

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07361

研究課題名(和文) 卵巣における生体ストレス応答の研究：KEAP1-NRF2制御系の不妊への影響

研究課題名(英文) The effects of stress response system in the ovary: KEAP1-NRF2 system and female infertility

研究代表者

松丸 大輔 (MATSUMARU, Daisuke)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50624152

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)：本研究は、加齢や酸化ストレス、そしてストレス応答因子が卵巣機能に与える影響を解明することを目的とし、加齢マウスおよび遺伝学的に多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)様症状を呈するマウスを用いて解析を行った。加齢マウスでは卵巣の組織学的変化と酸化ストレスの増加が観察された。PCOSモデルマウスではアンドロゲンの過剰曝露により卵胞の形態異常、炎症、酸化ストレスマーカーの上昇が確認された。抗酸化剤の投与により一部の組織症状の改善が観察されたが、排卵には至らず卵巣機能は完全には回復しなかった。以上の結果は、酸化ストレスとその応答系が不妊に及ぼす影響の解明に貢献すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、加齢と酸化ストレスが卵巣機能に与える影響を解析し、またPCOS(多嚢胞性卵巣症候群)の発症メカニズムを探ることを目的とした解析を行った。研究成果として、卵巣の加齢に伴う組織像の変化や酸化ストレスの関与を示唆し、PCOSモデルマウスにおける酸化ストレス応答、炎症の存在を示した。抗酸化剤を用いて部分的な症状回復を誘導できた点から、酸化ストレスの制御が不妊治療のアプローチの1つとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The ovarian functions are strongly affected by aging. Therefore, infertility has become an emerging social problem by recent late marriages. Generally, the presence of excessive oxidative stress in the ovary is explained as a cause of female infertility, but the mechanisms how it causes infertility remain unclear. The current study analyzed the effects of aging, oxidative stress, and stress response systems on ovarian function. We utilized aged mice and genetically modified mice showing symptoms similar to polycystic ovary syndrome (PCOS). In the aged mice, we observed histological abnormalities in the ovary and an increase of oxidative stress markers. In the PCOS model mice, we observed abnormal ovarian follicle morphology, inflammation, and increased oxidative stress markers. An antioxidant treatment improved part of such ovarian abnormalities. These results suggest that oxidative stress and its response systems, at least in part, play an essential role in infertility.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：卵巣 酸化ストレス 炎症 卵胞 細胞死 細胞増殖

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々の生体は、外部環境とそれに対する応答の間でバランスを保ちながら機能している。このバランスに最も影響を及ぼす要因の一つとして加齢・老化が挙げられる。加齢は全身の臓器に様々な影響を与えるが、中でも生殖器は他の臓器と比較して特に加齢・老化の影響を受けやすい臓器である。女性においては、雌性生殖細胞の成熟と排卵の過程が性ホルモンを介して全身的に制御されており、これが加齢の影響を強く受けるため、近年の晩婚化に伴い、生殖器の機能低下に起因する不妊が社会問題として顕在化している。一般的には、卵巣における生殖細胞の成熟や排卵過程における過度の酸化ストレスの存在が女性不妊の一因と説明されているが、卵巣における酸化ストレスとその応答のメカニズム、さらにその破綻がどのように不妊を引き起こすかは未解明である。また、女性の不妊につながる病気として最も発症頻度が高い多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS: Polycystic ovary syndrome) は、生殖可能な全女性人口の 5-10% が罹患するといわれているが、その症状がどのようにして生じるのか、その背後にある細胞・分子メカニズムは明らかにされていない。本研究は、これらの未解明の部分に焦点を当て、酸化ストレスが卵巣の機能に与える影響を解析した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、生体ストレス応答と不妊の関係を学術的な「問い」として捉え、卵巣における酸化ストレスの標的細胞や、その下流の応答分子シグナルの細胞・分子メカニズムを解明することである。加齢による生殖機能の低下を理解するために、加齢マウスモデルを用いて卵巣における酸化ストレスの影響を調査する。さらに、遺伝学的手法を用いたアンドロゲン高産生マウスを使用し、男性ホルモンが引き起こす PCOS の発症に酸化ストレス応答がどのように寄与するかを明らかにすることを目指す。これらの解析を通じて、酸化ストレスが不妊に及ぼす影響を評価し、その制御方法を探ることを目指している。

