

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06881

研究課題名(和文) 卵巣発育制御機構の解明と原始卵巣のin vivo activation法の開発

研究課題名(英文) Analysis of the regulatory mechanism of primordial follicle growth in mouse ovaries

研究代表者

小松 紘司 (Komatsu, Kouji)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：40456893

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)：卵巣では多くの原始卵巣が休眠状態で存在し、長期間の周期的排卵活動を維持しているが、卵巣組織内における原始卵巣の休眠維持機構、発育誘導機構は明らかにされていない。本研究では卵巣組織内における原始卵巣の発育制御機構を解明するために申請者が開発した卵巣組織培養法を用いて研究を行った。その結果、血管新生に伴う物質供給量の増加によって原始卵巣の発育が促進される事、17 β -エストラジオールが原始卵巣の発育を抑制する事が明らかになった。また、生体内においてもVEGFを含んだ生理活性物質徐放剤の移植、エストロゲン受容体のアンタゴニストの投与によって原始卵巣の発育を人為的に促進する手法を確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では17 β -エストラジオール(E2)が卵巣組織内の原始卵巣の発育を抑制する事を明らかにした。E2は月経周期に伴って周期的に濃度変化する事から、卵巣内において周期的な原始卵巣の発育を制御する制御因子であると考えられる。また、申請者はエストロゲン受容体アンタゴニストであるタモキシフェンをマウス腹腔に投与する事によって生体内で原始卵巣の発育を促進する事ができることを確認した。エストロゲン阻害剤は抗癌剤として用いられているものが複数種類存在している事から、本研究の成果は既存のエストロゲン阻害剤のドラッグリポジショニングによる新しい不妊治療法の開発の可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：Ovarian follicle development is coordinated by multiple factors, which sustain periodic ovulation. After the secondary follicular stage, follicle development is mainly regulated by gonadotropins. However, primordial and primary follicle development is regulated by gonadotropin-independent mechanism, and the regulatory mechanisms that govern these stages remain poorly understood. To elucidate these regulatory mechanisms, we developed mouse ovarian tissue culture and live imaging analysis methods. By these experimental methods, we clarified that the supply of serum substances from blood vessels provides the cue for the activation of dormant primordial follicles. Furthermore, we explored that 17 β -estradiol suppresses the growth of primordial follicles in mouse ovaries. These results indicate that angiogenesis and the change of 17 β -estradiol concentration in an ovary is physiological key factors in the regulation of primordial follicle growth.

研究分野：生殖

キーワード：卵巣 原始卵巣 エストラジオール

1. 研究開始当初の背景

動物種によって月経周期の長さや1回の排卵数は異なるが、哺乳類は月経周期毎に一定数の卵子を排卵する。長期間にわたる周期的排卵活動維持のために卵巣内には生後から休眠状態の原始卵胞が数多く貯蔵されている。卵巣内の卵胞発育は下垂体から分泌されるゴナドトロピン依存的に制御されるステージとゴナドトロピン非依存的な制御を受けるステージに分けられる。原始卵胞はゴナドトロピン非依存的な発育制御を受けており、過去の研究によって原始卵胞の発育抑制、促進に作用する因子が数多く報告されている。しかし、生体内においてどのように生理学的に原始卵胞の発育が制御されているかという点については不明な点が多く残されている。申請者はこの課題を解明するために、卵巣組織培養下で卵胞発育過程を可視化、トレースできる実験手法を確立し、研究に取り組んでいる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウスの卵巣組織培養を用いて原始卵胞の発育を制御する因子とそのメカニズムを解明することである。また、その結果を元に投薬など侵襲性の低い処置によって卵巣組織内の原始卵胞発育を人為的に促進する方法を確立する事を目指している。今回の申請研究では以下の2つの研究を行った。

(1) 血管新生と休眠状態の原始卵胞活性化の関連性

申請者は活性化状態の原始卵胞の多くが血管と接触していることを発見した。卵巣では卵胞発育、黄体形成など月経周期毎に起こる生理現象によって活発に血管新生が起こる。そこで、血管新生が原始卵胞の発育に及ぼす影響を解明するために、卵巣組織培養による実験と血管新生誘導因子を浸透させた生理活性物質徐放剤の移植実験を行い、関連性を検証した。

