

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2020
課題番号：19K18631
研究課題名（和文）転写因子p53によるSF1/Ad4BPを介した性機能調節機構

研究課題名（英文）p53 regulates sexual functions through SF1/Ad4BP

研究代表者

原口 広史（Haraguchi, Hirofumi）

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：50804506

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：転写因子SF1/Ad4BPは性機能分化への関与が知られていたが、その調節機構は不明であった。Mdm2は癌抑制因子として知られるp53の抑制因子であり、Mdm2を欠損させるとp53分解が起こらずp53の作用が増強する。本研究では、卵丘細胞の転写調節因子として、p53とMdm2を介した卵子成熟および排卵の調節機構を調べる中で、顆粒膜細胞においてp53による転写調節によりSF1/Ad4BPの発現が調節され、卵巢機能がコントロールされていることを明らかにした。p53のSF1を介した性機能調節機構が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、p53のSF1を介した性スペクトラム調節機構が明らかとなった。Mdm2-p53の系がSF1を介して、メスマウスの卵巢機能や子宮機能の維持を図っていること、その欠損により、完全メスからややオス寄りに偏位した性スペクトラムの状態になっている可能性が示された。また、SF1を調節している因子としてのp53の過剰発現・活性化により、SF1低下を介してメスをオス化する因子としてのp53の側面を見出した。これらの知見は、今後の研究の進展により、性分化異常の機序の解明や、不妊症の病態解明、避妊薬の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：The transcription factor SF1/Ad4BP is known to be involved in sexual functions and sex differentiation, but their regulatory mechanism remained unknown. Mdm2 is a suppressor of p53, and when Mdm2 is deficient, p53 degradation does not occur and the action of p53 is enhanced. In this study, we investigated the regulatory mechanism of oocyte maturation and ovulation mediated by Mdm2 and p53 in the cumulus granulosa cells. We revealed that the expression of SF1/Ad4BP is transcriptionally regulated by p53 and this regulation is associated with ovarian function. Thus, we clarified that p53 is involved in SF1-mediated regulation of ovarian functions.

研究分野：産婦人科学

キーワード：p53 Mdm2 SF1/Ad4BP 卵巢 排卵 卵子成熟

1. 研究開始当初の背景

性腺や副腎の発生・分化・形成に関わる主要な転写因子 SF1 / Ad4BP (NR5A1) は広く知られ研究がなされており、全身性や臓器特異的な SF1 ノックアウトマウスを用いた解析やヒトの遺伝子変異の報告から、SF1 の機能が低下するとオスはオスとしての生殖機能を失い内外性器を含めメス化し、メスはメスとしての生殖機能を障害されることが判明している。これらの知見は、雌雄を連続的な表現型と考える性スペクトラムという観点では、SF1 がオス・メスに性を固定する因子であり、SF1 作用の低下により性の定位がメス寄り、かつ、完全メスでない位置に移行することを示している。これまでに、SF1 の調節に関わる因子として WT1 や CBX2 などの転写因子がこれまで報告されているが、依然 SF1 発現調節機構は複雑であり未解明な点が多い。

排卵は単一の現象ではなく、卵胞成熟・卵子成熟・卵胞破裂・黄体形成などの一連の現象の複合体である。第一減数分裂前期の卵母細胞は受精・発生能を有さない未熟な卵子であり、下垂体からの LH サージによって減数分裂を再開し、受精能および初期胚への発生能を獲得する(卵子成熟)。卵子成熟は LH が卵子に直接作用し誘導されるわけではなく、LH が LH 受容体を発現している顆粒膜細胞・莖膜細胞に作用し、そこで産生される二次因子が卵子に作用して卵子成熟を誘導するという局所制御機構が存在する。卵子に接する顆粒膜細胞である卵丘顆粒膜細胞(卵丘細胞)は卵子成熟に重要な卵丘細胞-卵子複合体(cumulus cell-oocyte complex; COC)の構成要素であり、LH サージによる卵丘細胞膨化(COC expansion)により、卵子・卵丘間の gap junction が急速に消失し、卵子内 cAMP が低下して減数分裂再開する。グラーフ卵胞では、LH サージ後の卵子成熟に引き続いて、卵胞破裂と成熟卵子の放出(排卵)が惹起されることから、卵子成熟はいわば「排卵の窓口」となる重要な過程である。現時点では、LH サージ後の卵子成熟の際の、卵丘細胞における機能的転写因子の存在は明らかとなっていないため、その同定および機能調節の仕組みの解明が必要とされている。体外受精・胚移植において、採卵後に認められる卵子成熟不全は不成功の主因の1つであるもののその病態は未だ明らかでなく、未熟卵子を体外で成熟させる技術が望まれているが未だ確立しておらず、卵子成熟機構の解明は生殖医学領域における重要な課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、組織および細胞培養系を用いた p53 の SF1 転写調節機構の解析と Mdm2 および p53 のコンディショナルノックアウトマウスを用いた性機能の表現型解析によって、p53 の SF1 を介した性機能調節機構を明らかにすることを目的とする。

