

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06315

研究課題名(和文) 新生仔期マウス卵巣における卵胞形成過程の分子機構

研究課題名(英文) The mechanisms of the folliculogenesis in the neonatal mouse ovary

研究代表者

佐藤 友美 (SATO, TOMOMI)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科(八景キャンパス)・教授

研究者番号：40295506

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)：卵胞形成過程において、卵母細胞と体細胞との相互作用に関係すると思われるいくつかの重要遺伝子の機能を新生仔期マウス卵巣の器官培養系を用いて調べた。その結果、アクチビンシグナルは卵胞が形成された後に顆粒膜細胞の増殖を促進していることがわかった。同様に、線維芽細胞増殖因子の受容体を阻害しても卵胞形成に対する影響はなかったが、卵胞成長が阻害されていた。一方、ヘッジホッグシグナルは卵胞形成時の基底膜の再構築過程に関与していることがわかった。本研究により、卵胞形成および初期の卵胞成長に関与するいくつかの因子の作用が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵母細胞の成長、成熟、減数分裂の制御には、顆粒膜細胞に包まれた卵胞構造が必須である。いったん形成された卵胞は生涯にわたり卵巣内に貯蔵されることから、卵胞形成過程が正常に進行することは、メスの生殖活動において非常に重要である。これまでの研究から、卵胞形成過程は多くの因子による複雑な遺伝子カスケードに従って進行しており、性ホルモンや女性ホルモン様作用をもつ化学物質に曝露されると、その過程が遺伝子発現レベルでかく乱されることが示されている。本研究により卵胞形成および初期の卵胞成長に関与するいくつかの因子の作用が明らかとなり、不妊の原因を解明するにあたり基礎的知見を提供した。

研究成果の概要(英文)：A follicle consists of single oocyte and granulosa cells, and it is essential for the female reproduction. Primordial follicles are formed soon after birth, however, the process of folliculogenesis remains unclear. This study is aimed to examine the role of several growth factors in folliculogenesis using the organ-culture system. Activin signaling is involved with early follicle growth, but not folliculogenesis in the neonatal mouse ovary. Inhibition of FGFR showed no effect on folliculogenesis, but it resulted in a suppression of follicle growth. Hedgehog signaling is involved with basement membrane remodeling during folliculogenesis even before thecal cell differentiation. These results provide important information to understand folliculogenesis and early follicle growth in the mouse ovary.

研究分野：生殖生物学

キーワード：卵胞形成 エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

マウスの卵母細胞は卵巣内にある原始卵胞内に保存されており、卵胞刺激ホルモン (FSH) の刺激により一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞と成長して排卵刺激 (LH サージ) により排卵される。卵胞は卵母細胞と体細胞 (顆粒膜細胞) から構成されており、細胞質同士がつながった **germ cell cyst** の状態から、出生直後に卵母細胞のアポトーシス、顆粒膜細胞の侵入と基底膜の再構築により形成される (1)。卵母細胞の成長、成熟、減数分裂の制御には、顆粒膜細胞に包まれた卵胞構造が必須であり、またいったん形成された原始卵胞は生涯にわたり卵巣内に貯蔵されることから、卵胞形成過程が正常に進行して卵胞の質が保証されることは、メスの生殖活動において非常に重要であると言える。

一方、出生前後の性ホルモン投与などにより卵胞形成過程が乱されると、卵母細胞を複数含む多卵性卵胞が多数発生し、成長後もそのまま存在することが知られている。新生仔期マウスへのテストステロン投与でも多卵性卵胞は発生するが、アロマターゼ阻害剤の同時投与で減少することから、エストロゲン様作用により卵胞形成過程がかく乱されることが分かっている (2)。さらに、内分泌かく乱物質であると疑われているビスフェノール A や経口避妊薬の投与でも多卵性卵胞が高頻度で発生することから (3,4)、エストロゲン様作用を持つ化学物質による曝露も卵胞形成過程をかく乱し、原始卵胞の数と質に悪影響を及ぼして不妊を導く可能性がある。

