

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14962

研究課題名（和文）新しい変化センサー・卵巣間質組織に着眼した繁殖障害／機能疾患の早期治療法の構築

研究課題名（英文）Developing Treatment Strategies for Reproductive Disorders/Functional Disorders with a Focus on Novel Sensor Technologies and Ovarian Stromal Tissue

研究代表者

梅原 崇（Umehara, Takashi）

広島大学・統合生命科学研究科（生）・助教

研究者番号：60826858

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、卵巣機能低下原因として近年注目されている『卵巣線維化』が起こるメカニズムを明らかとするため、加齢マウスと肥満マウスの比較解析を行い、細胞内小器官であるミトコンドリアにおける脂質代謝がそのキーファクターであることを突き止めた。特に、その代謝パターンの中で、脂質代謝が低下していたことから、老化と肥満の共通項が脂質蓄積にあるということが新しい発見となった。このような卵巣の線維化が起こる卵巣間質組織において、脂質代謝やミトコンドリア機能を改善する薬剤を非侵襲的に投与したところ、ミトコンドリア機能改善と共に、卵巣機能の回復が認められ、新しい卵巣機能回復を発見することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣の線維化は実験動物であるマウスのみならず、ヒトでも認められる現象である。本成果で新しく突き止めた“卵巣線維化がミトコンドリア、特に脂質代謝に起因すること”という学術成果は、ほ乳類に共通して認められる卵巣線維化を改善／予防する手法を構築するための礎になりうる。また、この成果を基に、ミトコンドリア機能改善剤を投与し、卵巣線維化を除去し、機能を改善した成果は、マウスのみならず、ヒトや家畜の妊孕性を回復させ得る成果であり、社会的にも意義深い成果だと考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the mechanisms underlying ovarian fibrosis, a prominent cause of ovarian dysfunction. Through comparative analysis of aging and obese mouse models, we identified mitochondrial lipid metabolism as a key factor in this process. Notably, the observed decline in lipid metabolism within this metabolic pattern revealed a novel finding, indicating that lipid accumulation serves as a common denominator between aging and obesity. In the ovarian stromal tissue where such fibrosis occurs, we non-invasively administered pharmacological agents targeting lipid metabolism and mitochondrial function. As a result, we successfully discovered the restoration of ovarian function, accompanied by improvements in mitochondrial function. This breakthrough offers a promising avenue for innovative approaches to ovarian function recovery.

研究分野：農学

キーワード：生殖 卵巣 繁殖

### 1. 研究開始当初の背景

雌の生殖細胞である卵は、雌の生殖器官である卵巣に貯蔵され、周囲の体細胞と共に卵胞を形成している。ほ乳類において、卵は出生前後に体細胞分裂から減数分裂に移行するため、その数は出生後に増加することはない。したがって、卵の数が加齢や病態による子どもを産む能力：妊孕性の限定要因であると考えられてきた。しかしながら、早期に機能を消失した卵巣においても、完全に卵胞が喪失するわけではなく小さな卵胞がいくつか残存していること、外因性のホルモンを投与すると妊孕性が低い個体でもまれに卵が採取できることから、必ずしも卵や卵胞の数だけが妊孕性低下原因であるという訳ではない。近年、卵や卵胞の数の減少だけでなく、加齢に伴って、卵巣の間質組織が線維化することが報告され、それがマウスだけでなく、ウシやヒトでも認められる現象であることが示された。さらに我々のグループでは、顆粒層細胞で特異的に成長因子である Neuregulin1 (NRG1) を欠損したマウスが、野生型マウスと比較して早期に卵巣機能が消失し、それと同時に卵巣線維化も早期に発症していることを突き止めた。さらに、それら線維化細胞の周辺に脳下垂体から分泌される黄体形成ホルモン (LH) を感受する LH 受容体陽性細胞が頻発していること、そして LH 分泌を抑制する GnRH-antagonist を長期間投与することで、線維化が解消され、妊孕性が回復することを見出した。さらに、GnRH-antagonist だけでなく、卵巣を外科的にせん断することでも卵巣線維化が解除され、新しい卵胞の成熟が認められることも突き止めた。しかしながら、卵巣線維化が起こるメカニズムやその重要性について不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

