

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 14 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791539

研究課題名（和文） 神経栄養因子の女性生殖領域における役割の包括的検討とその臨床応用
 研究課題名（英文） Global analysis of the roles of neurotrophic factors in female reproductions and their clinical applications.

研究代表者

河村 和弘 (KAWAMURA KAZUHIRO)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：10344756

研究成果の概要（和文）：近年、性ホルモンに加えて様々な成長因子やサイトカインによるネットワークが生殖の調節に重要な働きをしていることが明らかにされてきた。本研究では、新規生殖関連因子として神経栄養因子(neurotrophic factors)に着目し、それらのリガンド-受容体システムによる女性生殖調節作用、特に初期卵胞発育、着床前期胚の発育および着床、絨毛および胎盤の発育への作用に焦点を当て検討を行い、brain-derived neurotrophic factor (BDNF)/ tyrosine kinase receptor B (TrkB) シグナルが着床前期胚の発育および着床、絨毛および胎盤の発育に重要な働きを持つことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Recent studies revealed that, in addition to sex hormones, networks of diverse growth factors and cytokines have been shown to regulate reproductive functions. In this project, we focused on the roles of neurotrophic factors as novel regulators of female reproductive functions in early follicle growth, preimplantation embryo growth and implantation, and subsequent trophoblasts and placental growth. We demonstrated that BDNF/TrkB signaling had important roles in preimplantation embryo growth and implantation, and subsequent trophoblasts and placental growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学・生殖医学

キーワード：神経栄養因子、卵胞発育、胚発育、着床、絨毛発育

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで生殖内分泌学の視点から、生殖現象のうち卵成熟や受精後の着床前期胚発育を調節する新規因子を見出してきた。卵成熟は、下垂体前葉から分泌される

luteinizing hormone (LH) の急峻な増加 (LH サージ) によって誘導されることが知られている。しかし、卵巣における LH 受容体は、卵を取り巻く体細胞である顆粒膜細胞、莖膜細胞に局在しており、卵自身には発現し

ていないため、卵成熟には、顆粒膜細胞、莖膜細胞由来のパラクライン因子が関与していると考えられる。このパラクライン因子を網羅的に解明するため、ゴナドトロピン投与後のマウス卵巣を経時的に採取してDNA マイクロアレイに供し、LH サージ後に急増する分泌タンパクのうち、受容体が卵または卵丘細胞に存在するものを最終候補として検討を進め、新規卵成熟因子を同定してきた。

この新規卵成熟因子の中には、BDNF と glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) という2つの神経栄養因子が含まれていた。BDNF と GDNF はマウスでは LH サージにより顆粒膜細胞より産生され、その受容体である TrkB と GDNF family receptor-alpha1 (GFRA1)-ret protooncogene (Ret) を発現している卵に作用し卵成熟を誘導する。BDNF と GDNF の卵成熟作用は、我々の報告後または時を同じくして、他の動物種でも確認された。卵は成熟後に排卵され、精子と受精する。受精卵は卵割を続け着床前期胚となり、卵管・子宮内腔を下降し、子宮内膜に着床する。我々は、TrkB および GFRA1-Ret が着床前期胚にも発現しており、BDNF と GDNF が卵管・子宮から産生され、胚の発育促進、アポトーシス抑制作用を持つことを明らかにした。

着床前期胚の最終発育段階である胚盤胞では、TrkB および GFRA1-Ret は2種類の細胞系譜のうち、栄養外胚葉 (TE: trophoblast) に限局している。TE は着床およびその後の絨毛・胎盤発育に関与することから、BDNF と GDNF はこれらの生殖現象にも重要な役割を果たす可能性が示唆される。逆に、卵成熟以前の生殖現象を考えた場合、TrkB および GFRA1-Ret は、マウスおよびヒト卵巣における卵胞の初期発育段階である原始卵胞から卵に発現が認められ、その後の卵胞発育により発現量が変化する(未発表データ)。最近、GDNF がラット原始卵胞より産生され、オートクライン作用により、原始卵胞から一次卵胞への発育を促進させることが報告された。従って、BDNF も初期卵胞発育に関与していることが推測される。

2. 研究の目的

これらの知見から、当初神経細胞に必須のホルモンとして同定された神経栄養因子が、生殖領域においても重要な働きを持つことが期待され、BDNF、GDNF を含む神経栄養因子の女性生殖現象への作用について動物モデルおよびヒト臨床検体を用いて検討し、