卵巣では、エストロゲン受容体 (Estrogen receptor, ER) α は間質細胞に、ER β は顆粒膜細胞に存在している。それぞれのノックアウトマウスを用いた解析から、性ホルモンは ER β を介して卵母細胞のアポトーシスを抑制することで多卵性卵胞を誘導していることが明らかとなっている (5-7)。しかし、アポトーシス誘導受容体である Fas をコードする遺伝子 *lpr* に変異をもつ Fas^{lpr/lpr} マウスでは、卵母細胞のアポトーシスが抑制されているにもかかわらず多卵性卵胞は発生しなかったことから (6)、出生直後の性ホルモン投与による多卵性卵胞の誘導には、卵母細胞のアポトーシス以外の卵胞形成過程も関与していることを示している。そこで、出生直後のマウスに合成エストロゲンまたは溶媒を投与し、卵巣における遺伝子発現変動を網羅的に解析したところ、細胞外マトリクスや細胞増殖、形態形成などに関わる 1000 以上の遺伝子が発現変動していた。さらに、いくつかの転写因子および転写調節因子が発現が変化していた。これらの結果は、原始卵胞形成過程は、多くの因子による複雑な遺伝子カスケードに従って進行しており、出生直後の性ホルモン投与はその過程を遺伝子発現レベルでかく乱し、多卵性卵胞を誘導することを示している。

2. 研究の目的

本研究では、卵胞形成過程のうち卵母細胞-体細胞相互作用に関係する重要遺伝子の機能について、顆粒膜細胞特異的遺伝子改変マウス、および器官培養系を用いて調べることにより、卵胞形成過程と性ホルモンによるそのかく乱機構を統合的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 性ホルモン投与による遺伝子発現変化のうち、ER β を介した作用を明らかにするために、出生直後の野生型または ER β ノックアウトマウス卵巣をコラーゲンゲル上で性ホルモンや各種阻害剤の存在下で器官培養し、組織学的変化を調べた。また、器官培養後の卵巣から RNA を抽出して遺伝子発現量の変化を RT-qPCR 法により調べた。

(2) CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により、顆粒膜細胞特異的に Cre recombinase を発現する Foxl2-creGFP マウスを作製した。また、C57BL/6N-Gt(ROSA)26Sor マウス (8) と交配させることにより、作製した Foxl2-creGFP マウスの卵巣と子宮における Cre recombinase の活性を確認した。

(3) 2 週齢の未成熟マウス卵巣から、二次卵胞と前胞状卵胞を単離して浮遊培養する実験系を確立し、基底膜の状態を組織学的に調べた。

4. 研究成果

(1) 新生仔期マウス卵巣の器官培養系を用いて、合成エストロゲンであるジエチルスチルベストロール (DES) の添加によって野生型マウス卵巣ではインヒビン α 鎖の発現が増加するが、ER β ノックアウトマウス卵巣では増加しないことを見だし、DES によるインヒビン α 鎖の発現増加は ER β を介していることを明らかにした。一方、アクチビン β A 鎖の発現は野生型、ER β ノックアウトマウス卵巣ともに DES 添加により増加しており、 β A 鎖遺伝子の発現増加は ER α を介していることが明らかとなった。また、これらの遺伝子発現変化は、いずれも、DES が卵巣に直接作用することによって引き起こされていることが分かった。

さらに、新生仔期マウス卵巣におけるアクチビンシグナルの働きを調べるために、器官培養系を用いてアクチビン受容体阻害剤やアクチビン、インヒビンの添加実験を行ったが、いずれの処理によっても多卵性卵胞は誘導されなかった。一方、受容体阻害剤を添加すると、原始卵胞形成後に顆粒膜細胞の増殖が減少して卵胞成長が抑制され、一次卵胞数が減少した。さらに、新生仔期マウス卵巣におけるアクチビンシグナルの活性化を調べるために、E18.5、0、5、10、15、20