(2) 17-エストラジオールの原始卵胞発育制御における作用

17-エストラジオール(E2)は卵胞発育にしたがって産生・分泌量が増加し、排卵後、減少するという月経周期に沿った周期的な血中濃度変化を示すことが知られている。これまで、原始卵胞発育とE2の関連性について報告はないが、本研究では卵巣組織培養およびエストロゲン阻害剤のマウスへの投与によって、その作用について解析を行った。

3. 研究の方法

本研究では卵母細胞特異的に発現する遺伝子 *oogenesin1* (*Oog1*) のプロモーターに蛍光タンパク質 AcGFP1 の遺伝子を結合した組換え遺伝子を持つトランスジェニックマウスと、ヒストン H2B に蛍光タンパク質 mCherry を結合した組換え遺伝子を持つトランスジェニックマウスを用いて実験を行った。*Oog1* は原始卵胞の段階から発現を開始し、卵胞発育にしたがってその発現量が増加する事が知られている。我々はその特性を生かすことによって原始卵胞発育過程を AcGFP1 の発現変化で解析する方法を確立した(図1、文献1)。この解析法では一次卵胞以降の卵母細胞においてのみ AcGFP1 が検出できる条件でタイムラプス撮影することによって、原始卵胞が一次卵胞へと発育する過程をリアルタイムで観察、解析する事が可能である。本研究では、上記2種類のトランスジェニックマウスをかけ合わせて生まれるマウスの生後0日目、4日目、4週齢の卵巣を用いて組織培養を行った。培養下において、原始卵胞の発育制御候補因子を添加し、培養卵巣組織のタイムラプス撮影とライブイメージング解析を行う事によって原始卵胞発育への効果を検証した。

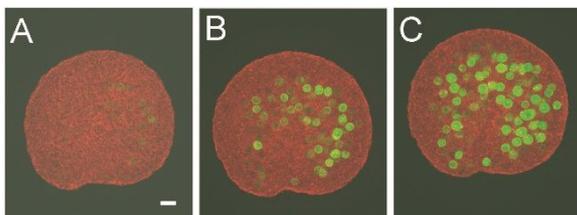


図1 生後4日目のトランスジェニックマウス培養卵巣組織のタイムラプス画像
培養2日目(A)、6日目(B)、10日目(C)に培養卵巣組織を共焦点顕微鏡にて撮影した。
緑: AcGFP1(卵母細胞)、赤: mCherry(細胞核)
Scale bar: 100 μ m

(1) 血管新生と休眠状態の原始卵胞活性化の関連性

血管新生に伴う原始卵胞への物質供給量増加の状態を培養下で再現するために、培養液に添加する血清濃度を変え、原始卵胞しか存在しない生後0日目の卵巣を培養し、原始卵胞の発育状況を解析した。また、その結果を *in vivo* で検証するために、血管新生誘導因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) を浸透させた生理活性物質徐放剤 (MedGel、株式会社メドジェル) をマウス(10週齢)の卵巣嚢内に移植した。移植後の効果を調べるために、移植後5日目の卵巣を摘出し、原始卵胞の発育状態の指標となる転写因子 forkhead box O3A (FOXO3A) の卵母細胞内における局在を組織学的な解析によって調べた(図2)。

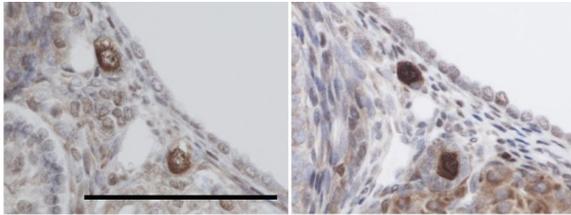


図2 FOXO3A の染色画像

FOXO3A は原始卵胞が活性化（発育）状態の時は細胞質内にのみ局在し（左図）、休眠状態の時は卵母細胞の核内に移行する（右図）。
Scale bar: 50 μm

（2）17-エストラジオールの原始卵胞発育制御における作用

（1）と同様に生後0日目の卵巣を培養し、E2を培養液に添加する事によって、その効果を検証した。また、生後4日目、4週齢のマウス卵巣を培養し、E2またはエストロゲン受容体のアンタゴニストであるICI 182789（ICI）を添加し、ライブイメージング解析を行った。また、その結果を *in vivo* で検証するために、エストロゲン受容体のアンタゴニストであるタモキシフェンをマウス腹腔内に投与し、卵母細胞内の FOXO3A の局在を指標として原始卵胞の休眠/活性化状態を識別する組織学的な解析を行った。