Mdm2 は p53 の抑制因子であり、Mdm2 を欠損させると p53 分解が起こらず p53 の作用が増強する。本研究は卵丘細胞の転写調節因子として、癌抑制因子として知られる p53 の抑制因子である Mdm2 を介した卵子成熟および排卵の調節機構を SF1 に着目して調べた。将来的には、卵子成熟不全の治療や未熟卵子体外成熟技術開発という臨床応用を目指すものである。

3. 研究の方法

Mdm2-loxP および p53-loxP マウスを用いて、卵巣顆粒膜細胞(壁および卵丘顆粒膜細胞)特異的な Mdm2 欠損マウス、p53 欠損マウス、Mdm2/p53 の 2 重欠損マウスを作成し、妊娠能のある野生型雄マウスとの自然交配での排卵・受精、着床、分娩の表現型、過排卵(排卵誘発)での排卵の表現型を検討した。卵巣顆粒膜細胞の遺伝子欠損マウス作成のために、プロゲステロン受容体(Pgr)-Cre マウスを用いた。COC の組織培養の際に、FSH または PGE2 または cAMP を添加すると in vitro で COC expansion が認められる。野生型マウスから採取した COC を FSH または PGE2 または cAMP での培養する際に Mdm2 阻害剤 Nutlin-3 を同時添加して、in vitro COC expansion を観察した。また、Mdm2 欠損マウスおよびコントロールマウスから COC を回収、卵丘細胞を分離、RNA 抽出し、マイクロアレイで Mdm2 欠損による transcript の変化を検討した。マイクロアレイで差の認められる遺伝子から p53 のターゲットになりうる遺伝子を選出し、顆粒膜細胞株を用いて p53 の ChIP アッセイおよびルシフェラーゼアッセイを行い、p53 の転写調節によるターゲットであることを確認した。

ヒト体外受精(顕微授精)患者の卵丘細胞を採取し、MDM2 および SF-1 をはじめとする p53 のターゲット遺伝子の mRNA 発現量と、卵子成熟、受精の臨床成績との相関を検討した。

4. 研究成果

卵巣顆粒膜細胞の Mdm2-loxP/Pgr-Cre の雌マウス(Mdm2 欠損マウス)は排卵および受精の障害のために不妊となるが p53-loxP/Pgr-Cre (p53 欠損マウス)および Mdm2-loxP/p53-loxP/Pgr-Cre (Mdm2/p53 の 2 重欠損マウス)の雌マウスでは正常な排卵・受精の表現型を示すこと、Mdm2 欠損マウスでは、卵子成熟の過程である COC expansion と卵子成熟の指標である卵核胞崩壊が障害されていた。これらの結果から、卵巣顆粒膜細胞における p53 の誘導は卵母細胞の成熟を阻害し排卵・受精を妨げることが示唆された。

卵丘細胞を用いたマイクロアレイと定量的 PCR の結果から、Mdm2 欠損の卵丘細胞で低下し、p53・Mdm2 の 2 重欠損の卵丘細胞では低下を認めない遺伝子として卵丘機能の重要な調節因子であるステロイド産生因子 1 (SF1/Ad4BP, Nr5a1) を選出した。細胞株を用いた ChIP アッセイ

にてその SF1 プロモーター領域に p53 が結合すること、ルシフェラーゼアッセイで p53 転写活性があることを確認した。SF1 は顆粒膜細胞の p53 によって転写調節を受けていることが示された。卵巣における Mdm2 欠損による p53 の増加は卵子成熟を障害すること、p53 の転写調節因子として SF1 が機能していることが示唆された。以上のマウスモデルを用いた解析から、p53 と SF1 を介した卵子成熟の過程の異常および不妊との関連が明らかとなった。

