

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21688019

研究課題名（和文）マイクロ RNA の比較発現解析による排卵機構の解明，その卵子成熟培養系への応用

研究課題名（英文）The study for development of novel *in vitro* oocyte maturation technique generated from expression profile of micro-RNA during ovulation process

研究代表者

島田 昌之（SHIMADA MASAYUKI）

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：20314742

研究成果の概要（和文）：

排卵期において，顆粒膜細胞の ERK1/2 経路が多様な遺伝子発現を誘導し，自身の黄体化，卵丘細胞の膨潤および卵成熟を引き起こす。しかし，体外培養系では，ERK1/2 の標的遺伝子発現が低値を示し，これは ERK1/2 経路を増強する NRG1 発現がほとんど認められないことに起因していた。Nrg1 は，体外培養でアンチセンス鎖由来のマイクロ RNA が発現し，それが発現抑制していた。これらの結果から，卵の体外培養系に NRG1 を添加し，高い発生能を有する成熟卵を得ることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

During ovulation process, ERK1/2 pathway increased the expression level of multiple kinds of genes in granulosa cells, which induced luteinization of granulosa cells, cumulus cell expansion and oocyte maturation. However, in *in vitro* culture system, the level of ERK1/2-target genes was lower than those in *in vivo* due to the low level of neuregulin 1. Neuregulin 1 that enhanced the phosphorylation of ERK1/2 was corded by Nrg1 which had two transcription start sites in both terminals. The micro-RNA that might be generated from antisense strand of Nrg1 via Dicer-dependent manner suppressed the transcription of sense strand. To rescue the low level of Nrg1 in *in vitro*, the addition of neuregulin improved oocyte developmental competence.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2010 年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2011 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
年度			
年度			
総計	20,400,000	6,120,000	26,520,000

研究分野：動物生殖学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学，応用動物科学

キーワード：排卵，顆粒膜細胞，転写制御，シグナル伝達経路，受精，成長因子，卵，体外成熟培養

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の卵は、胎児期に減数分裂を開始し、第一減数分裂前期で停止した状態にある。この未熟卵は、一層の扁平な体細胞（顆粒膜細胞）で覆われた原始卵胞を形成し、顆粒膜細胞の増殖とともに、卵胞腔をもった胞状卵胞に至る。胞状卵胞は、卵胞膜を裏打ちする顆粒膜細胞、卵を直接覆う卵丘細胞および第一減数分裂前期で停止した卵からなり、顆粒膜細胞に LH 受容体が形成されることで、排卵準備を完了した発達した卵胞となる。この卵胞に脳下垂体から一過的に分泌された LH が作用することで、卵は減数分裂を再開し、受精可能な第2減数分裂中期に進行し、細胞間にヒアルロン酸を主成分とするマトリックスを蓄積した卵丘細胞層（卵丘細胞の膨潤）とともに卵管へと排出される（排卵）。顆粒膜細胞は、黄体化し多量のプロジェステロンを合成・分泌する黄体を形成する。

このような卵胞発達期および排卵期は、脳下垂体から放出される卵胞刺激ホルモン（FSH）と LH により制御されていることが知られている。しかし、卵胞内の局所環境がどのように変化し、受精能を持った卵が形成され、排卵に至るかについては、不明な点が多い。特に、FSH や LH の受容体は主に顆粒膜細胞に発現することから、顆粒膜細胞から卵丘細胞および卵を刺激する局所因子が必要と推察されるが、その知見は非常に少ない。

## 2. 研究の目的

卵胞発育、排卵期の卵胞内局所因子を解明することは、①繁殖障害の原因解明と治療法の開発、②体外培養系の創出、につながると期待される。それにより、家畜の繁殖障害を予防すること、あるいは繁殖障害が起こりにくい育種をすることが可能となり、体外培養系は、雌の遺伝資源の有効利用を可能とする。体外培養系において、FSH や LH により発現誘導されない二次因子については、その添加が必須となると予想される。