臨床応用の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 神経栄養因子によるゴナドトロピン非依存性の初期卵胞発育

生後 5、10 日目のマウス卵巣を採取し、その卵巣に存在する原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞における神経栄養因子のリガンド・受容体の発現を免疫染色にて検討する。市販の抗体が利用できない場合はポリクローナル抗体を作製する。卵は非特異的に染色されることがしばしば認められるため、抗原による吸着試験を行う。それでも不明瞭な場合は、in situ hybridization を用いる。

リガンド・受容体の発現様式から初期卵胞発育への作用が期待できる神経栄養因子については、生後 5 日目のマウス卵巣の組織培養下で培養液に添加して培養する。培養終了後に固定し切片を作製して、卵巣に含まれる卵胞の種類と数を組織学的に評価定量する。また、受容体の特異的抑制剤、リガンド・受容体の中和抗体が存在するものは、同様のアッセイにおいて、その初期卵胞発育抑制効果について検討する。神経栄養因子の顆粒膜細胞への作用を調べるため、培養終了後の検体で PCNA 染色、TUNEL アッセイを行い、神経栄養因子の顆粒膜細胞増殖、アポトーシスへの影響について検討する。神経栄養因子により発育促進を行った初期卵胞から正常成熟卵が得られるかどうかについて、培養後の卵巣を卵巣除去マウスに移植し、ゴナドトロピン処理後に卵巣を摘出し、卵胞より卵を採取して体外受精を行い、胚移植後に生仔が得られるかを調べる。

当科の婦人科良性疾患手術の際に、性周期のある患者より摘出された卵巣を 1 mm 大に細切した卵巣断片を用いて、神経栄養因子の発現解析を行い、可能性のある因子に関してマウスと同様に培養し、卵胞測定を行う。初期卵胞は卵巣表面の皮質に多く存在するので、その部分より卵巣断片を作製する。特異的抑制剤、中和抗体を用いた発育抑制実験、PCNA 染色、TUNEL アッセイも同様に行う。

これまで、初期卵胞発育に関与する因子として GDF-9、kit ligand が同定されているが、これらの因子と神経栄養因子を組み合わせて、ヒト卵巣断片において最も効率的な初期卵胞発育が得られる組み合わせを探る。この際、全ての組み合わせを試すのではなく、全て加えた上で 1 種類づつ因子を除いていくことで、最短の時間で結果が

得られるよう工夫する。最良の培養条件が決定されたら、既報により凍結解凍後のヒト卵巣断片を培養後、卵巣除去免疫抑制マウス(SCIDマウス)に移植し、ゴナドトロピン処理後に卵巣を摘出し、卵胞より卵を採取して対照群より多くの成熟卵が得られるかを検討する。得られた卵は、Gバンド法により染色体異常の有無、DNAマイクロアレイにより遺伝子発現異常の有無を検討する。倫理的な観点から、胚発生能については、化学的処理により卵を単為発生させ、卵割率、胚盤胞到達率を比較検討する。

(2) 神経栄養因子による着床前期胚の発育および着床

妊娠マウスより各発育段階の着床前期胚を採取し、同時期の卵管・子宮も採取する。これらの検体における神経栄養因子のリガンド・受容体の発現を免疫染色にて検討する。胚盤胞では、内細胞塊(ICM: inner cell mass)と栄養外胚葉(TE)での染色の違いに留意する。さらに、それぞれの発現量をreal-time RT-PCRにて定量する。卵管・子宮での神経栄養因子産生はELISAにて定量する。

リガンド・受容体の発現様式から着床前期胚発育への作用が期待できる神経栄養因子については、妊娠マウス卵管より採取した2細胞期胚の培養液に添加して培養する。培養後の胚盤胞到達率を測定し、TUNELアッセイにより胚盤胞のアポトーシス発生への影響を調べる。さらに、differential staining法により胚盤胞の細胞増殖への作用および着床への作用について検討する。また、受容体の特異的抑制剤、リガンド・受容体の中和抗体が存在するものは、同様のアッセイにおいて、その抑制効果について検討する。着床前期胚は初期卵胞と異なり、antisenseやRNAiにより遺伝子発現抑制を行うことができる。従って、特異的抑制剤、中和抗体がないものは、これらの手法を用いて抑制効果を調べる。さらに、胚盤胞を特異的抑制剤や中和抗体と同時に偽妊娠マウスの子宮内に移植し、着床胚数、着床部位の組織学的検討を行い、神経栄養因子in vivoでの役割について検討する。特異的抑制剤、中和抗体がないものは、一方の子宮に発現抑制胚盤胞を移植し、コントロール胚を対側の子宮に移植し同様の解析を行う。