次に、ヒト卵巣顆粒膜細胞の臨床検体を用いて、ヒト体外受精の成績と MDM2 および SF1 の発現量との相関関係検討したところ、卵子成熟不良や受精率不良の場合に卵丘顆粒膜細胞の MDM2 発現と SF1 発現が低下していることが示された。これらのことから、ヒトおよびマウスの卵丘顆粒膜細胞において、p53 - MDM2 - SF1 軸が卵子成熟、排卵、受精を調節していることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Akaeda Shun, Hirota Yasushi, Fukui Yamato, Aikawa Shizu, Shimizu Hirota Ryoko, Kaku Tetsuaki, Gebriel Mona, Hirata Tomoyuki, Hiraoka Takehiro, Matsuo Mitsunori, Haraguchi Hirofumi, Saito Kanatani Mayuko, Takeda Norihiko, Fujii Tomoyuki, Osuga Yutaka	4. 巻 22
2. 論文標題 Retinoblastoma protein promotes uterine epithelial cell cycle arrest and necroptosis for embryo invasion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e50927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202050927	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 Haraguchi Hirofumi, Harada Miyuki, Kashimada Kenichi, Horikawa Reiko, Sakakibara Hideya, Shozu Makio, Fujii Tomoyuki, Osuga Yutaka, Kugu Koji	4. 巻 47
2. 論文標題 National survey of primary amenorrhea and relevant conditions in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 774 ~ 777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.14606	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 Hiraoka Takehiro, Hirota Yasushi, Fukui Yamato, Gebriel Mona, Kaku Tetsuaki, Aikawa Shizu, Hirata Tomoyuki, Akaeda Shun, Matsuo Mitsunori, Haraguchi Hirofumi, Saito-Kanatani Mayuko, Shimizu-Hirota Ryoko, Takeda Norihiko, Yoshino Osamu, Fujii Tomoyuki, Osuga Yutaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Differential roles of uterine epithelial and stromal STAT3 coordinate uterine receptivity and embryo attachment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-72640-0	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 Matsuo Mitsunori, Hirota Yasushi, Fukui Yamato, Fujita Hidetoshi, Saito-Fujita Tomoko, Kaku Tetsuaki, Gebriel Mona, Hirata Tomoyuki, Akaeda Shun, Hiraoka Takehiro, Tanaka Tomoki, Haraguchi Hirofumi, Saito-Kanatani Mayuko, Shimizu-Hirota Ryoko, Takeda Norihiko, Fujii Tomoyuki, Osuga Yutaka	4. 巻 161
2. 論文標題 Levonorgestrel Inhibits Embryo Attachment by Eliminating Uterine Induction of Leukemia Inhibitory Factor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 bqz005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endocr/bqz005	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 原口広史、廣田泰	4. 巻 26
2. 論文標題 【子宮頸部の生理と病理】子宮頸部の生理 子宮頸部の周期的変化	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY	6. 最初と最後の頁 17-20
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 -

1. 著者名 賀来哲明, 廣田泰, 福井大和, 大村恵里香, 赤枝俊, 平岡毅大, 松尾光徳, 原口広史, 大須賀穰, 藤井知行	4. 巻 86
2. 論文標題 月経随伴症状を有する子宮腺筋症に対する子宮腺筋症病巣除去術の効果	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 産科と婦人科	6. 最初と最後の頁 767-771
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 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 森嶋かほる, 原口 広史, 高村 将司, 金谷 真由子, 平野 茉来, 秋山 育美, 能瀬 さやか, 原田 美由紀, 平田 哲也, 廣田 泰, 甲賀 かをり, 平池 修, 大須賀穰, 藤井知行	4. 巻 73
2. 論文標題 腹腔鏡下子宮筋腫核出術の安全性を担保するための最適な筋腫個数に関する検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床婦人科産科	6. 最初と最後の頁 701-704
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 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 松尾光徳, 高村将司, 長嶋菜月, 原口広史, 原田美由紀, 甲賀かをり, 藤井知行, 大須賀穰	4. 巻 35
2. 論文標題 腹腔鏡手術後ドレーン抜去時に発生した卵管ポートサイトヘルニアの一例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本産科婦人科内視鏡学会雑誌	6. 最初と最後の頁 299-303
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 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 石沢千尋, 浦田陽子, 真壁友子, 原口広史, 矢野倫子, 松尾光徳, 宮下真理子, 金谷真由子, 森嶋かほる, 廣田泰, 大須賀稜, 藤井知行	4. 巻 69
2. 論文標題 子宮粘膜炎に対しGnRHアンタゴニストを使用して多量出血をきたした1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 東京産科婦人科学会誌	6. 最初と最後の頁 23-28
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 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 Haraguchi H, Hirota Y, Saito-Fujita T, Tanaka T, Shimizu-Hirota R, Harada M, Akaeda S, Hiraoka T, Matsuo M, Matsumoto L, Hirata T, Koga K, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y.	4. 巻 33
2. 論文標題 Mdm2-p53-SF1 pathway in ovarian granulosa cells directs ovulation and fertilization by conditioning oocyte quality.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 2610-2620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201801401R	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 Haraguchi H, Imamura Y, Kokabu T, Hasegawa-Minato J, Kobayashi M, Nagayasu Y, Sekine M, Yanaihara N.	4. 巻 46
2. 論文標題 Reports of the 2019 ACOG Annual Clinical and Scientific Meeting in Nashville, Tennessee	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res	6. 最初と最後の頁 5-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.14127	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 Matsuo M, Hirota Y, Fukui Y, Fujita H, Saito-Fujita T, Kaku T, Gebril M, Hirata T, Akaeda S, Hiraoka T, Tanaka T, Haraguchi H, Saito-Kanatani M, Shimizu-Hirota R, Takeda N, Fujii T, Osuga Y.	4. 巻 46
2. 論文標題 Levonorgestrel Inhibits Embryo Attachment by Eliminating Uterine Induction of Leukemia Inhibitory Factor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 pii: bqz005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endo/bqz005	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0件

〔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
連携研究者	廣田 泰 (HIROTA YASUSHI) (40598653)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	

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