

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06241

研究課題名(和文) アクチビン・インヒビン・エストラジオール経路は濾胞閉鎖を制御するか？

研究課題名(英文) Is follicle atresia regulated by Activin, Inhibin, and estradiol pathway?

研究代表者

荻原 克益 (OGIWARA, Katsueki)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：00422006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：濾胞の死滅(濾胞閉鎖)を抑制することが示唆されているホルモン試薬による抑制機構の詳細を明らかにすることが本研究の目的である。アクチビン、インヒビン、エストラジオール(E2)の関与が示唆されていたので、これらがどのように関与するか注目して解析した結果、ホルモン試薬に含まれるインヒビン抗体によりインヒビンの機能が阻害されることでアクチビンが作用し続け、その結果、E2量の増加、濾胞内顆粒膜細胞(GC)でのエストロゲン受容体(ERα)の発現増加を誘導、濾胞閉鎖を免れる可能性が高いことを突き止めた。GCでのERαの発現誘導が濾胞閉鎖に重要な役割を担っていることを発見した点が最も大きな成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

濾胞内顆粒膜細胞においてエストロゲン受容体が発現している濾胞が濾胞閉鎖を免れる可能性が高いことを発見したことが本研究の最も重要な成果である。一回の排卵で1個の卵を排卵する種(ウシやヒツジなど)において濾胞閉鎖機構のモデルが提唱されているが、これらの種とは異なる機構で濾胞閉鎖が調節されている可能性があることを見出した点は学術的にとても意義のある成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The objective of the present study is to investigate the details of the inhibitory mechanism of follicle atresia by the hormone reagent, which is suggested to exert an inhibitory effect on the follicle atresia during folliculogenesis. Our previous study has suggested that activin, inhibin and estradiol (E2) were involved in the atresia. In this study, we examined in more detail how the factors are associated with the atresia. An anti-inhibin antibody contained in the hormone reagent inhibits the activity of inhibin A. In this case, activin A exerts its activity through the receptor, resulting in the accumulation of E2 in the follicles and the upregulation of the estrogen receptor α (ERα) expression in the granulosa cells of the follicles. We found that the accumulation and the upregulation probably played important roles in the inhibition of the atresia. This is the most significant finding in this study.

研究分野：生殖生物学

キーワード：濾胞選択 濾胞閉鎖 アクチビン インヒビン エストロゲン エストロゲン受容体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

卵巣は、次世代へと種をつなぐための卵(子)を作る。多くの哺乳類において、卵は濾胞と呼ばれる袋状構造の中で成長し、卵成熟(受精能を獲得)後に排卵され、精子と受精する。哺乳類卵巣内には、成長を開始する前の濾胞が多数ストックされており(この濾胞は原始濾胞卵とよばれる)、原始濾胞内には、減数分裂開始後一旦停止した卵が存在している。排卵周期において、あるホルモンの刺激(未同定)によりある一定数の原始濾胞が成長を開始するが、その多くはアポトーシスにより死滅(濾胞閉鎖)し、生き残った濾胞が排卵前濾胞となり、最終的に排卵される。この生き残る濾胞と死滅する濾胞が選別される過程は「濾胞選択」とよばれ、産仔数の少ない哺乳類などでみられる現象である。産仔数が少ない種にとって、より質の良い卵と精子を受精させ、生存率の高い子孫を残すことは種にとって重要な使命となり、濾胞選択はより質の良い卵を選択し、次世代へと提供することで、この重要な使命の一役を担っていると考えられる。

濾胞選択の研究は、一回の排卵で1個の卵を排卵する種(ウシやヒツジなど)を中心に実施されてきた。特に、畜産分野の研究では、質の良い卵を多く得る手段として濾胞選択に注目し、その分子機構解明を目指して盛んに実施されてきた。これまで数多くの研究が報告されており、ウシやヒツジでは濾胞選択の分子機構に関するモデルも提唱されているが、未だ解明されていないブラックボックスは存在する。加えて、濾胞選択の最も大きな疑問である、なぜその濾胞が選択されたのか、生き残る濾胞と死滅濾胞の違いは何かについて明確な答えは得られていない。つまり、この研究の根本については今なお未解明なままとなっている。一方、本研究課題で扱うマウスについては、ウシやヒツジなどの研究に比べてその報告数も極端に少なく、研究は圧倒的に遅れているのが現状である。そこで本研究では、マウスの濾胞選択機構の詳細に迫る研究を展開した。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、マウス濾胞選択の分子機構の解明である。本目的を達成する手段として、本研究では排卵数を増加させることができるホルモンに注目した。通常、マウスは一回の自然排卵で10-15個程度の卵を排卵するが、人工的に排卵を誘導(過排卵誘導)することで、20-30個の卵の排卵が観察される。一方、本研究で用いたホルモン試薬(CARD hyperOva、以降、Ovaとよぶ)を用いて排卵を誘導(超過排卵誘導)すると、100個前後の排卵が観察される。この結果から、本来死滅するはずの濾胞が死滅せずに、つまり濾胞選択が抑制されることで100個前後の排卵になるのではないかという仮説をたてた。もしOvaにより濾胞選択が抑制されるのであれば、この抑制機構の詳細を解明することで、濾胞選択機構解明の