以上のことから、本研究では、卵胞発育および排卵過程において、時期特異的に発現する遺伝子の同定とその制御機構を解明した。さらに、それらの中から、体外培養系と体内で発現レベルの変化が異なる遺伝子群に着目し、その差異を引き起こすメカニズムの解明と、両者の比較解析によりキーとなる分泌因子を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### ①マイクロアレイ解析

3週齢の C57/BL6 雌マウスに eCG と hCG を投与して、卵胞発育と排卵を誘起し、経時的に顆粒膜細胞を回収した。排卵不全モデルとして、C/EBP $\beta$  を顆粒膜細胞特異的に欠失させた *Cebpb<sup>lox/lox</sup>;Cyp19a1Cre* マウスと顆

粒膜細胞特異的に恒常的活性型 $\beta$ -Catenin を発現する *Ctnnb1<sup>(Ex3)lox/lox</sup>;Cyp19a1Cre* マウスを作成した。これらから回収した Total RNA をサンプルとして、常法にしたがって発現解析用のマイクロアレイ解析を実施した。

### ②発現解析

マイクロアレイ解析により発現が検出された遺伝子は、real-time PCR 法によりその mRNA 量を定量し、western blotting あるいは免疫蛍光染色法によりそのタンパク質レベルの発現量と局在を検出した。

さらに、eCG 投与マウスから回収した顆粒膜細胞の初代培養系を用いて、FSH や LH 刺激後にサンプリングを行い、体内環境における遺伝子発現量と比較解析した。

### ③発現制御機構の解析

eCG 投与したマウスから顆粒膜細胞を回収し、その初代培養系を用いて、リガンド添加実験、あるいは抑制剤添加実験を行い、その発現機構を解明した。さらに、luciferase 遺伝子を用いたレポーターアッセイにより、プロモーター活性測定を行った。

さらに、マイクロ RNA 形成に関わる Dicer を siRNA によりノックダウンした顆粒膜細胞を用いて、遺伝子発現量に及ぼす影響を検討した。

### ④機能解析

顆粒膜細胞特異的に Cre を発現する *Cyp19a1Cre* マウスと *Nrg1* 遺伝子の EGF domain をコードする Exon 7~10 を loxP 配列でサンドイッチした *Nrg1<sup>lox/lox</sup>* マウスを交配して得た *Nrg1<sup>lox/lox</sup>;Cyp19a1Cre* の表現系解析を行った。

体外培養系を用いたリガンド添加実験により、活性化されるシグナル伝達経路を western blotting にて、標的遺伝子を real-time PCR により検出した。

## 4. 研究成果

### ① 卵胞発育期における発現遺伝子の同定と機能解析

卵胞発育を促す FSH 製剤である eCG の投与は、顆粒膜細胞を増殖させ、LH 受容体や EGF 受容体の形成を促した。それとともに、卵胞膜におけるアンドロゲン合成酵素群とそれを顆粒膜細胞でエストロゲンに変換するアロマトーゼの発現が、著しく亢進されていた。この既知の遺伝子群と共に、アセトアルデヒド分解酵素群の発現が同定された。

アセトアルデヒド分解酵素 *Aldh* は、13 種類からなる family を形成している。そこで、卵胞発育過程における *Aldh* family の発現を検出した結果、*Aldh1a1* と *Aldh1a7* の発現が

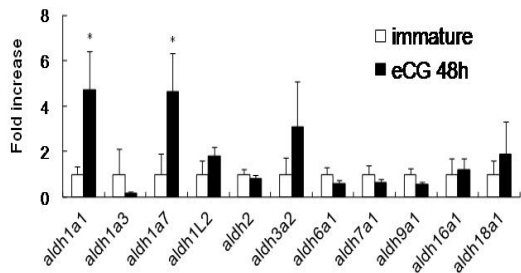


図1. 卵胞発育期に発現上昇するAldh familyの網羅的解析有意に増加していた (図1). さらに, 卵胞発育期においてアセトアルデヒドが増加し, 直ちに減少することも明らかとなった.

