

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05940

研究課題名(和文) 卵巣における核内受容体FXRの機能解明

研究課題名(英文) Elucidation of FXR function in the ovary

研究代表者

富岡 郁夫 (Tomioka, Ikuo)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：30528196

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)：核内受容体 FXRは代謝制御の主要因子として、肝臓や腸における存在・機能が注目されてきた。このFXRが生殖器にも発現しているが、その機能は全くの不明であった。そこで本研究は、生殖器におけるFXRの機能解明を目的とした。FXRの機能を解明するため、遺伝子編集技術を用いてFXRノックアウト(FXR-KO)マウスを作出し、表現型解析をおこなった。その結果、FXR-KOメスマウスは、野生型マウスに比べ排卵数や血中エストラジオール濃度、顆粒層細胞のエストラジオール合成関連酵素の遺伝子発現が有意に高かった。FXRは性ホルモン合成に関与する遺伝子群を抑制制御し、排卵数を抑えている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果より、FXRは性ホルモン合成に関与する遺伝子群を抑制し、排卵数を抑えている可能性が示された。これまで生殖機能に関与しないとして知られていたFXRであるが、独自に作製したFXR-KOマウスの知見から、FXRは性ホルモン合成に大きく関与していることが示された。食から始まる代謝シグナルと生殖現象は密接に関連しており、その仲介因子がFXRであることを証明できれば、卵胞発育や排卵メカニズムの解明といった基礎研究にとどまらず、卵巣関連疾患の新たな治療法開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：FXR mainly existed in metabolic organs and regulates the cholesterol, lipid, and the glucose homeostasis. FXR had been revealed to be expressing in the ovary. However, the functions and the precise molecular mechanism of FXR in ovary remain still unknown. In this study, we investigated the functions of FXR and its target genes in the ovarian granulosa cells. To elucidate the function of FXR in the ovary, we generated FXR knockout (FXR-KO) mice using gene editing technology and performed phenotypic analysis. The results showed that FXR-KO female mice had significantly higher ovulation number, blood estradiol concentration, and gene expression of estradiol synthesis-related enzymes in granulosa cells than wild-type mice, suggesting that FXR suppresses ovulation number by repressing and regulating genes involved in sex hormone synthesis.

研究分野：動物生殖学

キーワード：FXR 性ホルモン ノックアウトマウス

## 1. 研究開始当初の背景

FXR は胆汁酸をリガンドとする核内受容体で、肝臓で胆汁酸濃度が上昇すると FXR が SHP(small heterodimer partner)を介して胆汁酸合成酵素 (CYP7A1) を発現抑制し、胆汁酸合成を阻害する。腸では FXR により発現誘導された胆汁酸輸送タンパク FABP6 (fatty acid binding protein 6)が、胆汁酸を細胞内から血管へと運び、95%の胆汁酸は再び肝臓へ戻り再利用され、残り 5%が全身循環する。FXR ノックアウトマウスでは血中および肝臓のコレステロールや中性脂肪量が増加し、インスリン抵抗性を呈し糖代謝異常も見られたことから、FXR はコレステロール・脂質・糖の代謝を制御していることが明らかとなっている。

このように肝臓や腸における存在・機能が注目されてきた FXR であるが、我々は早くから FXR とそのターゲット遺伝子が卵巣にも存在することを見出しており、最近ではヒト・ウシの卵胞液で胆汁酸が高濃度に蓄積されていることや FXR のターゲット遺伝子である FABP6 ノックアウトマウスでは排卵数が顕著に減少することなど、卵巣における FXR の重要性を連想させる論文が続々と報告された。現在、卵巣における FXR や胆汁酸の機能に関しては全くの不明であるが、生殖と FXR カスケードが密接に関連し、卵巣機能に対して重要な役割を担っていることが予想された。実際、我々はこれまでの *in vitro* 実験から、卵巣の FXR が自身のターゲット遺伝子を介してホルモン合成に関与することを明らかにしてきた。