ヒントが得られる可能性があると考え、本研究を実施した。

これまでの研究から、アクチビン、インヒビン、 $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ )が濾胞閉鎖の抑制に関与することが示唆されていた。本課題は、これらの因子によりどのように濾胞閉鎖の抑制が誘導されるのか、その分子機構の解明を目指して実施された。研究の全体像を理解しやすくするために、今回の研究成果にはこれまでの研究成果も含めて記述した。

### 3 . 研究の方法

本研究では、過排卵を誘導したマウスと超過排卵を誘導したマウスを比較することで、発現量に差異のみられる遺伝子や血中量に差のあるホルモンの探索を行った。続いて、差異のある因子やホルモンについて、発現変動や卵巣内での局在、血中量の変動などを調べた。また、卵巣の器官培養系を用いて、上記候補因子が誘導されるかを調べた。

### 4 . 研究成果

#### ( 1 ) Ova により濾胞内アポトーシスは抑制された

仮説通りであれば、Ova により濾胞の死滅は減少すると予想される。そこで、TUNEL 法により濾胞内でのアポトーシスの有無を検出した。eCG (FSH の作用をもつ) もしくは Ova 注射後、12、24、48 時間で卵巣を単離し TUNEL 法を行ったところ、12 時間後では、eCG、Ova 両方でシグナルは観察されたが、24 と 48 時間後では、eCG のみで観察された。この結果から、Ova により濾胞閉鎖 (濾胞選択) は抑制されていることが示唆された。さらに、eCG 注射後 12~48 時間の間に濾胞選択にとって重要なイベントが起こっていることも示唆された。

#### ( 2 ) Ova により Activin、Inhibin の卵巣内発現が上昇し、血中ホルモン量は増加した

Ova には、eCG と抗 Inhibin  $\alpha$  抗体が含まれている。Inhibin  $\alpha$  は、Inhibin  $\beta$ a とヘテロダイマーを形成することで、Inhibin A ホルモンとして機能する。Inhibin A は、Activin A (Inhibin  $\beta$ a のホモダイマー) の受容体への結合を阻害する機能を有する。そこで、Ova の作用により Inhibin  $\alpha$  や Inhibin  $\beta$ a の発現が変動しているかどうかを調べた。eCG もしくは Ova 注射後、12 と 48 時間で卵巣を単離し、Western blot 解析を行ったところ、Inhibin  $\alpha$  は前駆体、活性体 (活性型がダイマーを形成) とともに Ova により有意に発現上昇していた。一方、Inhibin  $\beta$ a は活性体のみ Ova で有意な発現上昇がみられた。

次に、Activin A と Inhibin A の血中量を調べたところ、両ホルモンとも Ova 注射後、12、48 時間において有意に増加していることが明らかとなった。

以上の結果から、Activin A と Inhibin A が濾胞閉鎖 (濾胞選択) の抑制に関与することが示唆された。

( 3 ) Inhibin  $\beta$ <sub>a</sub> を発現する濾胞は濾胞閉鎖を免れる可能性が高い

Activin A の関与が示唆されたことから、卵巢隣接切片を用いて、Inhibin  $\beta$ <sub>a</sub> の免疫組織化学染色 (IHC) とアポトーシスの検出を行った。その結果、Inhibin  $\beta$ <sub>a</sub> を発現する濾胞はアポトーシス陰性であることが明らかとなった。この結果から、Inhibin  $\beta$ <sub>a</sub> を発現する濾胞は濾胞閉鎖を免れている可能性があることが示唆された。