日齢のマウス卵巣を4%パラホルムアルデヒドで固定後に切片を作製し、アクチビンシグナル仲介因子である SMAD2 の抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、SMAD2 の局在を経時的に観察した。その結果、SMAD2 は germ cell cyst から原始卵胞にかけて卵母細胞の細胞質に局在し、原始卵胞からは顆粒膜細胞の細胞質に局在し始めることが分かった。また一次卵胞から胞状卵胞では、主に顆粒膜細胞の細胞質に局在することが分かった。

以上の結果から、アクチビンシグナルは卵胞形成過程には作用しておらず、原始卵胞形成後の顆粒膜細胞の増殖を促進していると考えられる。一方、DES は卵胞形成を抑制して多卵性卵胞を誘導するが、その作用過程にアクチビンシグナルは関与していない可能性が示された。

また、新生仔期に DES を投与されたマウス卵巣の網羅的遺伝子発現解析により発現量に変化していた遺伝子群のうち、線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor : FGF) に着目した。新生仔期マウス卵巣を FGF 受容体の阻害剤を添加して器官培養し、組織学的に解析したところ、多卵性卵胞誘導作用、および卵胞形成に対する影響はなかったが、卵胞成長が阻害されていた。さらに、新生仔期マウス卵巣を器官培養していくつかの転写因子の阻害剤の影響を組織学的に調べたが、単独の添加では多卵性卵胞誘導および卵胞形成に対する影響はなかった。

また、卵胞形成時には基底膜が再構築されるが、その過程にヘッジホッグシグナルが関与しており、その阻害剤であるシクロパミン添加によって多卵性卵胞が発生することを見出した。一方で、これまで我々が観察している DES 曝露によって誘導される多卵性卵胞の形成過程には、ヘッジホッグシグナリングは関与していないことが明らかとなった。

(2) Foxl2-creGFP マウスを作製し、卵巣と子宮における Cre recombinase の活性を C57BL/6N-Gt(ROSA)26Sor マウスとの交配により確認したところ、Foxl2 が発現している卵巣顆粒膜細胞および子宮間質細胞において Cre 遺伝子組換えにより緑色蛍光が赤色蛍光に変換されており、Cre recombinase 活性を確認することができた。

(3) 卵胞の浮遊培養系を確立するために、未成熟マウス卵巣から卵胞を採取し、一つずつ単離した後に再度いくつかの卵胞を共培養した。培養液の組成、血清濃度、培養期間、および使用するプレートの形状について、いくつかの条件を検討した。その結果、10 日間の卵胞浮遊培養系を確立し、この培養系を用いることで、卵胞の形態維持や成長に関わる因子の作用を調べることが可能となった。

