

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460256

研究課題名(和文) 神経変性との共通点から卵変性および卵成熟過程を知る

研究課題名(英文) Maturation and degeneration of oocyte compared with neuronal degeneration.

研究代表者

高橋 則行 (Takahashi, Noriyuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員

研究者番号：80267450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の遂行により、以下の点を明らかにした。

(1) 正常動物とNF-H KOマウスの卵胞閉鎖時の様子・閉鎖率・排卵数・受精率・着床率などの比較において統計学的に有意な差は見られず、NF-H分子の神経・卵における存在自体が生殖に大きな影響を及ぼす可能性は否定された。(2) IDPN投与により一過性の性腺に直接的な生殖毒性が雌雄ともに起こることを明らかにした。また、毒性を示す濃度以下の低濃度IDPNが卵成熟において促進的に働く作用はほぼないことも明らかにした。(3) 神経変性と関連するtauおよびFMR1の卵巣での発現とその局在の変化を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The findings are that 1) no statistical differences between wild-type and NF-H KO mice were found in reproductive parameters, indicating that NF-H expression itself scarcely influence on reproductive system, 2) IDPN showed a transient reproductive toxicity on gonads of both sexes directly and low dose IDPN does not promote oocyte maturation, and 3) neuronal proteins tau and FMR1 were expressed in specific types (including oocyte) of ovarian cells.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：卵巣 卵成熟 卵変性 神経

1. 研究開始当初の背景

生殖補助医療における問題点の実質的改善が従来の進め方では難航していることから、全く異なる視点からの基礎研究が必要である。

本研究課題を着想した当時行っていた研究の中で、これまで神経特異的に発現するとされてきたニューロフィラメント重鎖(NF-H)が卵で特異的に発現し、神経変性時に見られるそのリン酸化が卵成熟および卵変性時にも見られることを見出し、そのようすから卵成熟・卵変性と神経変性との間に共通した事象が存在するかもしれないという仮説を立てた。

そしてその立証のための研究を行うことによって、卵成熟および卵変性をより深く知ることができ、その基礎研究から得られた知見を臨床応用することが可能となれば停滞する生殖補助医療の飛躍的な進歩につながり、大きな社会貢献ができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

当初の目的として次の3点を設定した。

(1) 卵変性および卵成熟におけるNF-Hリン酸化の必要性とそのシグナリング経路を神経変性研究によって得られた知見と比較しつつ解明する。その遂行によってNF-Hの存在自体およびNF-Hのリン酸化が生殖全体および卵成熟・卵変性においてどんな意味を持つのかを明確なものにする。特にNF-Hのリン酸化が細胞の寿命と如何に関わるかを検討した研究はなく、その詳細を明らかにすることは生殖分野のみならず細胞生物学的知見としても重要なものとなる。

(2) 神経細胞体においてNF-Hの異常なリン酸化と神経変性を引き起こすことが知られている3,3'-iminodipropionitrile (IDPN)が雌雄の性腺(特に卵巣さらには卵)および生殖ホルモン軸の組織(視床下部・下垂体前葉・性腺)に対する作用とその機序を解明する。この研究の遂行により、これまで神経毒としてのみ知られていたIDPNの生殖における影響(毒性のみならずポジティブな影響)について見出すことができ、その知見は単純形状の化学分子(生体由来の複合物ではなく)の添加によって生殖補助医療において重要な卵成熟および卵変性を制御できる可能性を持つことから、容易に臨床への応用が可能な生殖補助医療において有効な手段となり得る。