( 4 ) Ova 処理マウスの卵巢において E<sub>2</sub> の量が有意に増加していた

Ova がステロイドホルモンの産生に関与しているかを調べるために、qRT-PCR 解析を行った。eCG もしくは Ova 注射マウス卵巢 cDNA を用いてホルモン産生遺伝子の発現を調べたところ、Ova 処理マウス卵巢において Cyp19a1 遺伝子の発現が有意に上昇していることが判明した。また、タンパク質発現についても同様であった。この遺伝子は E<sub>2</sub> 産生に関与することから、次に、血中および卵巢内のホルモン量を測定した。その結果、Ova 処理マウスの血中および卵巢において有意に増加していることが明らかとなった。これらの結果は、E<sub>2</sub> が濾胞閉鎖 (濾胞選択) に関与していることを示唆している。

( 5 ) Ova 処理マウスの卵巢においてエストロゲン受容体 (ER $\alpha$ ) の発現量が有意に増加していた

E<sub>2</sub> の関与が示唆されたことから、次に、E<sub>2</sub> 受容体の発現変動を調べた。その結果、Ova 処理マウスの卵巢において ER $\alpha$  の発現が有意に上昇していることが判明した。この結果は、ER $\alpha$  が濾胞閉鎖 (濾胞選択) に関与していることを示唆している。

( 6 ) Inhibin  $\beta$ <sub>a</sub> を発現する濾胞の顆粒膜細胞 (GC) に ER $\alpha$  は発現していた

ER $\alpha$  の関与が示唆されたことから、次に卵巢における発現の局在を調べた。( 3 ) の結果より、Inhibin  $\beta$ <sub>a</sub> を発現する濾胞が死滅から免れる可能性が高いということが示唆されていたので、卵巢の隣接切片を用いて、Inhibin  $\beta$ <sub>a</sub> と ER $\alpha$  の IHC を行った。その結果、莢膜細胞層において ER $\alpha$  の発現が確認されたが、それとは別に、Inhibin  $\beta$ <sub>a</sub> を発現する濾胞の GC にも ER $\alpha$  が発現していた。つまり、生き残る可能性が高い濾胞の GC でのみ ER $\alpha$  は発現し、死滅する可能性の高い濾胞の GC にはその発現が見られなかった。この結果は、濾胞の GC において ER $\alpha$  が発現することが濾胞生存のために必要であることを示している。

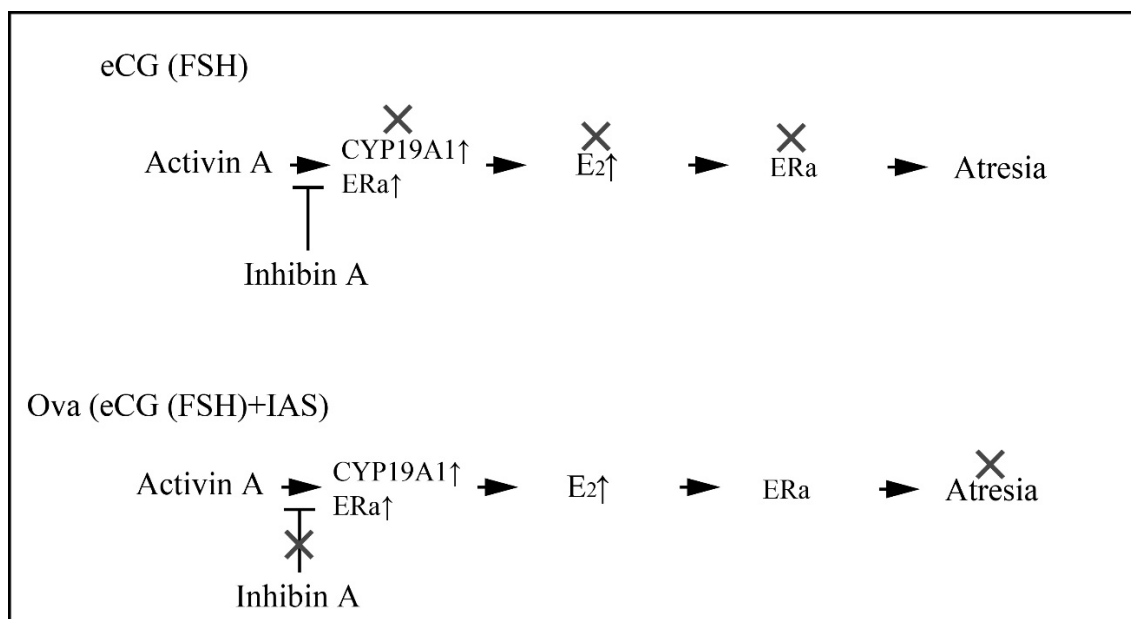
( 7 ) 卵巢器官培養系に Activin A を添加すると E<sub>2</sub> 産生量の増加と ER $\alpha$  の発現上昇がみられた

