

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03108

研究課題名(和文) 卵巣間質の間葉系幹細胞に着眼した卵巣加齢化メカニズム解明と予防・根治法開発

研究課題名(英文) The study for understanding the mechanisms how MSCs induce ovarian aging

研究代表者

島田 昌之 (Shimada, Masayuki)

広島大学・統合生命科学研究科(生)・教授

研究者番号：20314742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：加齢や肥満、炎症など多様な原因により卵巣機能が低下し、雌の妊孕性が消失する。本研究において、加齢により卵巣間質細胞の代謝能が低下し、脂肪顆粒が蓄積した老化細胞が出現することがわかった。さらに、老化細胞が分泌するSASP因子により炎症が惹起され、卵巣間質は線維化すること、この一連の変化は、肥満個体においても認められ、卵巣間質の異常が卵巣機能低下を引き起こす重要性が示された。このような間質の変化は、大規模なDNAの脱メチル化が生じた顆粒膜細胞由来の間葉系幹細胞様細胞の多様な分化誘導により引き起こされていた。さらに、一連の起点となる代謝能の低下を改善することで、卵巣機能を回復させることにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢や肥満、炎症などにより卵巣機能が低下することは、雌の妊孕性を消失させることから、家畜の生産性のみでなく、ヒトの不妊症にも関連する問題である。しかし、その低下原因が不明であるため、卵巣機能を低下させない予防法や低下した卵巣機能を回復させる根治法の開発は困難であった。本研究において、卵巣間質の代謝活性の低下が、卵巣機能低下の出発点であることが明らかとなり、代謝改善薬により卵巣機能が回復する根治法の開発に成功した。今後、家畜やヒトへの応用には、動物種間で異なる代謝機構の影響などを考慮し、応用研究を実施する計画である。

研究成果の概要(英文)：Ovarian function declines due to various causes such as aging, obesity, and inflammation. In this study, the metabolic activity of ovarian interstitial cells decreased with aging, and senescent cells with accumulated lipid droplets appeared. Furthermore, SASP factor secreted by senescent cells induced inflammation, and the ovarian stroma became fibrotic. This change was also observed in obese individuals, indicating that abnormalities in the ovarian stroma cause ovarian dysfunction. These stromal changes were caused by the induction of diverse differentiation of granulosa cell-derived mesenchymal stem cell-like cells with large-scale DNA demethylation. Furthermore, we succeeded in recovering ovarian function by improving the decline in metabolic capacity.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：卵巣 線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊孕性(次世代を得る能力)は、年齢と共に減退する。このことは、育種選抜された種畜の利用期間を限定し、高い経済形質を有する家畜を生産するための高コスト化を引き起こしている。雌では、生殖細胞が出生前にすべて減数分裂に移行しているために数は増加しないことから、卵母細胞の枯渇が加齢による妊孕性低下原因と考えられている。繰り返しの過剰排卵処理をした供卵牛において、回数を経るごとに得られる受精卵の数が減少することは、卵母細胞の枯渇説を裏付けるものである。しかし、このような供卵牛であっても、妊娠が成立した場合、分娩後の過剰排卵成績は回復することも報告されている。したがって、卵母細胞の枯渇ではない妊孕性低下原因があると考えられるが、その詳細は不明である。

我々は、加速度的に妊孕性低下を起こす遺伝子改変マウスにより、卵巣間質の線維化と脂肪組織化が卵巣機能低下を引き起こすことを突き止めた。この卵巣機能の老化モデルマウスを用いて、卵巣間質が機能変異する仕組みを解明することは、卵巣の加齢に伴う機能低下を予防する、さらには機能低下した卵巣機能を回復させる治療法の開発につながると期待される。それに加えて、肥満や感染症などの卵巣機能低下要因の解明にもつながるものである。それらにより、卵巣機能を維持することは、家畜の生産性向上だけでなく、ヒトの不妊治療にも貢献する。

2. 研究の目的

卵巣間質において、加齢に伴って線維芽細胞や血管内皮細胞、ステロイドホルモン産生細胞と脂肪細胞が出現(減少)する。これらの細胞は、一般的に間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell, 以下 MSC)から分化した細胞と考えられている。つまり、卵巣に MSC が存在し、MSC が血管内皮細胞や正常部位でステロイド産生細胞に分化すると生殖機能は亢進し、線維芽細胞や脂肪細胞に分化すると機能は抑制されると考えられるが、これまで卵巣において MSC が存在し、それが時期特異的に分化するといった報告は全くない。