(3) 神経変性・卵変性・卵成熟に3つの現象に共通して存在するNF-H以外の分子につい

て、特に卵巣・卵に対する作用とその機序を解明する。これまでに、神経特異的のエノラーゼ(ENO2)が卵巣で発現し、神経とは異なる発現制御機構を持つこと・NF-Hが卵特異的に発現し、その成熟・変性時のリン酸化パターンが神経変性時のそれと類似すること(リン酸化制御機構の一部は神経変性時とは異なることも含む)を明らかにしており、これらの分子と同様に特に卵巣内で発現し様々な翻訳後修飾を受けて卵変性・卵成熟などの卵巣における現象と関連する分子がまだ多数存在するであろうことが示唆され、その解析を進めることは卵巣機能ひいては生殖全体をより明確に深く知る上で重要な研究であると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 正常およびNF-H KOマウスの生殖軸に関連する組織(脳・下垂体・性腺・甲状腺・副腎など)を胎児期・思春期前・成体(性サイクルごと)など様々な状況下の動物から採取し、形態学的に比較観察する。さらにその組織中で起きていることを調べるべく、免疫組織化学的および分子生物学的手法を用いて特定分子の発現および局在について検討する。血液サンプルも採取し、血中のホルモン量についても測定する。特に雌個体については、卵巣閉鎖時のようす・閉鎖率・排卵数・受精率・着床率などの比較も行う。さらに同様な項目について、IDPN投与がどのような影響を及ぼすか、NF-Hのリン酸化のようすも並列して検討しながら比較解析していく。

(2) 視床下部・下垂体前葉・性腺の生殖軸全体におけるIDPNの毒性スペクトルの詳細を知るべく、IDPN投与後に数点のタイムポイントを設けて各組織をサンプリング・各々について組織学的・生化学的・分子生物学の実験を行う。また、下垂体および性腺から分泌される血中ホルモン量の変化・差異についても測定する。またこれまでに、雌ラットにおいて、投与後1週間前後をピークとしその後改善する卵巣毒性を見出しているが、単回投与から1ヶ月以上の長期における毒性についての検討は為されていない。IDPNの単回投与により、神経毒性は永続的に見られるため、一過性と思われる生殖毒性も何らかの形で長期的に存在する可能性があり、観察期間をさらに広げることでこの点についても検討していく。

(3) これまで神経特異的に発現するとされてきた分子の中で特に神経変性との関連が知られている分子について、成体・発生中・過排卵処理した動物の卵巣での発現と局在を免疫組織学的手法および分子生物学的手法

を用いて明らかにし、可能であればそれらの発現を誘導する分子群についても検索を進める。具体的にはアルツハイマー病・パーキンソン病やニューロパチーなどを始めとする脳・抹消神経疾患と関連の深い分子群について卵巣での発現と局在を調べていく。

4. 研究成果

本研究課題の遂行により、以下の点を明らかにした。

(1) NF-H KO マウスの性腺の形態学的観察・血中ホルモン量・生殖行動の観察・卵閉鎖時のようす・閉鎖率・排卵数・受精率・着床率などの正常動物と比較において、統計学的に有意な差は見られなかった。このことから、NF-H が存在しなくても生殖全体のような正常動物同様であり、NF-H 分子の神経や卵における存在自体が生殖に大きな影響を及ぼす可能性は否定された。

また、NF-H KO 動物への IDPN 投与は、永続的な神経毒性を示すだけでなく正常動物で見られた場合と同様に一過性の生殖毒性を示したことから、特に性腺に対する毒性は必ずしもNF-Hとそのリン酸化を介して起きているのではなく、他の経路を通じて起きている可能性がある。

一方で、NF-H の神経での異常なリン酸化や変性卵・成熟卵におけるリン酸化がそれらの細胞の寿命に関わるのかについては、書類手続き上の問題から NF-H KO 動物の購入が遅れさらに繁殖が思うように進まなかったことから研究期間中に明確な結果が得られておらず、現在もその是非を検討している状態である。

(2) 雌雄正常動物への IDPN 投与により、永続的な神経毒性および一過性の性腺毒性が雌雄ともに見られること・性腺ホルモン軸の組織の中でも視床下部および下垂体前葉への IDPN 投与の影響は少ないかほとんどなく、性腺に直接的に働きかけて毒性を示すことを卵胞の体外培養を行うことによって明らかにしその成果を論文発表した。

