

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791689

研究課題名(和文) 卵胞成熟過程における、小胞体ストレスの意義の検討

研究課題名(英文) Evidence of the activation of unfolded protein response in granulosa and cumulus cells during follicular growth and maturation

研究代表者

原田 美由紀 (HARADA, MIYUKI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70451812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：卵胞発育、成熟過程には局所因子が重要な役割を果たすことが知られているが、その機序については未解明な点が多い。近年、小胞体ストレスが広く細胞の恒常性維持に関わることが明らかとなり、卵胞発育、成熟とも関わるのではないかと仮説を立てた。本研究において、マウス卵巣を用いて小胞体ストレス応答遺伝子として代表的な、spliced XBP1(sXBP1)とHSPA5が卵胞の発育過程に応じて顆粒膜細胞に発現していることを示した。さらに、ヒト卵丘細胞を用い、sXBP1発現が成熟卵子周囲卵丘細胞において亢進していることを示した。卵胞発育、成熟過程において、小胞体ストレス応答が惹起され役割を担うことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Follicular growth and maturation are known to be regulated by intra-ovarian factors, although the mechanisms are still to be known. Recently, unfolded protein response (UPR) has been known to have essential roles in keeping homeostasis. In the present study, to test whether UPR in granulosa cells (GC) and cumulus cells (CC) is involved in the process of follicular growth and maturation, we examined the presence of UPR in GC during follicular growth and the association between UPR expression in CC and oocyte maturity. UPR-related genes, spliced form of X-box binding protein -1 (XBP1(S)) and heat shock 70kDa protein 5 (HSPA5), were expressed in mice GC of growing follicles, and their expression is stage-dependent. In addition, the expression levels of XBP1(S) mRNA in CC enclosing human mature oocytes were 2-fold higher than those in CC enclosing immature oocytes. These findings suggest that UPR is activated in GC during follicular growth, playing roles in follicular growth and maturation.

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

キーワード：卵巣 小胞体ストレス 卵胞発育 卵胞成熟 顆粒膜細胞

## 1. 研究開始当初の背景

< 顆粒膜細胞、卵丘細胞は卵子と相互作用することにより、卵子の成熟過程において重要な役割を果たす (卵丘細胞とは卵子周囲の顆粒膜細胞を指す) >

卵巣においては、一層の顆粒膜細胞により卵子が内包された原始卵胞がプールとして存在し、原子卵胞の顆粒膜細胞が増殖して一次卵胞を形成することから成熟過程が始まる。この初期過程は FSH 非依存性であるが、その後 FSH 受容体が発現することにより FSH の厳密な調節により一次卵胞から排卵直前のグラフ卵胞へと成熟する。この過程において局所の炎症反応、低酸素状態、酸化ストレス等は種々の役割を果たすことが報告されている。これらの刺激は後述する小胞体ストレスと密接に関連していると考えられる。一方、卵胞の構造からみると、卵子周囲の卵丘細胞は卵胞成熟において重要な働きをする。卵子周囲の顆粒膜細胞である卵丘細胞は高い増殖能を有し、FSH 受容体ならびにアンドロゲン受容体などを有し、傍分泌作用、およびギャップジャンクションを介した直接作用により卵子と相互作用し、その成熟過程を制御するとされている。よって、卵丘細胞の情報を得ることは、卵胞成熟全般と卵子の状態を推測することにも有用である。

< 生体でのダイナミックな変化に広く小胞体ストレスが関与する >

タンパク質が正常に機能するためには、小胞体において、分泌されたタンパク質が正常に折りたたまれること、異常な折りたたみ構造となってしまったタンパク質が除去、分解されることが必須である。感染、炎症、虚血、酸化ストレス、低酸素、タンパク質合成亢進などの、生理的、病理的環境下では異常な折りたたみ構造のタンパク質が小胞体内に蓄積する。この状態を小胞体ストレスと呼ぶ。これに対して細胞では小胞体ストレス応答という細胞内情報伝達経路が活性化される。