このアセトアルデヒドの合成は, 卵胞膜におけるアンドロゲン合成において, CYP17A1によるアンドロステンジオン同様の副産物として産生されていることも突き止めた. 卵胞発育期に ALDH の作用を抑制したとき, 卵胞直径の増大は認められるが, 顆粒膜細胞における LH 受容体形成が低値であり, 排卵刺激後の卵成熟能が著しく低いことも明らかとなった (図2). 以上の結果から, 卵胞発育期にアセトアルデヒドが産生され, それをALDH family が分解することで, 顆粒膜細胞の分化が誘導され, 卵の成熟能が高められることが初めて明らかとなった.

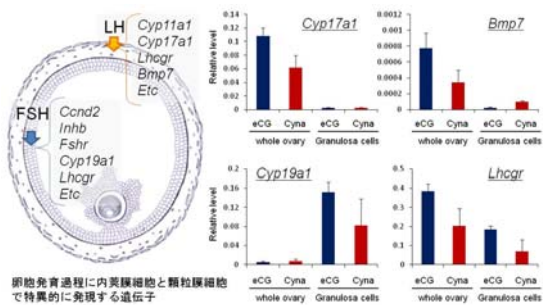


図2. ALDH抑制剤Cynamide (Cyna)が卵胞発育に関わる遺伝子発現に及ぼす影響

## ② 排卵過程における特異的発現遺伝子の同定

排卵刺激後に発現する遺伝子の中から, 排卵に必要な遺伝子を絞り込むために, 排卵不全を呈する *Cebpb<sup>flx/flx</sup>;Cyp19a1Cre* マウスと *Ctnnb1<sup>(Ex3)flx/flx</sup>;Cyp19a1Cre* マウスの解析を行った. その結果, *Ctnnb1<sup>(Ex3)flx/flx</sup>;Cyp19a1Cre* マウスと野生型マウスの比較解析から, *Areg* の発現が重要であることが示唆された. 一方, *Cebpb<sup>flx/flx</sup>;Cyp19a1Cre* マウスにおいては, *Nrg1* 遺伝子や黄体化マーカー遺伝子の発現が低下していた. 体外培養において, ARGE に NRG1 を添加することで, 顆粒膜細胞の黄体化が促進されたことから, *Cebpb<sup>flx/flx</sup>;Cyp19a1Cre* マウスの黄体形成不全は, NRG1 の発現低下により引き起こされている可能性が示唆された.

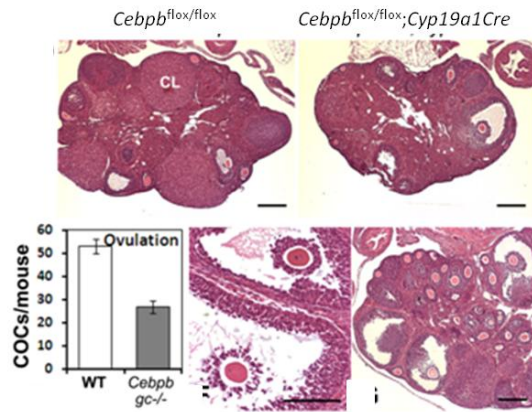


図3. *Cebpb*遺伝子欠損マウスは排卵不全を呈する

## ③ 体外培養系で発現が誘導できない遺伝子の解析

次に, 卵胞発育期や排卵期に発現誘導され, それぞれに重要な役割を果たす *Aldh* family や *Areg*, *Nrg1* について, その発現制御機構と作用の詳細を調べる目的で, 顆粒膜細胞の初代培養系における発現を検出した. その結果, 未成熟マウスから回収した顆粒膜細胞をFSH 添加培地で培養したとき, 卵胞発育マーカーである *Cyp19a1* や *Lhcgr* と同様に *Aldh1a7* の発現が誘導された. eCG 刺激したマウスから回収した顆粒膜細胞では, LH 刺激により *Areg* 発現が著しく上昇した. しかし, *Nrg1* の発現は, 逆に減少していた. おもしろいことに, random adapter で total RNA を逆転写したとき, LH 刺激後の *Nrg1* の発現量は, 未添加コントロールと同等であった. すなわち, polyA 構造が形成されていないか, あるいは polyA 構造付近が分解されていると推察された.