組織の線維化は、肝硬変や慢性腎臓病のような病態で認められる所見であり、医学分野で多く研究されている。一般的な線維化メカニズムとして、脂質や炎症がキーワードによく挙げられており、加齢だけでなく、肥満でも起こることが知られている。重要なポイントは炎症やミトコンドリア機能低下による炎症誘発。修復の繰り返しによって、過剰にコラーゲンが組織に沈着することである。面白いことに、我々のグループでは、加齢だけでなく肥満によっても卵巣が早期に線維化すること、またこの線維化が他の臓器に先んじて発症することも見出ししている。すなわち、繁殖能力を司る卵巣は、加齢や肥満などの個体変化に繊細であり、他臓器と比べて早期に機能疾患に陥っていると言える。また、卵巣が産生する性ホルモンは、個体の恒常性の維持にも重要な役割を果たすため、卵巣機能疾患が起点となり全身の疾患へと加速度的に拡大する。申請者らは、加齢化モデルや肥満マウスにおいて、卵巣間質組織が脂肪化・線維化した結果、内分泌異常や低繁殖性が引き起こされることを初めて明らかにした。そこで本研究課題では、卵巣間質組織は環境変化に対するメインセンサーであり、変化に対して“脂肪化・線維化”という共通したレスポンスを示すことで、繁殖障害のみならず全身の機能疾患をも引き起こす重要組織であると仮説立て、その立証を分子生物学的・薬理的解析によって試みる。そして、この基礎知見を基に雌畜の利用効率・期間を高める非侵襲的な治療法開発に挑戦する。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、老化と肥満という異なる変化を受け入れた卵巣間質組織 (センサー) が、脂肪化・線維化という共通したレスポンスを返す仕組みを明らかにするため、加齢モデル/肥満マウスの比較解析を行った。加齢モデルとして 12 か月齢の C57BL6 マウス、肥満マウスとして摂食中枢に機能変異を組み込んだ Blobby マウスを用いて、卵巣機能低下を引き起こすセントラルドグマを探索した。

まず、卵巣が脂肪化する原因を同定することを試みた。具体的には、若齢の通常なマウス、肥満マウス、そして加齢化モデルから卵巣を回収し、脂肪酸取り込み受容体である *Cd36* や脂質合成に関わる遺伝子 *Acaca* や *ApoE* などの遺伝子発現をリアルタイム PCR によって検討した。それと同時に、そのタンパク質が卵巣内のどこに発現しているのか？を明らかとするために、免疫蛍光染色によって検討した。そして脂質が蓄積しているかを明確化するため、血中の脂肪酸量と共に、各臓器の脂肪酸量を ELISA キットによって測定した。以上の結果から、脂質蓄積の由来が、細胞内合成なのか、細胞外からの取り込みなのか推察されるが、脂質は細胞内においてミトコンドリア脂質酸化で用いられ、分解される経路にも用いられる。つまり、分解できずに蓄積している可能性も示唆されることから、細胞におけるリアルタイムな細胞内代謝を解析するためフラックスアナライザーと呼ばれる培養環境中の酸素消費量と pH 変化を検出する機器をもちいて、脂質代謝の変化を検証した。以上の解析によって、加齢や肥満によって卵巣が脂肪化する原因を検討した。

肝臓の線維化である肝硬変は、脂質の過剰蓄積である脂肪肝に伴う過剰な酸化ストレス蓄積とマクロファージの集積に起因することが知られている。そこで、若齢のコントロールマウス、肥満マウス、そして加齢化モデルの卵巣切片を作成し、酸化ストレスマーカーと卵巣間質細胞マーカーの二重染色を行い、その陽性細胞数を計測した。また、免疫細胞として線維化に重要なマクロファージには炎症性マクロファージ (M1) と炎症を抑えるマクロファージ (M2) が存在する。

そこで、それぞれのマーカータンパク質を認識する抗体を用いて免疫染色を行い、その局在性と数を検討した。また、これら抗体を用いて染色した細胞をフローサイトメトリーに供試し、その変化パターンを理解することで、そのポピュレーションの変化を検証した。また、マクロファージが誘導する炎症反応レベルは、それぞれの卵巣から mRNA を抽出し、炎症性サイトカインやケモカインの遺伝子発現量を定量すること、回収した卵巣をすりつぶし、組織中の炎症性サイトカイン量を ELISA 法によって検討することで評価した。

以上の研究を基盤として、脂肪化・線維化を予防あるいは改善する方法を候補化し、抗線維化剤や抗酸化剤などの薬剤投与による卵巣機能回復に挑戦した。これら処理を加齢マウスや肥満マウスに行ったのち、その卵巣を回収し蛍光染色によって脂肪化・線維化を評価した。また遺伝子発現解析によって、炎症性サイトカインやケモカイン量を測定し、免疫染色法によって、マクロファージや酸化ストレスを検討した。