### 3. 研究の方法

本研究では、27 ヶ月齢までの加齢マウスを用いた解析、KEAP1-NRF2 制御系の遺伝子改変マウス (Nrf2 ノックアウトマウス、Keap1 ノックダウンマウス) を用いた解析、Cre-loxP システム制御下でテストステロン合成酵素である  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-3 ( $17\beta$ -HSD3) を高発現する遺伝学的アンドロゲン高産生マウスを用いた解析を行った。組織学的解析としては、HE 染色、ピクロシリウスレッド染色、アルシアンブルー染色、鉄染色、免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色は、4-ヒドロキシノネナール (4-HNE)、マロンジアルデヒド (MDA)、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) といった酸化ストレスマーカー、NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1)、ヘムオキシゲナーゼ (HO-1) といった KEAP1-NRF2 制御系標的因子、アンドロゲン受容体 (AR)、エストロゲン受容体 (ER) 等のステロイドホルモン受容体、細胞増殖、細胞死等について解析した。また、アンドロゲン高産生マウスに関しては、卵巣組織の遺伝子発現解析を行い、炎症性サイトカイン遺伝子の発現解析を行い、抗酸化剤を用いた回復実験を行った。

### 4. 研究成果

加齢マウスの基礎的な組織学的解析を行ったところ 27 ヶ月齢マウスにおいて卵巣近傍の脂肪組織が卵巣組織に浸潤し組織の境界が判別しにくくなっていることがわかった。また、卵巣内に大きな空胞が存在し、卵胞は確認できなかった。また、18 ヶ月齢以降のマウスにおいて酸性粘液多糖類の陽性領域がやや増加していることが観察できた。また、核酸の酸化的損傷マーカーである 8-OHdG の発現が増加していた。これらのことから、卵巣の加齢性変化において酸化ストレスの関与の可能性が示唆された。生体の酸化ストレス応答系として、KEAP1-NRF2 制御系に注目し Nrf2 ノックアウトマウス、Keap1 ノックダウンマウスの解析を