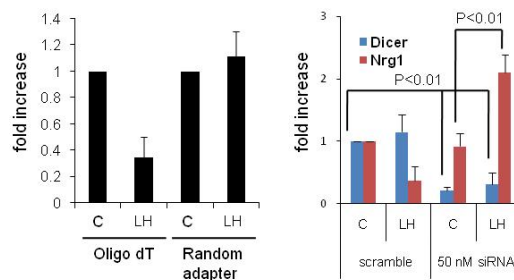


図4. 顆粒膜細胞の体外培養における*Nrg1*発現

*Nrg1* 遺伝子の発現機構について, さらに詳細に解析するため, *Nrg1* 遺伝子のプロモーター領域の検索を行った. *Nrg1* 遺伝子は, reverse 側にコードされているが, 上流および下流どちらにも転写因子の結合サイトが複数認められ, それらは両者で相同性が認められた. 両者のプロモーターコンストラクションを作成し, その活性を luciferase 遺伝子による reporter assay により検討した. その結果, 顆粒膜細胞において LH 刺激によ

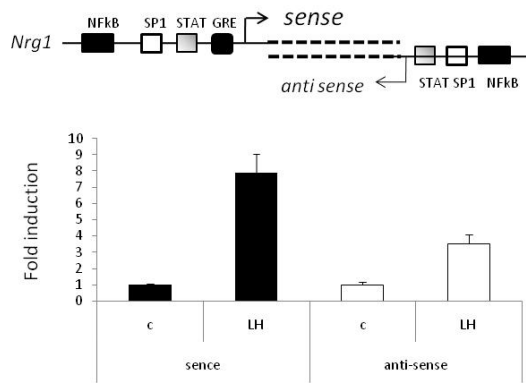


図5. *Nrg1*遺伝子の予測されるプロモーター領域とその活性り両者の活性が上昇していた。

これらの結果から, in vitroにおいて, *Nrg1*は, センスおよびアンチセンス鎖両方が発現し, アンチセンス鎖がセンス鎖の分解に関わっているのではないかと推察した. そこで, このようなアンチセンス鎖から siRNA を形成する Dicer に着目し, Dicer ノックダウン顆粒膜細胞における *Nrg1* 発現を検出した結果, *Nrg1* 発現が LH により有意に上昇した. Dicer ノックアウトマウスは, 不妊を呈するが, その原因は卵胞発育や排卵不全ではなく, 黄体

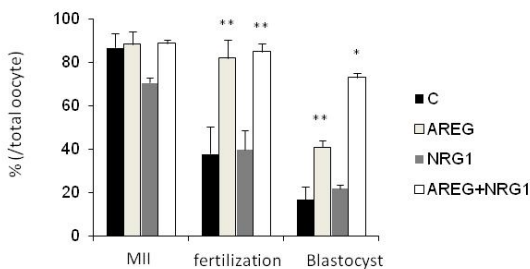


図6. NRG1添加が卵の成熟, 発生能に及ぼす影響形成不全であるため, in vivo においては *Nrg1* 発現への関与は無いと考えられるが, 体外培養環境における誤った siRNA の発現が, 特定の遺伝子発現を妨げていることが示唆された。

④ 体外で発現誘導されない遺伝子産物の添加試験-卵成熟・受精への影響-

これまでの結果から, 体外培養条件では, 排卵期に体内では発現する *Nrg1* が低値であることが示された. そこで, NRG1 を添加することで, 体外成熟培養における卵の受精能および発生能が改善されるか否かを検討した.