小胞体ストレス応答は主として以下の3つの反応からなる。新たなタンパクの産生を阻止するために mRNA からの翻訳の開始を阻害する。分子シャペロン (タンパク質の構造形成を援助するタンパク質) を産生して異常な折りたたみを減少させる。小胞体関連分解 (ERAD: ER associated degradation) 因子群を産生して異常な折りたたみ構造のたんぱく質を分解処理する。小胞体ストレス応答における分子シャペロンの代表として HSP (heat shock protein)70 ファミリーに属する Heat shock 70kDa protein 5 (HSPA5)がある。また、ERAD 因子群の転写誘導には活性型 X-box-binding protein 1 (XBP1)が必須である。XBP1 の産生は巧妙に制御されており、XBP-1mRNA がスプライスされて splicedXBP-1mRNA となり、この splicedXBP-1mRNA から XBP1 が産生される。以上のように、小胞体ストレス応答はタンパク質が正常に機能するために生体に備わっている機構である。

## 2. 研究の目的

背景の項で述べた知見に基づき、我々は以下の仮説を立てた。

仮説: 性周期に応じて、厳密な調節下にダイナミックな変化を周期的に遂げている卵巣において、顆粒膜細胞、卵丘細胞に生じる小胞体ストレスは、卵子との相互作用を介して、卵胞発育に重要な役割を果たすのではないかと考えた。

卵巣では、炎症、低酸素、細胞増殖など、恒常性を乱す刺激が局所で周期的に起きていることにより小胞体ストレスが惹起されているのではないかと考えた。そして、顆粒膜細胞、卵丘細胞で惹起された小胞体ストレス応答シグナルは、卵子との相互作用を介して卵胞発育、成熟に関わるのではないかと考えたのである。この仮説を明らかとするため、本研究において、以下を目的とした。

(1) 卵巣における小胞体ストレス応答の発

現の時間的、空間的局在を明らかにする。

マウス卵巣において小胞体ストレス応答遺伝子 mRNA の発現の局在を同定する。また、卵胞成熟過程のいずれの時期に小胞体ストレス応答遺伝子が発現するのか、発現パターンを検討する。

( 2 ) 小胞体ストレス応答の意義を明らかにするため、ヒト卵丘細胞における小胞体ストレス応答遺伝子の発現量と卵子の質との関係を明らかにする。

### 3 . 研究の方法

( 1 ) マウス卵巣における小胞体ストレス応答遺伝子の発現の解析

マウス卵巣を用いて小胞体ストレス応答遺伝子発現の解析をした。小胞体ストレスマーカーとして、小胞体ストレス応答遺伝子として代表的な、spliced XBP1(sXBP1)と HSPA5 につき解析を進めた。sXBP1 は小胞体関連分解因子群の転写誘導に必須の転写因子であり、HSPA5 は代表的な分子シャペロン(タンパク質の構造形成を援助するタンパク質)である。23 日齢の未熟 C57BL6/J 雌マウスに pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) 5 単位を腹腔内注射を 3 日連続して行ない、その 48 時間後に卵巣を回収し切片を作成した。In situ hybridization 法により mRNA 発現を検討するために、マウス sXBP1, HSPA5 配列より PCR 法を用いて約 150 塩基長の cDNA 断片を作成し、T/A クローニング、転写により、ジゴキシゲニンラベルした antisense, sense RNA プローブを作成した。これを用い、sXBP1, HSPA5mRNA の発現を検討した。

( 2 ) ヒト卵丘細胞における小胞体ストレス応答遺伝子発現と内包する卵子の質の関連の検討

体外受精患者のうち、顕微授精を施行する患者においては、採卵後個々の卵子周囲の卵丘細胞をヒアルロニダーゼを用いて除去し、顕微授精に供する。この際に得られる卵丘細胞を卵胞毎に分けて回収し、sXBP1, HSPA5mRNA

