

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11214

研究課題名(和文) 卵巣顆粒膜細胞分化におけるプロスタグランジンD2の役割解明

研究課題名(英文) Role of prostaglandin D2 in the differentiation of ovarian granulosa cells

研究代表者

今道 力敬 (Imamichi, Yoshitaka)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：00570194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：プロスタノイドの中でもプロスタグランジン(PG)E2およびPGF2は、正常な卵巣機能を果たすために重要な脂質メディエーターとして知られる。卵巣形成・機能に必須な転写因子であるsteroidogenic factor-1を卵巣顆粒膜細胞に過剰発現させると、リボカリン型PGD合成酵素L-PGDSの遺伝子発現が亢進した。そこで本研究では、卵巣顆粒膜細胞におけるPGD2の役割解明を目指した。その結果、L-PGDSの発現はマウス卵巣の黄体化によって亢進され、産生されたPGD2はアルドケト還元酵素(AKR1CL)を介することで黄体機能に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロスタグランジン(PG)E2およびPGF2は、ステロイドホルモン合成、排卵、卵丘細胞の膨潤や黄体退縮などに関与することが解明されてきたが、卵巣におけるPGD2の役割はそのほとんどが不明であった。我々は、マウス卵巣の黄体化に伴い、PGD2合成・代謝に関与するL-PGDSとAKR1CLの遺伝子発現が亢進すること、さらにL-PGDSとAKR1CLの両者が卵巣形成に必須の転写因子SF-1に制御されることを見出した。本研究結果は、黄体の形成、維持および退縮の機序解明につながり、得られた知見は黄体機能不全の原因究明と治療法の開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Among prostanoids including the prostaglandins (PGs) and the thromboxanes, PGE2 and PGF2 are the pivotal lipid mediators for normal ovarian functions. We found that the expression of the lipocalin-type PGD synthase (L-PGDS) was up-regulated in ovarian granulosa cells by the overexpression of the transcription factor steroidogenic factor-1, which is essential for ovarian development and function. In this study, we attempted to clarify the roles of PGD2 in ovarian granulosa cells. The expression of L-PGDS was increased in the luteinized mouse ovary. We also found that the expression of an aldo-keto reductase (AKR1CL) which catalyzes the conversion of prostaglandins was increased in the luteinized mouse ovary. These results suggested that the ovarian PGD2 exerts functions in luteal phase via conversion by AKR1CL.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：prostaglandin D2 ovary

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

排卵や黄体形成には、FSH による原始卵胞から排卵期卵胞に至る卵胞の成熟、LH サージによる卵胞での排卵関連因子の発現誘導、顆粒膜細胞の黄体細胞への分化誘導が伴う。これらの現象は、卵胞を構成する卵巣顆粒膜細胞の増殖・分化に依存するため、その調節機構の詳細の解明は、排卵障害や黄体機能不全の原因解明の鍵となる。卵巣では、核内受容体 NR5A ファミリーに属する転写因子 steroidogenic factor-1 (SF-1) および liver receptor homolog-1 (LRH-1) がステロイドホルモン合成酵素や細胞増殖因子など顆粒膜細胞の分化に必須な因子の遺伝子を転写制御している。実際、SF-1 および LRH-1 の顆粒膜細胞特異的ノックアウトマウスは、排卵障害や黄体形成不全の表現型を示すことが報告されており、これらの転写因子が顆粒膜細胞の分化に必須であることを裏付けている。我々は、卵巣顆粒膜由来細胞株である KGN 細胞に SF-1 あるいは LRH-1 を導入し、それらの導入に伴う遺伝子発現変化をマイクロアレイ法により網羅的に解析した。その結果、SF-1 および LRH-1 の導入により、卵巣での機能が既知であるプロスタグランジン (PG) E 合成酵素 (PGES) のみならず、リポカリン型 PGD 合成酵素 (L-PGDS) の遺伝子発現が誘導されることを見出した。

2. 研究の目的

PG の作用は、各 PG に特異的な受容体を介して発揮される。これまで、卵巣における PG の重要な役割として、PGE₂ が EP2 受容体を介して卵子・卵丘細胞複合体の卵丘細胞層の膨潤を引き起こし、排卵を惹起すること、PGF₂ が黄体細胞の FP 受容体を介して黄体退縮を引き起こすことが明らかとなっている。しかし、現在に至るまで、PGD₂ の卵巣における役割は、そのほとんどが不明のまま残されていた。そこで本研究では、卵巣顆粒膜細胞分化における PGD₂ の役割の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 卵巣における PGD₂ 合成酵素群の発現解析

野生型の未成熟雌マウスに妊馬血清ゴナドトロピン (PMSG) およびヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) を投与し、経時的に卵巣における PG 合成酵素および PG 受容体 (COX-1、COX-2、L-PGDS、H-PGDS、PTGDR、PTGFR など) の遺伝子発現を TaqMan リアルタイム PCR 法により解析した。

(2) 卵巣顆粒膜細胞における PGD₂ の作用の検討

ヒト卵巣顆粒膜細胞由来 KGN 細胞の培養系に対し、DP 受容体アゴニストを添加し、PG 合成酵素、PG 受容体遺伝子およびステロイドホルモン合成酵素 (STAR、CYP17 および CYP19A1) の遺伝子発現変化を解析した。さらに、マウス卵巣顆粒膜細胞の初代培養系を用いて PGD₂ の作用を検討した。マウス初代卵巣顆粒膜細胞を回収するために、野生型の未成熟雌マウスに 4 日間連続して DES を投与した。はじめに PG 合成酵素および PG 受容体に対する DES 投与の影響を調べた。雌マウスに DES 投与後、経時的に卵巣を回収し、PG 合成酵素および PG 受容体の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法により解析した。続いて、野生型マウス卵巣顆粒膜細胞初代培養系を用い、ステロイドホルモン合成酵素の遺伝子発現に対する PGD₂ の作用を検討した。

(3) DP 受容体欠損マウスを用いた解析

DP 受容体欠損マウスの成熟した雄マウス 1 匹に対し、8 週齢の雌マウス 2 匹を交配させ、産仔数を計測し、野生型マウスと比較した。野生型マウスおよび DP 受容体欠損マウスの雌に対し PMSG および hCG による過排卵処理を行い、排卵された卵子数を測定した。

(4) アルドケト還元酵素 AKR1CL 遺伝子の発現解析および転写解析

上述した PMSG および hCG 投与したマウス卵巣 cDNA を用いて AKR1CL の遺伝子発現変化をリアルタイム法により解析した。AKR1CL の転写調節機構については、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) および 293 細胞を用いたレポーターアッセイにより解析した。

4. 研究成果

(1) マウス卵巣における PGD₂ 合成酵素および PG 受容体の発現変化

未成熟マウスに PMSG および hCG を投与し、卵巣の成熟および黄体化の各段階における遺伝子発現を調べた。L-PGDS は投与前と比較し、PMSG 投与 24 時間後に一時的に低下するが、hCG 投与後に発現が上昇し、hCG 投与後 96 時間後に最も高発現していた。DP 受容体は、投与前に高発現しており、PMSG 投与および hCG 投与により発現が低下した。これらの結果から、L-PGDS は未成熟卵胞および黄体で発現すること、DP 受容体は未成熟卵胞で高発現することが示唆された。

(2) 卵巣顆粒膜細胞における PGD₂ の作用

卵巣顆粒膜細胞由来の KGN 細胞を培養し、DP 受容体アゴニスト添加後の遺伝子発現変化を解析したところ、濃度依存的にステロイド合成遺伝子の発現を上昇させた。

マウス卵巣顆粒膜細胞の初代培養のための予備検討として、DES 投与による卵巣の PG 合成酵素および PG 受容体遺伝子の発現への影響を検討した。その結果、DES は L-PGDS および DP 受容体の遺伝子発現に影響を与えなかった。そこでマウス卵巣顆粒膜細胞を初代培養し、DP 受容体アゴニストの作用を検討したところ、ステロイドホルモン合成遺伝子 (CYP17 および CYP19A1) の発現を上昇させた。以上の結果より、卵巣顆粒膜細胞において PGD₂ は、ステロイドホルモン合成に関与する可能性が示唆された。

(3) DP 受容体欠損マウスを用いた解析

DP 受容体欠損マウス交配後の産仔数を野生型マウスと比較したところ、有意な産仔数の増減を認めなかった。排卵数においても有意な差を認めなかった。

(4) アルドケト還元酵素 AKR1CL の卵巣における発現および転写機構の解析

L-PGDS は黄体化により発現が亢進するが、DP 受容体は発現が低下していた。そのため、黄体における PGD₂ の DP 受容体を介さない役割を明らかにするために、AKR1CL 遺伝子に注目し検討した。アルドケト還元酵素である AKR1CL はマウスゲノム上で発見された遺伝子であるが、最近 PGD₂ から 9,11-PGF₂ への合成能をもつことが報告された。そこで、卵巣における AKR1CL の発現変化を調べたところ、hCG 投与 96 時間後に高発現していた (図 1A)。9,11-PGF₂ の受容体である FP 受容体も hCG 投与 96 時間に高発現していた。さらに、培養細胞への遺伝子導入実験により、AKR1CL の遺伝子発現は SF-1 導入により亢進されることがわかった。そこで、AKR1CL プロモーターを用いてルシフェラーゼレポーターアッセイによる転写解析を行った。ルシフェ

ラーゼレポーターアッセイの結果より、AKR1CL 転写開始点より上流約 300p の領域に SF-1 に転写活性化される領域が存在することが示唆された（図 1B）。以上の結果により、卵巣において、SF-1 が AKR1CL の発現を誘導すること、また PGD₂ は黄体において AKR1CL により 9,11-PGF₂ へと変換され、FP 受容体に作用する可能性が示唆された。

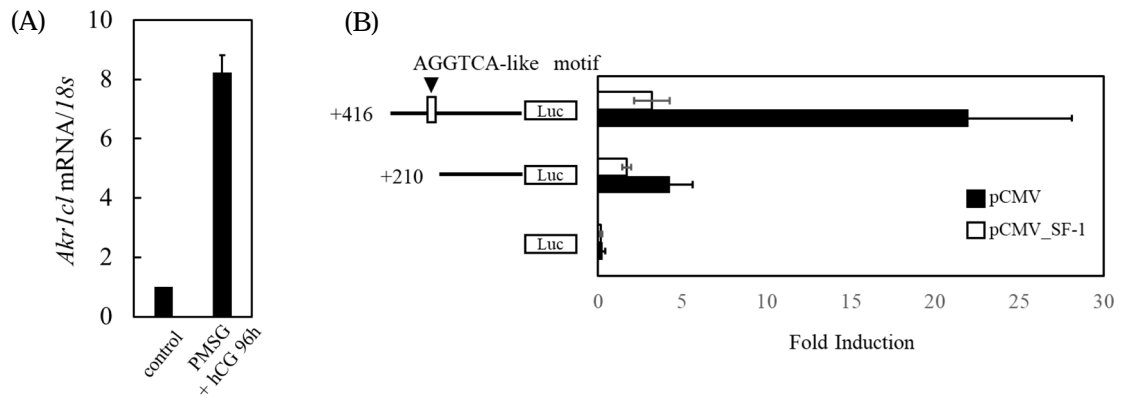


図1 ゴナドトロピン投与による AKR1CL 遺伝子の発現変化 (A) および SF-1 による AKR1CL 遺伝子の転写活性の促進 (B)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yazawa T, Imamichi Y, Sekiguchi T, Miyamoto K, Uwada J, Khan RI, Suzuki N, Umezawa A, Taniguchi T	4. 巻 2019
2. 論文標題 Transcriptional Regulation of Ovarian Steroidogenic Genes: Recent Findings Obtained from Stem Cell-Derived Steroidogenic Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 2314-6141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/8973076	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 -
1. 著者名 Yazawa T, Imamichi Y, Yuhki K, Uwada J, Mikami D, Shimada M, Miyamoto K, Kitano T, Takahashi S, Sekiguchi T, Suzuk N, Khan RI, Ushikubi F, Umezawa A, Taniguchi T	4. 巻 86
2. 論文標題 Cyclooxygenase 2 is acutely induced by CCAAT/enhancer binding protein to produce prostaglandin E 2 and F 2 following gonadotropin stimulation in Leydig cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 786-797
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mrd.23163	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kashiwagi H, Yuhki K, Imamichi Y, Kojima F, Kumei S, Tasaki Y, Narumiya S, Ushikubi F	4. 巻 119
2. 論文標題 Prostaglandin F2 Facilitates Platelet Activation by Acting on Prostaglandin E2 Receptor Subtype EP3 and Thromboxane A2 Receptor TP in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thrombosis and haemostasis	6. 最初と最後の頁 1311-1320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0039-1688906	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yazawa T, Imamichi Y, Uwada J, Sekiguchi T, Mikami D, Kitano T, Ida T, Sato T, Nemoto T, Nagata S, Islam Khan MR, Takahashi S, Ushikubi F, Suzuki N, Umezawa A, Taniguchi T	4. 巻 196
2. 論文標題 Evaluation of 17 -hydroxysteroid dehydrogenase activity using androgen receptor-mediated transactivation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of steroid biochemistry and molecular biology	6. 最初と最後の頁 105493-105499
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jsbmb.2019.105493.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 矢澤隆志、北野健、今道力敬	4. 巻 37
2. 論文標題 ステロイドホルモンと性スペクトラム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1442 - 1446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34297/AJBSR	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yazawa T, Imamichi Y, Sekiguchi T, Miyamoto K, Uwada J, Khan M.R.I. Islam, Suzuki N, Umezawa A, Taniguchi T	4. 巻 2019
2. 論文標題 Transcriptional Regulation of Ovarian Steroidogenic Genes: Recent Findings Obtained from Stem Cell-Derived Steroidogenic Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1155/2019/8973076	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 -

1. 著者名 Kashiwagi H, Yuhki K, Imamichi Y, Kojima F, Kumei S, Narumiya S, Ushikubi F	4. 巻 2
2. 論文標題 Roles of prostanoids in the regulation of platelet function.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Thrombosis & Haemostasis: Research	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Imamichi Y, Sekiguchi T, Kitano T, Kajitani T, Okada R, Inaoka Y, Miyamoto K, Uwada J, Takahashi S, Nemoto T, Mano A, Khan MRI, Islam MT, Yuhki KI, Kashiwagi H, Ushikubi F, Suzuki N, Taniguchi T, Yazawa T.	4. 巻 7
2. 論文標題 Diethylstilbestrol administration inhibits theca cell androgen and granulosa cell estrogen production in immature rat ovary	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-08780-7	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢澤隆志, 今道力敬
2. 発表標題 精巢・ライディッヒ細胞における COX-2 の転写調節機構
3. 学会等名 日本動物学会 北海道支部 第63回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢澤隆志、今道力敬、宇和田淳介、谷口隆信
2. 発表標題 DESによる幼若ラット卵巣のステロイドホルモン産生の抑制
3. 学会等名 第89回 日本動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今道力敬、矢澤隆志
2. 発表標題 第3回ペプチド・ホルモン研究会シンポジウム ~多様な動物種における普遍および特異な内分泌現象の解明~
3. 学会等名 日本動物学会 第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢澤隆志, 今道力敬, 宮本薫, 宇和田淳介, 谷口隆信
2. 発表標題 DES投与が幼若ラット卵巣のステロイドホルモン合成に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第91回 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yazawa Takashi, Imamichi Yoshitaka, Uwada Junsuke, Taniguchi Takanobu
2. 発表標題 Analysis of steroidogenic pathway using stem cell-derived steroidogenic cells
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今道力敬
2. 発表標題 Diethylstilbesterolは卵巣ステロイド合成を抑制する
3. 学会等名 第8回ペプチド・ホルモン研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 矢澤 隆志, 今道 力敬, 宇和田 淳介, 谷口 隆信
2. 発表標題 哺乳類における11-ケトテストステロン産生
3. 学会等名 日本動物学会 第88回富山大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 矢澤隆志、今道力敬
2. 発表標題 DES投与が幼若ラット卵巣のステロイドホルモン産生に及ぼす影響
3. 学会等名 日本動物学会北海道支部第62回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 矢澤 隆志, 今道 力敬, 宮本 薫, 谷口 隆信
2. 発表標題 幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の分化誘導
3. 学会等名 第90回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今道 力敬, 結城 幸一, 折坂 誠, 北野 健, 向井 邦晃, 牛首 文隆, 谷口 隆信, 梅澤 明弘, 宮本 薫, 矢澤 隆志
2. 発表標題 11-ケトテストステロンはエストロゲンへと変換されないアンドロゲンとして機能する
3. 学会等名 第90回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2017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