さらに、IDPN の長期投与が生殖に与える影響についても年単位での検討を行っており、一度は回復する生殖機能も IDPN 投与動物では無投与群と比べて速やかに低下する兆候を示す結果が得られている。現在もその詳細全体を明らかにすべく、組織学および分子生物学的解析を続けている。

また、生殖毒性を示す濃度以下の低濃度 IDPN が卵成熟において促進的に働く作用はないかほとんど見られないことも明らかにしたが、想定した濃度以下で促進的に働く可

能性も残されているため、現在もその解明のための実験を継続している。その成果は学会発表し、論文作成中である。

さらに、生殖全体に対する IDPN の広範な毒性を知るべく、IDPN 投与が動物の生殖行動に与える影響についても研究を進め、雌の場合は特に育児行動に・雄の場合は特に交尾行動に影響を与えるという結果を得ており、神経毒性と複合的に作用する生殖毒性についても新たな知見を見出させる可能性があるデータを得た。その成果は学会発表し、現在論文作成中である。

(3) NF-H 以外の神経特異的に発現するとされてきた分子の中で、神経変性を伴うアルツハイマー病および精神遅滞との関連が高い分子 microtubule associated protein 1 (tau) / fragile X mental retardation 1 (FMR1) について卵巣での発現とその局在の変化を明らかにした。

FMR1 は卵および顆粒膜細胞・莢膜細胞などの細胞質に発現し、特に卵での発現が卵胞の成長に伴って減衰することが分かった。さらに乳児期の発生中の卵巣において、卵原細胞から原始卵胞への転換期に FMR1 タンパク質が発現し始めることを見出し、その成果を論文発表した。

tau は卵および分裂中のその他の細胞に特異的に発現し、その発現パターンも細胞増殖（分裂）時に大きく変動するだけでなく特に卵での発現がNF-Hのリン酸化パターンと同調する部分も大きく、卵変性および卵成熟に深く関与している可能性があるため、現在もその詳細な解析を進めており、本年学会発表・論文投稿予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Takahashi N, Tarumi W, Itoh MT and Ishizuka B. The stage- and cell type-specific localization of fragile X mental retardation protein in rat ovaries. *Reprod Sci*. 2015; Epub 査読有
doi: 10.1177/1933719115589416.

Takahashi N, Hamada N, Ishizuka B. Acute toxic effects of 3,3'-iminodipropionitrile on hypothalamic-pituitary-gonadal axis in male rats. *Reprod Tox*. 2014; 43C: 19-25. 査読有
doi: 10.1016/j.reprotox.2013.10.007.

Takahashi N, Tarumi W, Ishizuka B. Involvement of hyaluronan synthesis in ovarian follicle growth in rats. *Reproduction* 2014; 147(2): 189-197. 査読有
doi: 10.1530/REP-13-0464.

Sakaguchi K, Itoh MT, Takahashi N,

Tarumi W, Ishizuka B. The rat oocyte synthesises melatonin. *Reprod Fertil Dev*. 2013; 25(4): 674-682. 査読有
doi: 10.1071/RD12091.

[学会発表](計 13 件)

Takahashi N, Suzuki N, Itoh MT, Ishizuka B. The involvement of neurofilament heavy chain phosphorylation in the maturation and degeneration of rat oocytes. 日本動物学会第 87 回沖縄大会. 2016 年 11 月 17~19 日(沖縄コンベンションセンター, 沖縄県)
須賀 万智, 谷内 麻子, 五十嵐 豪, 柳澤 裕之, 石塚 文平. 一般女性の更年期リテラシーの評価. 第 31 回日本女性医学学会学術集会. 2016 年 11 月 5~6 日(ウェスティン都ホテル京都, 京都府)