4. 研究成果

（1）血管新生と休眠状態の原始卵胞活性化の関連性

生後0日目の卵巣を培養し、培養液に fetal bovine serum (FBS) を0, 5, 10%の割合で添加した結果、血清濃度依存的に原始卵胞の発育が促進される事が明らかになった（図3）。この結果は血清に含まれる物質の供給量増加が原始卵胞の発育促進に効果がある事を示している。そこで、この結果を *in vivo* レベルで検証するために、VEGFを浸透させた生理活性物質徐放剤をマウス卵巣嚢に移植した。移植後5日目の卵巣を摘出し、免疫組織染色によって卵母細胞内の FOXO3A の局在を調べた。その結果、血管新生の促進によって休眠状態から離脱して発育状態に活性化された原始卵胞の数が有意に増加することが確認された（図4）。

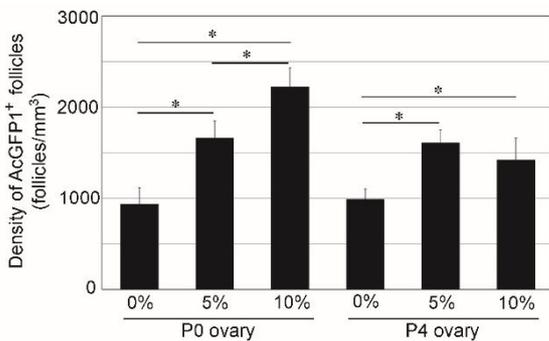


図3 培養卵巣組織中の AcGFP1 陽性卵胞の密度

0%, 5%, 10% FBS で培養した生後0日目（P0）4日目（P4）卵巣内の培養10日における AcGFP1 陽性卵胞（一次卵胞以上の卵胞）の数をカウントし、卵巣内における密度を算出したグラフ。

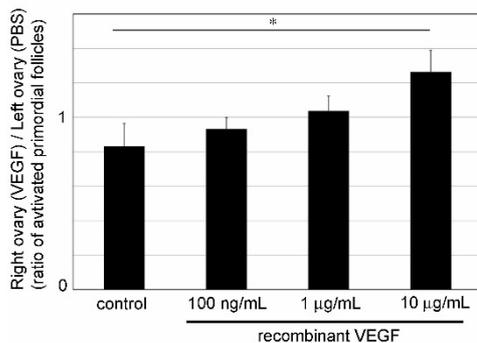


図4 VEGFを含む生理活性物質徐放剤移植後5日目の卵巣における原始卵胞の活性化率

左側卵巣に PBS、右側卵巣に VEGF を浸透させた生理活性物質徐放剤を移植し、5日後の卵巣内の原始卵胞活性化率を FOXO3A の局在を指標として調べたグラフ。コントロール（control）は無処理マウスの左右卵巣における原始卵胞の活性化比率を比較（右卵巣/左卵巣）したものである。

また、生後0日目の培養卵巣組織の培養液中に VEGF を添加しても原始卵胞の発育は促進されなかったことから、*in vivo* レベルでの原始卵胞発育の活性化は血管新生によって促進されたものであると考えられる。VEGF 以外の血管新生誘導因子である bFGF (basic fibroblast growth factor) HGF (hepatocyte growth factor) を生理活性物質徐放剤に浸透させて移植しても、VEGF 同様に原始卵胞の活性化が促進される事を確認している（文献1）。

これらの結果は月経周期に伴って周期的に卵巣内で起こる卵胞発育、排卵後の組織修復、黄体形成といった生理現象によって誘導される血管新生が休眠状態の原始卵胞活性化に重要な役割を果たしている事を示唆している。

（2）17-エストラジオールの原始卵胞発育制御における作用

生後4日目の卵巣を生後0日目の卵巣と同様に FBS 濃度を変えて培養すると、生後0日目の卵巣の結果とは異なり、原始卵胞の発育促進効果が見られなかった（図3）。この原因を調べるために、生後0日目、4日目の卵巣を用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、*stefin A* 遺伝子が生後4日目卵巣において総じて発現上昇している事が明らかになった（図5）。Stefin

A (STFA)は cathepsin という酵素の働きを阻害する事が知られている。原始卵胞では cathepsin、STFA が共に発現している事から、これらの働きを調べるために cathepsin の働きを阻害する薬剤 (cathepsin B, L に対する阻害剤、E-64d) を添加し、生後 4 日目の卵巣を培養した結果、原始卵胞の発育が阻害される事が明らかになった (図 6)。この結果は cathepsin の作用が原始卵胞の発育制御に重要であることを示唆している。