NRG1 単独添加では, 卵の減数分裂再開が誘導されなかった. さらに, NRG1 は AREG による減数分裂再開を遅延させ, 第2減数分裂中期への進行速度を体内のそれと同調させていた. この成熟卵を体外受精したとき, AREG 単独添加区と比較して, 卵の胚盤胞期胚への発生率は有意に高かった.

ブタ卵においても NRG1 添加効果を検討し

た結果, NRG1 の受容体である ErbB3 は体外培養 24 時間で発現し, その時間に NRG1 を添加すると, 卵の成熟率に変化はないが体外受精後の発生能がマウスと同様に向上した。

⑤ 顆粒膜細胞特異的 *Nrg1* 遺伝子欠損マウスの作成

添加実験により, 顆粒膜細胞の黄体化, 卵の発生能を促進した *Nrg1* 遺伝子について, 体内における役割を明らかとするため, 遺伝子欠損マウスの作成を試みた. *Nrg1*<sup>-/-</sup>マウスは, 胎生致死であることから, *Cyp19a1Cre* マウスを用いた顆粒膜細胞特異的欠損マウスを作出した. その結果, 一腹産子数の有意な低下と, 早期の卵巣機能の消失が表現系として明らかとなった。

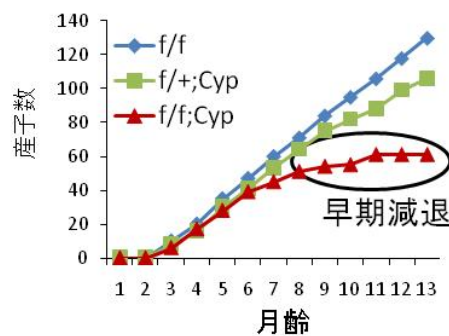


図7. *Nrg1*<sup>flax/flax</sup>; *Cyp19a1Cre* 雌マウスの交配試験

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Kawai T, Mihara T, Kawashima I, Fujita Y, Ikeda C, Negishi H, Richards JS, Shimada M. (2012) Endogenous acetaldehyde toxicity during antral follicular development in the mouse ovary. *Reprod Toxicol*, 33, 322-330 (査読付き)
2. Y. Fujita, T. Mihara, T. Okazaki, M. Shitanaka, R. Kushino, C. Ikeda, H. Negishi, Z. Liu, J.S. Richards, M. Shimada (2011) Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 on human sperm recognize bacterial endotoxins and mediate apoptosis. *Hum Reprod* 26(10): 2799-2806. (査読付き)
3. Y. Yamashita, M. Okamoto, I. Kawashima, T. Okazaki, R. Nishimura, Y. Gunji, M. Hishinuma, M. Shimada (2011) The Positive Feedback Loop Between Prostaglandin E2 and EGF-Like Factors Is Essential for the Sustainable Activation of MAPK3/1 in Cumulus Cells During In Vitro