そこで、本研究では、卵巣に MSC が存在するか？そして、その動態および分化に影響する因子を同定することで、正常に卵巣機能(周期的に卵胞が発育し、排卵が生じる)が発揮される環境を解明することができる。さらに、その破綻メカニズムが明らかとなることで、加齢や肥満、感染症などによる卵巣機能低下の仕組みを示すことで、その予防や根治法の開発が可能になると考えた。そこで、本研究では、卵巣間質細胞を回収し、MSC の特徴を有する細胞が存在するか？その動態変化を経時的に観察するだけでなく、加齢モデルや肥満モデルマウスを用いて、MSC の正常/異常な分化による卵巣機能への影響の解明を試みた。

3. 研究の方法

C57/Bl6 マウス(WT マウス)と顆粒膜細胞特異的 Nrg1 欠損マウス(gcNrg1KO マウス)を通常給餌あるいは high fat 給餌をおこない、経時的に卵巣を回収した。また、満腹中枢機能が破綻した変異マウスである Blobby マウスをもちいて、肥満による卵巣機能破綻について詳細に観察した。さらに、間質に認められた線維芽細胞や肥満細胞の由来を解明するため、顆粒膜細胞特異的に EGFP を発現するマウスも実験に用いた。

MSC 様細胞の検出は、卵巣から卵胞を切り出した残存(間質)をコラーゲナーゼ処理後、MSC マーカー抗体を用いたフローサイトメトリー解析により行った。また、卵巣の凍結切片あるいはパラフィン切片を作成し、抗体や染色色素を用いた染色に供試した。さらに、間質細胞の代謝活性は、フラックスアナライザーを用いて real time 解析を行った。

4. 研究成果

卵巣間質に MSC マーカーである CD73 陽性+CD90 陽性、分化マーカーである CD34 陰性を示す細胞が 2~3%程度存在することを確認した。この MSC 様細胞数は、排卵後に増加し、卵胞発育期に減少することが明らかとなったことから、発情周期に伴って、何らかの細胞が間葉系転換し、それが卵巣間質を構成する細胞へと分化していると考えられた。卵胞発達、排卵と MSC 様細胞の出現が平行に起こっていたことから、両者の関係を解明するため、卵胞の主要構成細胞である顆粒膜細胞で EGFP を発現するマウスを用いた実験を行った。その結果、顆粒膜細胞由来細胞が卵巣間質を構成する線維芽細胞、血管内皮細胞になっている可能性が示され、かつ EGFP 陽性の MSC 様細胞も検出された。

卵巣間質で MSC 様細胞から分化したと推定された線維芽細胞を詳細に解析した結果、加齢に伴って線維芽細胞内にコラーゲンの蓄積が生じ、卵巣間質を線維化させていた。このような卵巣間質では、炎症性サイトカインの発現と酸化ストレスマーカーの上昇が観察されたことから、この炎症が MSC 様細胞を線維芽細胞に分化させ、それが間質の線維化を促進していると考えた。このような炎症が生じている卵巣間質から回収した細胞をフラックスアナライザーで解析した結果、酸素消費量が著しく低下していた(Umehara et al., 2022)。この結果は、卵巣間質細胞の

代謝が低下し、老化細胞化することで、SASP 因子が分泌され、免疫細胞を誘引して炎症が引き起こされている可能性が考えられた。そこで、マクロファージの誘引を観察した結果、予想通り、卵巣間質で加齢に伴って M2 マクロファージ数が増加していた。

さらに、経時的に詳細な観察を行った結果、卵巣間質細胞は、代謝低下に伴って脂肪顆粒が細胞質に蓄積していること、その後に線維化を起こすことが明らかとなった。そこで、この代謝低下が直接的な卵巣機能低下に関わっているかを明らかにするため、肥満モデルマウスを用いた解析を行った。その結果、体重増加に伴って、卵巣間質に脂肪顆粒を蓄積した細胞が出現し、その間質では SASP 因子の発現上昇、M2 マクロファージの誘引が加齢個体の卵巣と同様に認められた。以上の結果から、卵巣の機能低下は卵巣間質の代謝異常による老化細胞の蓄積によること、この老化細胞が分泌する SASP 因子により、MSC 様細胞から分化した間質細胞が脂肪細胞化・線維化することで、間質の硬化が起こり、卵巣機能が破綻するという新たな卵巣機能低下モデルが提唱された。

そこで、代謝改善薬や抗酸化因子をもちいて卵巣間質の代謝機能を向上させることが、肥満個体や加齢個体の卵巣機能を回復させることができるかを検討した (Hoque et al., 2021)。その結果、ミトコンドリアの電子伝達系を活性化する複数の代謝改善薬により、卵巣間質に求められた脂肪細胞や線維化細胞が消失し、卵巣機能が正常化することが明らかとなった。

