

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450395

研究課題名(和文) 卵胞発育および閉鎖過程におけるCNPシグナルの役割

研究課題名(英文) Roles of CNP signaling pathway in follicular development and atresia

研究代表者

辻 岳人(tsuji, takehito)

岡山大学・環境生命科学研究科・准教授

研究者番号：90314682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)が、卵胞の発育や閉鎖の制御に関わるか解析した。マウス個体に投与もしくは遺伝子導入によりCNP濃度を上昇させたが、卵胞数に変化は認められなかった。また、CNPに対するデコイレセプターのNPR3が卵胞の顆粒層細胞に局在していたが、CNP機能の亢進するNpr3遺伝子変異マウスの卵胞数に異常はなかった。CNP投与による卵胞閉鎖の抑制効果は認められなかったものの、培養した初期卵胞では顆粒層細胞でのアポトーシス抑制効果があることが初めて明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether C-type natriuretic peptide (CNP) functions to regulate follicular development and atresia. The numbers of ovarian follicles in mice injected with CNP and CNP transgenic mice showed no difference compared with those of normal mice. We showed the expression of Npr3 gene in granulosa cells of ovarian follicles, but no alterations were observed in the ovary of mice with a mutation in Npr3 gene. Next, we investigated CNP function in cultured early antral follicles, and found that a moderate inhibitory effect of CNP on apoptosis in granulosa cells. We conclude that CNP may have the potential to control follicular atresia via inhibition of apoptosis in granulosa cells.

研究分野：動物遺伝学

キーワード：CNP 卵胞 卵胞閉鎖

1. 研究開始当初の背景

ナトリウム利尿ペプチドファミリーの1つとして知られるC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)は、受容体であるNPR2に結合し、cGMPを介して特定の細胞に作用する。我々はこれまでにCNP/NPR2/cGMPシグナル経路が卵母細胞の減数分裂の停止状態を維持させる重要な役割を担い、正常な卵子を形成するために必須の因子であることを報告した。

卵母細胞の減数分裂の進行は、卵胞の発育・成熟段階に応じて周囲の顆粒膜細胞などの体細胞と協調的に制御されていることから、卵母細胞の減数分裂制御に関わるCNP/NPR2/cGMPシグナルが、卵胞の発育においてもなんらかの役割を担うかもしれない。さらに、cGMPは、顆粒膜細胞のアポトーシスを阻害する効果が報告されている。したがって、CNPの卵巣における新たな機能として卵胞の発育を促進するとともに、閉鎖により死滅することを抑制する働きがある可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究においては、卵胞発育および卵胞閉鎖のそれぞれにおけるCNPの効果明らかにするために、CNPを過剰に作用させたマウスにおける卵胞発育および卵胞閉鎖への影響を解析した。

3. 研究の方法

(1) CNPによる卵胞発育への影響

CNP投与による卵胞発育への効果について

3週令C57BL/6Jマウスに体重当たり50 μ g/kgのCNPを腹腔内へ1日2回の4日間投与した。投与後、体重および卵巣の重量を測定した。

CNPトランスジェニックマウスでの卵胞発育

CNPを肝臓特異的に発現させることで血中CNPを上昇させるトランスジェニックマウス(SAP-CNP-Tg)を用いた。4週令のSAP-CNP-Tgマウスの卵巣を採取して、卵巣当たりの卵胞数を解析した。

(2) 卵胞発育過程へのNpr3遺伝子の効果について

卵巣におけるNpr3遺伝子発現について
CNPのデコイレセプターであるNPR3について、卵巣におけるNpr3遺伝子発現をin situハイブリダイゼーションにより明らかにした。

LGJマウスにおける卵胞発育について
Npr3遺伝子に突然変異をもつLGJマウスを用いた。4週令のLGJマウスの卵巣を採取して、卵巣当たりの卵胞数を解析した。

(3) 卵胞閉鎖へのCNPによる抑制効果について

in vivo 卵胞閉鎖モデルにおけるCNPの効果

ジエチルスチルベストロール(DES)の投与と中断により誘導される卵胞の発育と閉鎖をin vivo 卵胞閉鎖モデルとして使用した。3週令C57BL/6JマウスにDESを4日間投与したものを卵胞閉鎖非誘導群、DESを2日間投与その後2日間投与中止したものを卵胞閉鎖誘導群とし、DESを2日間投与その後CNP2日間投与したものをCNP投与群とした。投与終了後に卵胞重量を測定し、さらにDNAを抽出してDNAの断片化レベルを観察した。

in vitro 卵胞閉鎖モデルにおけるCNPの効果

3週令C57BL/6JマウスにDESを2日間投与し、卵巣より回収した初期胞状卵胞を無血清培地にて24時間培養して誘導される顆粒層細胞のアポトーシスをin vitro 卵胞閉鎖モデルとした。培地にCNPを添加した場合のアポトーシス頻度を解析した。さらに、卵胞における活性型カスパーゼ3の免疫染色およびアポトーシス関連因子の遺伝子発現量の変化について解析を行った。