の発現を定量的 PCR 法にて解析した。また各々の卵胞の内包していた卵子の成熟度、受精成立の有無を記録し、小胞体ストレス応答遺伝子発現量との関連を検討した。卵子の成熟度に関しては、Metaphase II (MII)卵で受精が成立したものを成熟卵子、それ以外(MI 卵であったが受精不成立、MI 卵、Germinal Vesicle (GV)卵)を未熟卵子と定義した。

### 4 . 研究成果

( 1 ) マウス卵巣における小胞体ストレス応答遺伝子の発現の解析

マウス卵巣において、sXBP1, HSPA5mRNA の発現を顆粒膜細胞に認めた。その発現は卵胞の成熟期に応じており、一次卵胞、初期二次卵胞には認めず、後期二次卵胞、胞状卵胞、排卵期卵胞の卵丘細胞に認めた。この結果より小胞体ストレスが卵胞の成熟過程において役割を担うことが示唆された。

( 2 ) ヒト卵丘細胞における小胞体ストレス応答遺伝子発現と内包する卵子の質の関連の検討

sXBP1mRNA 発現は、成熟卵子周囲卵丘細胞において、未熟卵子周囲のものに比し約 2 倍増加していた。HSPA5 に関しては有意差を認めなかった。

卵巣は性周期に応じて、厳密な調節下にダイナミックな変化を周期的に遂げている、特有の臓器である。小胞体ストレスがその調節に関わっているという概念は、卵巣の生理、病理に新たな視座を提供するものであり、今後のさらなる研究によりこの機序を明らかにすることにより、現行の不妊治療にて良好胚を得ることができない患者に対して、卵巣における小胞体ストレスを調節することにより卵子の質の改善を図る新たな治療法の開発につながる事が期待される。

### 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 12 件)

Harada M, Osuga Y, Fujimoto A, Fujimoto A, Yano T, Kozuma S

Predictive factors for recurrence of mature cystic teratomas after surgical excision.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2013; 171: 325-8. 査読有

DOI: 10.1016/j.eyogrb.2013.09.004

Akiyama I, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Harada M, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Fujii T, Saito S, Kozuma S

Bone Morphogenetic Protein 7 Increased Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A Expression in Human Granulosa Cells and VEGF Receptor Expression in Endothelial Cells.

Reprod Sci. 2014; 21: 477-82. 査読有

DOI: 10.1177/1933719113503411

Tokura Y, Yoshino O, Ogura-Nose S, Motoyama H, Harada M, Osuga Y, Shimizu Y, Ohara M, Yorimitsu T, Nishii O, Kozuma S, Kawamura T.

J Assist Reprod Genet. 2013; 30: 821-5. 査読有

DOI: 10.1007/s10815-013-9991-3

Urata Y, Osuga Y, Akiyama I, Nagai M, Izumi G, Takamura M, Hasegawa A, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Yoshino O, Koga K, Kozuma S

J Clin Endocrinol Metab. 2013; 98: 1583-90. 査読有

DOI: 10.1210/jc.2012-3475

Zhao Y, Koga K, Osuga Y, Izumi G, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Yoshino O, Inoue S, Fujii T, Kozuma S

Cyclic stretch augments production of neutrophil chemokines and matrix

metalloproteinase-1 (MMP-1) from human decidual cells, and the production was reduced by progesterone.

Am J Reprod Immunol. 2013; 69: 454-62. 査読有

DOI: 10.1111/aji.12092

大井なぎさ、原田美由紀、藤本晃久、大須賀穰

採卵数の少ない症例に ICSI は必要か

産婦人科の実際 2013; 62: 1279-84. 査読無

大井なぎさ、原田美由紀、藤本晃久、大石元、平田哲也、堤亮、渡辺裕子、大須賀穰、藤井知行、矢野哲、上妻志郎

累積妊娠率から見た至適採卵数の検討

日本受精着床学会誌 2013;30:65-9 査読有

Akiyama I, Yshino O, Osuga Y, Shi J, Hirota Y, Hirata T, Harada M, Koga K, Fujimoto A, Yano T, Taketani Y

The localization and regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin (PCSK)6 in human ovary.