行った。Keap1 ノックダウンマウスにおいては、卵胞外間葉において KEAP1-NRF2 制御系標的因子の NQO1 の発現が増強していた。また、4-HNE の発現は Nrf2 ノックアウトマウスにおいて他マウスより強かった。また、鉄染色を行ったところ、Nrf2 ノックアウトマウスにおいて鉄の沈着が強く、野生型マウス、Keap1 ノックダウンマウスの順で染色が弱くなることを見出した。本研究の解析の範囲では、Nrf2 ノックアウトマウスにおいて大きな卵巣の組織像の変化は観察できず、むしろ Keap1 ノックダウンマウスにおいて黄体を確認できないなどの異常が観察された。Nrf2 ノックアウトマウスでは通常より加齢に伴う生殖能力の低下が早く、また、NRF2 の過剰蓄積を呈する Keap1 ノックダウンマウスにおいても排卵障害様の表現型を呈した。このことから、生体ストレス応答の極端なインバランスは卵巣機能の破綻に繋がることが示唆された。続いて、不妊の原因として最も多いと考えられる PCOS 様症状を安定的に示す遺伝学的アンドロゲン高産生マウスを用いた解析を行った。3 週齢アンドロゲン高産生マウスの血中アンドロゲン濃度を測定した結果、テストステロン及ジヒドロテストステロンの両方がコントロールと比較して有意に高かった。また、HE 染色の結果、アンドロゲン高産生マウスの卵巣において 5 週齢の時点で多数の嚢胞状卵胞が存在していた。さらに、本来であれば排卵が開始している 5 週齢以降で排卵後に形成される黄体の存在は確認されなかった。これらの結果より、アンドロゲン高産生マウスの PCOS 様症状発症時期は 4~5 週齢の間である可能性が示された。PCOS の患者やモデル動物の卵胞において、細胞死や細胞増殖の発現パターンが異なるという報告が挙げられているため、細胞増殖マーカーである phospho Histone H3 及び細胞死マーカーである Cleaved caspase 3 の発現を発症前の 4 週齢と発症後の 6 週齢の 2 つの時点で蛍光免疫染色を用いて解析した。pHH3 に関しては、Control マウスの卵胞では多くのシグナルが観察され、一方でアンドロゲン高産生マウスでは、4 週齢の時点で一部卵胞において pHH3 の発現が低下しており、発症後の 6 週齢で存在する嚢胞状卵胞ではシグナルがほとんど観察されなかった。また、細胞死マーカーである Cleaved caspase-3 は Control でも多くの発現が見られ、アンドロゲン高産生マウスでは卵胞腔に沿ったシグナルが見られた。これらの結果から、アンドロゲン高産生マウスでは発症前から一部卵胞で細胞増殖が停止しており、その後はアポトーシスのみが起きているという状態であることが明らかとなった。PCOS の女性及びそのモデル動物では卵巣におけるコラーゲンの蓄積が亢進しているという報告が多くあるため、組織上の I・III 型コラーゲンを染めるピクロシリウスレッド染色を実施した結果、発症前である 3 週齢から間質部位においてコラーゲン組織が蓄積しており、週齢を経るにつれて悪化していく様子が観察された。次に、組織線維化の原因となる炎症に着目し、アンドロゲン高産生マウスの卵巣における炎症マーカーの遺伝子発現量を解析したところ、I11 $\beta$  と Nos2 の発現量はコントロールと比較して有意に高いことが明らかとなった。このことから、アンドロゲン高産生マウスの卵巣は炎症状態を示している可能性が示唆された。炎症の原因となりうる酸化ストレスマーカーの発現として、HO-1 は、アンドロゲン高産生マウスに存在する嚢胞状卵胞の周囲でその発現が上昇している様子が観察され、8-OHdG も同様にアンドロゲン高産生マウスにおける嚢胞状卵胞の周囲で発現が上昇していることが明らかとなった。これらの結果より、アンドロゲン高産生マウスの卵巣においては、嚢胞状卵胞の周囲で局所的に酸化ストレスが上昇している可能性が示された。次に、アンドロゲン高産生マウスに対し抗酸化剤を投与した結果、嚢胞状卵胞が減少し、組織像に回復が見られた。しかし、その一方で黄体の存在は投与後も確認できず、排卵の回復には至らない可能性が高いことが示された。投与マウスにおいては、上昇していた HO-1 発現の減少、減少していた pHH3 の回復、Cleaved caspase-3 の減少といった事柄が観察された。組織の局所レベルでは KEAP1-NRF2 制御系標的因子の変動が確認されたが、卵巣の遺伝子発現解析においては確認できなかった。これは卵巣全体を用いたことにより、局所的な発現変動がマスクされた可能性によるものと考えられた。以上の結果より、PCOS 様症状の原因が、酸化ストレスに依存する過程とそうではない過程の複数である可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計21件（うち査読付論文 20件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Matsumaru Daisuke, Motohashi Hozumi	4. 巻 10
2. 論文標題 The KEAP1-NRF2 System in Healthy Aging and Longevity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1929 ~ 1929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10121929	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 Zhao Mingyue, Murakami Shohei, Matsumaru Daisuke, Kawauchi Takeshi, Nabeshima Yo-ichi, Motohashi Hozumi	4. 巻 171
2. 論文標題 NRF2 pathway activation attenuates ageing-related renal phenotypes due to -klotho deficiency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 579 ~ 589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac014	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 Oishi Tetsuya, Matsumaru Daisuke, Ota Nao, Kitamura Hiroshi, Zhang Tianxiang, Honkura Yohei, Katori Yukio, Motohashi Hozumi	4. 巻 6
2. 論文標題 Activation of the NRF2 pathway in Keap1-knockdown mice attenuates progression of age-related hearing loss	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 npj Aging and Mechanisms of Disease	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41514-020-00053-4	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 Wati Sisca Meida, Matsumaru Daisuke, Motohashi Hozumi	4. 巻 36
2. 論文標題 NRF2 pathway activation by KEAP1 inhibition attenuates the manifestation of aging phenotypes in salivary glands	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 101603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.redox.2020.101603	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 (*Equal contribution) Uruno A*, Matsumaru D*, Ryoke R, Saito R, Kadoguchi S, Saigusa D, Saito T, Saïdo TC, Kawashima R, Yamamoto M.	4. 巻 40
2. 論文標題 Nrf2 Suppresses Oxidative Stress and Inflammation in App Knock-in Alzheimer's Disease Model Mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00467-19	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 Matsumaru D, Motohashi H.	4. 巻 167
2. 論文標題 From germ cells to neonates: the beginning of life and the KEAP1-NRF2 system.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biochem.	6. 最初と最後の頁 133-138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz070	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 松丸大輔, 本橋ほづみ.	4. 巻 50
2. 論文標題 KEAP1-NRF2系制御による健康長寿.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 糖尿病・内分泌代謝科	6. 最初と最後の頁 190-196
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 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 吉田 莉子、松丸 大輔、石田 慶士、目加田 京子、本橋 ほづみ、中西 剛
2. 発表標題 遺伝学的アンドロゲン高産生マウスの多嚢胞性卵巣症候群様症状は酸化ストレス制御によって改善される
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Daisuke Matsumaru, Riko Yoshida, Yuta Mori, Keishi Ishida, Kyoko Mekada, Hozumi Motohashi, Tsuyoshi Nakanishi
2. 発表標題 Establishment and characterization of genetic mouse model of polycysticovary syndrome
3. 学会等名 2023 Japan/Korea Joint Symposium on Pharmaceutical Health Science and Environmental Toxicology( (招待講演) (国際学会) )
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2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
連携研究者	本橋 ほづみ (MOTOHASHI Hozumi)  (00282351)	東北大学・加齢医学研究所・教授  (11301)	
連携研究者	中西 剛 (NAKANISHI Tsuyoshi)  (50303988)	岐阜薬科大学・薬学部・教授  (23701)	

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
---------	---------