#### 4. 研究成果

若齢マウス、肥満マウス、そして加齢化モデルの卵巣をサンプルとした遺伝子発現解析を行ったところ、加齢マウスや肥満マウスにおいては、脂質取り込み受容体の発現が増加しており、それは線維化が起こる卵巣間質に局在していることを見出した。一方で、細胞内で脂質を合成する遺伝子群の発現は低値であった。すなわち、これら卵巣間質は外部から多量の脂肪酸を取り込めると言える。さらに、フラックスアナライザーを行ったところ、ミトコンドリアの全体的な代謝低下のみならず、外部から脂質添加をしても反応性が低いという結果が見出された。実際に、卵巣内への脂質蓄積も過剰であったことから、細胞外から脂質が細胞内に取り込まれるが、その利用はできないという二重の作用で細胞内に脂質が蓄積していると言える。

このような脂質蓄積は、ミトコンドリアの暴走に伴う酸化ストレスの過剰化、細胞死の誘導を引き起こす。そこで、酸化ストレスマーカーである 4 ヒドロキシノネナルを認識する抗体と卵巣間質細胞のマーカーである NR2F2 を認識する抗体を用いた二重染色を行ったところ、予想通り機能低下していた卵巣間質では酸化ストレスが高値となっていた。同様な過剰化は他の異なるマーカー（8-oxo、細胞内 ROS 測定）を用いても同様な結果が得られたことから、脂質蓄積した卵巣では酸化ストレスが常態的に高まっていることが明らかになった。このように酸化した臓器では細胞死が誘導され、その除去と再生のために炎症 / 抗炎症が起こる。そこで、各種炎症性 / 抗炎症性サイトカインの発現を解析したところ、いずれの炎症性因子も高値となっていることも明らかとなった。通常であれば、炎症の高まり 抗炎症の高まり 炎症の低下 抗炎症の低下となるが、慢性的な脂質蓄積に伴う炎症の高まりによって、常態的に炎症 / 抗炎症が高値となっていると考えられる。それと同時に、M1 マクロファージのみならず、M2 マクロファージも卵巣間質に頻発していた。以上の結果より、脂質蓄積と同時に認められる酸化ストレス、炎症 + 抗炎症が卵巣線維化の元凶であると考えられた。

以上の研究成果を基に、まず肺線維症に用いられる薬剤や慢性腎臓病で用いられる薬剤を用いて、卵巣線維化との関係を検討した。すると、一部の抗線維化剤では効果がないこと、また卵巣機能が損なわれることが明らかとなった。特に、抗線維化剤の中で成長因子受容体抑制剤がある。この受容体は、卵巣を構成する体細胞の増殖や分化にも必須であることから、卵巣線維化を解消する以前に、生殖の源である卵胞の機能を阻害していた。効果が認められた抗線維化剤では、2 週間の飲水投与によって、炎症 / 抗炎症因子の低減と卵巣の脱線維化が起こり、排卵される卵の数が有意に改善した。驚くべきところは、わずか 2 週間の処置で機能改善が起こる点であり、卵巣の機能低下は完全な線維化ではなく、線維化過程から既に起こるものであり、他臓器と比較して早期に改善しているのだと考えられる。このような直接的な薬剤だけでなく、ミトコンドリア機能改善剤の投与も行った。ミトコンドリア機能改善剤には様々な種類があるが、特に BGP15 という小胞体ストレスの抑制作用もある薬剤を用いた。BGP15 は卵のミトコンドリア機能を改善することが報告されていることから、飲水投与でも卵巣内にも取り込まれることが明らかである。そこで、卵巣への到達に問題がないこの薬剤を飲水投与 / 腹腔内投与したところ、飲水投与では 2 週間、腹腔内投与ではわずか 4 日の処理で線維化の解消と排卵数の増加が認められた。特に、BGP15 処理した卵巣間質細胞では、脂質取り込みや脂質合成に関わる遺伝子の発現は変わらない一方で、フラックスアナライザーによる細胞代謝は劇的に改善していた。つまり、卵巣間質の線維化において、ミトコンドリア代謝の重要性が明確化されたと言える。このように卵巣線維化が改善したマウスでは、加齢 / 肥満いずれも妊孕性の改善が認められ、産子数が増加した。しかしながら、その改善は薬剤処理をやめることで喪失した。以上のような成果より、本研究によって肥満や老化に伴う卵巣機能低下の改善法の構築に成功したと言える。

卵巣の線維化は実験動物であるマウスのみならず、ヒトでも認められる現象である。本成果で新しく突き止めた“卵巣線維化がミトコンドリア、特に脂質代謝に起因すること”という学術成果は、ほ乳類に共通して認められる卵巣線維化を改善 / 予防する手法を構築するための礎になりうる。また、この成果を基に、ミトコンドリア機能改善剤を投与し、卵巣線維化を除去し、機能を改善した成果は、マウスのみならず、ヒトや家畜の妊孕性を回復させ得る成果であり、社会的にも意義深い成果だと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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