を持つこと明らかにした。さらに若年マウスにおいてCNPの単独投与が二次卵胞発育を促進し、排卵卵子が増加することを確認した。(Sato et al. Mol Endocrinol, 2012)。このように申請者らは、CNPを用いた卵胞発育誘起について先駆的研究を行い十分な成果を得ており、当該領域の研究において世界をリードしている。これらの研究成果は、国内外の学術集会において高く評価され、学術奨励賞を受賞している(第11回生殖バイオロジ-東京シンポジウム2012, International Ovarian Conference 2013)。

本研究により、CNPによる卵胞発育の分子基盤が明らかとなり、卵胞発育不全の病因・病態解明に向けた新しい視点からの解析が可能と期待される。また、動物実験で得られた成果をヒト卵巣検体で確認することで、poor responderや加齢不妊患者といったFSH抵抗性患者に対するCNPを用いた卵巣刺激法の開発につながると考えられる。現在の不妊治療において、加齢による妊孕性の低下の克服は解決すべき重要課題である。本研究はFSHによる卵巣反応性が低下した加齢症例において、卵巣刺激を可能にする新たなアプローチによりこの問題の解決に貢献するFSH不応性のpoor responderや、より重症なovarian resistant syndromeの患者では、FSH刺激による卵胞発育誘起は困難であるが、CNPによる卵巣刺激が有効であれば、その問題点の解決策となりうる。

すでに研究申請者らは、若年マウスと比較して加齢マウスにおける顆粒膜細胞のNPRB受容体の発現が、FSH受容体(FSHR)ほど減少しないことを予備実験において確認しており(図2)、本研究計画の実効性は非常に高いと期待している。また、入手困難な加齢マウスに関しても、独自のルートにより研究に必要な十分な数を準備できるようにしている。

3. 研究の方法

【CNPによる卵胞発育促進作用の分子基盤の解明】

CNPはcGMPを介して卵胞発育を促進すると考えられるが、その下流シグナルは同定できておらず、CNPがどのような作用により卵胞発育を誘起するのか不明である。本研究では、

CNPにより誘導されるcGMPの下流シグナルをDNAマイクロアレイを用いた網羅的に同定し、候補因子について卵胞構成細胞における細胞内機能を解析する。

1) マイクロアレイを用いたcGMP下流シグナルの網羅的解析

cGMPの細胞内シグナルの探索を行うために、マイクロアレイを用いてCNP投与群と非投与群における遺伝子発現の変化について網羅的解析を行う(外部委託)。得られたデータは定量的real-time RT-PCRにより検証し、CNP処理により発現が上昇した因子を候補因子とする。その中で細胞内シグナルの中心となるハブ遺伝子をcGMP下流シグナルの候補因子として同定する。

2) CNPの下流シグナル候補因子の細胞内機能解析

各候補因子について、卵胞発育の主体となる顆粒膜細胞における細胞内機能を解明するために、マウス卵胞より単離した顆粒膜細胞およびヒト不死化顆粒膜細胞を用いての以下の項目について明らかにする。

・細胞増殖効果：卵胞発育には顆粒膜細胞の増殖が必要であるため、候補因子の細胞増殖効果について培養顆粒膜細胞のセルカウントおよびMTTアッセイを用いて解析を行う。

・アポトーシス抑制効果：cGMPを介した卵胞発育にはアポトーシス抑制効果による顆粒膜細胞の生存性向上の関与が報告されている。そこで、培養顆粒膜細胞のカパーゼ3/7活性を定量する。

・ホルモン産生測定：培養顆粒膜細胞のエストロゲン(E2)産生をELISA法を用いて測定する。

各試験区のコントロールには、候補因子の特異的アゴニストやアンタゴニスト、siRNA、抑制剤などを用いる。

さらにin vivoにおける【加齢マウスにおけるCNPの卵巣発育促進効果と卵子機能評価】について検証する。

研究代表者は、予備実験において、加齢マウスにおける顆粒膜細胞のNPRB受容体発現が比較的保たれていることを確認している。そこで、加齢マウスにCNPを投与し卵胞発育誘起を試みる。さらにCNP投与により得られた卵子について、その機能評価を行う。

1) 加齢マウスにおけるCNPの卵胞発育促進効果

加齢マウス(46-50週齢)に対して、CNPおよびFSHを腹腔内に投与し、hCG投与により排卵を誘導した後に卵管内に排卵された卵子数とその成熟度を測定する。性成熟したマウスの卵巣刺激は、性周期を考慮して行う必要があるため、膣スメア法を用いて性周期を確認した上で投与を行う。加齢マウスの性周期は、若年マウスが4日間であるのに対し、平均6.8日間かかる。先行研究で行った若年マウスのCNP投与プロトコルでは、4日間のCNP投与期間が必要であった。そこで、加齢