鬼丸 亜沙美, 河村 和弘, 松井 大輔, 石塚 文平. 早発卵巣不全に対する卵胞活性化療法(IVA:in vitro activation)の適応の予測. 第 57 回日本卵子学会. 2016 年 5 月 14~15 日(朱鷺メッセ, 新潟県)

高橋 則行, 樽見 航, 浜田 直美, 河村 和弘, 鈴木 直, 伊藤 正則, 石塚 文平. ラット排卵時における IDPN 投与の影響 Effects of 3,3'-iminodipropionitrile on oocyte maturation at ovulatory period in rats. 日本動物学会第 86 回新潟大会. 2015 年 9 月 17~19 日(朱鷺メッセ, 新潟県)

須賀 万智, 五十嵐 豪, 谷内 麻子, 石塚 文平. 一般女性の更年期リテラシーと更年期ケアの課題 メノポーズ週間アンケート調査より. 第 30 回日本女性医学学会学術集会. 2014 年 11 月 7~8 日(メルパルク名古屋, 愛知県)

石塚 文平. シンポジウム「早発卵巣不全患者の管理」早発卵巣不全症例に対する排卵誘発法の進歩. 第 88 回日本内分泌学会学術総会. 2015 年 4 月 25 日(ホテルニューオータニ東京, 東京都)

高橋 則行, 浜田 直美, 樽見 航, 河村 和弘, 鈴木 直, 伊藤 正則, 石塚 文平. 卵胞成長におけるヒアルロン酸の必要性 Hyaluronan synthesis is required for follicle growth. 第 59 回日本生殖医学会学術講演会. 2014 年 12 月 4~5 日(京王プラザホテル, 東京都)

高橋 則行, 浜田 直美, 樽見 航, 河村 和弘, 田中 守, 鈴木 直, 伊藤 正則, 石塚 文平. 卵胞成長におけるヒアルロン酸の必要性. 日本動物学会第 85 回仙台大会. 2014 年 9 月 11~13 日(東北大学川内北キャンパス, 宮城県)

Takahashi N, Hamada N, Ishizuka B. Toxic effects of 3,3'-iminodipropionitrile on hypothalamic-pituitary-gonadal axis in male rats. The 9th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility. 2013 年 11 月 13~14 日(神戸国際会議場, 兵庫県)

高橋 則行, 樽見 航, 浜田 直美, 伊藤 正則, 河村 和弘, 田中 守, 鈴木 直, 石塚 文平.

3,3'-iminodipropionitrile(IDPN)の生殖軸における毒性について. 第 58 回日本生殖医学会学術講演会. 2013 年 11 月 15~16 日(神戸国際会議場ほか, 兵庫県)

樽見 航, 河村 和弘, 拝野 貴之, 星名 真理子, 川越 雄太, 石塚 文平, 鈴木 直. 卵巣組織凍結に向けた卵胞存在部位の解析 卵巣機能不全での変化. 第 58 回日本生殖医学会学術講演会. 2013 年 11 月 15~16 日(神戸国際会議場ほか, 兵庫県)

高橋 則行, 樽見 航, 浜田 直美, 伊藤 正則, 河村 和弘, 田中 守, 鈴木 直, 石塚 文平. 3,3'-iminodipropionitrile(IDPN)の生殖軸への毒性について. 第 18 回日本生殖内分泌学会. 2013 年 12 月 7 日(シェーンバウハ・サポー, 東京都)

樽見 航, 伊藤 正則, 河村 和弘, 石塚 文平, 田中 守, 鈴木 直. アンドロステンジオンは発育過程にある卵の形態と機能の異常を誘起し、この異常によって卵成熟は阻害される. 第 54 回日本哺乳動物卵子学会. 2013 年 5 月 25~26 日(学術総合センター, 東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 則行 (TAKAHASHI, NORIYUKI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員
研究者番号: 80267450

(2) 研究分担者

石塚 文平 (ISHIZUKA, BUNPEI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・名誉教授
研究者番号: 80097336