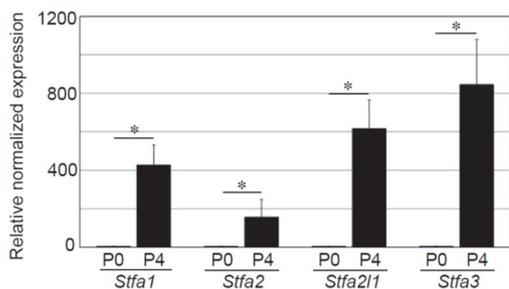


図 5 STFA ホモログ遺伝子の定量的 PCR 生後 0 日目 (P0) 卵巣、生後 4 日目 (P4) 卵巣における STFA ホモログの遺伝子発現を定量的 PCR によって調べたグラフ。

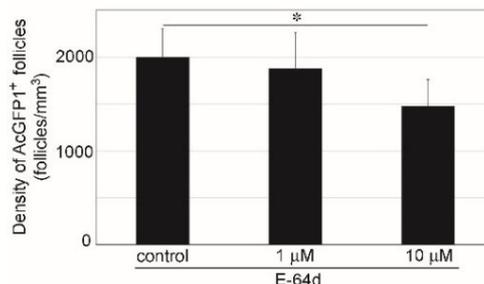


図 6 cathepsin の原始卵胞発育における作用の検証実験

cathepsin B, L に対する阻害剤 E-64d を各濃度で培養液に添加し、生後 4 日目の卵巣を培養。培養 10 日目の培養卵巣組織中における AcGFP1 陽性卵胞の密度を表したグラフ。

原始卵胞にはエストロゲン受容体 (ER α , ER β) が発現しているが、その作用は明らかにされていない。我々はこの点に着目してエストロゲンの原始卵胞における作用を解明するために E2 を培養液に添加し、生後 0 日目の卵巣を培養した。その結果、E2 の濃度依存的に原始卵胞の発育が阻害されることが明らかになった (図 7)。また、エストロゲン受容体のアンタゴニストである ICI を添加して生後 4 日目の卵巣を培養すると原始卵胞の発育が促進されることがわかった。これらの結果は E2 が原始卵胞の発育抑制作用をもっている事を示唆している。生後 4 日目の STFA の発現上昇、E-64d による原始卵胞の発育抑制 (図 6)、E2 による発育抑制 (図 7)、ICI による発育促進、これらの結果から申請者は E2 と STFA の発現の関連性に着目し、実験を行った。その結果、E2 が STFA の発現を制御している事が明らかになった (図 8)。

過去の研究において、原始卵胞周辺の細胞外マトリックスによる物理的圧力が原始卵胞の発育を抑制しているという報告がある (文献 2)。cathepsin B は collagen などの細胞外マトリックスを分解する作用があることが報告されており、原始卵胞にも cathepsin B が局在する事が

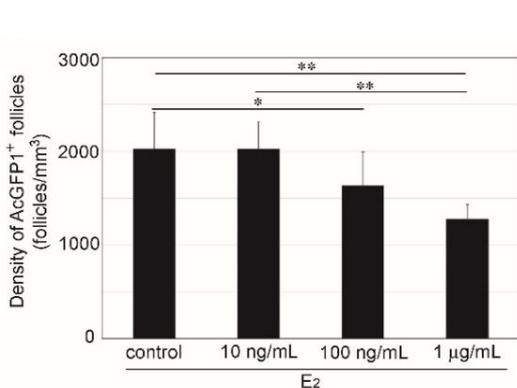


図 7 E2 の原始卵胞発育に対する作用の検証実験

E2 を各濃度で培養液に添加し、生後 0 日目卵巣を培養。培養 10 日目の培養卵巣組織中における AcGFP1 陽性卵胞 (一次卵胞以上の卵胞) の密度を表したグラフ。