また、卵巣間質のリモデリングを強制的に誘導することは可能であるかを検討するため、線維化した卵巣間質に傷をつけることで、組織再生時に間質が正常化するか否かも検討した。その結果、間質に切り込みを入れることで、線維化した細胞が消失し、間質構造が正常化すること、その結果、卵巣発育が再開し、個体の妊孕性が回復することも示した (Umehara et al., 2020)。

次に、卵巣間質の炎症が卵巣発育を負に制御するメカニズムを解明するため、顆粒膜細胞に発現する TLR4 を刺激し、その影響を検討した。その結果、形態的には正常に卵巣発育が誘起されるが、LH に反応せず排卵が生じない PCOS 様の卵巣が多数認められた (Adetunji et al., 2020)。これは、PCOS (多嚢胞性卵巣症候群) の卵巣では、卵巣間質の線維化が認められるという臨床報告とも合致する結果であった。さらに、この LH への反応性が消失している仕組みを解析した結果、卵巣発育に伴って顆粒膜細胞で大規模に誘起される DNA の脱メチル化が、炎症発生時には誘導されないことが示された (Adetunji et al., 2020)。

この大規模な DNA の脱メチル化は、顆粒膜細胞でレチノイン酸依存的に DNA 複製期の DNMT1 量の増加が抑制されることで、細胞分裂に伴って DNA メチル化がコピーされにくくなることで起こることも示した (Kawai et al., 2021)。また、この DNA の脱メチル化は、全染色体においてプロモーター領域の 1/3 程度の場所で認められ、スーパーエンハンサー領域から DNA 構造をオープン化すること、その後に各領域特異的なタイミングでヒストンのアセチル化が起こることで遺伝子発現が誘起されることで、卵巣発育と排卵現象が引き起こされていることも明らかとなった (Kawai et al., 2021)。

このような全染色体において 1/3 程度のプロモーター領域で DNA の脱メチル化が生じることが、顆粒膜細胞が間葉系転換し、MSC 様細胞へと排卵後に変化できる要因であると考えられる。そこで、顆粒膜細胞が脂肪細胞化するメカニズム解明の一つとして、コレステロール合成能の獲得に着眼した結果、LH 刺激により SREBP が活性化し、脱メチル化が誘導されているコレステロール合成に関わる酵素群を発現させていることも明らかとなった (Nakanishi et al., 2021)。また、上記のように炎症が生じると卵巣発育不全や間質の線維化を引き起こすことから、内因性の炎症抑制因子であるコルチゾールに着眼し、その卵巣発育への影響を検討した。その結果、コルチゾール濃度の上昇は、炎症性サイトカインの発現上昇を抑制するが、同時に顆粒膜細胞のアポトーシスも誘導することから、ステロイド剤は卵巣加齢化や肥満に伴う機能低下の予防や根治には利用できないと考えられた (Tonai et al., 2020, Nakanishi et al., 2021)。

以上の結果から、卵巣間質に MSC 様細胞が存在し、発情周期に伴って顆粒膜細胞の一部が間葉系転換していると考えられた。この顆粒膜細胞の間葉系転換は、卵巣発育期に排卵準備を完了するための顆粒膜細胞の大規模な DNA の脱メチル化が可能にしているものと推定された。さらに、加齢や肥満により卵巣間質細胞の代謝が低下して老化細胞化すると SASP 因子が分泌され、MSC 様細胞が正常に分化できず線維化していくこと、代謝改善薬によりこの負のスパイラルが解消され、卵巣間質を正常化できることが明らかとなった。また、卵巣間質の線維化要因であるコラーゲンをコラゲナーゼで分解することが、卵巣の凍結保存、移植後の生着率を劇的に改善することも報告した (Kawai et al., 2020) 卵巣間質の炎症は、間質の線維化だけでなく、卵巣発育、特に顆粒膜細胞の異常なエピジェネティック制御を引き起こすことから、卵巣間質に存在する MSC 様細胞が正常に分化できる環境を維持することが、卵巣を機能させ、個体の妊孕性を維持するために重要であることが明確化された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tonai S, Kawabata A, Nakanishi T, Lee JY, Okamoto A, Shimada M, Yamashita Y	4. 巻 66
2. 論文標題 Iron deficiency induces female infertile in order to failure of follicular development in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Reprod Dev	6. 最初と最後の頁 475-483
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2020-074	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 Adetunji AO, Kawai T, Shimada M	4. 巻 142
2. 論文標題 Impact of lipopolysaccharide administration on luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor (Lhcgr) expression in mouse ovaries.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Reprod Immunol	6. 最初と最後の頁 103193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jri.2020.103193	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 Umehara T, Urabe N, Obata T, Yamaguchi T, Tanaka A, Shimada M.	4. 巻 19
2. 論文標題 Cutting the ovarian surface improves the responsiveness to exogenous hormonal treatment in aged mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reprod Med Biol	6. 最初と最後の頁 415-424
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12345	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 Hoque SAM, Umehara T, Kawai T, Shimada M	4. 巻 163
2. 論文標題 Adverse effect of superoxide-induced mitochondrial damage in granulosa cells on follicular development in mouse ovaries.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radic Biol Med.	6. 最初と最後の頁 344-355
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.434	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 該当する