マウスの性周期を考慮して発情期(Estrus)の翌日からCNP投与を開始して次の発情前期(Proestrus)にhCGを注射して排卵誘起を行う。得られた排卵卵子については、ヒアルロニダーゼ処理を行い卵丘細胞を除去して卵子の核成熟を評価する。また、CNPを投与したマウスにおいて体重測定、各臓器の組織学的検査、行動異常の有無について調べ、副作用の発生を検索する。

2) CNP投与による卵子の機能評価

将来的な臨床応用を目標に、CNP投与によって得られた卵子が、生理的なFSH刺激で得られた卵子と質的に異なるかどうかについて評価を行う。DNAマイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的比較解析の他、得られた卵子を用いて体外受精を行い、受精率、胚盤胞到達率を比較する。また、卵子のエピジェネティックな異常を検証するため、インプリント遺伝子のメチル化解析を行う。さらに胚移植後に得られた産仔数及び出生仔の異常の有無を調べて卵子の質の評価を行う

4. 研究成果

まず、【CNPによる卵胞発育促進作用の分子基盤の解明】においてわれわれはcGMPの細胞内シグナルの探索を行うために、マイクロアレイを用いてCNP投与群と非投与群における遺伝子発現の変化について網羅的解析を行った。得られたデータからコントロール群と比較して ± 2 以上の遺伝子発現変化があったものを抽出した。さらにそのなかからリガンド-受容体の反応を示すものを選別し候補因子として同定した。

得られた候補遺伝子の卵胞発育の主体となる顆粒膜細胞における細胞内機能を解明するために、マウス卵胞より単離した顆粒膜細胞およびヒト不死化顆粒膜細胞を用いて細胞増殖効果、アポトーシス抑制効果、ホルモン産生について検証を行った。その結果得られた候補遺伝子が細胞増殖能を持つことを明らかにした。しかしながらアポトーシス抑制効果はなかった。ホルモン産生能の評価としてE2を測定したところ、E2産生が増加することが明らかになった。

またCNPの卵胞発育促進効果について調べたところ、加齢マウスにおける卵胞発育が促進されることが明らかになった。

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5件)

Takae S, Tsukada K, Sato Y, Okamoto N, Kawahara T, Suzuki N.

Accuracy and safety verification of ovarian reserve assessment technique for ovarian tissue transplantation using optical coherence tomography in mice ovary.

Sci Rep. 査読有り 2017 Mar 8;7:43550.

doi: 10.1038/srep43550.

Zhai J, Yao G, Dong F, Bu Z, Cheng Y, Sato Y, Hu L, Zhang Y, Wang J, Dai S, Li J, Sun J, Hsueh AJ, Kawamura K, Sun Y.
In Vitro Activation of Follicles and Fresh Tissue Auto-transplantation in Primary Ovarian Insufficiency Patients.
J Clin Endocrinol Metab. 査読有り 2016 Nov;101(11):4405-4412.
doi:10.1210/jc.2016-1589

Cheng Y, Feng Y, Jansson L, Sato Y, Deguchi M, Kawamura K, Hsueh AJ.
Actin polymerization-enhancing drugs promote ovarian follicle growth mediated by the Hippo signaling effector YAP.
FASEB J. 査読有り 2015 Jun;29(6):2423-30.
doi: 10.1096/fj.14-267856.

Takae S, Sugishita Y, Yoshioka N, Hoshina M, Horage Y, Sato Y, Nishijima C, Kawamura K, Suzuki N.
The role of menstrual cycle phase and AMH levels in breast cancer patients whose ovarian tissue was cryopreserved for oncofertility treatment.
J Assist Reprod Genet. 査読有り 2015 Feb;32(2):305-12.
doi: 10.1007/s10815-014-0392-z.

Takae S, Kawamura K, Sato Y, Nishijima C, Yoshioka N, Sugishita Y, Horage Y, Tanaka M, Ishizuka B, Suzuki N.
Analysis of late-onset ovarian insufficiency after ovarian surgery: retrospective study with 75 patients of post-surgical ovarian insufficiency.
PLoS One. 2014 May 23;9(5):e98174.
doi: 10.1371/journal.pone.0098174.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 可野 (YORINO, Sato)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員

研究者番号：00511073