当科の体外受精胚移植プログラムで得られた余剰胚、婦人科良性疾患手術の際に摘出された正常子宮、付属器から得られた子宮内膜、卵管、を用いてマウスと同様の発現解析を行う。可能性のある因子に関して

マウスと同様のアッセイを行う。ヒトでは倫理的に胚移植によるin vivoの実験は不可能なので、摘出子宮から正常子宮内膜を採取し、子宮内膜細胞の分離培養を行う。余剰胚より得た胚盤胞を導入し、神経栄養因子の添加で胚盤胞の子宮内膜上皮細胞への接着能、胚盤胞由来トロホブラストの増殖・浸潤能、などを検討する。特異的抑制剤、中和抗体、antisense、RNAiによる着床抑制効果も調べる。

(3) 神経栄養因子による絨毛および胎盤の発育

マウス胎盤および胎盤より単離した絨毛細胞における神経栄養因子のリガンド・受容体の発現を免疫染色にて検討する。さらに、それぞれの発現量をreal-time RT-PCR、ELISAにて定量する。

リガンド・受容体の発現様式から絨毛細胞への作用が期待できる神経栄養因子については、マウス胎盤より単離した絨毛細胞の培養液に添加し培養する。培養後にWST-1アッセイ、活性化caspase-3定量により、細胞増殖、アポトーシス発生への作用を検討する。また、受容体の特異的抑制剤、リガンド・受容体の中和抗体が存在するものは、同様のアッセイにおいて、その抑制効果について検討する。神経栄養因子のin vivoにおける胎盤発育への作用を検討するため、妊娠マウスに特異的抑制剤、中和抗体を注射し、胎盤・胎児重量、TUNELアッセイによる胎盤アポトーシス発生、PCNA染色による細胞増殖能、の変化について調べる。

ヒトでは妊娠中絶による妊娠初期の絨毛、分娩後の胎盤以外は入手が困難であり、分娩後の胎盤は神経栄養因子の絨毛細胞への作用について検討するには不適切と考えられることから、妊娠中絶検体からの絨毛を用いて実験を行う。マウスと同様の発現解析を行い、可能性のある因子に関して、絨毛組織培養の培養液に添加し培養する。培養後の絨毛細胞の分化増殖、遊走、浸潤をPCNA染色、組織学的検討により評価する。特異的抑制剤、中和抗体、antisense、RNAiによる抑制効果も調べる。さらに、ヒト初期絨毛をSCIDマウスに移植して子宮外妊娠モデルマウスを作製する。この際、最も適した移植部位、生着に必要な時間を検討しておく。絨毛細胞の生着後に特異的抑制剤、中和抗体を投与して、絨毛細胞の発育抑制効果があるかどうかを検討する。同時に、特異的抑制剤、中和抗体の全身作用を調べ、子宮外妊娠治療の薬剤としての安全性を確認する。

4. 研究成果

(1) 神経栄養因子によるゴナドトロピン非依存性の初期卵胞発育制御。

生後5、10日目のマウス卵巣を用いて、神経栄養因子のリガンド・受容体の発現を検討し、その発現様式から初期卵胞発育への作用が期待できる神経栄養因子として、BDNF, neurotrophin-4/5 (NT-4/5), nerve growth factor (NGF), GDNF が候補として考えられた。生後5日目のマウス卵巣の組織培養下で、それらの候補を培養液に添加して培養して卵巣に含まれる卵胞を評価定量した。候補因子の受容体またはリガンドの抑制剤を用い、その初期卵胞発育抑制効果について検討した。さらに、候補因子の顆粒膜細胞への作用を調べるため、培養終了後の検体で細胞増殖、アポトーシスへの作用についても検討した。候補因子により発育促進を行った初期卵胞から正常成熟卵が得られるかどうかについて、培養後の卵巣を卵巣除去マウスに移植し、ゴナドトロピン処理後に卵巣を摘出し、卵胞より卵を採取して体外受精を行い、胚移植後に生存が得られるかを調べた。これらの結果、候補因子はそれぞれ異なった作用を示しながら、初期卵胞発育に関与していることが明らかとなった。詳細は今後論文にまとめ公表する予定である。ヒトに関する研究では、上記候補因子のリガンド・受容体の発現検討を行い、ヒト初期卵胞にも発現していることが確認された。しかし、検体の入手困難さのため、既報の因子とこれらの候補因子を組み合わせ、ヒト卵巣断片培養実験は十分に行えていない。今後も引き続き、研究を継続する予定である。

(2, 3) 神経栄養因子による着床前期胚の発育および着床と絨毛/胎盤の発育の制御

妊娠マウスより採取した着床前期胚および子宮における神経栄養因子のリガンド・受容体の発現の検討から、BDNFとその受容体である TrkB が胚盤胞の栄養外胚葉(TE)に発現しており、さらに子宮にも発現していることが mRNA およびタンパクレベルで確認された。BDNF/TrkB シグナルは PI3K 経路を介して胚盤胞の outgrowth の促進、matrix metalloproteinase 活性を増加させ着床を促進させる作用を有していた。BDNF/TrkB は TE が分化して発生する胎盤 trophoblast にも発現が認められたことから、このシグナルが着床後の胎盤および胎児発育にも重要であることが考えられた。実際、BDNF/TrkB シグナルは trophoblast の増殖を促進し、アポトーシスを抑制した。In vivo では BDNF/TrkB シグナル抑制により胎盤発育が抑制され、その結果胎児発育も抑制された。従って、BDNF/TrkB シグナルは着床とその後の胎盤・

胎児発育に重要であることが明らかとなった。我々は、更に trophoblast が悪性化した絨毛癌細胞においても BDNF/TrkB シグナルが癌細胞の増殖促進・アポトーシス抑制作用を持つことを in vitro および in vivo の実験により見出し、このシグナルの抑制が絨毛癌の新たな分子標的治療となる可能性を報告した。

我々は更に BDNF-TrkB シグナルがヒト絨毛細胞の発育に重要な働きをもつことを明らかにした。正常妊娠および異所性妊娠絨毛において、BDNF は syncytiotrophoblasts および extravillous trophoblasts (EVTs) に発現しており、TrkB 受容体は cytotrophoblasts および EVTs に発現していた。絨毛組織培養において内因性 BDNF-TrkB シグナルを Trk 抑制剤である K252a および TrkB 細胞外ドメインを用いて抑制したところ、cytotrophoblast の分化および EVT の marker である HLA-G の減少を伴う EVT の outgrowth の抑制が認められた。組織学的解析ならびに糖代謝の測定結果から、これらの抑制剤は cytotrophoblast の増殖能と cellular viability を減少させることが明らかになった。さらに、TUNEL アッセイおよび caspase-3/7 アッセイの結果、内因性 BDNF-TrkB シグナルの抑制により cytotrophoblast のアポトーシスが増加した。ヒト絨毛組織を SCID マウスの腎被膜下に移植し異所性妊娠モデルマウスを作製し、K252a を投与したところ、cytotrophoblast の分化・増殖抑制、異所性妊娠 marker の hCG-beta レベルの減少、アポトーシスの増加が認められ、移植した絨毛組織の発育が抑制された。本研究成果から、BDNF-TrkB シグナルはヒト cytotrophoblast の分化、増殖、生存に重要な働きをもち、その抑制は異所性妊娠の新たな薬物療法の開発につながることを示された。

本研究期間には BDNF/TrkB を中心とした神経栄養因子の機能解析を行った。今後、これら一連の研究により確立した手法を用いて他の神経栄養因子についても検討を進め、神経栄養因子の女性生殖領域における相互的な役割を包括的に調べ、臨床応用を目指した研究を行って行く予定である

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 8 件)

- ① Cheng Y, Kawamura K, Deguchi M, Takae S, Mulders SM, Hsueh AJ. Intraovarian thrombin and activated protein C signaling system regulates steroidogenesis during the periovulatory

period. *Mol Endocrinol*, 26, 331-340, 2012, DOI: 10.1210/me.2011-1187, 査読有り

- ② Kawamura K, Kawamura N, Kumazawa Y, Kumagai J, Fujimoto T, Tanaka T. Brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase B signaling regulates human trophoblast growth in an in vivo animal model of ectopic pregnancy. *Endocrinology*, 152, 1090-1100, 2011, DOI: 10.1210/en.2010-1124, 査読有り
- ③ Kawamura K, Cheng Y, Kawamura N, Takae S, Okada A, Kawagoe Y, Mulders S, Terada Y, Hsueh AJ. Pre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes. *Hum Reprod*, 26, 331-340, 2011, DOI: 10.1093/humrep/der282, 査読有り
- ④ Kawamura N, Kawamura K, Manabe M, Tanaka T. Inhibition of brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase B signaling suppresses choriocarcinoma cell growth. *Endocrinology*, 151, 3006-3014, 2010, DOI: 10.1210/en.2009-1378, 査読有り
- ⑤ Kawamura K, Ye Y, Liang CG, Kawamura N, Gelpke MS, Rauch R, Tanaka T, Hsueh AJ. Paracrine regulation of the resumption of oocyte meiosis by endothelin-1. *Dev Biol*, 327, 62-7-, 2009, DOI: 10.1016/j.ydbio.2008.11.033, 査読有り
- ⑥ Ye Y, Kawamura K, Sasaki M, Kawamura N, Groenen P, Gelpke MD, Rauch R, Hsueh AJ, Tanaka T. Kit ligand promotes first polar body extrusion of mouse preovulatory oocytes. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 26, 2009, DOI: 10.1186/1477-7827-7-26, 査読有り
- ⑦ Ye Y, Kawamura K, Sasaki M, Kawamura N, Groenen P, Sollewijn Gelpke MD, Kumagai J, Fukuda J, Tanaka T. Leptin promotes oocyte development into preimplantation embryos and involvement of Ob-Ra/MEK signaling in the leptin mediated oocyte nuclear maturation. *Reprod Biomed Online*, 19, 181-190, 2009, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19712552>, 査読有り
- ⑧ Kawamura K, Kawamura N, Sato W, Fukuda J, Kumagai J, Tanaka T. Brain-derived neurotrophic factor promotes implantation and subsequent

placental development by stimulating trophoblast cell growth and survival. *Endocrinology*, 150, 3774-3782, 2009, DOI: doi: 10.1210/en.2009-0213, 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

- ① 河村和弘, 白澤弘光, 熊澤由紀代, 熊谷仁, 寺田幸弘, BDNF/TrkB シグナルによるヒト trophoblast の発育制御、第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会、2011.8.29~31、大阪
- ② 河村和弘, 卵成熟を誘導する新規体細胞由来因子の同定、第 104 回日本繁殖生物学会大会、2011.9.15~17、盛岡
- ③ 河村和弘, 河村七美, 熊澤由紀代, 熊谷仁, 寺田幸弘, BDNF/TrkB シグナルを標的とした異所生妊娠に対する新規薬物療法、第 19 回日本胎盤学会学術集会、2011.9.30~10.1, 東京
- ④ 河村和弘、生殖における BDNF/TrkB シグナルの役割、第 56 回日本生殖医学会学術講演会・総会、2011.12.7~9、横浜
- ⑤ 河村和弘、パラクライン/オートクライン因子による胚発育調節、第 28 回日本受精着床学会総会・学術講演会、2010.7.28、横浜
- ⑥ 河村和弘、Brain-derived neurotrophic factor(BDNF)による着床と胎盤発育の促進とその分子機構の解析、第 18 回日本胎盤学会学術集会、2010.9.30、熊本
- ⑦ Kazuhiro Kawamura, Roles of BDNF/TrkB signaling in reproduction, *FertiLink2010*, 2010.10.17, Kyoto

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: 絨毛癌の治療剤

発明者: 河村和弘

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2010-185384

出願年月日: 22 年 8 月 20 日

国内外の別: 国内

名称: 子宮外妊娠の治療剤

発明者: 河村和弘

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2010-294391

出願年月日: 22 年 12 月 29 日

国内外の別: 国内

名称: 子宮外妊娠の治療剤

発明者: 河村和弘

権利者: 同上

種類：特許
番号：PCT/JP2011/080466
出願年月日：23年12月28日
国内外の別：国外

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 和弘 (KAWAMURA KAZUHIRO)
秋田大学・医学部・講師

研究者番号：10344756

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：