- Maturation of Porcine Cumulus-Oocyte Complexes. *Biol Reprod* 85, 1073-1082 (査読付き)
4. M. Shimada, Y. Yamashita (2011) The key signaling cascades in granulosa cells during follicular development and ovulation process. *J Mamm Ova Res*, 28, 25-31 (査読付き)
  5. N. Noma, I. Kawashima, H.Y. Fan, Y. Fujita, T. Kawai, Y. Tomoda, T. Mihara, J.S. Richards, M. Shimada (2011) LH induces Neuregulin 1 (NRG1) type III specific transcripts that interact with EGF-like factor pathways to control granulosa cell differentiation and oocyte maturation. *Mol. Endocrinol.* 25(1):104-116 (査読付き)
  6. 川島一公, 野間紀孝, Heng-Yu Fan, JoAnne S. Richards, 島田昌之 (2010) ERK1/2 の活性化増強システムが, 卵子成熟, 卵丘細胞の膨潤, 顆粒膜細胞の黄体化に必須である, 日本生殖内分泌学会誌, 14 巻, 35-40 (査読付き)
  7. H.Y. Fan, A. O'Connor, M. Shitanaka, M. Shimada, Z. Liu, J.S. Richards (2010)  $\beta$ -Catenin (CTNNB1) Promotes Preovulatory Follicular Development but Represses LH-Mediated Ovulation and Luteinization. *Mol Endocrinol* 24(8) 1529-1542 (査読付き)
  8. J. Ito, M. Shimada, N. Kashiwazaki (2010) Possible involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in the maintenance of metaphase II arrest in porcine oocytes matured in vitro. *Anim Sci J*, 81, 42-47. (査読付き)
  9. T. Mihara, K. Fukumoto, T. Okazaki, M. Shimada (2010) Murine sperm expresses Toll-like receptor (TLR) family that responds to the pathogens released from virus, and decreases fertilization ability by the stimuli. *J Mamm Ova Res*, 27, 136-143 (査読付き)
  10. Y. Yamashita, I. Kawashima, Y. Gunji, M. Hishinuma, M. Shimada (2010) Progesterone is essential for maintenance of Tace/Adam17 mRNA expression, but not EGF-like factor, in cumulus cells, which enhances EGF receptor signaling pathway during in vitro maturation of porcine COCs. *J Reprod Dev*, 56(3) 315-323 (査読付き)
  11. 島田昌之 (2010) 卵子卵丘細胞複合体と卵子形成, *J Mamm Ova Res*, 26, 189-194 (査読付き)
  12. M. Shimada, J.S. Richards (2010) Cumulus cells are an essential mediator of ovulation stimuli from granulosa cells to oocyte. *J Mamm Ova Res*, 27(1):2-10. (査読付き)
  13. Z. Liu, D.G. de Matos, H.Y. Fan, M. Shimada, S. Palmer, J.S. Richards (2009) IL6: an autocrine regulator of the mouse cumulus cell-oocyte complex expansion process. *Endocrinology*, vol. 150 (8) 3360-3368. (査読付き)
  14. H.Y. Fan, Z. Liu, M. Shimada, E. Sterneck, P.F. Johnson, S.M. Hedrick, J.S. Richards (2009) ERK1/2 in ovarian granulosa cells are critical for female fertility. *Science*, vol (324) 938-941. (査読付き)
  15. Y. Yamashita, M. Hishinuma, M. Shimada (2009) Activation of PKA, p38MAPK and ERK1/2 by gonadotropins in cumulus cells is critical for induction of EGF-like factor and TACE/ADAM17 gene expression during in vitro maturation of porcine COCs. *J Ova Res*, 2(1):20. (査読付き)
- [学会発表] (計 30 件)
1. M. Shimada, Cumulus cells are an essential mediator of ovulation stimuli from granulosa cells to oocyte, International Ovarian Conference, 2012, 東京都, 2012 年 3 月 17 日 (シンポジウム)
  2. 島田昌之, 卵胞環境の時期特異的变化を考慮した体外成熟培養, 第 29 回日本受精着床学会, 東京都, 2011 年 9 月 7 日 (シンポジウム)
  3. I. Kawashima, Z. Liu, L. K. Mullany, J.S. Richards, M. Shimada, Cumulus cell-oocyte complex expansion is regulated by  $Ca^{2+}$  induced m-calpain activity leading to cumulus cell motility and migration. 44<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, Portland, Oregon, USA, 2011 年 8 月 5 日 (selected oral presentation)
  4. 島田昌之, 卵胞発育, 排卵期におけるか流膜細胞のシグナル伝達経路の役割, 第 51 回日本哺乳動物卵子学会, 大田原市, 2011 年 5 月 22 日
  5. 島田昌之, EGF like factor による卵成熟, 排卵調節機構, 第 84 回日本内分泌学会, 神戸市, 2011 年 4 月 23 日 (シンポジウム)
  6. 島田昌之, 卵子成熟を制御する顆粒膜細