<引用文献>

1. Pepling ME and Spradling AC. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev. Biol.*, 234: 339-351, 2001.
2. Iguchi T, Todoroki R, Takasugi N and Petrow V. The effects of an aromatase inhibitor and a 5 alpha-reductase inhibitor upon the occurrence of polyovular follicles, persistent anovulation, and permanent vaginal stratification in mice treated neonatally with testosterone. *Biol. Reprod.* 39: 689-697, 1988.
3. Suzuki A, Sugihara A, Uchida K, Sato T, Ohta Y, Katsu Y, Watanabe H and Iguchi T. Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice. *Reprod. Toxicol.*, 16: 107-116, 2002.
4. Kirigaya A, Hayashi S, Iguchi T and Sato T. Developmental effects of ethinylestradiol on reproductive organs of female mice. *In Vivo*, 20: 867-874, 2006.
5. Kirigaya A, Kim H, Hayashi S, Chambon P, Watanabe H, Iguchi T and Sato T. Involvement of estrogen receptor β in the induction of polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Zool. Sci.*, 26: 704-712, 2009.
6. Kim H, Nakajima T, Hayashi S, Chambon P, Watanabe H, Iguchi T and Sato T. Effects of diethylstilbestrol on programmed oocyte death and induction of polyovular follicles in neonatal mouse ovaries. *Biol. Reprod.*, 81: 1002-1009, 2009.
7. Sato T, Kim H, Kakuta H and Iguchi T. Effects of 2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-propionitrile on induction of polyovular follicles in the mouse ovary. *In Vivo*, 32: 19-24, 2018.
8. Hasegawa Y, Daitoku Y, Sekiguchi K, Tanimoto Y, Mizuno-Iijima S, Mizuno S, Kajiwara N, Ema M, Miwa Y, Mekada K, Yoshiki A, Takahashi S, Sugiyama F and Yagami K. Novel ROSA26 Cre-reporter knock-in C57BL/6N mice exhibiting green emission before and red emission after Cre-mediated recombination. *Exp. Anim.*, 62: 295-304, 2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sato T., H. Kim, H. Kakuta and T. Iguchi	4. 巻 32
2. 論文標題 Effects of 2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-propionitrile on induction of polyovular follicles in the mouse ovary.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 19-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.11199	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 Nakajima T., T. Sato, T. Iguchi and N. Takasugi	4. 巻 86
2. 論文標題 etinoic acid signaling determines the fate of the uterus from the mouse Mullerian duct.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reprod. Tox.	6. 最初と最後の頁 56-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.diff.2020.10.003	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 Toyota K., H. Miyakawa, C. Hiruta, T. Sato, H. Katayama, T. Ohira, T. Iguchi	4. 巻 12
2. 論文標題 Crustacean sex determination and differentiation: an overview of endocrine regulation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12020305	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 Terauchi K.J., S. Miyagawa, T. Iguchi and T. Sato	4. 巻 381
2. 論文標題 Hedgehog signaling regulates the basement membrane remodeling during folliculogenesis in the neonatal mouse ovary.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 555-567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-020-03222-9	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 Iguchi T., T. Sato, T. Nakajima, S. Miyagawa and N. Takasugi	4. 巻 118
2. 論文標題 New frontiers of developmental endocrinology opened by researchers connecting irreversible effects of sex hormones on developing organs.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Differentiation	6. 最初と最後の頁 4-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.diff.2020.10.003	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 Kakuta H., T. Iguchi and T. Sato	4. 巻 32
2. 論文標題 The involvement of granulosa cells in the regulation by gonadotropins of Cyp17a1 in theca cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 1387- 1401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.11391	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 Oikawa S., S. Kobayashi, S. Miyagawa, T. Iguchi and T. Sato	4. 巻 33
2. 論文標題 Diethylstilbestrol alters the expression of activins in the neonatal mouse ovary in vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 1095-1102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.11578	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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kakuta H. and T. Sato
2. 発表標題 Amphiregulin can regulate the expression of Cyp17a1 in cultured mouse theca cells.
3. 学会等名 The 52nd Annual meeting of Society for the Study of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato T., Miyamori M. and Y. Yamashita
2. 発表標題 Involvement of estrogen receptor beta with cell proliferation during postpartum uterine regeneration period.
3. 学会等名 The 52nd Annual meeting of Society for the Study of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimada I. and T. Sato
2. 発表標題 The morphological changes in the mouse uterus after parturition.
3. 学会等名 The 91st Annual meeting of Zoological Society of Japan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ushinohama C. and T. Sato
2. 発表標題 Involvement of Activin signaling with polyovular follicles induced by diethylstilbestrol in the neonatal mouse ovary.
3. 学会等名 The 91st Annual meeting of Zoological Society of Japan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimada I., T. Ishikawa and T. Sato
2. 発表標題 Regulation of collagen in the uterus during postpartum period
3. 学会等名 The 92nd Annual meeting of Zoological Society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ushinohama C. and T. Sato
2. 発表標題 The role of activin signaling in the neonatal mouse ovary
3. 学会等名 The 92nd Annual meeting of Zoological Society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamashita Y. and T. Sato
2. 発表標題 The Role of Estrogen Receptor Beta in the Uterus after Parturition.
3. 学会等名 The 90th Annual meeting of Zoological Society of Japan
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