1. 著者名 Tomoko Kawai and Masayuki Shimada	4. 巻 10
2. 論文標題 Pretreatment of ovaries with collagenase before vitrification keeps the ovarian reserve by maintaining cell-cell adhesion integrity in ovarian follicles.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 6841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63948-y.	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 Kawai Tomoko, Richards JoAnne S., Shimada Masayuki	4. 巻 4
2. 論文標題 Large-scale DNA demethylation occurs in proliferating ovarian granulosa cells during mouse follicular development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02849-w	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 該当する

1. 著者名 Nakanishi Tomoya, Tanaka Risa, Tonai Shingo, Lee Joo Yeon, Yamaoka Manami, Kawai Tomoko, Okamoto Asako, Shimada Masayuki, Yamashita Yasuhisa	4. 巻 162
2. 論文標題 LH Induces De Novo Cholesterol Biosynthesis via SREBP Activation in Granulosa Cells During Ovulation in Female Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endo/bqab166	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 Nakanishi Tomoya, Okamoto Asako, Ikeda Maki, Tate Sachiko, Sumita Miyu, Kawamoto Rie, Tonai Shingo, Lee Joo Yeon, Shimada Masayuki, Yamashita Yasuhisa	4. 巻 27
2. 論文標題 Cortisol induces follicle regression, while FSH prevents cortisol-induced follicle regression in pigs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Human Reproduction	6. 最初と最後の頁 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/molehr/gaab038	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12件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 島田昌之
2. 発表標題 哺乳類の雌雄比が1:1となる仕組み
3. 学会等名 日本繁殖生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田昌之
2. 発表標題 生殖細胞におけるミトコンドリアと細胞質，核の情報交換
3. 学会等名 日本受精着床学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田昌之
2. 発表標題 精子，卵，受精卵の代謝機構と その人為的制御，ARTへの応用
3. 学会等名 日本IVF学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoko Kawai and Masayuki Shimada
2. 発表標題 The pretreatment with collagenase before vitrification improves the ovarian reserve due to the maintenance of the cell-cell attachments with oocyte and granulosa cells
3. 学会等名 35th Eshre annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoko Kawai, S.A Masudul Hoque, JoAne S. Richards and Masayuki Shimada
2. 発表標題 Dramatic epigenetic changes in the genome impact gene expression and the differentiation of ovarian granulosa cells
3. 学会等名 Society for the Study of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島田昌之
2. 発表標題 より多く、より良い成熟卵を得るための対ミトコンドリア戦略
3. 学会等名 日本受精着床学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島田昌之
2. 発表標題 卵胞発育と酸化ストレス
3. 学会等名 生殖バイオロジー東京シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川合智子, S.A Masudul Hoque, JoAne S. Richards 島田昌之
2. 発表標題 排卵前卵胞の顆粒膜細胞における大規模なゲノム構造の変化は、顆粒膜細胞の分化に重要である
3. 学会等名 日本生殖内分泌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島田昌之
2. 発表標題 生殖生物学の新知見に基づく家畜繁殖技術開発
3. 学会等名 日本生殖医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島田昌之
2. 発表標題 精巣・卵巣環境を考える
3. 学会等名 第24回日本IVF学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島田昌之
2. 発表標題 マウスを用いた基礎研究から、ブタの産子数向上技術へのトランスレーション
3. 学会等名 第129回日本畜産学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島田昌之
2. 発表標題 前胞状卵胞における卵胞閉鎖 酸化ストレスと抗酸化因子のバランス
3. 学会等名 第39回日本受精着床学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021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
研究 分担者	中村 隼明 (Nakamura Yoshiaki) (30613723)	広島大学・統合生命科学研究科(生)・助教 (15401)	
研究 分担者	磯部 直樹 (Isobe Naoki) (80284230)	広島大学・統合生命科学研究科(生)・教授 (15401)	

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		
米国	Baylor College of Medicine		