Activin A が、E<sub>2</sub> 産生量や ER $\alpha$  の発現を制御しているかどうか調べるために、卵巢の器官培養系を用いて解析した。単離した卵巢を Activin A と共に培養後、Cyp19a1、ER $\alpha$  の発現と培養液中の E<sub>2</sub> 量を調べた。その結果、Activin A により Cyp19a1、ER $\alpha$  の発現は有意に上昇

し、E<sub>2</sub>量も有意に増加していることが判明した。この結果より、Activin A が E<sub>2</sub> 産生量と ER $\alpha$  の発現を制御していることが示唆された。

#### まとめ

以上の結果から、下図に示すようなモデルを提唱した。eCG 処理卵巣では Inhibin A と Activin A が存在するが、Inhibin A の作用により Activin A の効果は発揮できない。その結果、E<sub>2</sub> 量の増加や ER $\alpha$  の発現量の増加は見られず、濾胞は死滅する（下図上）。一方、Ova 処理マウスの卵巣では、Inhibin A の作用が Ova に含まれる抗体により阻害されるので、Activin A の効果が発揮され、E<sub>2</sub> 量の増加、ER $\alpha$  の発現量の増加がおこり、最終的に濾胞が生き残る（下図下）。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kondo Yoshiko, Rajapakse Sanath, Ogiwara Katsueki	4. 巻 109
2. 論文標題 Involvement of cathepsin L in the degradation and degeneration of postovulatory follicle of the medaka ovary	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 904 ~ 917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioad116	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 Futamata Ryota, Kinoshita Masato, Ogiwara Katsueki, Kioka Noriyuki, Ueda Kazumitsu	4. 巻 9
2. 論文標題 Cholesterol accumulation in ovarian follicles causes ovulation defects in Abca1a Japanese medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e13291 ~ e13291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2023.e13291	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 Ogiwara K. Fujimori, C., Takahashi T.	4. 巻 560
2. 論文標題 The PGE2/Ptger4b pathway regulates ovulation by inducing intracellular actin cytoskeleton rearrangement via the Rho/Rock pathway in the granulosa cells of periovulatory follicles in the teleost medaka.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular and cellular endocrinology	6. 最初と最後の頁 111816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mce.2022.111816.	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 Takahashi T., Ogiwara K.	4. 巻 101
2. 論文標題 cAMP signaling in ovarian physiology in teleosts: A review.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 110499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2022.110499.	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 Takahashi T., Ogiwara K.	4. 巻 321-322
2. 論文標題 Signal pathway of LH-induced expression of nuclear progesterin receptor in vertebrate ovulation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 114025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2022.114025.	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上野愛莉、荻原克益
2. 発表標題 マウス濾胞選択におけるエストロゲン受容体 ERα の関与
3. 学会等名 日本動物学会第94回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 近藤祥子、Sanath Rajapakse、荻原克益
2. 発表標題 メダカ排卵後濾胞組織の分解へのカテプシンL の関与
3. 学会等名 日本動物学会第94回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 荻原克益、近藤祥子
2. 発表標題 メダカ Growth hormone の排卵への関与
3. 学会等名 日本動物学会第94回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上野愛莉、渡邊弥也、荻原克益
2. 発表標題 マウス濾胞選択におけるアクチビン、17 $\beta$ -estradiolの関与
3. 学会等名 日本動物学会北海道支部第66回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上野愛莉、渡邊弥也、荻原克益
2. 発表標題 Activin Aと17 $\beta$ -Estradiol によるマウス濾胞選択の制御
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤祥子、荻原克益
2. 発表標題 メダカ卵巢内排卵後濾胞組織の分解時期の特定と分解機構
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荻原克益、近藤祥子、高橋孝行
2. 発表標題 TGF $\beta$ 3 によるメダカ排卵実行酵素 MMP15 発現タイミングの制御機構
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 塚本真生、荻原克益
2. 発表標題 両者の間にコミュニケーションは存在するか、それとも独立して進行するか？
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊弥也、荻原克益
2. 発表標題 マウス濾胞選択におけるアクチビン-エストラジオール17 の関与
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会
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

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