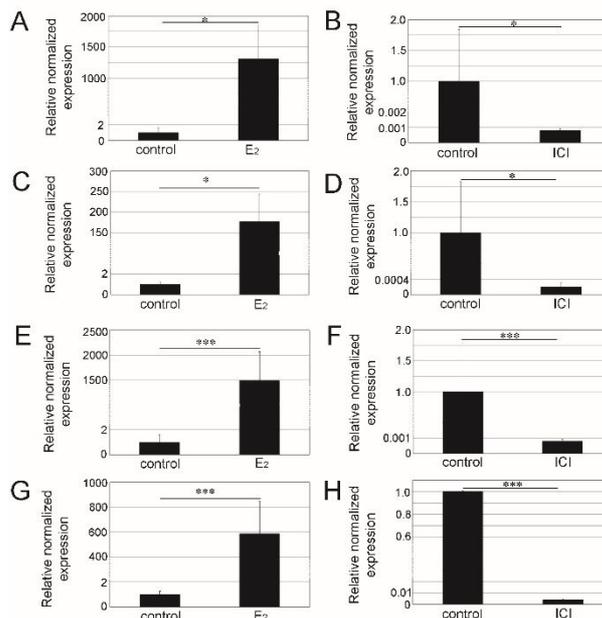


図 8 E2、ICI 添加培養 24 時間後の生後 4 日目卵巣における Stfa 遺伝子発現の定量的 PCR

E2 100 ng/mL (A, C, E and G)、ICI 1 μM (B, D, F, and H) を添加し、生後 4 日目卵巣を 24 時間培養した後、Stfa1 (A, B)、Stfa2 (C, D)、Stfa211 (E, F)、Stfa3 (G, H) mRNA の発現量を定量的 PCR によって調べたグラフ。

報告されている（文献 3）。我々も実験において同様の結果を確認している。これら過去の報告と今回の研究結果をふまえると、「E2 は原始卵胞において STFA の発現を介して cathepsin の活性を調整する作用がある。これによって、E2 は原始卵胞周辺の細胞外マトリックスの分解をコントロールし、発育を制御している」という可能性が考えられる（論文投稿中）。また、これらの結果を *in vivo* で検証するために、エストロゲン受容体アンタゴニストであるタモキシフェンをマウス腹腔内に投与し、検証実験を行った。タモキシフェンは既にトランスジェニックマウスの作製にも用いられており、抗癌剤としても使用されている薬剤であることから、生体内でのエストロゲン阻害効果は実証されている。タモキシフェン投与 24 時間後のマウス卵巣を摘出し、FOXO3A の局在を指標に原始卵胞の活性化率を調べた結果、生体内においてもエストロゲンの作用を阻害する事によって原始卵胞の活性化が促進されていることが明らかになった。タモキシフェン以外にも抗癌剤として臨床で利用されているエストロゲン阻害剤が複数ある事から、今回の結果はエストロゲン阻害剤のドラッグリポジショニングによる新規不妊治療法の開発が可能であることを示唆している。今後、副作用が少なく、より大きな効果が得られるエストロゲン阻害剤の探索と投与方法の検討を行い、新規不妊治療法開発への基盤をつくることを目指して研究を継続していく予定である。

文献

1. Increased supply from blood vessels promotes the activation of dormant primordial follicles in mouse ovaries
Komatsu K, Masubuchi S
Journal of Reproduction and Development. 66(2): 105-113 (2020)
2. Mechanical stress accompanied with nuclear rotation is involved in the dormant state of mouse oocytes
Nagamatsu G, Shimamoto S, Hamazaki N, Nishimura Y, Hayashi K
Science Advances. 5(6): eaav9960 (2019)
3. Degradation of extracellular-matrix protein by human cathepsin B from normal and tumor tissues
Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn KV, Sloane BF.
Biochemical Journal. 282 (Pt1): 273-278 (1992)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 KOMATSU Kouji、MASUBUCHI Satoru	4. 巻 66
2. 論文標題 Increased supply from blood vessels promotes the activation of dormant primordial follicles in mouse ovaries	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 105 ~ 113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2019-091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小松紘司
2. 発表標題 卵巣内における原始卵胞～一次卵胞の発育過程にはマルチステップな発育制御機構が存在する
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松紘司
2. 発表標題 卵巣内で起こる血管新生は休眠状態の原始卵胞を活性化する
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松紘司
2. 発表標題 生理活性物質徐放剤を用いた原始卵胞のin vivo activation
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小松紘司
2. 発表標題 卵母細胞 - 顆粒層細胞間の細胞膜融合による新規結合構造の解析
3. 学会等名 第19回日本生殖工学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松紘司
2. 発表標題 Promoting follicle development by inducing ovarian angiogenesis
3. 学会等名 9th Federation of the Asia and Oceanian Physiological Societies (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------