近年、ウシの生産現場において顕著な受胎率低下が喫緊の課題となっている。人工授精後の受胎率は 1990 年代に約 60%であったのに対し、2010 年では 45%以下と顕著に低下しており、一因として、高カロリー・高コレステロール食である濃厚飼料給与量の増加との関連が疑われている。乳量・乳質・肉質を重視した飼養管理形態への変化により、粗飼料給与量は低下し濃厚飼料給与量が増加しており、実際、乳用牛の濃厚飼料給与量は 1970 年代の約 20%から、2010 年には約 50%に増加している。このようにウシにおける食餌成分と受胎率の関係は統計解析上、極めて有意であるものの、その因果関係については明確でない。加えて、ヒトにおいて肥満や高コレステロール症が排卵不全や生理不順などの卵巣機能障害を引き起こすことが知られており、食の欧米化が進む現在の日本ではその患者数が増加し続けている。一因として卵巣におけるインスリン抵抗性が挙げられているが、その詳細な誘発メカニズムもまた不明である。食から始まる代謝シグナルが生殖現象に関与していることは容易に想像でき、生活習慣病が卵巣機能障害に関与していることは明らかであったが、現在、それを説明できる因子や分子メカニズムは不明である。一方で、筋肉と肝臓では FXR の機能低下がインスリン抵抗性を惹起することが知られており、卵巣におけるインスリン抵抗性にも FXR が関与している可能性がある。また、欧米の妊婦で高頻度に発症する妊娠期胆汁うっ滞(ICP)は、妊娠ホルモンであるプロゲステロンの代謝産物が肝臓 FXR の機能を阻害し引き起こされることや、男性ホルモンの一種であるアンドロステロンが FXR のリガンドであるなど、FXR と生殖生理機能の関連を示すヒントは多い。

## 2. 研究の目的

そこで本研究は、FXR が性ホルモン合成や卵胞発育、排卵や妊娠維持などの卵巣生理機能に不可欠の因子であるとの仮説を立て、卵巣における FXR の機能解明を目的とした。本研究は、代謝主要因子である FXR が生殖現象に関与しているという新たな視点から切り込むものである。

## 3. 研究の方法

ICR より受精卵を採取し、遺伝子編集技術を用いて FXR ノックアウト (FXR-KO) マウスを作製し、雌雄の野生型と FXR-KO マウスを用いて、以下の実験を実施した。

- ① 未成熟の野生型および FXR-KO マウス精巣よりライディッチ細胞を採取し、24 時間培養後の培養上清中のテストステロン量を計測した。
- ② 野生型および FXR-KO 雄マウスの血清を採取し、血中テストステロン濃度を測定した。
- ③ 野生型および FXR-KO マウス精巣よりライディッチ細胞を採取し、性ホルモン合成関連遺伝子の発現量を調べた。
- ④ 野生型および FXR-KO マウス精巣よりライディッチ細胞を採取し、通常培地とライディッチ細胞培養上清で培養した。
- ⑤ 未成熟の野生型および FXR-KO 雌マウスに過排卵処理をおこない、排卵卵子数を計数・比較した。
- ⑥ 野生型および FXR-KO 雌マウスの血清を採取し、血中エストラジール濃度を測定した。

- ⑦ 野生型および FXR-KO 雌マウスの排卵過程における性ホルモン合成関連遺伝子群および性ホルモン受容体関連遺伝子群の発現を調べるため、PMSG 投与後 0 時間、24 時間、および 48 時間で卵胞顆粒層細胞を採取・培養し、性ホルモン合成関連遺伝子群の発現量を調べた。
- ⑧ 卵胞顆粒層細胞より RNA を採取し、マイクロアレイ解析を実施した。

#### 4. 研究成果

これまで *in vitro* の研究結果から、FXR が生殖機能に関与することを明らかにしてきたが、生体内の複雑系における FXR の機能を解明するため、遺伝子編集技術を用いて FXR-KO マウスを作出し、表現型解析をおこなった。その結果、以下の成果を得た。

- ① ライディッチ細胞培養上清中のテストステロン量を測定した結果、野生型マウスに比べ、FXR-KO マウスで有意に高かった。
- ② hCG 投与後 12 時間の血中テストステロン濃度は、野生型マウスに比べ、FXR-KO マウスで大幅に高かった。
- ③ ライディッチ細胞の遺伝子発現解析の結果、FXR-KO マウスでテストステロン合成遺伝子である StAR, CYP11a1, HSD3b, および CYP17a1 の発現が有意に上昇していた。
- ④ 野生型マウスライディッチ細胞は、通常培地と比較して、培養上清で培養すると StAR の発現量が低下するが、FXR-KO マウスライディッチ細胞は、培養上清で培養しても StAR の発現量は低下しなかった。
- ⑤ 未成熟 FXR-KO メスマウスに過排卵処理すると、野生型マウスに比べ採卵数が有意に増えることが示された。
- ⑥ PMSG 投与後 24 時間の血中エストラジオール濃度は、野生型マウスに比べ、FXR-KO マウスで大幅に高かった。
- ⑦ PMSG 投与後 24 時間の FXR-KO マウスの顆粒層細胞において、エストラジオール合成関連酵素が野生型マウスと比べ有意に高いことを見出した。
- ⑧ PMSG 投与後 24 時間の FXR-KO マウスの顆粒層細胞より RNA を抽出し、マイクロアレイ解析した結果、FXR-KO マウスの卵胞は野生型より発育段階が進んでいることが示された。