4. 研究成果

(1) CNP投与による卵胞発育への影響

3週令C57BL/6JマウスにCNPを4日間投与したのち卵巣重量を測定した結果、生理食塩水を投与したコントロール群とは有意な差が認められなかった。さらに、投与期間を延長もしくは投与量を2倍にした場合でも有意な差が認められなかった。また、卵巣切片により卵胞発育を観察したところ、CNP投与したマウスではコントロール群と同様に各発育段階の卵胞は観察され、顕著な差は認められなかった。

血中CNP濃度を上昇させることのできるSAP-CNP-Tgマウスの卵巣を観察したところ、一次卵胞、二次卵胞、初期前胞状卵胞、後期前胞状卵胞、胞状卵胞のすべてが観察された。また、正常マウスと比較して各卵胞数に有意な差は認められなかった。

以上の結果より、CNPの過剰作用による卵胞の発育促進への効果は認められなかった。

(2) 卵胞発育過程へのNpr3遺伝子の効果

CNPの作用機序にはデコイレセプターであるNPR3の存在が知られているが、卵胞発育への関与は不明である。そのため、まずはNpr3遺伝子の卵胞における発現パターンを明らかにするために、in situハイブリダイゼーションによる解析を行った。その結果、Npr3遺伝子は1次卵胞、2次卵胞、前胞状卵胞、胞状卵胞のすべての顆粒細胞に発現してい

た。一方、卵母細胞では発現が認められなかった。また、PMSG 投与 48 時間後にみられるグラフ卵胞では卵丘細胞に限局していた。これらの発現パターンは CNP の受容体である Npr2 遺伝子の発現パターンと重なる部分が非常に多い。そのため、NPR3 はデコイレセプターとして卵胞での CNP の効果に抑制的な影響を及ぼす可能性が考えられた。

次に、Npr3 遺伝子に機能喪失型突然変異をもつため、CNP の効果が亢進することが期待される LGJ マウスの卵胞発育を解析した。4 週令および 7 から 10 週令の発情前期における LGJ マウスの卵巣切片における卵胞数を解析したところ、一次卵胞、二次卵胞、初期前胞状卵胞、後期前胞状卵胞、胞状卵胞のすべてが観察され、正常マウスと比較して各卵胞数に有意な差は認められなかった。

以上の結果より、NPR3 の機能低下による CNP の機能亢進による卵胞の発育促進への効果は認められなかった。

(3) 卵胞閉鎖への CNP の抑制効果について

卵胞閉鎖への CNP による抑制効果を調べるため、DES 投与後に誘導される卵胞閉鎖への CNP による効果を解析した。DES のみを投与した初期胞状卵胞群では、多数の卵胞発育が促進されて初期胞状卵胞の状態が維持されて卵巣重量が顕著な増加を示す。これに対して DES の投与中断ののち 2 日目後の卵胞閉鎖誘導群では卵巣重量が未処理の卵巣と同程度になった。CNP を投与した場合、DES 投与のように増加した卵巣重量は維持されず、卵胞閉鎖誘導群とほぼ同程度であった。さらに DNA の断片化を観察したところ、DES 投与群では DNA 断片化はほぼ認められなかったが、CNP 投与群では卵胞閉鎖誘導群と同程度の DNA 断片化が認められた。したがって、CNP 投与により閉鎖卵胞の抑制に効果が認められなかった。

次に、培養した初期胞状卵胞により CNP による卵胞閉鎖への効果を解析した。CNP を添加した初期胞状卵胞について断片化した DNA を定量したところ、FSH や cGMP による抑制効果より低いものの、明確な抑制効果が認められた。また、TUNEL 法でも解析したところ、CNP の添加により顆粒層細胞に特異的なアポトーシス陽性細胞のシグナル強度が明らかに減少していた。また、活性化したカスパーゼ 3 の陽性シグナルも減少していた。

以上の結果より、in vivo 卵胞閉鎖モデルにおける CNP による抑制効果は確認できなかったが、培養した初期胞状卵胞でのアポトーシス抑制効果を確認することができた。顆粒層細胞のアポトーシスは卵胞閉鎖を引き起こす重要な変化であり、CNP が卵胞閉鎖の調節に関与する可能性が強く示唆する。これまで cGMP が顆粒層細胞のアポトーシス抑

制することは知られており、本研究により cGMP は CNP/NPR2 の経路により供給されて効果を発揮する可能性が初めて示された。一方、マウス個体レベルでの検証では、これらの CNP による効果を確認することができなかった。CNP は血液中では容易に分解されるため、卵巣で効果を発揮する十分な CNP が届かなかった可能性もある。今後 CNP による卵胞での効果を in vivo レベルで証明するには、CNP アナログを使用するなど処置条件を再度検討する必要がある。

本研究では培養条件下でのアポトーシス抑制効果が確認されたのみであるが、この成果より CNP は減数分裂の再開抑制効果と顆粒層細胞のアポトーシス抑制効果が期待され、家畜から回収した卵胞の体外成熟の効率改善への応用利用も期待される。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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

辻 岳人 (TSUJI, Takehito)
岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号：90314682

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

八十田明宏 (YASODA, akihiro)

京都大学大学院医学研究科・講師

研究者番号：50378642

国枝哲夫 (KUNIEDA, Tetsuo)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：80178011

(4)研究協力者

()