

平成30年6月26日現在

機関番号：14602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18568

研究課題名(和文) マウス卵巣成長機構における卵巣間質細胞群の生物学的役割

研究課題名(英文) Biological role of mouse ovarian theca/ interstitial cells in the mechanism of follicle growth

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、我々は、マウス卵巣莢膜・間質細胞のRNA-seqやin situ hybridizationでの局在解析などにより、それらの特異的発現遺伝子群を同定し、体系的な機能解析を行うための分子基盤の構築を目指した。Nid1, Spon1は二次卵胞以降の莢膜・間質細胞に、一方、Aspn/ PLAP1は外莢膜細胞において特異的に発現していた。さらに、Aspn/ PLAP1抗体は二次卵胞の成長を完全に抑止した。これらの結果は、莢膜・間質細胞がそれらの機能に基づいて亜集団に分類されること、およびAspn/ PLAP1が二次卵胞成長制御に重要な役割を果たすことを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed transcriptomes of mouse ovarian theca/ interstitial cells by RNA-seq. Gene ontology analysis demonstrated that the theca/ interstitial cell-specific genes were largely categorized into four major groups. The specific and unique expression of newly detected representative genes, including nidogen 1, Spondin 1, and Aspn/ PLAP1, in theca cells and the adjacent interstitial cells of secondary, preantral and antral follicles were also confirmed. Particularly, expression of Aspn/PLAP1 was detected specifically in outer theca cells. Intriguingly, an Aspn/ PLAP1 antibody completely arrested the growth of secondary follicles which is gonadotropin-independent follicle developmental stage. Altogether, these results suggest that theca/ interstitial cells are classified into subpopulations on the basis of their functions, and provide evidence that Aspn/ PLAP1 is expressed exclusively in outer theca cells and plays a pivotal role in the growth of secondary follicles.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：莢膜・間質細胞 RNA-seq 卵巣 卵胞成長 二次卵胞 Aspn/ PLAP1

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。哺乳類卵巣は主として、各成長段階の卵胞(原始～胞状卵胞)と、それらの卵胞の間隙(間質)を埋める間質細胞と間質内の毛細血管網とで構成される。

これまで、卵胞の成長・成熟では卵胞中に存在する顆粒膜細胞と莢膜細胞の役割が知られている。例えば、莢膜細胞は黄体形成ホルモンに反応してアンドロゲンを合成し、顆粒膜細胞は、それを基質として、濾胞刺激ホルモン(FSH)の刺激を受けてエストロゲン(E₂)の合成を行い、卵胞の発育や排卵を促進する(Two-cell two-gonadotropin system)。一方、卵胞外に存在する間質細胞は、卵胞周辺に多数存在するにもかかわらず、その生物学的役割は全く不明である。

これまでの研究で、申請者は、マウス二次卵胞においてペプチドホルモンであるタキキニン(TK)がGTH非依存期の二次卵胞の顆粒膜細胞に直接作用し、JAK/STATおよびMAPKシグナル伝達経路を介してCOX-2の発現を上昇させ、その下流のプロスタグランジン受容体サブタイプを活性化することにより、卵胞成長を促進することを明らかにしている。(平成25年度科研費若手B、課題番号:25840117、論文投稿準備中)。この研究の過程で、申請者は、単離した二次卵胞の成長が間質細胞との共培養によって飛躍的に促進することを見出した。また、二次卵胞以降の卵胞成長時に起こる莢膜細胞層形成時には、莢膜細胞の増殖のみならず、間質細胞が卵胞に遊走し、莢膜細胞層に加入することで莢膜細胞層が形成されること、さらに、膜糖タンパクであるThy-1が莢膜細胞と間質細胞に発現しており、*in vivo*でFSHを投与すると間質細胞での発現が上昇すること、Thy-1特異抗体の投与で二次卵胞の成長が停止することを明らかにした(論文投稿準備中、itami et al. *Biol Reprod* 84, 986-995, 2011)。

以上の申請者らの研究は、間質細胞は、顆粒膜細胞や莢膜細胞とは全く異なるメカニズムで二次卵胞成長・成熟に極めて重要な役割を果たしていることを示唆している。

2. 研究の目的

以上の背景から、申請者は、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析、バイオインフォマティクス解析、分子生物学的手法、組織学的手法や、我々が独自に開発したマウス卵胞の三次元培養法や器官培養法などの内分泌学的手法などを駆使して、(1)卵巣間質細胞特異的に発現している遺伝子の同定、(2)それらの卵巣における間質細胞特異的発現の検証、(3)間質細胞特異的遺伝子産物の生理機能の決定を通じ、卵胞成長・成熟における間質細胞群のこれまで知られていなかった生物学的役割とその分子基盤を体系的に解明することを構想した。

3. 研究の方法

(1) 卵巣間質細胞特異的発現遺伝子の探索 次世代シーケンサーを用いたRNA-seq、 およびバイオインフォマティクス解析

RNA-seqはイルミナ社製のHiSeq™1500を用いて行った。実験には性周期がない3週齢のマウスを用いた。卵巣顆粒膜、間質細胞は申請者所属研究室独自の手法で分離(Itami et al. *Reprod Biol Endocrinol* 9, 159, 2011)し、それぞれ58Mリードのシーケンシングを行った。

RNA-seqで得られたショートリードシーケンスデータをリシーケンスにより解析し、間質細胞特異的遺伝子候補を選抜した。マウスゲノムシーケンス(mm10)へのマッピングとFragment per kilo base per mega reads(FPKM)の評価は、tophat(v2.1.0)-cufflinks(v2.0.10)パイプラインを用いて行った。定量化した発現値の比較解析はGenome jackおよびExcelなどのプログラムを用いて行った。

リアルタイムPCR法による候補遺伝子の再検証

の解析結果で得られた候補遺伝子が本当に間質細胞特異的に発現しているのかどうかを明らかにするために、3週齢マウス卵巣分離顆粒膜細胞、および、間質細胞試料間でのリアルタイムPCR法により発現比較を行った。この時点で、対象遺伝子が間質細胞試料において顆粒膜細胞試料よりも発現が低い場合は、以降の実験対象から除外した。

(2) 間質細胞特異的発現遺伝子もしくは分子の局在解析

(1)の結果から、間質細胞特異的な発現が確定した標的分子について、組織切片を用いて*in situ* hybridization法で各標的分子の局在解析を行い、この結果から最終的な間質特異的発現分子を決定した。

(3) 間質細胞特異的に発現している分子の作用解析

間質細胞特異的発現遺伝子のパスウェイ解析

(2)で間質細胞特異的な発現が確定した遺伝子を元に、遺伝子オントロジーエンリッチメント解析(GO解析)、およびパスウェイ解析ツールでの解析結果や既知の文献情報を基にこれらの分子経路を予測し、「形態変化・分化」「移動」「増殖」などの生理機能を絞り込んだ。

マウス卵巣、および、二次卵胞培養系による間質細胞特異的発現分子の生理機能解析

のパスウェイ解析の結果に従い、卵巣、および二次卵胞の培養系を用い、標的分子のアゴニスト、アンタゴニスト、経路の各種阻害剤などを投与し、生理機能解析を行った。

二次卵胞の成長、形態変化、莢膜細胞層への間質細胞の遊走・加入を含む、間質細胞の

移動などは三次元培養法（間質細胞との共培養系）を用いて明らかにした (Itami et al. *Reprod Biol Endocrinol* 9, 159, 2011)。

4. 研究成果

(1) 卵巣間質細胞特異的発現遺伝子の探索

次世代シーケンサーを用いた RNA-seq、およびバイオフィンフォーマティクス解析

ショートリード全体の 80.98% がゲノム上にマップでき、そのうち、12000 遺伝子の FPKM 値が 0.1 より高かった。それらの中の 258 遺伝子が間質細胞において、顆粒膜細胞と比較して、2 倍以上の発現レベルであった。

リアルタイム PCR 法による候補遺伝子の再検証

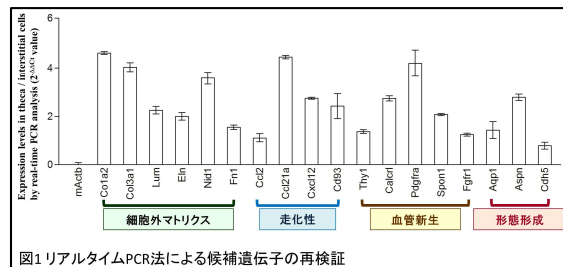


図1 リアルタイムPCR法による候補遺伝子の再検証

の解析結果で得られた候補遺伝子が本当に間質細胞特異的に発現しているのかどうかを明らかにするために、顆粒膜細胞、および、間質細胞試料間でのリアルタイム PCR 法による発現比較を行った。この時点で、対象遺伝子が間質細胞試料において顆粒膜細胞試料よりも発現が低い場合は、以降の実験対象から除外した。リアルタイム PCR 解析から、FPKM 値の高い遺伝子の中から選択した 19 の遺伝子が間質細胞で顕著に発現していた (図 1)。GO 解析の結果、これらの遺伝子は細胞外マトリクス、走化性、血管新生、形態形成の 4 つの主要なグループに分類された。

(2) 間質細胞特異的発現遺伝子もしくは分子の局在解析

間質特異的発現遺伝子もしくは分子の決定

次世代シーケンサーを用いた RNA-seq によるトランスクリプトーム解析とリアルタイム PCR 解析の結果から絞り込んだ 19 の間質細胞特異的発現遺伝子の候補について、3 週齢のマウスを用いた *in situ hybridization* 法で卵巣における局在解析を行った。その結果、*Nid1*, *Col3a1*, *Spon1*, *Aspn/PLAP1* の 4 遺伝子が間質細胞で発現していたものの、間質細胞特異的ではなく、同時に莢膜細胞にも発現していることが明らかになった。これらの結果から、卵巣内の莢膜細胞群と間質細胞群は非常に近い細胞集団であることが示唆された。以降、本研究では、莢膜・間質細胞群を標的として実験を進めた。

莢膜・間質細胞特異的遺伝子の発現パターン解析

で行った局在解析の結果、*Nid1*, *Col3a1*, *Spon1*, *Aspn/PLAP1* の 4 遺伝子は、いずれも、二次卵胞以降の莢膜・間質細胞に発現してい

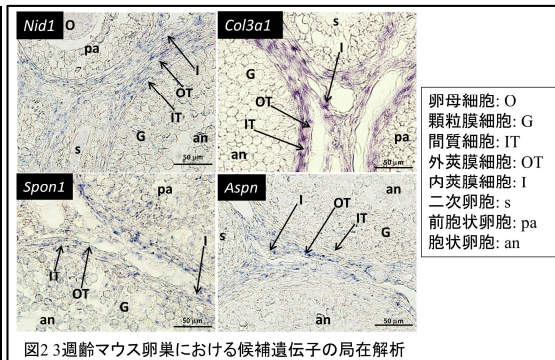


図2 3週齢マウス卵巣における候補遺伝子の局在解析

た。しかしながら、その発現の強弱やパターンは様ではなく、*Nid1*, *Col3a1*, *Spon1* が内莢膜細胞、外莢膜細胞、間質細胞のいずれにおいても発現していたのに対して、*Aspn/PLAP1* は外莢膜細胞と間質細胞には発現していたものの、内莢膜細胞には発現していないことが明らかになった (図 2)。以上の結果から、莢膜・間質細胞群は単一の機能をもった細胞のみで構成されているのではなく、幾つかの固有の機能を有する複数種の細胞で構成されている可能性が示唆された。

3) 間質細胞特異的に発現している分子の作用解析

間質細胞特異的発現遺伝子のパスウェイ解析

In situ hybridization 法による局在解析で莢膜・間質細胞特異的な発現が確定した *Nid1*, *Col3a1*, *Spon1*, *Aspn/PLAP1* の 4 遺伝子について、GO 解析、およびパスウェイ解析ツールでの解析結果や既知の文献情報を基にこれらの分子経路を予測した。その結果、*Nid1*, *Col3a1* は細胞外マトリクスの形成や細胞接着などに関わること、*Spon1* は細胞の分化や血管形成に、*Aspn/PLAP1* は細胞増殖や形態形成の制御に関わることがそれぞれ予測された。

マウス卵巣、および、卵胞培養系による莢膜・間質細胞特異的発現分子の生理機能解析

の結果

を基に、卵巣および二次卵胞の培養系において特異抗体を用いて標的分子の活性を阻害することで生理機能解析を行った。

その結果、三次元卵胞培養系において *Spon1* 抗体処理により莢膜細胞層の形成が阻害された。また *Aspn/PLAP1* 抗体処理では莢膜細胞層の形成と卵胞成長がほぼ完全に阻害され、それらの中の約 30% の卵胞が収縮した (図 3)。*Aspn/PLAP1* は TGF- β 1 および BMP-2 に結合し、内因性阻害分子として機能することが知られている。そこで *Aspn/PLAP1* による卵胞成長制御が TGF- β / BMP シグナル伝達

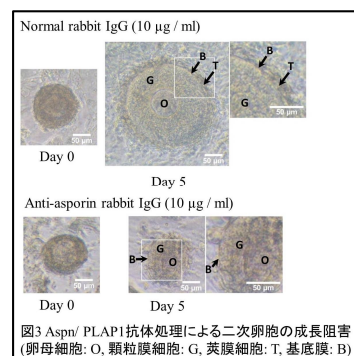
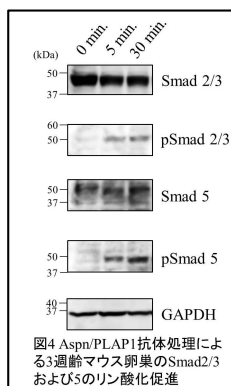


図3 *Aspn/PLAP1* 抗体処理による二次卵胞の成長阻害 (卵母細胞: O, 顆粒膜細胞: G, 莢膜細胞: T, 基底膜: B)

経路を介するか否かを明らかにするために、Aspn/ PLAP1 抗体処理卵巣抽出試料の p-Smad2/3 および p-Smad1/5/9 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、Aspn の阻害により Smad2/3 および Smad5 のリン酸化が促進されたことから、Aspn/ PLAP1 は TGF- β 1/ BMP シグナル伝達経路を阻害することで卵巣成長制御において重要な役割を果たしていることが示唆された (図 4)。



以上の結果から、我々は莖膜・間質細胞がそれらの機能に基づいて幾つかの亜集団に分類されること、および Aspn/ PLAP1 が二次卵巣成長制御に重要な役割を果たすことを明らかにした。

その他の莖膜・間質細胞特異的発現分子の機能解析に関しては、現在遂行中である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) 「ゴナドトロピン非依存段階における新規卵巣成長機構」青山雅人 第42回日本比較内分泌学会大会、大会実行委員会主催シンポジウム、2017年11月18日(招待講演)
- 2) 青山雅人、白石慧、堀江郁、大杉知裕、奥田利美、安田恵子、佐竹炎
トランスクリプトーム解析によるマウス卵巣莖膜・間質細胞特異的発現遺伝子の同定
日本動物学会第 88 回富山大会 2017(富山) 2017 年 9 月 21 - 23 日
- 3) Aoyama M, Shiraishi A, Horie K, Osugi T, Yasuda K, Satake H.
Identification of mouse ovarian theca/interstitial cell-specific genes by transcriptome analysis

18th International Congress of Comparative Endocrinology (ICCE18), June 4-9, 2017, Alberta, Canada

- 4) 青山雅人、白石慧、堀江郁、大杉知裕、安田恵子、佐竹炎
トランスクリプトーム解析によるマウス卵巣莖膜・間質細胞特異的発現遺伝子の同定

第 41 回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム(神奈川) 2016 年 12 月 9 - 11 日

- 5) Aoyama M, Shiraishi A, Horie K, Osugi T, Yasuda K, Satake H.

Identification of mouse ovarian interstitial cell-specific genes by transcriptome analysis

日本動物学会第 87 回沖縄大会 2016(沖縄) 2016 年 11 月 17 - 19

- 6) Aoyama M, Shiraishi A, Horie K, Yashda K, Satake H.

Identification of mouse ovarian interstitial cell-specific genes by transcriptome analysis

The 8th Congress of Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE), June 20-24, 2016, Seoul, Korea

〔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

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：

(4)研究協力者

()