①～③の結果より、雄マウス精巣において、FXR は性ホルモン合成関連遺伝子群の発現を抑制し、テストステロン合成を抑制制御していることが示された。さらに、FXR はライディッチ細胞から産生される性ホルモンやその代謝産物をリガンドとして活性化し、StAR の遺伝子発現を抑制している可能性が示された。

④～⑦の研究より、雌マウス卵巣において、FXR は性ホルモン合成に関与する遺伝子群を抑制し、排卵数を抑えている可能性が示された。その詳細な分子メカニズムの解明が今後の課題である。

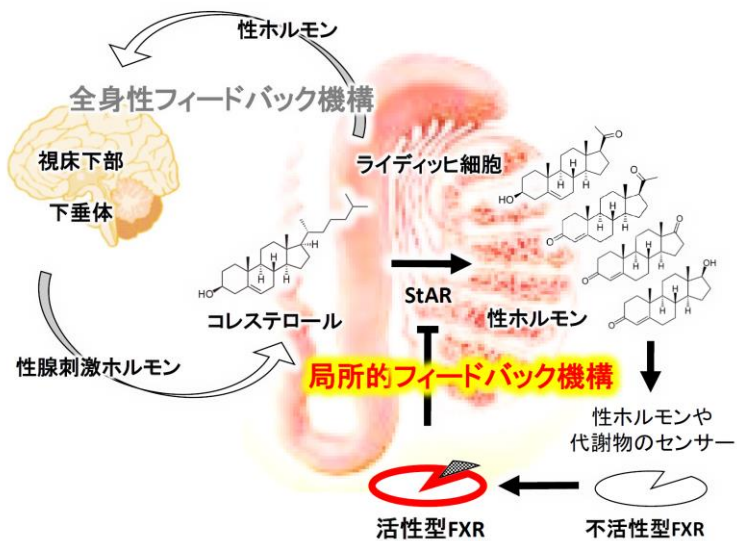


図. 雄マウス精巣における FXR 機能の推定メカニズム

#### 5. まとめ

これまで生殖機能に関与しないとして知られていた FXR であるが、独自に作製した FXR-KO マウスの知見から、FXR は性ホルモン合成に大きく関与していることが示された。食から始まる代謝シグナルと生殖現象は密接に関連しており、その仲介因子が FXR であることを証明できれば、卵胞発育や排卵メカニズムの解明といった基礎研究にとどまらず、卵巣関連疾患の新たな治療法開発に繋がる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Watanabe Toshiaki, Yamazaki Shun, Yoneda Nao, Shinohara Haruka, Tomioka Ikuo, Higuchi Yuichiro, Yagoto Mika, Ema Masatsugu, Suemizu Hiroshi, Kawai Kenji, Sasaki Erika	4. 巻 24
2. 論文標題 Highly efficient induction of primate iPS cells by combining RNA transfection and chemical compounds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 473 ~ 484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12702	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 TAKAE Kentaro, NAKATA Mizuho, WATANABE Takafumi, SASADA Hiroshi, FUJII Hiroshi, TOMIOKA Ikuo	4. 巻 65
2. 論文標題 Evidence for the involvement of FXR signaling in ovarian granulosa cell function	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 47 ~ 55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-054	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富岡郁夫、棚橋由佳、耕作比香留、諸白家奈子、藤井博
2. 発表標題 マウス排卵機構へのFXR (farnesoid X receptor)の関与
3. 学会等名 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富岡郁夫、棚橋由佳、水谷祐輔、諸白家奈子、藤井博
2. 発表標題 FXRノックアウト雄マウスの生殖生理学的解析
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2018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
---------	---------