- 胞分泌因子, 第 15 回日本生殖内分泌学会, 吹田市, 2010 年 11 月 20 日 (シンポジウム)
7. 田畑 慧, 川合 智子, 下中 麻奈美, 島田昌之, Zhilin Liu, JoAnne S. Richards, 渡辺 浩彦, 森 崇英, 卵胞発育, 排卵過程の顆粒膜細胞における Toll-like receptor family の発現とその機能解析, 第 55 回日本生殖医学会, 徳島市, 2010 年 11 月 11 日
  8. 島田昌之, Cumulus cells are an essential mediator of ovulation stimuli from granulosa cells to oocyte, 第 103 回日本繁殖生物学会, 十和田市, 2010 年 9 月 2 日 (シンポジウム)
  9. M. Shimada, The innate immune functions of male and female germ cells - The expression of TLR family reduces the risk of infection problem from fetus. 30<sup>th</sup> Annual meeting of The American Society for Reproductive Immunology, Pennsylvania, USA, 2010 年 5 月 17 日 (特別招待講演)
  10. 川合智子, 川島一公, Zhilin Liu, 藤田陽子, 根岸広明, JoAnne S. Richards, 島田昌之, 顆粒膜細胞に発現する ALDH1 family が, 産生されるアセトアルデヒドを分解し, 排卵前卵胞への発育を促進する, 第 50 回日本哺乳動物卵子学会, 新潟市, 2010 年 5 月 29 日 (学術奨励賞受賞演題)
  11. 島田昌之, 卵子の受精後の発生能を高める仕組みの解明とその IVF への応用, 第 5 回日本生殖再生医学会, 東京都 2010 年 2 月 21 日 (シンポジウム)
  12. 川島一公, 野間紀孝, 島田昌之, 顆粒膜細胞で発現する Neuregulin-1 (NRG1) は, Sphingosine-1-Phosphate (S1P) の産生を介して卵子の減数分裂進行速度を調整し, 発生能を獲得させる, 第 14 回日本生殖内分泌学会大会, 東京都, 2009 年 11 月 28 日 (学術奨励賞受賞演題)
  13. 島田昌之, 排卵刺激による卵胞環境の段階的誘導 (sequential induction) が卵子成熟を制御する, 第 27 回日本受精着床学会総会・学術集会, 教育講演, 京都市, 2009 年 8 月 5 日 (教育講演)
  14. M. Shimada, N. Noma, M. Shitanaka, I. Kawashima, H. Y. Fan, J. S. Richards, Neuregulin 1 is a novel oocyte maturation regulatory factor expressed in granulosa cells during ovulation process in mice, 42<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, Pittsburg, USA, 2009 年 7 月 28 日 (selected oral presentation)
  15. M. Shimada, The involvement of Toll-like receptor family expressed on cumulus cells in fertilization, 12<sup>th</sup> International symposium of Immunology of Reproduction, Varna, Bulgaria, 2009 年 6 月 18 日 (招待講演)
- 〔図書〕 (計 1 件)  
 森崇英 (総編集), 島田昌之 (編集幹事)  
 卵子学, 京大出版会, 2011 年, 総ページ数 1187 ページ
- 〔その他〕  
 ホームページ等  
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/seisyoku/framepage%20shimada.html>
6. 研究組織  
 (1) 研究代表者  
 島田 昌之 (SHIMADA MASAYUKI )  
 広島大学・大学院生物圏科学研究科  
 准教授  
 研究者番号 : 20314742
- (2) 研究分担者  
 なし ( )  
 研究者番号 :
- (3) 連携研究者  
 なし ( )  
 研究者番号 :