Am J Reprod Immunol. 2012;68:491-8 査読有  
DOI: 10.1111/aji.12003

Takamura M, Osuga Y, Izumi G, Yoshino O, Koga K, Saito A, Hirata T, Hirota Y, Harada M, Hasegawa A, Taketani Y

Fertil Steril. 2012; 98: 1218-24.e1-2 査読有

DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.07.1117

Urata Y, Osuga Y, Izumi G, Takamura M, Koga K, Nagai M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Yoshino O, Taketani Y

Interleukin-1 stimulates the secretion of thymic lymphopoietin (TSLP) from endometrioma stromal cells: possible involvement of TSLP in endometriosis.

Hum Reprod. 2012; 27: 3028-35. 査読有

DOI: 10.1093/humrep/des291.

Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Akiyama I, Harada M, Koga K, Fujimoto A, Yano T,

Taketani Y.  
Growth differentiation factor 3 is induced by bone morphogenetic protein 6 (BMP-6) and BMP-7 and increases luteinizing hormone receptor messenger RNA expression in human granulosa cells.

Fertil Steril. 2012; 97: 979-83. 査読有  
DOI:10.1016/j.fertnstert.2012.01.100

Tsutsumi R, Fujimoto A, Osuga Y, Harada M, Takemura Y, Koizumi M, Yano T, Taketani Y.

Successful pregnancy following low-dose hCG administration to hMG in a patient with hypothalamic amenorrhea due to weight loss.

Gynecol Endocrinol. 2012;28:460-2 査読有  
DOI:10.3109/09513590.2011.633650

〔学会発表〕(計 7 件)

Harada M, Osuga Y, Yoshino O, Fujii T, Yano T, Kozuma S

Evidence of the activation of unfolded protein response in cumulus cells during follicular growth and its possible role in oocyte maturation.

95<sup>th</sup> The Endocrine Society's Annual Meeting. 2013年6月 サンフランシスコ(米国)

藤本麻葉、原田美由紀、大須賀穰、藤本晃久、平池修、藤井知行、矢野哲、上妻志郎  
卵巣成熟嚢胞性奇形腫の嚢腫摘出後の再発に関する検討

第 65 回日本産科婦人科学会 2013 年 5 月 札幌

能瀬さやか、原田美由紀、大須賀穰、長谷川亜希子、吉野修、小泉美奈子、有田白峰、国府田きよ子、松岡良

低用量ピルとジエノゲストの子宮内膜症性卵巣嚢胞摘出術後再発予防効果の比較検討

第 65 回日本産科婦人科学会 2013 年 5 月 札幌

原田美由紀、大須賀穰、大井なぎさ、堤亮、平田哲也、藤本晃久、甲賀かをり、平池修、藤井知行

第 53 回日本産科婦人科内視鏡学会 2013 年 9 月名古屋

吉新明日香、原田美由紀、大津洋、藤本晃久、大石元、平田哲也、堤亮、大井なぎさ、甲賀かをり、平池修、大須賀穰、藤井知行  
第 58 回日本生殖医学会 2013 年 11 月神戸

三宅友子、原田美由紀、藤本晃久、大須賀穰、大石元、平田哲也、長谷川亜希子、藤井知行、矢野哲、上妻志郎

40歳以上の不妊患者におけるARTの予後規定因子の検討

第 57 回日本生殖医学会 2012 年 11 月長崎

大井なぎさ、原田美由紀、藤本晃久、大須賀穰、大石元、平田哲也、堤亮、森嶋かほる、渡辺裕子、増澤菜美、藤井知行、矢野哲、上妻志郎

採卵数の少ない症例に ICSI は必要か

第 57 回日本生殖医学会 2012 年 11 月長崎

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

原田 美由紀 (HARADA MIYUKI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70451812

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし