

マウス顆粒膜細胞に発現する脂質転写因子 SREBP の賦活化メカニズムと
その機能に関する基礎的研究

県立広島大学大学院
総合学術研究科
生命システム科学専攻

博士論文

令和5年3月
(2023年)

中西 寛弥

目次

第一章	緒論	3
	図	9
第二章	顆粒膜細胞に発現する脂質転写因子 SREBP と制御因子 (SCAP, INSIG-1)の経時的発現変化とその役割	
	序論	10
	材料および方法	13
	結果	23
	考察	28
	図および表	31
第三章	LH が誘導する顆粒膜細胞の AMPK の不活性化は, INSIG-1 の消失と SREBP の賦活化を誘導する	
	序論	42
	材料および方法	44
	結果	49
	考察	53
	図および表	55
第四章	総合考察	68
	図	75
第五章	総括	79
	謝辞	82
	参考文献	83

第一章

緒論

性分化, 卵子形成と二次卵胞の形成

哺乳動物における性の決定は, マウスでは胎生 11.5 日, ヒトでは妊娠 8 週以降の胎児形成期の早い段階で起こる。性決定には, 性染色体が関係しており, 性染色体が XX であれば卵巢を持つ雌個体となり, 性染色体が XY であれば精巣を持つ雄個体となる。これらの生殖組織内には始原生殖細胞 (Primordial Germ Cell; PGC) とそれを支持する体細胞が混在しており, PGC は Y 染色体上に存在する SRY 遺伝子が発現するか否かにより, 精子へと分化するか, 卵子へと分化するかが決定する。Y 染色体上に存在する SRY 遺伝子が発現すると, 転写因子である SRY-box 9 (SOX9) の発現が増加し (Sekido and Lovell-Badge, 2008), これに伴い Fibroblast Growth Factor 9 (FGF9) の転写レベルが増加する (Colvin et al., 2001; Dinapoli et al., 2006)。FGF9 は SOX9 の発現をフィードバック作用により支え (Kim et al., 2006), この結果 SOX9 の分泌レベルが維持され, セルトリ細胞の形成, 精細管の形成, 中腎から精巣へのライディッヒ細胞前駆体細胞の移入, 血管の形成を促進し, 精巣が形成される。また精巣では, レチノイン酸の合成が誘導されないため, 精子の減数分裂が誘導されず, 性成熟を迎えるまで精巣には精母細胞が存在することとなる (Van Pelt et al., 1991; Endo et al., 2019)。一方, Y 染色体を有さない雌では, SRY 遺伝子が発現しないため, SOX9 の発現が誘導されず, この代わりに WNT4 が発現し, ライディッヒ細胞への分化を抑制し卵巢が形成される (Vanio et al., 1999)。卵巢内の体細胞では Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) の転写レベルが増加し, PGC を刺激し, 転写因子 Zinc finger GATA like Protein 1 (ZGLP1) の発現を上昇させ, PGC を一次卵母細胞に分化誘導する (Nagaoka et al., 2020)。その後, レチノイン酸が PGC に作用し Stimulated By Retinoic Acid 8 (STRA8) を発現させ, 一次卵母細胞への分化と減数分裂が誘導される (Bowles et al., 2006; Baltus et al., 2006; Koubova et al., 2006)。減数分裂を開始した一次卵母細胞は, 第一減数分裂の網状期で減数分裂を停止し, 出生後, 個体が性成熟を迎えるまで減数分裂を長期間停止する。一次卵母細胞は, 扁平な体細胞 (卵胞上皮細胞) に囲まれ, 原始卵胞となる。その後, 扁平な体細胞が一層の立方状の細胞 (顆粒膜細胞) へと変化し一次卵胞となり, 続いて多層の顆粒膜細胞を有する二次卵胞となる。さらに, 二次卵胞では卵とそれを取り囲む多層の顆粒膜細胞が強固な基底膜によって包まれ, その周囲に卵胞膜細胞や血管内皮細胞, 平滑筋を含む卵胞膜細胞層が形成される。これらの原始卵胞形成から二次卵胞までの発育メカニズムはマウスを用いた研究により明らかにされており, 原始卵胞の形成は卵母細胞で発現する転写因子 Factor in germline a (FIGLA), 原始卵胞以降は卵由来の転写因子 Spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1/2 (SOHLH1/2) が LIM homeobox protein (LHX8) や Newborn ovary homeobox (NOBOX), Growth Differential Factor 9 (GDF9), POU-type homeodomain—containing DNA-binding protein (POU5F1) の発現を誘導し

原始卵胞から二次卵胞が形成される (Dong et al., 1996; Soyal et al., 2000; Rajkovic et al., 2004)。また、近年、Habara や De Cian らは原始卵胞内の卵母細胞から放出される Oocyte-derived Respondin 2 (RSPO2)が卵胞上皮細胞に作用し、Wingless-type MMTV integration site family (WNT) シグナルを伝達し、卵胞上皮細胞から顆粒膜細胞を形成することを報告している (De Cian et al., 2020; Habara et al., 2021)。加えて、新生児の卵巣では、顆粒膜細胞や血管内皮細胞が Indian Hedgehog (IHH)や Desert Hedgehog (DHH)を発現し、卵巣内に存在する血管周皮細胞を刺激し、卵胞膜細胞層を形成させることが報告されている (Wijgerde et al., 2005; Spicer et al., 2009; Ren et al., 2012; Liu et al., 2018; Cowan et al., 2021)。上記のように、卵子や顆粒膜細胞から分泌される因子が各段階で作用し、原始卵胞から二次卵胞の形成を誘導し、この過程を経ることで卵子は十分な発生能を有する卵子へと成熟する。

二次卵胞から後期胞状卵胞までの卵胞発育

二次卵胞以降の卵胞発育は、視床下部一下垂体系から放出される Follicular-Stimulating Hormone (FSH)に依存する。顆粒膜細胞では、FSH に対する受容体 (FSH receptor; FSHR)が発現し、FSH が刺激すると卵胞発育が開始される。実際、FSH あるいは FSHR 遺伝子欠損雌マウスでは、二次卵胞以降の発育卵胞が認められず不妊となることが報告されている (Kumar et al., 1997; Dierich et al., 1998)。FSH-FSHR シグナルは、顆粒膜細胞のインスリン様成長因子 (Insulin-like Growth Factor-1; IGF-1)および IGF-1 受容体 (IGF-1R)の発現を誘導し、IGF-1 が autocrine/paracrine 的に作用すると、顆粒膜細胞の FSHR が発現上昇し、FSH の感受性を向上させる (Zhou et al., 1997)。また、FSH は顆粒膜細胞における Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)および Inhibin の発現を亢進し、卵胞膜細胞層への血管新生を誘導すると共に、卵胞膜細胞の Luteinizing Hormone (LH)受容体 (LHCGR)を形成させ、血管由来因子や LH への感受性を増加させる。この結果、初期胞状卵胞から後期胞状卵胞へ卵胞発育が誘導される (Hillier et al., 1991; Fraser et al., 2006; Li et al., 2020)。この VEGF の後期胞状卵胞への卵胞発育における重要性を示した報告として、卵胞発育を誘導する馬絨毛性性腺刺激ホルモン (equine Chorionic Gonadotropin; eCG)と同時に抗 VEGF 受容体抗体を投与したマウスあるいは VEGF 遺伝子欠損マウスでは、卵胞膜細胞層への血管形成が認められず、卵胞発育不全になることも示されている (Zimmermann et al., 2003; Rico et al., 2014; Sargent et al., 2015)。加えて、当研究室では、ブタを用いて卵胞表面における血管の有無に着目し、顆粒膜細胞におけるステロイドホルモンとその生存性について検討を行った。その結果、卵胞表面に血管が豊富な卵胞では、血管によりもたらされる FSH がコルチゾールを無害のコルチゾンに無毒化し、卵胞発育と卵子の質が担保されるが、血管が無い卵胞ではコルチゾールの産生が誘導され、コルチゾール依存的なアポトーシスが誘導され、卵子の質が著しく低下することを初めて明らかにしている (Okamoto et al., 2016; Nakanishi et al., 2021)。

FSH と共に下垂体からパルス状に放出される LH は、卵胞膜細胞の LHCGR を刺激し、Steroidogenic Acute Regulatory protein (StAR), Cholesterol side-chain cleavage enzyme (CYP11A1),

3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD)および Androgen 変換酵素 17 α -hydroxylase/C17-20-lyase (CYP17A1)の発現レベルを上昇させる。これらの発現上昇により、Cholesterol を基質として Androgen が産生される (Zhang et al., 2004)。一方、下垂体から放出される FSH は顆粒膜細胞膜上の FSHR を刺激すると P450 aromatase (CYP19A1) の発現を亢進し、卵胞膜細胞由来の Androgen を基質に Estrogen を合成する (Matson and Collins., 1984)。合成される Estrogen は、顆粒膜細胞に発現する Estrogen Receptor (ER)に結合すると、Cyclin D2 (CCND2) の発現を上昇させ、急速に顆粒膜細胞の増殖を誘導する (Robker and Richards, 1998)。この結果、卵胞が増大し卵胞内に卵胞液が満たされた卵胞腔が形成された初期胞状卵胞を経て、卵子とその周囲の顆粒膜細胞が丘状に突出した卵丘細胞を有した後期胞状卵胞が形成される。卵胞発育が進み、後期胞状卵胞へと卵胞発育する顆粒膜細胞では、LHCGR が発現する。Estrogen は、フィードバック作用により下垂体から一過的な LH の放出 (LH サージ)を誘導し、LH が顆粒膜細胞の LHCGR に作用すると排卵が誘導される。したがって、FSH は二次卵胞から後期胞状卵胞へとダイナミックな形態学的・分子学的変化が生じる卵胞発育を誘導すると共に、顆粒膜細胞における LHCGR の形成を促進し、排卵期への準備と移行を引き起こす重要な因子である。

卵子成熟、排卵および黄体化

Estrogen のフィードバック作用により下垂体から一過的に放出される LH は、卵子成熟および排卵を誘導する。LH は、顆粒膜細胞に高発現する LHCGR に結合すると、Epidermal Growth Factor (EGF)-like Factors の一種である Amphiregulin (AREG), Eprexigulin (EREG), β -cellulin (BTC), Neuregulin 1 (NRG1) の発現を誘導する (Park et al., 2004; Shimada et al., 2006; Noma et al., 2011; Kawashima et al., 2014)。細胞膜上に発現する EGF-like Factors は、LHCGR の下流シグナルである Protein Kinase C (PKC)により活性化する切断酵素 A disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17)によって切断され、顆粒膜細胞および卵丘細胞に発現する EGF 受容体 (EGFR)を刺激する (Yamashita et al., 2007; Yamashita et al., 2009; Yamashita et al., 2010; Yamashita et al., 2012; Yamashita et al., 2014)。EGF-like factors が EGFR に結合するとチロシン残基が自己リン酸化により活性化し、細胞内で Ras-MEK-ERK1/2 シグナルおよび PI3K-Akt シグナルが活性化され、Prostaglandin 産生酵素 (Prostaglandin Synthase 2; PTGS2)や Progesterone 合成酵素群 (StAR, CYP11A1, 3 β -HSD)の発現が上昇する。PTGS2 はアラキドン酸から Prostaglandin E2 (PGE2)の産生を促進し、卵丘細胞の Hyaluronan Synthase 2 (HAS2), Pentraxin 3 (PTX3), TNF Alpha Induced Protein 6 (TNFAIP6)の発現を上昇させる。これによりヒアルロン酸が産生され、卵丘細胞—卵丘細胞の隙間を満たすと、卵丘細胞の膨化が誘導される (Davis et al., 1999; Hizaki et al., 1999; Tilley et al., 1999)。卵丘細胞の膨化は、卵子への cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP)の供給を遮断し、顆粒膜細胞や卵丘細胞から卵子へ高濃度の cAMP 流入が断たれた卵子は、第一減数分裂前期から第二減数分裂中期へと減数分裂が進行し、卵子が受精可能な状態へと成熟する (Norris et al., 2008; Richards and Ascoli,

2018)。この一連の卵子成熟を誘導する出発点は、EGF-like factors による PGE2 の産生にあることから、PGE2 は成熟卵子の形成と正常な受精を担保する必須因子であると理解されている。他方で、Progesterone 受容体 (Progesterone Receptor; PGR)の遺伝子を欠損させた雌マウスでは、卵丘細胞の膨化および減数分裂の再開は正常に進行するが、全く排卵されず不妊症を呈する (Lydon et al., 1995; Robker et al., 2000)。ラットへの Anti-Progesterone antiserum あるいは Aminoglutethimide (CYP11A1 阻害剤), Epostane (3 β -HSD 阻害剤)の投与は、排卵を抑制することが報告されている (Lipner et al., 1971; Mori et al., 1979; Snyder et al., 1984)。また、PGR のアンタゴニストである RU486 をマウスやラットに投与すると排卵数が著しく減少することも報告されている (Van der Schoot et al., 1987; Sanchez-Criado et al., 1990; Loutradis et al., 1991; Gaytan et al., 2003)。さらに、PGR 遺伝子欠損雌マウスを用いた解析により、PGR 依存的に発現する A disintegrin and Metalloprotease with thrombospondin motif 1 (ADAMTS1), Cathepsin L (CTSL), Endothelin 2 (EDN2), Synaptosomal-Associated Protein 25 (SNAP25)が、成熟した卵子の排卵を誘起することが示されている (Robker et al., 2000; Ko et al., 2006; Shimada et al., 2007)。このように排卵刺激後の顆粒膜細胞では、EGF-like factors により活性化する Prostaglandin 経路と Progesterone 経路が、それぞれ卵子成熟と排卵を誘導し、受精可能な卵子を卵胞外へと放出する。排卵された卵子は、卵管膨大部に留まり、精子と受精した後、2細胞から胚盤胞へと卵割を繰り返し、子宮に着床し、胎仔が形成される。また、排卵後の卵胞内に残存する顆粒膜細胞は黄体細胞へと分化・増殖し、血管網が張り巡らされた黄体が形成される。この黄体細胞は、Cholesterol を基質として Progesterone を大量に産生し、妊娠維持を担う。

研究の目的

我が国では、妊娠可能な女性のうち、約 10~15%もの高い割合で不妊症を罹患しているとされる。この割合は、近年の晩婚化や生活習慣の変化に加えて、心理的・身体的ストレスにより右肩上がりに増え続けている (内閣府「少子化対策の現状と課題について」、2014)。不妊症の発症は、ステロイドホルモンバランスの崩壊が大きく関与し、この中でも、不妊症の一つである黄体化未破裂卵胞症候群 (Luteinized Unruptured Follicle-syndrome; LUF)は、健全な女性において 5~10%、不妊症女性においては 25%以上の高頻度に認められる症例である (Marik and Hulka, 1978; Killick and Elstein, 1987)。通常、下垂体から一過的に放出される LH により、卵巣では Progesterone 産生能が急速に増大し、成熟卵子の排卵が誘導され、顆粒膜細胞は黄体化する。一方 LUF 患者では、FSH が誘導する卵胞発育は正常であり、排卵を誘導する LH の分泌も正常値を示すにもかかわらず、成熟卵子が排卵されないまま顆粒膜細胞が黄体化する。LUF 患者の特徴は、排卵時の血中 Progesterone 濃度が顕著に低いことが知られるが、この原因には顆粒膜細胞の Progesterone 産生能が著しく低いことに起因し、このため成熟卵子が黄体内に留まる (Azmoodeh et al., 2015)。したがって、LUF は、視床下部-下垂体系は正常に機能するが、顆粒膜細胞の Progesterone 産生が低下するという異常を示

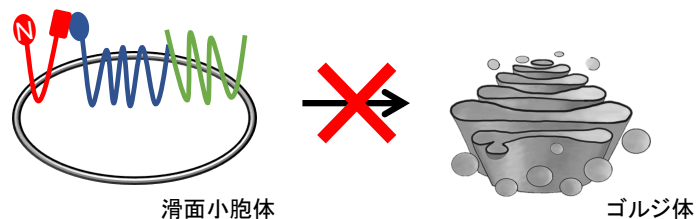
していると考えられる。Progesterone は、滑面小胞体に存在する Cholesterol が StAR によりミトコンドリアへ運搬され、ここに発現する CYP11A1 および 3 β -HSD により産生されるが、LUF 患者では、何らかの要因により Cholesterol の供給不足あるいは StAR, CYP11A1, 3 β -HSD の発現不足により Progesterone 産生が低下すると考えられ、Progesterone 産生機構の全容を解明することは、LUF の予防ならびに治療のために重要な課題であると言える。

当研究グループでは、これまでの研究において、新規卵子成熟因子および排卵制御因子の探索を目的として、卵胞発育期および排卵期の顆粒膜細胞で発現する遺伝子を Transcriptome 解析により網羅的かつ経時的に解析している。この解析結果から、肝臓において Cholesterol 生合成を制御する転写因子 Sterol-Regulatory Element Binding Protein (SREBP) が、卵胞発育期から排卵期の顆粒膜細胞においても高発現することを見出し、卵巣においても Cholesterol 生合成経路が存在している可能性が示唆された。この SREBP が Cholesterol 生合成を制御するメカニズムは、Cholesterol の同化組織である肝臓において先行して研究されており、図 1 に示したように、以下の様に制御されることが報告されている。生体内の Cholesterol 量が多い時には、肝臓で SREBP が小胞体膜上に発現し、SREBP を正に制御する SREBP-cleaved activating protein (SCAP) および SREBP を負に制御する Insulin-induced gene-1 (INSIG-1) と結合し、SREBP-SCAP-INSIG-1 の三量体を形成する。これにより SREBP の核内移行が生じず、Cholesterol 合成酵素の発現上昇が起こらず、Cholesterol の新規生合成は起こらない (Engelking et al., 2004; Liu et al., 2012)。一方で、生体内の Cholesterol 量が低下すると、急速に INSIG-1 が消失し、SREBP-SCAP の二量体が小胞体からゴルジ体へ移行する (Hua et al., 1996)。ゴルジ体では 2 つのプロテアーゼ Site 1/2 Protease により修飾を受け、SREBP の N 末端の放出により、核移行する結果、Cholesterol 生合成酵素群の発現を上昇させる (Rawson et al., 1997; Sakai et al., 1998)。SREBP-SCAP により発現上昇した Cholesterol 生合成酵素群は、グルコースの解糖により生じる Acetyl-CoA を基質として Cholesterol の生合成を促進する。通常、卵巣をはじめとする末梢組織 (Cholesterol 異化組織) では、上記機構による Cholesterol 生合成経路が活性化されず、Cholesterol の供給源は肝臓に依存すると考えられてきた。しかし、卵巣内の顆粒膜細胞において SREBP が高発現していたことから、肝臓と同様に、顆粒膜細胞においても SREBP, SCAP, INSIG-1 により Cholesterol を生合成する可能性がある。卵胞発育期における Estrogen 産生の基質は、卵胞膜細胞において Cholesterol を基に産生される Androgen を用いることから、顆粒膜細胞において発現する SREBP は、Estrogen 産生には関与しないものと考えられる。一方で、排卵期における Progesterone 産生は、顆粒膜細胞において Cholesterol を基質として Progesterone 産生を増大させることから、SREBP とその制御因子は、排卵に関与する可能性が示唆された。しかし、顆粒膜細胞において SREBP だけでなく SCAP や INSIG-1 が発現するか、いつ、どのようにして SREBP の N 末端が放出され、Cholesterol 生合成経路が活性化されるか、これが排卵に関与するのかは全く明らかになっていない。

そこで本研究では、哺乳動物の卵巣における Cholesterol 生合成経路の発現とその意義を

明らかにすることを目的として、研究を行った。まず、第一章の緒論では、不妊症の現状と排卵時の P4 産生との関係、およびその破綻により生じる LUF について論述した。第二章では、3 週齢の未成熟な C57BL/6 雌マウスに卵胞発育を誘導する eCG を投与し、48 時間後に排卵を誘導するヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (human Chorionic Gonadotropin; hCG) を投与後、顆粒膜細胞における SREBP, SCAP, INSIG-1 の経時的発現変化と Cholesterol 生合成経路の活性化時期の検討から、排卵への影響を検討した。第三章では、第二章において排卵刺激後の INSIG-1 の消失が排卵期の Progesterone 産生と排卵に重要であったことから、INSIG-1 の消失と SREBP の N 末端放出メカニズムを詳細に解析した。第四章の総合考察では、SREBP による Cholesterol 生合成の活性化メカニズムとその破綻についてまとめ、本研究結果を基盤とした LUF の新しい予防法や治療法を提案した。第五章の総括では、本研究を要約した。

A. 血中Cholesterol量が高い時



B. 血中Cholesterol量が低い時

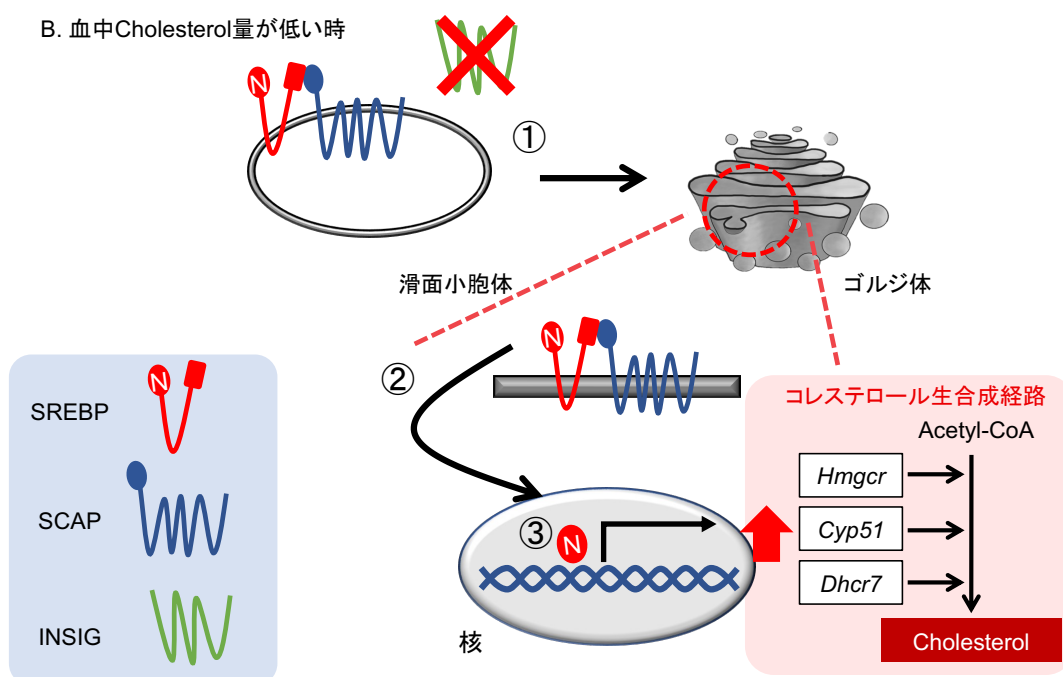


図1. 肝臓におけるSREBP, SCAP, INSIG-1のCholesterol生合成制御メカニズム

A; 血中Cholesterol濃度が高い時, SREBP-SCAP複合体にINSIG-1が結合し, Cholesterol生合成は抑制される

B; 血中Cholesterol濃度が低下すると

①INSIG-1が消失し, SRREBP-SCAP複合体がゴルジ体へ移行する

②SREBPのN末端が切断酵素により切断され放出される

③N末端SREBPが核内に移行し, Cholesterol生合成酵素の発現を上昇させることで, Cholesterol生合成経路を活性化させる

第二章

顆粒膜細胞に発現する脂質転写因子 SREBP と制御因子(SCAP, INSIG-1)の 経時的発現変化とその役割

序論

一般的に、副腎や精巣および卵巣などのステロイドホルモン産生組織は、肝臓に貯蔵された Cholesterol をその担体タンパク質である High-density Lipoprotein (HDL)あるいは Low-density Lipoprotein (LDL)と結合させ、末梢組織に発現する HDL 受容体 (Scavenger receptor type 1; SCARB1)あるいは LDL 受容体 (LDL receptor; LDLR)を介してステロイドホルモン産生に利用する (Rajkumar et al., 1988; Grummer and Carroll, 1988; Gwynne and Mahaffee, 1989; Azhar et al., 1998; Reaven et al., 2000)。卵巣では、ヒトやブタ、ウシ、マカクザルを含む多くの動物種において HDL 受容体および LDL 受容体が存在し (Rajapaksha et al., 1997; Murata et al., 1998; Sekar et al., 2000; Argov and Sklan, 2004; Cherian-Shaw et al., 2009), FSH や cAMP に応答して HDL および LDL が卵巣に輸送される (Azhar et al., 1988; Reaven et al., 1995; Lai et al., 2013)。このことから、卵巣においてもステロイドホルモン合成には、肝臓由来の Cholesterol が使用されるとこれまで考えられてきた。しかし、近年、Chang らは、マウス卵巣において、HDL および LDL とこれらの受容体が顆粒膜細胞および卵丘細胞には存在せず、間質細胞、卵胞膜細胞および黄体細胞に存在することを報告している (Chang et al., 2017)。さらに、HDL 受容体の *Scarb1* 遺伝子を欠損させた雌マウスでは、正常な卵胞発育と排卵が誘起されることが報告されている (Trigatti et al., 1999)。また、Yamashita らは、ブタ卵丘細胞一卵子複合体 (Cumulus-Oocyte Complex; COC)を体外成熟培養する際に HDL や LDL-Cholesterol を多量に含む FCS を無添加あるいは添加した培地で培養し、培地中の Progesterone 量を比較した結果、FCS の有無では Progesterone 量に差が認められないことを示している (Yamashita et al., 2005)。したがって、排卵期の顆粒膜細胞や卵丘細胞では Progesterone の産生には、HDL や LDL により供給される Cholesterol に依存せず、他の経路を介して顆粒膜細胞にもたらされる Cholesterol を利用している可能性が高い。

当研究室では、卵胞発育と排卵を誘導する因子の探索を目的として、eCG とその後に hCG を投与したマウスの顆粒膜細胞における Transcriptome 解析を実施している。この解析結果から、卵胞発育期後期から排卵期の顆粒膜細胞において *Srebp* (Sterol-Regulatory Element binding protein)が高く発現することを見出した。SREBP は、肝臓において Cholesterol 生合成を制御する転写因子として報告され、3つのアイソフォーム (SREBP-1a, SREBP-1c, SREBP-2)が報告されている (Horton and Shimomura, 1999; Shimano, 2001; Shimano, 2002; Horton et al., 2003)。SREBP-1a あるいは SREBP-2 を過剰発現させたマウスの肝臓では、Cholesterol の蓄

積により脂肪肝となる一方、これらの遺伝子をノックアウトしたマウスの肝臓では、Cholesterol の新規合成が生じないことが報告されている (Shimano et al., 1996; Shimano et al., 1997; Horton et al., 1998; Merath et al., 2011; Rong et al., 2017)。さらに、SREBP は、正の制御因子である SCAP (SREBP cleavage-activating protein) と負の制御因子である INSIG-1 (Insulin induced gene-1) により、以下の様に転写の ON と OFF が制御され、Cholesterol が新規合成されていることが報告されている (Brown et al., 2018)。

- ① 摂食により膵臓のβ細胞から放出されたインスリンが、肝細胞膜上のインスリン受容体に結合し、*Srebp* と *Scap* mRNA の発現が亢進され、小胞体膜上で Full-length SREBP (f-SREBP) と SCAP が二量体を形成する (Matsuda et al., 2001; Engelking et al., 2004; Haas et al., 2012)。
- ② SREBP-SCAP 複合体はゴルジ体へ移行し、SREBP の N 末端 (N-terminal SREBP; n-SREBP) の核移行により、3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) や Cytochrome P450 family 51 (CYP51), 7-dehydrocholesterol reductase 7 (DHCR7) のような Cholesterol 生合成酵素群の発現が上昇する。
- ③ Cholesterol 生合成酵素群の発現により、Acetyl-CoA を基に Cholesterol が新規合成される (Horton et al., 2003)。
- ④ その後、SREBP 依存的に発現する INSIG-1 は、新規合成された Cholesterol のフィードバックにより SREBP-SCAP 複合体に結合し、SREBP-SCAP-INSIG-1 の三量体を形成し n-SREBP の核移行と Cholesterol 新規合成を抑制する (Engelking et al., 2004; Engelking et al., 2005)。

当研究室の結果から、卵巣においても卵胞発育刺激以降の顆粒膜細胞において *Srebp* の発現を認めていることから、SCAP および INSIG-1 による SREBP の転写制御機構と Cholesterol 新規合成システムが機能している可能性が高い。しかし、卵巣におけるこれらの発現変化や役割は全く報告されていない。

そこで本研究では、SREBP とその制御因子の卵巣における経時的発現変化とその役割を明らかにする目的で、マウスに eCG を投与して卵胞発育を誘導し、その 48 時間後に排卵を誘導する hCG を投与した卵巣から顆粒膜細胞を回収し、SREBP, SCAP, INSIG-1 の遺伝子・タンパク質発現変化を調べた。さらに SREBP, SCAP, INSIG-1 のタンパク質の相互作用を免疫沈降法と免疫組織化学染色法により調べた。次に、SREBP の標的遺伝子である Cholesterol 新規合成酵素群 (*Hmgcr*, *Cyp51*, *Dhcr7*) の遺伝子発現と Cholesterol 量、Progesterone 量との相関を調べた。次に、SREBP の役割を明確化するため、eCG 投与後のマウスに SREBP の活性化阻害剤である Fatostatin を投与し、Cholesterol 新規合成および Progesterone 産生に与える影響を個体レベルで解析した。また顆粒膜細胞の初代培養系を用いて、*Scap* mRNA 特異的な small interfering RNA (siRNA) による Knockdown が Cholesterol 新規合成および Progesterone 産生に及ぼす影響を詳細に検討した。さらに、顆粒膜細胞の初代培養系により、顆粒膜細胞に取り込まれる Cholesterol が Progesterone 産生に寄与するかを調べた。最後に、

Fatostatin が Cholesterol 新規合成および Progesterone 産生, 卵子成熟, および排卵に及ぼす影響を検討するとともに, Fatostatin による卵子成熟および排卵の抑制効果が Progesterone 投与により回復するかを検討した。

材料および方法

試薬の調製

- PBS (Phosphate Buffered Saline; リン酸緩衝生理食塩水)

PBS (+) ×10 は超純水に 0.1% (w/v) CaCl₂ (Hayashi Pure Chemical Ind., Ltd, Osaka, Japan), 0.1% (w/v) MgCl₂ · 6H₂O (Katayama Chemical Industries Co, Ltd, Osaka, Japan), 1% (w/v) glucose (Nacalai tesque, Kyoto, Japan)を溶解し作製した。PBS (-)は超純水に 0.8% (w/v) NaCl (Fujifilm Wako, Osaka, Japan), 0.02% (w/v) KCl (Nacalai tesque), 0.281% (w/v) NaHPO₄ · 12H₂O (Nacalai tesque)を溶解し作製した。作製した PBS (-)に PBS (+) ×10, 1% (w/v) PVP (Sigma Aldrich, MO, USA), 1% (w/v) 抗生物質 (0.2% ペニシリン-ストربتマイシン, Nacalai tesque)を添加し PBS を作製した。

- PBS-Tween 20 (PBS-T)

PBS-T は PBS 500 ml に Tween 20 (Sigma Aldrich)を 1 ml 添加し作製した

- eCG (equine Chorionic Gonadotropin) および hCG (human Chorionic Gonadotropin)

eCG は, 20 IU の eCG (注射用血清性性腺刺激ホルモン 動物用セロトロピン, ASKA Animal Health Co., Ltd., Tokyo, Japan) を生理食塩水で 5 IU に希釈し, マウスに腹腔内投与した。

hCG は, 60 IU の hCG (注射用ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン 動物用ゴナドトロピン, ASKA Animal Health Co., Ltd) を生理食塩水で 6 IU に希釈し, eCG 投与 48 時間後のマウスに腹腔内投与した。

- Fatostatin (SREBP-SCAP 形成阻害剤)

Fatostatin (Cayman CHMECAL, MI, USA)は, まずジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide; DMSO, Fujifilm Wako)により, 1 mg/100μl に溶解した。使用前に, 総投与量に対して, DMSO が 10%(v/v)以下に生理食塩水で希釈した。Fatostatin は, Menon ら (Menon et al., 2015)の報告に基づいて, 3 週齢の未成熟雌マウスに eCG 5 IU を投与し 42 時間後に 1 kg あたり 30 mg の濃度で投与した。

- Progesterone (P4)

P4 (Sigma Aldrich)は, Ethanol (Fujifilm Wako)により, 2 mg/100 μl に溶解した。使用前に生理食塩水により希釈した後, 使用した。P4 は, Kanayama ら (Kanayama et al., 1994)の報告に基づいて, Fatostatin を投与したマウスに, hCG 6 IU と同時に 1 kg あたり 2 mg の濃度で投与した。

- 単離培地

単離用培地は Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Fujifilm Wako) に 1% (v/v)の抗生物質 (Nacalai Tesque)とウシ胎仔血清 (Fatal Calf Serum; FCS, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を添加し, 使用する 6 時間前に 37°C, 5%CO₂ インキュベーター内で予め加温して使用

した。

- ・最終培地

最終培地は DMEM に 1% 抗生物質を添加し、使用する 6 時間前に 37°C, 5%CO₂ インキュベーターで均衡化した。

- ・トランスフェクション用培地

培地に抗生物質が含有すると siRNA 導入効率が阻害されるため、トランスフェクション用培地を別途作製した。トランスフェクション用培地は、DMEM に 1% (v/v) FCS を添加し、6 時間前に 37°C, 5%CO₂ インキュベーターで均衡化し使用した。

- ・Amphiregulin (AREG)

AREG (Sigma Aldrich) は DMEM で 100 µg/ml に溶解し、最終培地で 100 ng/ml に希釈して使用した。

- ・Small interfering RNA (siRNA)

Scap mRNA に特異的な siRNA (sc-36463, Santa Cruz Technology, TX, USA) は Santa Cruz Technology で設計されたものを使用した。Scrambled RNA (SN-1001, Bioneer Corporation, Daejeon, Korea) はネガティブコントロール (NC) として使用した。これらを RNase free water (QIAGEN sciences, Venlo, Netherlands) で 10 µM に希釈し、さらにトランスフェクション用培地で最終濃度 (10 nM) に希釈した後、使用した。

- ・ヒアルロニダーゼ (Sigma Aldrich)

PBS により 1% (w/v) ヒアルロニダーゼを作製した後、-20°C で保管し、最終濃度 0.01% に希釈し使用した。

マウスの維持

日本クレア株式会社から購入した C57BL/6 マウスを当研究室で繁殖維持した。飼料には飼育繁殖用固形飼料 (CE-2, CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) を用いた。飼料および給水は、不断給餌および自由給水とした。飼育環境は、環境温度を 22±1°C、相対湿度を 55±10%、明暗時間を 12 時間照明 (午前 6 時点灯、午後 6 時消灯) とした。生後 3 週間で離乳させた雌マウスを実験に用いた。なお、本実験は県立広島大学実験動物委員会へ研究の前に予め研究申請し、承認を受けた。また実験動物の取り扱いには県立広島大学動物実験委員会の規定を遵守した。

顆粒膜細胞と COC の回収

25 G 注射針 (Terumo, Tokyo, Japan) を付けたシリンジ (Terumo) を用いて、3 週齢の未成熟雌マウスに eCG 5 IU を腹腔内投与し、48 時間後に hCG 6 IU を投与した後、各処理時間後に解剖し卵巣を取り出した。取り出した卵巣を単離用培地が入った 50 mm プラスチックシャーレ (AS ONE, Osaka, Japan) に入れた。室温 25°C で、実体顕微鏡 (OLYMPUS, CH, Tokyo, Japan) 下で 25 G 注射針を付けたシリンジを用いて、卵胞を穿刺し顆粒膜細胞および COC を

はじき出した。

COC は実体顕微鏡下でパスツールピペット (IWAKI, Shizuoka, Japan)を用いて回収した。COC 回収後の単離用培地をマイクロチューブ (AS ONE)に回収し、4°C に設定した冷却遠心機 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan)で 4,500 rpm で 5 分間遠心し、上清を取り除き単離用培地あるいは PBS を 1 ml 加え、再び同条件で遠心し、上清を取り除いて顆粒膜細胞を回収した。

Total RNA 抽出

雌マウスから回収した顆粒膜細胞の Total RNA 抽出は、RNeasy Mini Kit (Qiagen sciences)を用いて行った。顆粒膜細胞の入ったマイクロチューブに Buffer RLT 400 μ l に対して 4 μ l の β -Mercaptoethanol (Nacalai tesque)を混和した溶液を 350 μ l 添加し、超音波細胞破碎機により細胞膜を破碎した。その後、DEPC 処理水 (Nacalai tesque)で希釈した 70% (v/v) Ethanol を 350 μ l 添加しコレクションチューブをセットしたスピнкаラムへ入れ、冷却遠心機で 4°C, 15,000 rpm で 1 分間遠心した。コレクションチューブに溜まった液体を廃棄し、Buffer RW1 を 700 μ l 添加し、4°C, 15,000 rpm で 1 分間遠心した。コレクションチューブに溜まった液体を廃棄し、新たな下受けカラムをセットした後、Buffer RPE を 500 μ l 添加し、4°C, 15,000 rpm で 1 分間遠心した。コレクションチューブに溜まった液体を廃棄し、再び Buffer RPE を 500 μ l 添加し、4°C, 15,000 rpm で 2 分間遠心した。スピнкаラムをマイクロチューブへセットし、RNase free water を 50 μ l 添加し、氷上で 1 分間静置し、4°C, 15,000 rpm で 1 分間遠心した。マイクロチューブの抽出された Total RNA を含む RNase free water を -80°C で凍結保存した。

Quantitative RT-PCR

前項で抽出した Total RNA の濃度を Nanodrop one (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を用いて測定し、DEPC 処理水で RNA 濃度を 5 ng/ μ l に希釈した。7.2 μ l のサンプルに 4 μ l RT-Buffer (Promega, WI, USA), 0.8 μ l dNTP (Promega), 0.5 μ l Oligo (dT) Primer (Promega), 0.25 μ l Taq RT (Promega), 7.2 μ l DEPC 処理水を RT-PCR 用マイクロチューブ (Nippon Genetics, Tokyo, Japan)に入れた。サーマルサイクラー (Quick bath, ThermoGen Inc., Nagano, Japan)を用いて 42°C で 75 分間、94°C で 5 分間温めて cDNA を生成した。

RT-PCR によって生成された cDNA サンプル 1.2 μ l に対して、7.5 μ l KAPASYBR[®]FAST Universal 2X qPCR Master Mix (KAPA Biosystems, MA, USA), 0.6 μ l 標的遺伝子プライマーセット (primer F and R, FASMAC, Kanagawa, Japan), 5.1 μ l 滅菌超純水の計 15 μ l を Real-Time PCR 用の 8 連チューブ (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA)に入れた。CFX Opus リアルタイム PCR システム (Bio-Rad Laboratories Inc.)を用いて 95°C で 30 秒間、その後 95°C で 5 秒間、アニーリング温度 (X°C)で 45 秒間、40 サイクル行い cDNA を増幅した。各サンプルにおいて、内部標準を *Rpl 19* mRNA とした。標的遺伝子に対するプライマーのアニーリング温度およびプロダクトサイズは Table 1 に記した。非特異的な PCR 産物およびプライマーダ

イマーを除去するため、各プライマーはポジティブコントロールを用いて、PCR 後に融解曲線および PCR 増幅産物のアガロース電気泳動を行った。Real-Time PCR データ解析は、CFX Maestro 解析ソフトウェア (Bio-Rad Laboratories Inc.)を用いた。

タンパク質濃度測定

サンプルのタンパク質濃度測定は、Bio-Rad DC Protein Assay Regents Package (Bio-Rad Laboratories Inc.) を用いて行った。サンプルに Whole-cell extract buffer (WCEB; 超純水, 100 mM NaCl (Fujifilm Wako), 100 mM Na₄P₂O₇ (Nacalai tesque), 50 mM NaF (Nacalai tesque), 0.1 mM Na₃VO₄ (Sigma Aldrich), 1% TritonX-100 (Nacalai tesque), 2.5 mM HEPES (pH7.5, Sigma Aldrich), 10% glycerol (Fujifilm Wako), 5 mM EDTA (Dojindo, Kumamoto, Japan), 5 mM EGTA (Nacalai tesque) を溶解したものを)を 50 μ l 添加し超音波処理で細かく切断した。15,000 rpm で5分間遠心分離し、細胞が溶解している上清を新しいマイクロチューブへ移した。同様に Standard (5.68 mg/ml) を1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16まで WCEB で段階希釈し、マイクロチューブに2 μ l 作製した。また Blank (WCEB) をマイクロチューブに2 μ l 準備した。キット内の Regent A 1 ml に対して Regent S 20 μ l の割合で混合し、Blank, Standard, サンプルの入ったマイクロチューブにそれぞれ 25.4 μ l ずつ添加した。その後、15,000 rpm で1分間遠心し、室温で5分間遮光した。5分後、キット内の Regent B 200 μ l を各マイクロチューブに添加し、ボルテックス後、15,000 rpm で1分間遠心し、室温で15分間遮光した。Micro Well Plate (GDMP-96F, AS ONE) に各マイクロチューブの溶液を 100 μ l ずつダブルアッセイし、Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific) で吸光度 (波長: 750 nm) を測定した。Standard の吸光度をもとに検量線を作製し、サンプルのタンパク質濃度を算出した。

Western blotting

各処理区のサンプル溶解液は、タンパク質量が 10 μ l あたり 20 μ g になるように WCEB により希釈した後、試料緩衝液 (SDS-PAGE 用, 2倍濃縮, 2-ME 含有, Nacalai Tesque)により2倍希釈し、作製した。

・ SDS-PAGE

サンプル溶解液と MWPO₃ BlueStar prestained Protein Marker (Nippon Genetics)を 100°C で5分間温めた後、各 15 μ l を 7.5%ポリアクリルアミドゲルで展開した。7.5%ポリアクリルアミドゲルの組成は次の通りにした。

濃縮ゲル

超純水	2.89 ml
アクリルアミド(Nacalai tesque)	0.79 ml
1.5 M Tris-HCl (pH6.8, Bio-Rad Laboratories Inc.)	1.25 ml

10% (w/v) SDS (Nacalai Tesque)	50 μ l
10% (w/v) APS (Fujifilm Wako)	17 μ l
N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン (Nacalai tesque)	5 μ l

展開ゲル

超純水	3.89 ml
アクリルアミド (Nacalai tesque)	1.99 ml
0.5 M Tris-HCl (pH8.8, Bio-Rad Laboratories Inc.)	2 ml
10% (w/v) SDS (Nacalai Tesque)	80 μ l
10% (w/v) APS (Fujifilm Wako)	27 μ l
N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン (Nacalai tesque)	4 μ l

泳動バッファーは、超純水 1000 ml に Tris (Fujifilm Wako) 3.03 g, Glycine (Nacalai tesque) 14.4 g, SDS 1 g を溶解し使用した。Power Pac HC (Bio-Rad Laboratories Inc.) を用いて 20 mA に設定し、室温条件下で電気泳動を約 2 時間行った。

・転写

PVDF membrane (Polyvinylidene difluoride membrane, Hybond-P, GE Healthcare, UK) はマルチシェーカー (MMS-110, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて Methanol (Nacalai Tesque) で 5 分間振盪させ、超純水で共洗いし、超純水で 15 分間振盪させた後、転写バッファー (超純水 900 ml, Tris 7.5 g, Glycine 15 g, Methanol 100 ml) で共洗いし、15 分間振盪させ前処理を行った。また、スポンジと濾紙は転写バッファーに予め浸した。転写装置 (Bio-Rad Laboratories Inc.) の陰極側から、スポンジ、濾紙、PVDF membrane の順に置き、電気泳動後の展開ゲルのみを重ね、さらに濾紙、スポンジを重ね、4°C, 100 mA で一晩転写した。

・PVDF membrane のブロッキング

転写された PVDF membrane は PBS (-) で共洗い後、10 分間洗浄した。10 分後、20 ml PBS (-) に 1.0 g スキムミルク (Morinaga Milk, Tokyo, Japan) を溶解させた 5% スキムミルク / PBS (-) を作製した。洗浄後の PVDF membrane を作製した 5% スキムミルク / PBS (-) で 2 時間ブロッキングした。

・一次抗体反応

PBS-T 5 ml に 0.125 g スキムミルクを溶解し 2.5% スキムミルク / PBS-T を作製した。この溶液を用いて、1 : 10000 で希釈した抗 β -ACTIN 抗体 (Cell Signaling Technology, MA, USA), 1 : 1000 で希釈した抗 f-SREBP-1 抗体 (Enogene, NY, USA), 抗 n-SREBP-1 抗体 (Sigma Aldrich), 抗 f/n-SREBP-2 抗体 (Cayman CHEMICAL) あるいは抗 INSIG-1 抗体 (Novus Biologicals, CO, USA), また 1 : 3000 で希釈した抗 SCAP 抗体 (Gene Tex, CA, USA) にプロ

ッキングした PVDF membrane を浸して 4°C で一晩反応させた。

- ・洗淨

非特異的に結合した抗体を除去する目的で、一次抗体と反応させた PVDF membrane を PBS-T で 2 時間以上洗淨した。

- ・二次抗体反応

2.5%スキムミルク/PBS-T を用いて 1 : 3000 で希釈した Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology) を洗淨した PVDF membrane に浸して常温で 1 時間反応させた。

- ・洗淨

非特異的に結合した二次抗体を除去する目的で、二次抗体と反応させた PVDF membrane を PBS-T で 1 時間振盪した。

- ・検出

HRP 活性の検出には、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, IL, USA) を用いて行った。予め 4°C で保存されていた ECL 試薬 A と試薬 B をそれぞれ 37°C で 30 分保温した後、1 : 1 で混合した。混合した ECL 試薬を洗淨した PVDF membrane のおもて面に 5 分間反応させた後、PVDF membrane に付着した ECL 試薬を除去し、サランラップに巻いた。PVDF membrane をおもて面が上になるようにフィルムカセット (PL-B, Okamoto Mfg. Co., Ltd., Osaka, Japan) に貼り付けて、PVDF membrane と X-Ray Film (RX-U, Fujifilm Wako) を重ねて感光させた。感光後、X-Ray Film を現像液 (ハイレンドール, Fujifilm Wako) に 1 分間、停止液 (3%酢酸 (Nacalai tesque)) に 5 分間、定着液 (ハイレンフィクス, Fujifilm Wako) に 3 分間浸して水で約 20 分間洗淨した後、乾燥させた。

- ・定量

検出された標的タンパク質およびβ-ACTIN バンド画像をスキャナーで取り込み、Gel Pro Analyzer (Media Cybernetics, Inc., MD, USA)により定量化した。標的タンパク質のバンド画像から得られた数値をβ-ACTIN のバンド画像から得られた数値で割り、これをグラフ化した。

卵巣切片の作製

50 ml の PBS (-)に 2.0 g のパラフォルムアルデヒド (Paraformaldehyde; PFA, MERCK, Darmstadt, Germany)を 100°C で 2 時間溶解し、4% PFA/PBS (-)を作製した。採取した卵巣を作製した 4% PFA/PBS (-)に常温で 4 時間浸し、固定した。その後、0.1 M Tris-HCl (pH 7.2)で水洗し、50%, 70%, 90%, 95% (v/v)Ethanol (Fujifilm Wako)/超純水および 100% Ethanol で脱水、キシレン(Fujifilm Wako)中で脱アルコールした後、パラフィン (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan)浸透により、卵巣をパラフィン内に包埋した。包埋後、卵巣を含むパラフィンブロックを作製し、RX860 回転式マイクローム (Yamato Kohki Ind., Co., Ltd, Saitama, Japan)を用いて、厚さ 5 μm の卵巣切片を切り出した。切り出された卵巣切片を 37°C の温水で伸

展させた後、MAS コートガラス (Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan) 上で風乾させた。

ヘマトキシリン&エオジン(HE)染色

風乾後の卵巣切片はキシレン中で脱パラフィン後、100%, 90%, 80% Ethanol で親水処理をした後、洗浄した。まず、以下の手順でヘマトキシリン&エオジン(Sakura Finetek Japan Co., Ltd.)染色を行った。

ヘマトキシリン	1 分
水洗	5 分
エオジン	3 分

エオジン処理後、80%, 90%, 100% Ethanol により脱水処理、キシレン中で脱アルコール処理を行い、マルチマウント 480 (Matsunami Glass Ind., Ltd.)を用いて封入した後、BZ-X700 (KEYENCE, Osaka, Japan) で観察・撮影した。

免疫組織化学染色

免疫組織化学染色法は、VECTORSTAIN Elite ABC Rabbit IgG kit (Vector Laboratories, CA, USA)を用いた ABC 法により以下の手順で行われた。

卵巣切片が接着したスライドガラスはキシレン中で脱パラフィン後、100%, 90%, 80% Ethanol で親水処理を行った。その後、PBS (-)で洗浄した後、卵巣組織上の内在性ペルオキシダーゼを不活性化させるため、3% H₂O₂/Methanol に 10 分間浸し、再び PBS (-)で洗浄した。洗浄後、抗原を賦活化するために、卵巣切片を 98°C の 10 mM クエン酸バッファー (pH 6.0)に 30 分間浸した後、ゆっくり冷却した。卵巣切片を PBS (-)で洗浄し、3% (w/v)BSA/PBS(-)で 2 時間、室温でブロッキングした後、3% BSA/PBS を用いて抗 n-SREBP-1 抗体あるいは抗 n-SREBP-2 抗体を 1 : 100 に希釈し、4°C で一晩、一次抗体反応を行った。また非特異的な呈色を避けるため、ネガティブコントロールとして 3% BSA/PBS のみを滴下した。反応後の卵巣切片を PBS (-)で 5 分×3 回洗浄した後、VECTORSTAIN Elite ABC Rabbit IgG kit (Vector Laboratories)内の Biotinylated Antibody を滴下し、室温で 30 分間静置した。PBS (-)で洗浄した後、ABC reagents を滴下し、室温で 30 分間インキュベートした。DAB 溶液は、50 ml の 0.05 M Tris-HCl (pH 7.6)に 30% H₂O₂ を 10 µl 加え、DAB 錠 (Fujifilm Wako)を溶解し作製した。作製した DAB 溶液を卵巣切片に滴下し、顕微鏡下で観察しながら呈色したことを確認した後、すぐに PBS (-)で洗浄し反応を停止した。卵巣切片はヘマトキシリンにより核を染色し、Hard・Set Mounting Medium (Vector Laboratories)により封入後、BZ-X700 で観察・撮影した。

免疫沈降法 (Immunoprecipitation; IP)

eCG 5 IU 投与 48 時間後のマウスに hCG 6 IU を投与し、hCG 投与前あるいは投与後の顆粒膜細胞を回収後、WCEB に溶解した。顆粒膜細胞を溶解したサンプルのタンパク質濃度

を測定後、WCEBによりタンパク質量が150 µgになるように調整した。調整済みのサンプルに抗 SCAP 抗体を1:50の割合で添加し、4°Cで一晩混和しながら反応させた。反応させた後、サンプルに Protein G Magnetic Beads (Cell Signaling Technology)を10 µl 加え、室温で30分間混和した。混和後、磁気ビーズラックを用いて上清を除去し WCEB を加え洗浄した。洗浄を5回繰り返した後、上清を取り除いたサンプルに試料緩衝液を加え、Western Blotting に供試し、抗 SREBP-1 抗体、抗 SREBP-2 抗体、抗 INSIG-1 抗体あるいは抗 SCAP 抗体を用いて、SCAP に結合するタンパク質を検出した。抗 SCAP 抗体が特異的に SCAP を捕捉しているか確認する目的で、ネガティブコントロールとして免疫沈降を抗 Normal Rabbit IgG 抗体 (Cell Signaling Technology)を用いて行なった。タンパク質量を150 µgにした調整済みのサンプルに抗 Normal Rabbit IgG 抗体を1:50の割合で加え、同様の処理を施し、Western Blotting により検出した。さらに、精製前のサンプルにおける標的タンパク質の総発現量を測定するため、IP に用いた10% (15 µg)のタンパク質量を Western Blotting に供試し、Full-length/N-terminal SREBP-1, Full-length/N-terminal SREBP-2, SCAP, INSIG-1 の発現量を調べた (Input)。

細胞内 Cholesterol の抽出と測定

マウスの卵巣から顆粒膜細胞を回収後、50 µl の WCEB でホモジナイズした後、タンパク質濃度を測定した。その後、Bligh-Dyer 法を用いて (Bligh and Dyer, 1959), Cholesterol を抽出した。まず、クロロホルム: Methanol を1:2で調整し、サンプルに150 µl 加え、5分間激しく混和した後、10分間静置した。その後、50 µl クロロホルムと40 µl WCEB を加え、転倒混和した後、5,500 rpm で10分間遠心した。遠心後、クロロホルム分画のみを回収し、濃縮遠心分離機で Cholesterol 成分を固相化した。固相化した Cholesterol を Total Cholesterol and Cholesterol Ester Colorimetric/Fluorometric Assay kit (BioVision, CA, USA)内の Cholesterol assay buffer を50 µl 加え、再溶解した。サンプル中の Cholesterol 濃度は Total Cholesterol and Cholesterol Ester Colorimetric/Fluorometric Assay kit を用いて測定した。

Cholesterol の検出

顆粒膜細胞内の Cholesterol 量は蛍光色素である Filipin III (Cayman Chemical Co.) を用いて以下のように測定した。

顆粒膜細胞をガラスボトムディッシュ (Matsunami Glass Ind., Ltd.)で初代培養し、培養後培地を除去した。4% PFA/PBS (-)により常温で5分静置し、固定した。その後、PBS で3回洗浄し、PBS で0.1 mg/ml に希釈した Filipin III で2時間染色した。染色後、PBS で3回洗浄し、蛍光顕微鏡 (BZ-X700)で観察・撮影した。全細胞数に対する蛍光細胞をハイブリッドセルカウント (BZ-H3C, KEYENCE) により算出し、Cholesterol 量の相対値とした。

ステロイドホルモンの抽出と Progesterone 濃度の測定

マウスの卵巣を回収後、500 μ l の WCEB 中でホモジナイズした後、タンパク質濃度測定を行った。サンプル中の脂質成分を除去するため、0.3 N に調整された NaOH (Fujifilm Wako) を 600 μ l 入れ、10 分間静置した。鹼化後、4 ml ジクロロメタン (Fujifilm Wako) を加え、5 分間激しく混和し、5,500 rpm で 20 分間遠心した後、ジクロロメタン分画のみを回収し、濃縮遠心分離機 (TAITEC Co, Saitama, Japan) でステロイドホルモン成分を固相化した。固相化したサンプルを 50% Methanol (Fujifilm Wako)/超純水で再溶解し、サンプル中の Progesterone 濃度は Progesterone EIA KIT (Cayman CHEMICAL) を用いて測定した。

顆粒膜細胞の体外培養

eCG 投与 48 時間後のマウスから卵巣を回収し、単離用培地中で 25 ゲージの針がついたシリンジで顆粒膜細胞および COC を弾き出した後、COC および卵巣を取り除いた。その後、単離用培地を全てエッペンドルフチューブに回収し、5,500 rpm で 5 分間遠心した。遠心後、培地を除去し、前培養用培地 (DMEM, 1% FCS) を 100 μ l 加え、静かに混和した後、サンプルとトリパンプルを 1:1 で混ぜ、血球計算盤を用いて、生存細胞数をカウントした。コーティングした 48 ウェル培養プレートに 2×10^5 あるいは 12 ウェル培養プレートに 1×10^6 の細胞数に顆粒膜細胞を調整して播種し、前培養を行った。12 時間後、100 ng/ml AREG を加えた最終培地に入れ替え、培養を行った。培養後の顆粒膜細胞をエッペンドルフチューブに回収後、5,500 rpm 5 分間遠心し、培地を除去してサンプルを得た。

siRNA トランスフェクション

siRNA トランスフェクションには Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いた。顆粒膜細胞は体外培養時と同様に前培養し、3 時間後に、トランスフェクション用培地に入れ替えた。トランスフェクションには次の試薬を準備した。

	ウェル	48	12
	細胞数	2×10^5	1×10^6
Reagent A	Opti-MEM Medium (Thermo Fisher)	25 μ l	100 μ l
	Lipofectamine RNAiMAX Reagent	1.5 μ l	6 μ l
Reagent B	Opti-MEM Medium	25 μ l	100 μ l
	siRNA (10 μ M)	0.5 μ l	3 μ l

Reagent A および Reagent B を 1:1 で混和し、5 分間室温でインキュベートした。インキュベート後、 2×10^5 cells あるいは 1×10^6 cells に対して、Reagent 混合溶液をそれぞれ 25 μ l あるいは 100 μ l を添加し、トランスフェクションを行った。トランスフェクション後、顆粒膜細胞は最終培地で 3 回以上洗浄し、100 ng/ml AREG 添加最終培地に入れ替え、培養を

した後、顆粒膜細胞あるいは培養培地を回収し、サンプルを得た。

なお、遺伝子組み換え動物を用いた研究については、遺伝子組み換え実験の審査を予め受け承認を受け、研究を実施した。

COC の膨潤直径，卵子の MII 率の測定

eCG 5 IU 投与 48 時間後のマウスに hCG 6 IU を投与し、12 時間後に卵巣を取り出し、単離用培地中で顆粒膜細胞と COC を弾き出し、膨潤した COC のみを回収後、倒立顕微鏡 (DIAPHOTO, OLYMPUS) で撮影した。Image J (National Institutes of Health, MD, USA) により、COC の膨潤直径を測定した。

撮影後、COC を PBS ドロップに移し、ヒアルロニダーゼ処理した後、裸化卵子のみを回収し、4% PFA/PBS (-) で 30 分間固定した。卵子を PBS で洗浄後、スライドガラス上で VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories) を滴下した後、蛍光顕微鏡 (BZ-X700, KEYENCE) で観察した。MII 率は第一極体が存在し、且つ染色体が赤道面に規則的に配列し、紡錘体がキネトコアに結合した形態であるかにより判断し、回収した卵子当たりの MII 率を測定した。

排卵数

eCG 5 IU 投与 48 時間後のマウスに hCG 6 IU を投与し、16 時間後に卵管膨大部に排卵された卵子をかき出し、排卵卵子を 100 μ l の PBS ドロップ内に移した。その後、1% (w/v) ヒアルロニダーゼ (Sigma Aldrich) を最終濃度 0.01% (w/v) ヒアルロニダーゼに希釈して添加し、5 分間室温でインキュベートした後、裸化卵子の数を測定し、これを排卵数とした。

黄体数

eCG 5 IU 投与 48 時間後のマウスに hCG 6 IU を投与し、48 時間後の卵巣を回収し、連続的に卵巣切片を作製した後、HE 染色を行い、卵巣 1 個に対する黄体数を測定した。

統計処理

実験はそれぞれ 3 回以上繰り返して行い、その結果は Excel 統計 (BellCurve, Tokyo, Japan) を用いて統計分析した。算出した結果は平均値 \pm 標準誤差 (SEM) で表示した。3 群以上の比較は、一元配置分散分析後、Fisher の最小有意差法で算出した。2 群の比較は Student's T 検定を実施し、5% 水準で有意差があると評価した。

結果

実験1. 卵胞発育および排卵を誘導した顆粒膜細胞における SREBP, SCAP, および INSIG-1 の経時的発現変化

本実験では、まず、卵胞発育期および排卵期の顆粒膜細胞における SREBP-1, SREBP-2, SCAP, INSIG-1 の遺伝子発現とタンパク質発現を経時的に解析した。3 週齢の未成熟な C57BL/6 雌マウスに卵胞発育を誘導する eCG を投与し、48 時間後 (eCG 48h) に排卵を誘導する hCG を投与した後、顆粒膜細胞を経時的に回収した (hCG 2, 4, 6, 8, 12h)。この結果、顆粒膜細胞における *Srebp-1a* mRNA は、無刺激 (Non-stimulated; NS) では低い値を示したが、NS と比較して eCG 48h で有意に高い発現を示した。一方、hCG 刺激後 2 時間で NS と同程度まで発現が低下し、12 時間後まで低く維持された (Figure 1A)。 *Srebp-2*, *Scap* および *Insig-1* mRNA 発現は、NS では低い値を示したが、これらの発現は、eCG 48h までに徐々に上昇し、hCG 2h に有意に高い発現を示した。その後、hCG 8h まで発現は徐々に有意に低下し、hCG 12h 後に再び発現が有意に増加した (Figure 1B, C, D)。

次に、Western blotting 法により、f-SREBP-1, f-SREBP-2, SCAP あるいは INSIG-1 を検出し、バンドの濃淡を Gel-pro analyzer により数値化し、発現変化をグラフ化した。この結果、f-SREBP-1 および f-SREBP-2 を示すバンドは、NS において全く検出されなかったが、eCG 48h で濃いバンドが認められ、この値は NS と比較し有意に高い値であった。その後、hCG 投与 2 時間後から 8 時間後までにこれらの発現量は徐々に低下し、hCG 投与 12 時間後には、これらのバンドは消失していた (Figure 1E, F, G)。SCAP を示すバンドは、NS においても発現が認められ、eCG, hCG 投与の有無に関わらず、各処理区間においても恒常的に発現していた (Figure 1E, H)。INSIG-1 発現は、NS において発現が認められたが、eCG 投与 48 時間後にはさらに強いバンドが検出された。その後 hCG を投与すると INSIG-1 発現は有意に低下し、12 時間後にはバンドは消失していた (Figure 1E, I)。

実験2. hCG 投与が顆粒膜細胞における f-SREBP-1, f-SREBP-2, SCAP, および INSIG-1 の発現に及ぼす影響

hCG 投与前後の顆粒膜細胞における f-SREBP-1, f-SREBP-2, SCAP および INSIG-1 のタンパク質間相互作用を調べる目的で、eCG 48h と hCG 2h の顆粒膜細胞を、抗 SCAP 抗体により免疫沈降した後、Western blotting により f-SREBP-1, f-SREBP-2, INSIG-1 を検出した (Figure 2A)。ネガティブコントロールである抗 Normal Rabbit IgG 抗体を用いた免疫沈降では、f-SREBP-1, f-SREBP-2, SCAP, および INSIG-1 を示すバンドは全く検出されなかった (Figure 2A)。抗 SCAP 抗体で免疫沈降した結果、eCG 投与 48 時間後の顆粒膜細胞では、f-SREBP-1, f-SREBP-2, INSIG-1 を示すバンドが検出され、SREBP, SCAP, INSIG-1 が 3 量体を形成していたが、hCG 投与 2 時間後には、f-SREBP-1, f-SREBP-2 および INSIG-1 のバンドは検

出されず、これらのタンパク質相互作用が低下していることが明らかになった (Figure 2A)。さらに、それらのバンドを数値化したところ、eCG 48h と比べて hCG 2h の顆粒膜細胞では、SCAP に結合する f-SREBP-1, f-SREBP-2 および INSIG-1 が有意に減少した (Figure 2B, C, D)。SCAP を示すバンドは eCG 48h と hCG 2h の処理区間に差は認められなかった (Figure 2E)。

次に、切断された n-SREBP-1 と n-SREBP-2 を検出する目的で、hCG 刺激前後の顆粒膜細胞を Western blotting に供試した (Input)。この結果、eCG 投与 48 時間後の顆粒膜細胞では、f-SREBP-1 および f-SREBP-2 を示す濃いバンドが検出されたのに対して、n-SREBP-1 と n-SREBP-2 を示すバンドは検出されなかった (Figure 2F, G, H, I, J)。一方で、hCG 投与 2 時間後の顆粒膜細胞では、eCG 48h と比較して f-SREBP-1 および f-SREBP-2 を示すバンドは減弱し、n-SREBP-1 と n-SREBP-2 を示すバンドが検出され、この値は、hCG 投与前に比べ有意に高い値を示していた (Figure 2F, G, H, I, J)。さらに、INSIG-1 を示すバンドは、eCG 投与 48 時間後と比較して hCG 投与 2 時間後で有意に減少し、Figure 1I と Figure 2D の結果と一致した (Figure 2K)。また、SCAP を示すバンドは eCG 48h と hCG 2h の処理区間に差は認められなかった (Figure 2L)。

最後に、抗 n-SREBP-1 抗体あるいは抗 n-SREBP-2 抗体を用いた免疫組織化学染色法により n-SREBP-1 と n-SREBP-2 が hCG 刺激後に核へ移行しているかを調べた。その結果、eCG 刺激 48 時間後の顆粒膜細胞において、n-SREBP-1 および n-SREBP-2 は、細胞質全体に均一に存在することが明らかになった (Figure 3A, B, F, G)。しかし、hCG 投与 2 時間後の顆粒膜細胞では、n-SREBP-1 および n-SREBP-2 が核に凝集していた (Figure 3C, D, H, I)。また一次抗体として抗 n-SREBP-1 抗体および抗 n-SREBP-2 抗体を添加していないネガティブコントロールでは顆粒膜細胞で n-SREBP-1 および n-SREBP-2 を示す茶色のシグナルは検出されなかった (Figure 3E, J)。

実験3. hCG 投与が顆粒膜細胞における n-SREBP-1 および n-SREBP-2 の局在に及ぼす影響

hCG 刺激後の顆粒膜細胞において、INSIG-1 が消失し n-SREBP-1/-2 が核内に移行したことから、肝臓において SREBP 依存的に発現する Cholesterol 生合成酵素群 (*Hmgcr*, *Cyp51*, *Dhcr7*) が、卵胞発育期および排卵期の顆粒膜細胞においても発現するかを qRT-PCR により検討した。この結果、eCG 投与 48 時間後の顆粒膜細胞では、*Hmgcr*, *Cyp51*, *Dhcr7* mRNA 発現は NS と同程度の低い発現量であった。一方で、hCG 投与 2 時間後の顆粒膜細胞では *Hmgcr*, *Cyp51*, *Dhcr7* mRNA の発現は NS と eCG 投与 48 時間後に比べて有意に上昇し、その後、hCG 投与 4 時間後に有意に減少した。その後、徐々に発現量は増加し、hCG 投与 8 時間後に再び hCG 投与 2 時間後と同程度までこれらの発現量は増加した。Cholesterol 生合成酵素群の発現が低い値を示した hCG 投与前と高い値を示した hCG 投与 2 時間後の顆粒膜細胞における Cholesterol 量を計測した。その結果、eCG 投与 48 時間後の顆粒膜細胞に比べ、hCG 投与 2 時間後の顆粒膜細胞では Cholesterol 量が有意に高い値を示した (eCG 48h; 16.58 ± 0.98 ng/protein vs hCG 2h; 37.76 ± 0.83 ng/protein)。

実験4. Fatostatin 投与が Cholesterol 生合成および Progesterone 産生に与える影響

顆粒膜細胞における SREBP の *in vivo* での機能を調べる目的で、3 週齢の未成熟な雌マウスに eCG を投与し、42 時間後に SREBP 活性化阻害剤 (Fatostatin) を投与した後、6 時間後に hCG を投与し、その 2 時間後に顆粒膜細胞を回収した。その結果、hCG 投与区では、f-SREBP-1 と f-SREBP-2 を示すバンドは検出されなかったが、n-SREBP-1 と n-SREBP-2 を示す濃いバンドが認められ、これらの値は有意に高い値を示した。これに比べ、hCG を投与しない None 区、Fatostatin 単独区 (Fato) および hCG+Fatostatin 区 (hCG+Fato) では、f-SREBP-1 と f-SREBP-2 が有意に増加し、一方 n-SREBP-1 と n-SREBP-2 は有意に低下した (Figure 5A-5E)。次に、*Hmgcr*, *Cyp51*, *Dhcr7* mRNA 発現を調べた結果、None 区、Fato 区および hCG+Fato 区では、hCG 区と比較して有意に低い値を示した (Figure 5F-5H)。同様に、顆粒膜細胞における Cholesterol 量も hCG 区と比べて hCG+Fato 区で有意に低い値を示した (hCG; 40.04 ± 2.36 ng vs hCG+Fato; 20.82 ± 0.53 ng / protein) (Figure 5I)。また Progesterone 受容体 (*Pgr*) の mRNA 発現は、hCG 区と比較して hCG+Fato 区の顆粒膜細胞において有意に高い値を示した (Figure 5J)、Progesterone 産生酵素 (*Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1*) の mRNA 発現は hCG 区と hCG+Fato 区に有意な差は認められなかった (Figure 5K-M)。一方で、hCG+Fato 区の卵巣内 Progesterone 量は、hCG 区に比べて有意に低い値を示した (hCG; 182.06 ± 8.40 pg / protein vs hCG+Fato; 84.28 ± 26.93 pg / protein) (Figure 5N)。hCG 刺激 12 時間後の顆粒膜細胞において Progesterone のターゲット遺伝子である *Snap25* と *Ctsl* mRNA 発現も、Fatostatin 投与により有意に低下した (Figure 5O, P)。

実験5. Scap siRNA が Cholesterol 生合成および Progesterone 産生に与える影響

顆粒膜細胞における SREBP の役割を *in vitro* 試験によりさらに詳細に調べる目的で、*Scap* mRNA 特異的に結合する *Scap* siRNA (siRNA) を遺伝子導入し、*Scap* mRNA をノックダウンした。ネガティブコントロールとして、Scramble siRNA を用いた (NC)。まず、Figure 6A と 6B において、顆粒膜細胞の *Scap* mRNA と SCAP タンパク質発現を調べ、遺伝子導入により SCAP 遺伝子とタンパク質の両方でノックダウンが生じているかを確認した。その結果、*Scap* mRNA および SCAP タンパク質発現は、NC 区と比較して siRNA 区で有意に低下したことから、本研究で用いる *Scap* siRNA は使用可能であることが確認された。*Scap* siRNA 遺伝子導入後の顆粒膜細胞における *Hmgcr*, *Cyp51*, *Dhcr7* mRNA 発現は、NC と比べて有意に減少した。さらに、Progesterone 産生酵素 (*Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1*) の mRNA 発現を測定したところ、NC と siRNA 区間において、これらの発現に有意な差は認められなかった (Figure 6F-H)。次に、Filipin III を用いて細胞内 Cholesterol を検出した結果、NC では細胞内 Cholesterol を示す青い蛍光が認められたのに対して、siRNA 区では青い蛍光が検出されず、Filipin III 陽性細胞数も有意に減少した (Figure 6I, J)。また培地中の Progesterone 濃度は、NC と比較して siRNA 区で顕著に低い値を示した (NC; 25.83 ± 1.80 pg/ml vs siRNA; 10.45 ± 1.35 pg/ml)

(Figure 6K)。

実験6. Cholesterol の外部導入が Progesterone 産生に及ぼす影響

排卵期の顆粒膜細胞における Cholesterol 取り込み経路と取り込まれた Cholesterol が Progesterone 産生に寄与するかを検討する目的で、まずは hCG 投与後の顆粒膜細胞および黄体細胞における HDL 受容体である *Scarb1* mRNA の遺伝子発現を経時的に調べた。この結果、*Scarb1* mRNA 発現は、hCG 投与前と比較して hCG 投与 2 時間後の顆粒膜細胞において有意に上昇したが、hCG 投与後 6 時間および 12 時間後では hCG 投与前と同程度まで減少し、その後、hCG 投与 24 時間後および 48 時間後の黄体細胞において hCG 投与 2 時間後と同程度まで有意に発現が増加した (Figure 7A)。Figure 7B では、hCG 投与 2 時間後の血清と卵胞液中の Cholesterol 濃度を調べた。この結果、血清中 Cholesterol 濃度は、 1.05 ± 0.104 mg/ml と高濃度存在した。一方で、卵胞液中の Cholesterol 濃度は検出限界以下だった (Not detected; N.D) (Figure 7B)。さらに、HDL-Cholesterol および LDL-Cholesterol を含む FCS 添加培地で顆粒膜細胞を培養したところ、FCS 無添加区 (FCS (-)) と FCS 添加区 (FCS (+)) において Filipin III 陽性を示す青い蛍光像と培地中 Progesterone 濃度に差は認められず、同様の値を示した (Figure 7C-7E)。

実験7. Fatostatin が卵丘細胞の膨潤および減数分裂再開に与える影響

Fatostatin が卵子成熟に与える影響を調べる目的で、Fatostatin 投与後の雌マウスに hCG を投与し、4 時間後あるいは 12 時間後の卵巣から卵丘細胞卵子複合体 (Cumulus-Oocyte Complex; COC) を回収した。まず、卵丘細胞の膨潤関連遺伝子 (*Has2*, *Tnfaip6*, *Ptx3*) の mRNA 発現は、hCG を投与していない None 区および Fato 区と比較して hCG 区では有意に上昇し、hCG+Fato 区においても hCG 区と同程度まで高い発現量を示した (Figure 8A-8C)。さらに、hCG 投与 12 時間後の COC 形態を観察したところ、hCG 区および hCG+Fato 区の両処理区において完全に膨化した卵丘細胞が観察され、膨潤直径に差は認められなかった (Figure 8D, E)。さらに、卵子の MII 率は、None 区と Fato 区において著しく低い値を示したが、これらに比べ hCG 区および hCG+Fato 区では 90 % 程度の有意に高い値を示した (Figure 8F)。

実験8. Fatostatin が排卵および黄体形成に与える影響

Fatostatin が排卵や黄体化に及ぼす影響を調べる目的で、まず hCG 投与 16 時間後の卵管から COC を回収し、排卵された卵子の数を測定した。この結果、hCG を投与したマウスでは 1 つの卵巣当たり 22.67 ± 4.67 個の COC が排卵されたが、hCG+Fato 投与マウスでは 5.29 ± 2.02 個の COCs のみしか排卵されておらず、排卵数が約 75 % まで減少した (Figure 9A)。一方で、Fatostatin 投与マウスに hCG と P4 (hCG+P4) を同時に投与し回復実験を行ったところ、Fatostatin 投与により減少した排卵数は hCG 区と同程度まで回復した (Figure 9A)。次に、hCG 投与 48 時間後の卵巣における黄体の形態を観察したところ、Fatostatin を投与した

マウスでは、黄体内に未排卵の卵子が残存した異常な黄体 (Oocyte-Residual Corpus Lutea; ORCL)が形成され、正常な黄体数が hCG を投与したマウスと比較して顕著に減少した (Figure 9B-9K)。しかし、Fatostatin 投与後のマウスに hCG+P4 を投与すると、hCG 区と同様に正常な黄体が形成され、ORCL 数は Fatostatin 区と比較して有意に減少した (Figure 9B-9K)。

考察

本研究の結果から、マウスの顆粒膜細胞において、卵胞発育刺激により SREBP-1, SREBP-2 および SCAP 発現は mRNA およびタンパク質レベルで高い発現量を示し、これが排卵刺激後も高いレベルで維持されることが明らかになった。しかし、卵胞発育期で SREBP と SCAP の発現が高いにも関わらず、SREBP により制御される Cholesterol 生合成酵素は発現しなかった。一方、その後の排卵刺激以降に初めて Cholesterol 生合成酵素が発現し、Cholesterol が生合成されていた。加えて、卵胞発育期には INSIG-1 が高発現を示すが、排卵刺激後に急激に INSIG-1 が発現低下し、このとき n-SREBP の核移行が生じていた。さらに、マウスへの SREBP-SCAP 複合体阻害剤の投与により、Cholesterol 生合成酵素の発現、Cholesterol 生合成量と Progesterone 産生量は完全に抑制され、卵子は成熟するが、排卵が阻害されるという表現系が得られた。卵子は成熟するが、排卵が阻害されるという表現系は、*Pgr* KO マウスにおいても認められていることから (Robker et al., 2000)、排卵刺激による INSIG-1 の消失と SREBP の核移行は排卵に極めて重要であり、この破綻は LUF 様の病態の原因となることを初めて明らかにした。LUF では、成熟卵子がなかなか排卵されない、あるいは全く排卵されず、長期間 MII 期のままの成熟卵子のままの状態に留まる症状を示すが、これらは卵子の過成熟 (エイジング) の原因となり、受精卵の発生率低下の主要因となることが明らかにされている (星野由美, 日本 IVF 学会雑誌, Vol.17, No2, 2-7, 2014)。したがって、排卵刺激直後の SREBP による Cholesterol 生合成経路の活性化と、それに伴う Progesterone の速やかな合成は、成熟卵子のエイジング防止のために重要であり、排卵後に起こる受精や胚発生といった個体形成を左右すると考えられた。

本研究では、eCG 刺激により顆粒膜細胞で SREBP と SCAP, INSIG-1 が同時に発現上昇していたが、この発現上昇メカニズムは本研究では明らかにすることができていない。肝臓では、SREBP, SCAP および INSIG-1 の発現上昇メカニズムが詳細に報告されており、摂食により膵臓ランゲルハンス島β細胞から分泌される Insulin が、肝細胞内に PI3K-Akt シグナルを伝達すると SREBP と SCAP の発現が上昇することが明らかになっている (Saltiel, 2001; Leavens and Birnbaum, 2011; Rui, 2014)。卵胞発育期の顆粒膜細胞において、FSH-FSHR の下流には、PI3K-Akt シグナルが存在することが報告されている (Casarini and Crépieux, 2019)。実際、山下は FSH と LH を添加した培地でブタの顆粒膜細胞を培養すると、*Srebp-1a*, *Srebp-2*, *Scap* の発現が上昇するが、この上昇は PI3K 阻害剤 (LY294002) により抑制されることを報告している (山下泰尚, 博士論文, 2007)。さらに、Liu らは (2009)、マウス顆粒膜細胞において FSH による PI3K-Akt シグナルの活性化が転写因子 Forkhead box-containing protein, O sub-family 1 (FOXO1) のリン酸化を誘導し、FOXO1 が核内から細胞質へと移行する結果、*Srebp-1* と *Srebp-2* の発現が上昇することを明らかにしている (Liu et al., 2009)。このことから、卵胞発育期の顆粒膜細胞では、FSH-PI3K-Akt-FOXO1 を介して SREBP-1, SREBP-2 およ

び SCAP の発現が誘導されていると考えられる。一方、肝臓における INSIG-1 の発現は SREBP 依存的に発現上昇することが明らかになっていることから (Horton et al., 2003), 肝臓では, SREBP の発現と N 末端側の切断による活性化がまず先行して起こり, それに続いて INSIG-1 の発現が増加する。一方, 卵巣では, 後期胞状卵胞の顆粒膜細胞では, N 末端 SREBP が切断・核移行していないにもかかわらず, INSIG-1 が高発現していた。この結果は, 肝臓に認められる SREBP が INSIG-1 の発現を誘導するというメカニズムが卵巣では機能していないことを示唆し, 卵巣独自の INSIG-1 発現上昇メカニズムが卵巣には存在すると考えられた。

本研究において, *Insig-1* mRNA 発現は, 排卵刺激後の顆粒膜細胞においても比較的高く維持されていたが, タンパク質レベルでは, 排卵刺激以降に急激な消失が誘導されていた。このことから, 排卵刺激後の INSIG-1 の急速な消失は mRNA 発現の低下によるものではなく, タンパク質の翻訳後修飾の関与が示唆された。肝臓では, この INSIG-1 の翻訳後修飾に関する研究が報告されており, E3 ユビキチンリガーゼである glycoprotein 78 (gp78) が INSIG-1 に結合し, INSIG-1 のユビキチン化により消失することが報告されている (Song et al., 2005; Lee et al., 2006; Lee et al., 2006; Tsai et al., 2012; Liu et al., 2012; Han et al., 2019)。排卵後の顆粒膜細胞において, gp78 の発現やその機能に関する報告は全く存在しないが, 上記システム, もしくはそれに準ずるメカニズムにより排卵刺激後の顆粒膜細胞では INSIG-1 の急速な消失を生じさせている可能性が示唆された。

本研究において, Fatostatin をマウスに投与すると, Cholesterol 生合成と Cholesterol を基質として合成される Progesterone 量が著しく低下し, 排卵数が劇的に減少した。加えて, 黄体内に卵子が留まった異常な黄体形成が認められた。この表現系は, PGR の遺伝子欠損雌マウスや PGR のターゲット (*Adamts1*, *Pparγ*) 遺伝子欠損雌マウスと全く同様の表現系であったことから (Robker et al., 2000; Park et al., 2020), Fatostatin による Cholesterol 生合成の抑制は Progesterone 減少を伴うため, 上記の PGR の遺伝子欠損雌マウスや PGR のターゲット遺伝子欠損と同様の表現形となったことが強く示唆された。加えて, PGR の遺伝子欠損雌マウスで, 排卵は抑制されるが卵丘細胞の膨潤や卵子成熟は抑制されていないことも示されている。本研究においても Fatostatin の投与は, 卵丘細胞膨潤と卵子成熟に全く影響しなかったことから, SREBP は, Progesterone-PGR 系による排卵誘導にのみ重要であると考えた。

本研究結果をまとめると, 卵胞発育期の顆粒膜細胞において SREBP-1, SREBP-2, SCAP が発現するが, INSIG-1 が発現しているため, SREBP による Cholesterol 新規生合成は行われないことが明らかになった。排卵刺激後に INSIG-1 を急速に消失するため, SREBP の N 末端が切断され, 核内に移行する結果, 初めて Cholesterol が新規生合成されることも本研究により初めて明らかになった。さらに, この新規生合成された Cholesterol を基に Progesterone が産生され, 成熟卵子の排卵が誘導されることも明らかになった。したがって, 卵胞発育期に顆粒膜細胞で発現する SREBP-1, SREBP-2, SCAP, INSIG-1 と排卵期における INSIG-1 の

急激な消失は、成熟卵子の排卵に極めて重要である。

Table 1. qRT-PCRに用いたプライマーの塩基配列、アニーリング温度、
プロダクトサイズおよびアクセッションナンバー

mRNA	Primer sequences	Product size(bp)	Anneling temperature(°C)	Accession No.
<i>Rpl19</i>	F:5'-CTG AAG GTC AAA GGG AAT GTG-3' R:5'-GGA CAC AGT CTT GAT GAT CTC-3'	196	60	BC058135
<i>Srebp-1a</i>	F: 5'-CCG GGG AAC TTT TCC TTA AC-3' R: 5'-GTT GTT GAT GAG CTG GAG CA-3'	170	60	AB072350
<i>Srebp-2</i>	F: 5'-CCA TCT TCC CCT CTC TTT CC-3' R: 5'-AGG GAA GAT CCT GGG AGA AA-3'	224	64	NM033218
<i>Scap</i>	F: 5'-TCT CAG GCC TTC TAC AAC CA-3' R: 5'-GGC TCT CCT TGT TTG TGG TC-3'	200	60	NM001001144
<i>Insig-1</i>	F: 5'-GTG GAG CTT GCA ATC TGT GA-3' R: 5'-CTT CTC CGG AAT AGC TCG TG-3'	234	62	NM1533526
<i>Hmgcr</i>	F: 5'-TGG AGA TCA TGT GCT GCT TC-3' R: 5'-GCG ACT ATG AGC GTG AAC AA-3'	154	60	NM008255
<i>Cyp51</i>	F: 5'-TTG AGA ATT TGA GGC CAA CC-3' R: 5'-CTG GAT CTC ATG GAG GCA TT-3'	172	60	NM020010
<i>Dhcr7</i>	F: 5'-CGC TCC CAA AGT CAA GAG TC-3' R: 5'-GTG TCT TGG CCC AAA TGT CT-3'	233	60	NM007856
<i>Ctsl</i>	F: 5'-TCT GTT GCT ATG GAC GCA AG-3' R: 5'-CCG GTC TTT GGC TAT TTT GA-3'	219	60	NM009984
<i>Snap25</i>	F: 5'-AAA AAG CCT GGG GCA ATA AT-3' R: 5'-GCG ATT CTG GGT GTC AAT CT-3'	224	64	M22012
<i>Pgr</i>	F: 5'-GGT GGA GGT CGT ACA AGC AT-3' R: 5'-CTC ATG GGT CAC CTG GAG TT-3'	158	62	NM008829
<i>Star</i>	F: 5'-GCA GCA GGC AAC CTG GTG-3' R: 5'-TGA TTG TCT TCG GCA GCC-3'	249	60	NM011485
<i>Cyp11a1</i>	F: 5'-GGG AGA CAT GGC CAA GAT GG-3' R: 5'-CAG CCA AAG CCC AAG TAC CG-3'	279	60	BC068264
<i>Hsd3b1</i>	F: 5'-GGT GCA GGA GAA AGA ACT GC-3' R: 5'-TGA CAT CAA TGA CAG CAG CA-3'	197	60	NM001304800
<i>Scarb1</i>	F: 5'-CAG GCT GTG GGA ACT CTA GC-3' R: 5'-GAA AAA GCG CCA GAT ACA GC-3'	248	60	NM_016741
<i>Has2</i>	F: 5'-GAG CAC CAA GGT TCT GCT TC-3' R: 5'-CTC TCC ATA CGG CGA GAG TC-3'	154	62	NM008216
<i>Tnfaip6</i>	F: 5'-TTC CAT GTC TGT GCT GCT GGA TGG-3' R: 5'-AGC CTG GAT CAT GTT CAA GGT CAA A-3'	330	64	NM009398.2
<i>Ptx3</i>	F: 5'-GTG GGT GGA AAG GAG AAC AA-3' R: 5'-GGC CAA TCT GTA GGA GTC CA-3'	190	64	NM008987.3

Table 2. Western Blotting (WB), 免疫組織化学染色 (Immunohistochemistry; IHC), 免疫沈降法 (Immunoprecipitation; IP)に用いた抗体情報

Antibody	Cat No.	Company	Dilution used		
			WB	IHC	IP
SREBP-1 (Full-length)	E11-8425B	Eno Gene	1 : 1000		
SREBP-1 (Full-length/N-terminal)	SAB2102992	Sigma-Aldrich	1 : 1000	1 : 100	
SREBP-2 (Full-length/N-terminal)	10007663	Cayman Chemical	1 : 1000	1 : 100	
SCAP	GTX109474	Gene Tex	1 : 3000		1 : 50
INSIG-1	NB110- 55244SS	Novus Biologicals	1 : 1000		
β -ACTIN	#4967	Cell Signaling Technology	1 : 10000		
Anti-rabbit IgG HRP- linked antibody	#7074	Cell Signaling Technology	1 : 3000		

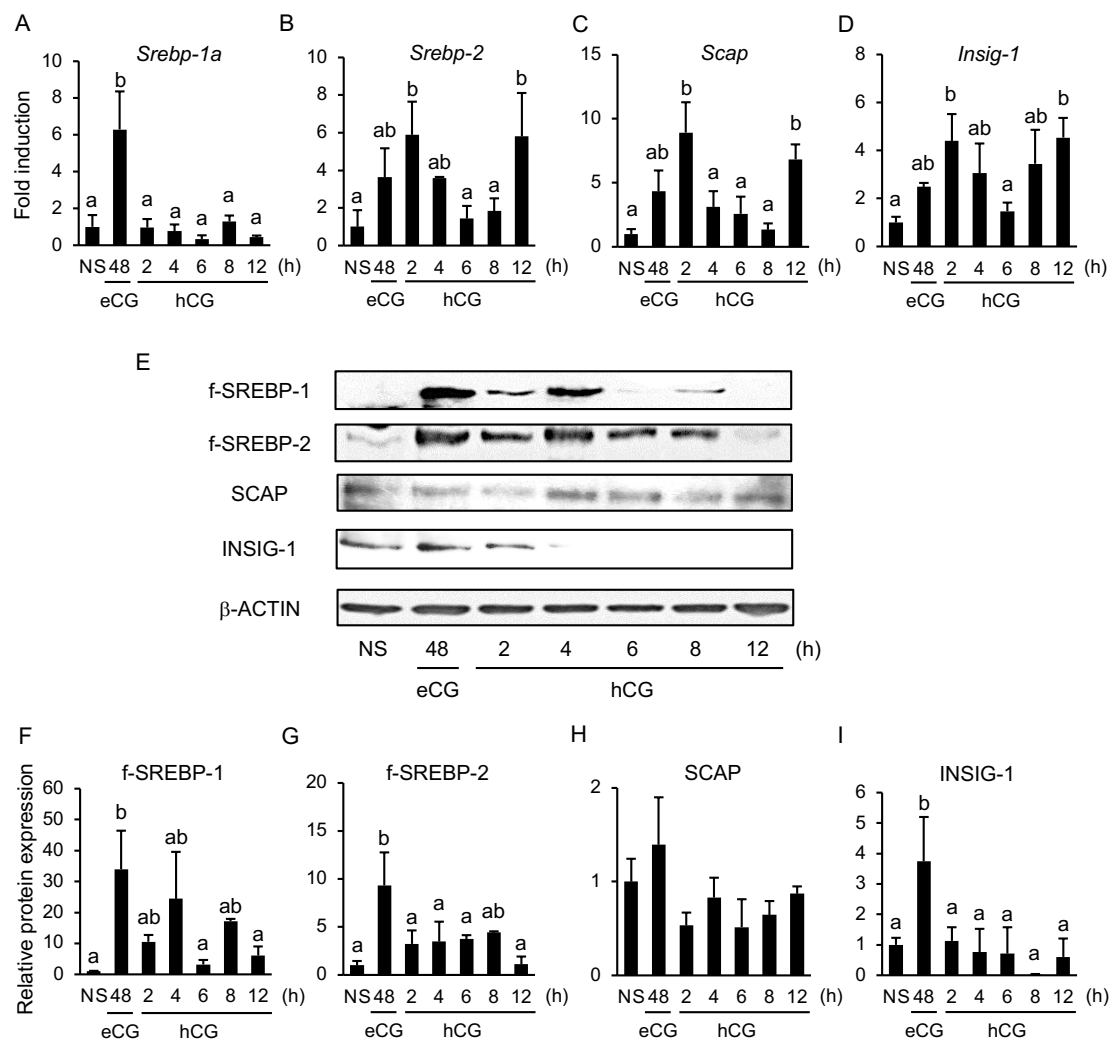


Figure 1. 卵胞発育および排卵を誘導した顆粒膜細胞におけるSREBP, SCAP, およびINSIG-1の経時的発現変化

マウス (Non-stimulated; NS)にeCGを投与し, 48時間後 (eCG 48h)にhCGを投与した後, 卵巣から顆粒膜細胞を経時的に回収した (hCG 2, 4, 6, 8, 12h)。

A-D; 顆粒膜細胞における*Srebp-1a* (A), *Srebp-2* (B), *Scap* (C), *Insig-1* (D) mRNA発現

E-I; 顆粒膜細胞におけるf-SREBP-1 (E, F), f-SREBP-2 (E, G), SCAP (E, H), INSIG-1 (E, I)のタンパク質発現を示すバンド画像と定量化されたバンドの濃淡を数値化した時のグラフ

遺伝子発現およびタンパク質発現を示すデータは, NSの平均値を1.0とした時の相対値として表記した。

a, b: 異符号間に有意差あり(p<0.05)

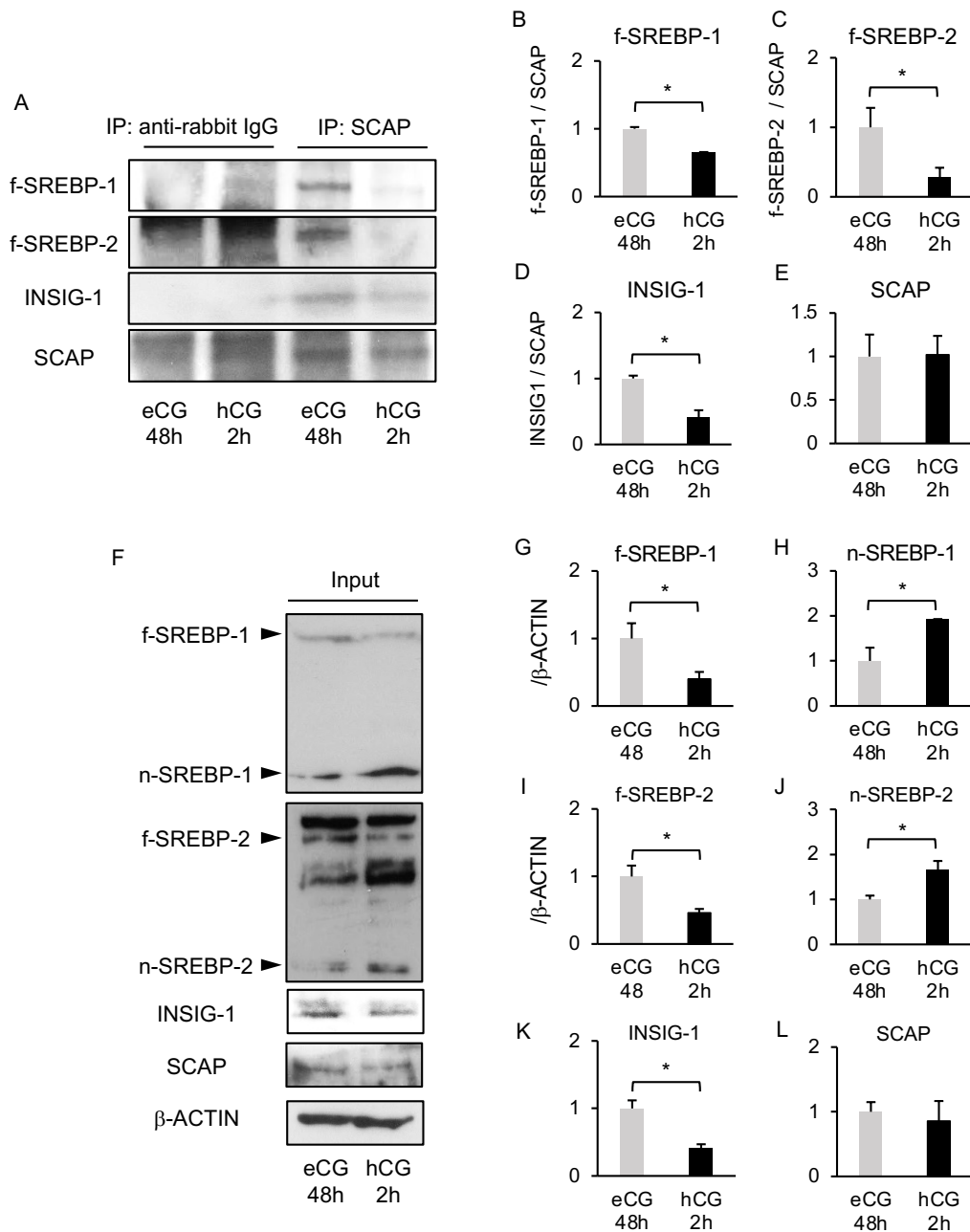


Figure 2. hCG投与が顆粒膜細胞におけるf-SREBP-1, f-SREBP-2, SCAP, およびINSIG-1の発現に及ぼす影響

マウスにeCG投与後 (eCG 48h)にhCGを投与し, 2時間後 (hCG 2h)の顆粒膜細胞を回収。

A-E; 抗SCAP抗体あるいは抗 Normal Rabbit IgG抗体を用いて免疫沈降後, WBによりf-SREBP-1 (A, B), f-SREBP-2 (A, C), INSIG-1 (A, D), SCAP (A, E)を検出し, バンド像をGel-pro analyzerにより数値化した。

F-L; 精製前のサンプルを用いたWBにより, f/n-SREBP-1 (G, H), f/n-SREBP-2 (I, J), INSIG-1 (K), SCAP (L)を検出した後, バンド像をGel-pro analyzerにより数値化した。

タンパク質発現を示すデータは, NSの平均値を1.0とした時の相対値として表記した。

*: 処理区間に有意差あり (p<0.05)

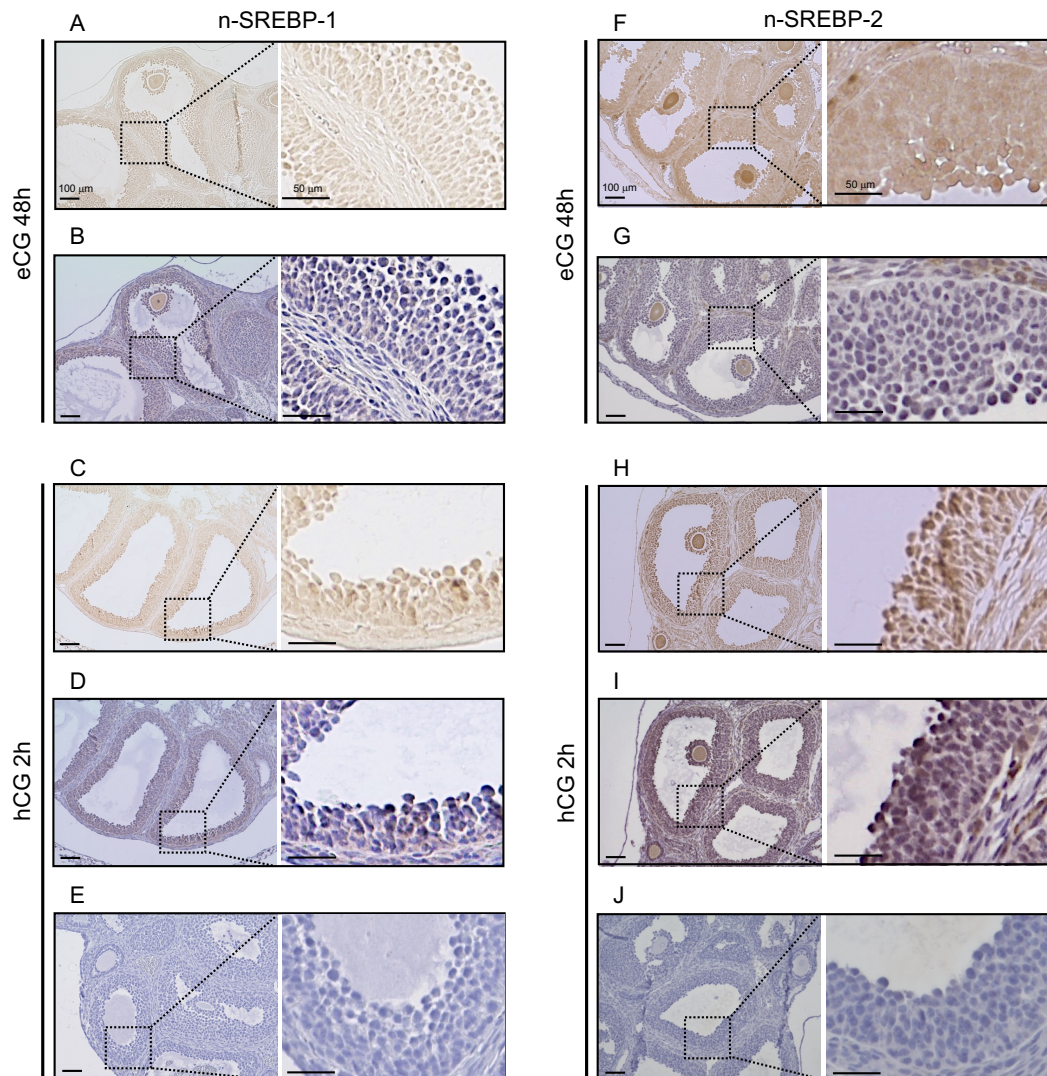


Figure 3. hCG投与が顆粒膜細胞におけるn-SREBP-1およびn-SREBP-2の局在に及ぼす影響

マウスにeCGを投与し、48時間後(eCG 48h)にhCGを投与し、2時間後(hCG 2h)の卵巣を免疫組織化学染色によりn-SREBP-1とn-SREBP-2の局在を解析

A, C; eCG 48h (A) あるいはhCG 2h (C)の卵巣における n-SREBP-1の染色像

B, D; eCG 48h (B) あるいはhCG 2h (D)の卵巣における n-SREBP-1の染色 + ヘマトキシリン染色像

F, H; eCG 48h (F) あるいはhCG 2h (H)の卵巣における n-SREBP-2の染色像

G, I; eCG 48h (G) あるいはhCG 2h (I)の卵巣における n-SREBP-2の染色 + ヘマトキシリン染色像

E, J; hCG 2hの卵巣におけるヘマトキシリン染色像

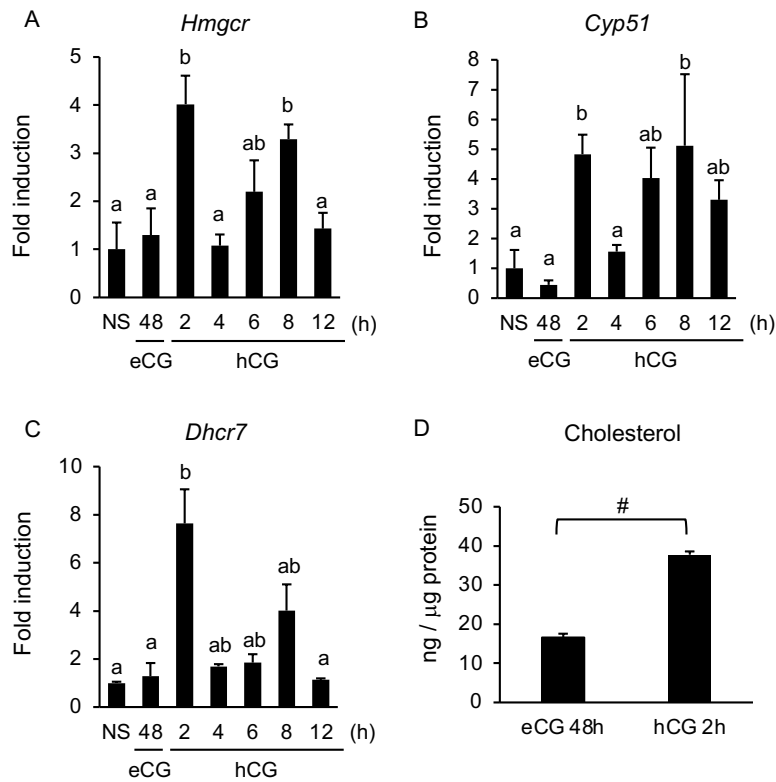


Figure 4. hCG投与が顆粒膜細胞におけるCholesterol生合成酵素およびCholesterol量に及ぼす影響

マウスにeCG投与前 (Non-stimulated; NS)およびeCGを投与し、48時間後 (eCG 48h)にhCGを投与した後、卵巣から顆粒膜細胞を経時的に回収した (hCG 2, 4, 6, 8, 12h)。

A-C; 顆粒膜細胞における*Hmgcr* (A), *Cyp51* (B), *Dhcr7* (C) mRNAの経時的発現

D; eCG 48hおよびhCG 2h後の顆粒膜細胞におけるCholesterol量 (D)

遺伝子発現を示すデータは、NSの平均値を1.0とした時の相対値として表記した。

a, b: 異符号間に有意差あり (p<0.05)

#: 処理区間に有意差あり (p<0.05)

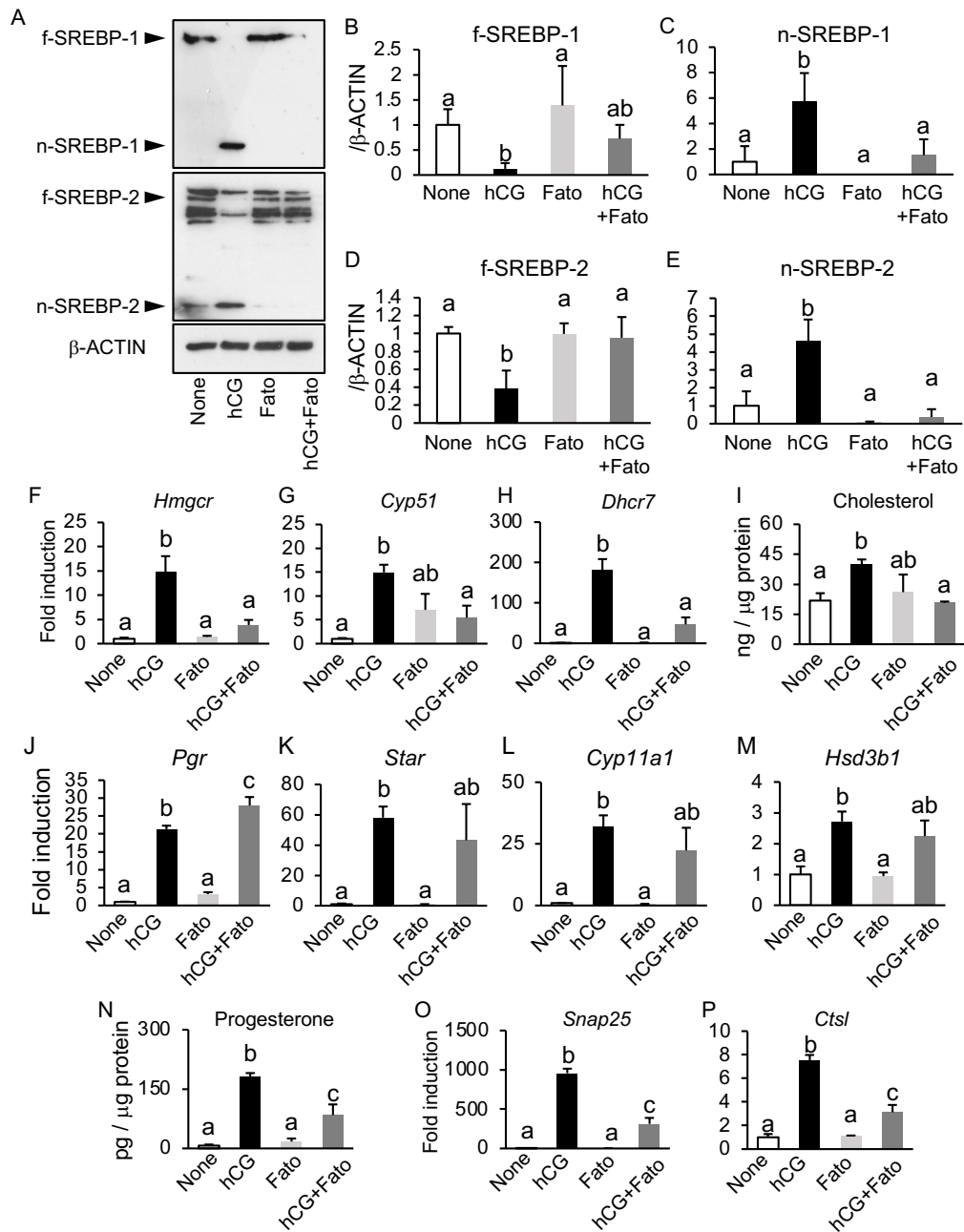


Figure 5. Fatostatin投与がCholesterol生合成およびProgesterone産生に及ぼす影響

マウスにeCGを投与し42時間後にFatostatin (30 mg/kg)を投与し、6時間後に hCGを投与した後、卵巣あるいは顆粒膜細胞を回収した (A-I; hCG 2h) (J-M; hCG 4h) (N-P; hCG 12h)。

A-E; 顆粒膜細胞におけるf-SREBP-1 (A, B)とn-SREBP-1 (A, C)あるいはf-SREBP-2 (A, D)とn-SREBP-2 (A, E)の検出と定量化

F-I; 顆粒膜細胞における*Hmgcr* (F), *Cyp51* (G), *Dhcr7* (H) mRNA発現とCholesterol量 (I),

J-M; 顆粒膜細胞における*Pgr* (J), *Star* (K), *Cyp11a1* (L), *Hsd3b1* (M) mRNA発現

N-P; 卵巣のProgesterone量 (N)と顆粒膜細胞における*Snap 25* (O)と*Ctsl* (P) mRNA発現

遺伝子発現およびタンパク質発現を示すデータは、Noneの平均値を1.0とした時の相対値として表記した。

a, b, c: 異符号間に有意差あり (p<0.05)

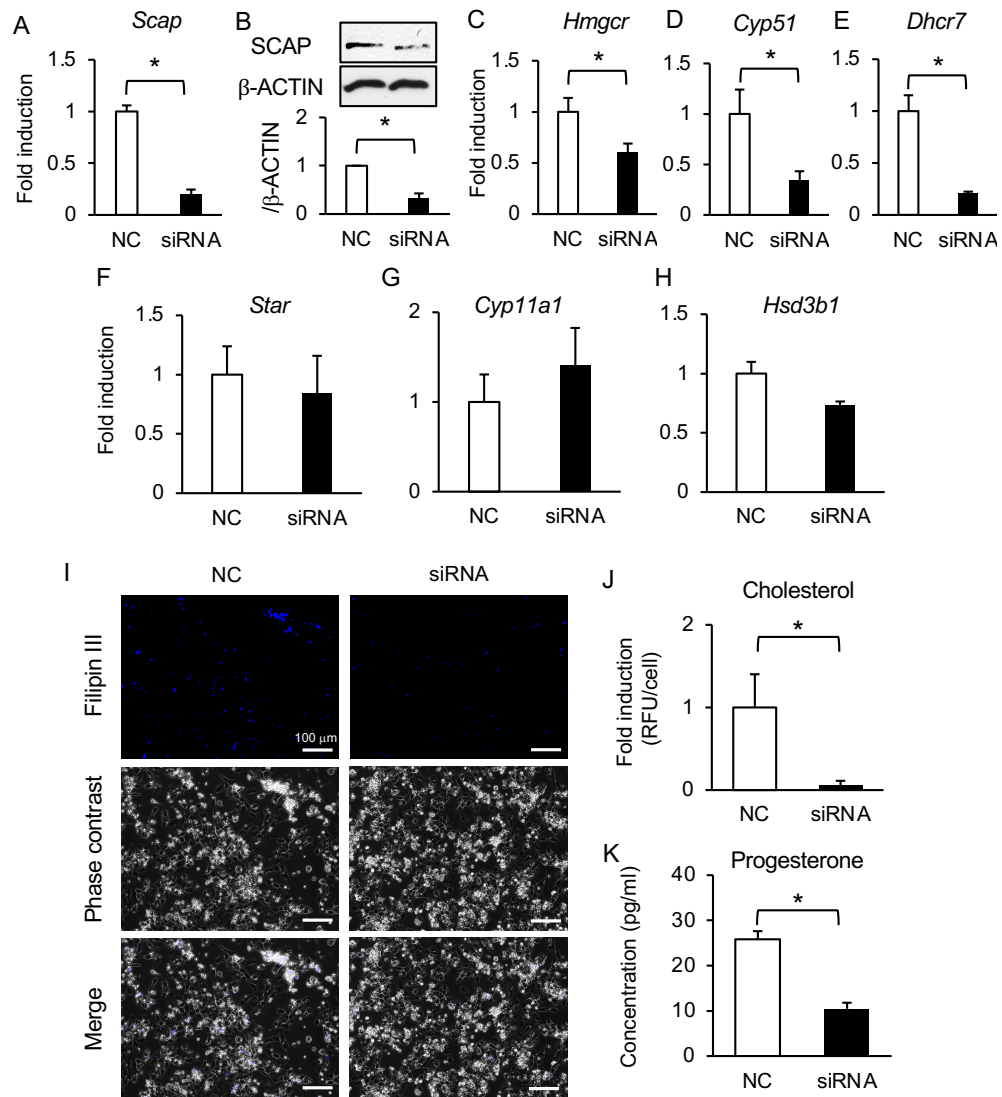


Figure 6. *Scap* siRNAがCholesterol生合成およびProgesterone産生に及ぼす影響

マウスにeCGを投与し、48時間後に顆粒膜細胞を回収した後、Scramble (Negative Control; NC) あるいは*Scap* siRNA (siRNA)をトランスフェクションした。その後、AREGを添加し、4時間

(A, B), 12時間 (C-J)あるいは16時間 (K)培養した。
A, B; AREG添加4時間後の顆粒膜細胞における*Scap* mRNA (A)あるいはSCAPタンパク質 (B)の発現

C-E; AREG添加12時間後の顆粒膜細胞における*Hmgcr* (C), *Cyp51* (D), *Dhcr7* (E) mRNA発現

F-H; AREG添加12時間後の顆粒膜細胞における*Star* (F), *Cyp11a1* (G), *Hsd3b1* (H) mRNA発現

I, J; AREG添加12時間後の顆粒膜細胞におけるFilipin III染色像 (I)とその蛍光強度を数値化した (J)

K; AREG添加16時間後の培地中Progesterone濃度 (K)

遺伝子発現, タンパク質発現およびCholesterol量を示すデータは, NCの平均値を1.0とした時の相対値として表記した。

*: 異符号間に有意差あり (p<0.05)

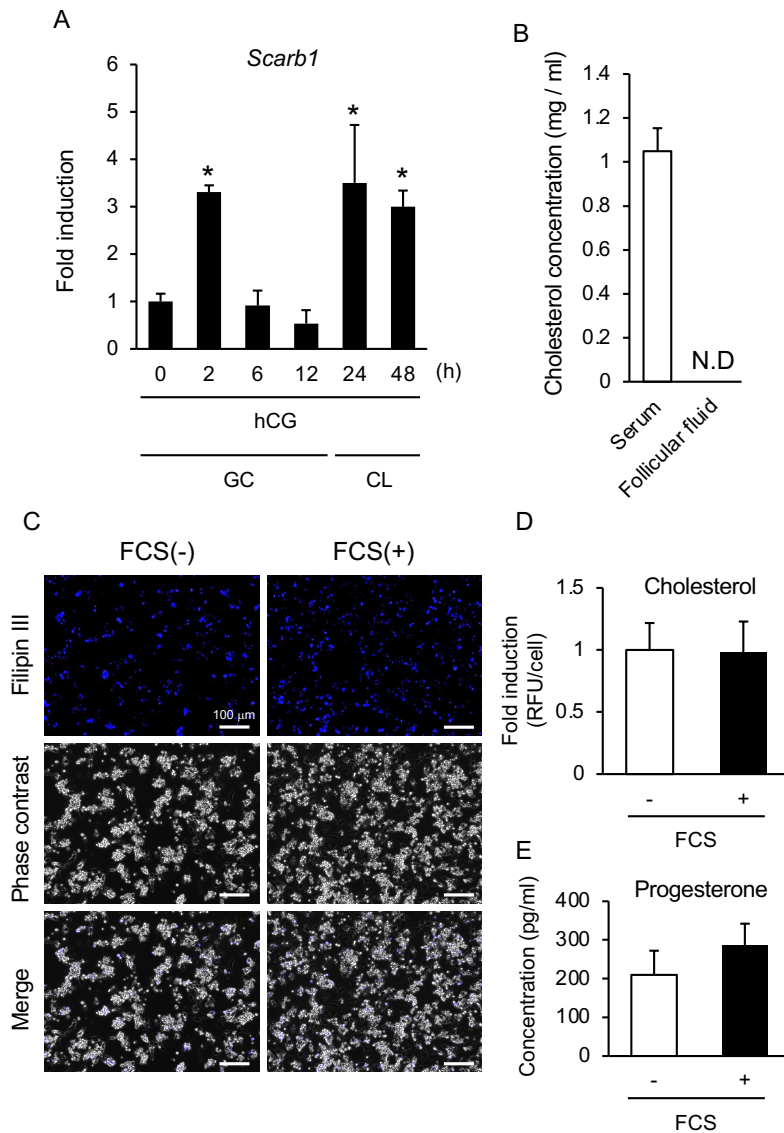


Figure 7. Cholesterolの外部導入がProgesterone産生に及ぼす影響

マウスにeCGを投与し、48時間後にhCGを投与した後、顆粒膜細胞 (Granulosa cells; GC) (hCG 0, 2, 6, 12h)あるいは黄体細胞 (Corpus Lutea; CL) (hCG 24, 48h)を回収した (A)。また、血清および卵胞液はhCG投与2時間後の雌マウスから回収した (B)。eCG投与48時間後のマウスから回収した顆粒膜細胞をFCSを添加していない(FCS (-)), あるいは添加 (FCS (+)) を添加したAREG培地で12時間培養 (C, D)あるいは16時間 (E)培養した。

A; 顆粒膜細胞 (GC)あるいは黄体細胞 (CL)におけるScarb1 mRNAの経時的な発現

B; hCG投与2時間後の血清中 (Serum)あるいは卵胞液中 (Follicular fluid)のCholesterol濃度

C, D; AREG添加12時間後の顆粒膜細胞におけるFilipin III染色像 (C)と数値化した蛍光強度 (D)

E; AREG添加16時間後の培地中Progesterone濃度

遺伝子発現を示すデータは、hCG 0hの平均値を1.0とした時の相対値として表記した。

Filipin IIIの蛍光強度を示す値は、FCS (-)の平均値を1.0とした時の相対値として表記した。

N.D.; Not detected

*: hCG 0hに対して有意差あり ($p < 0.05$)

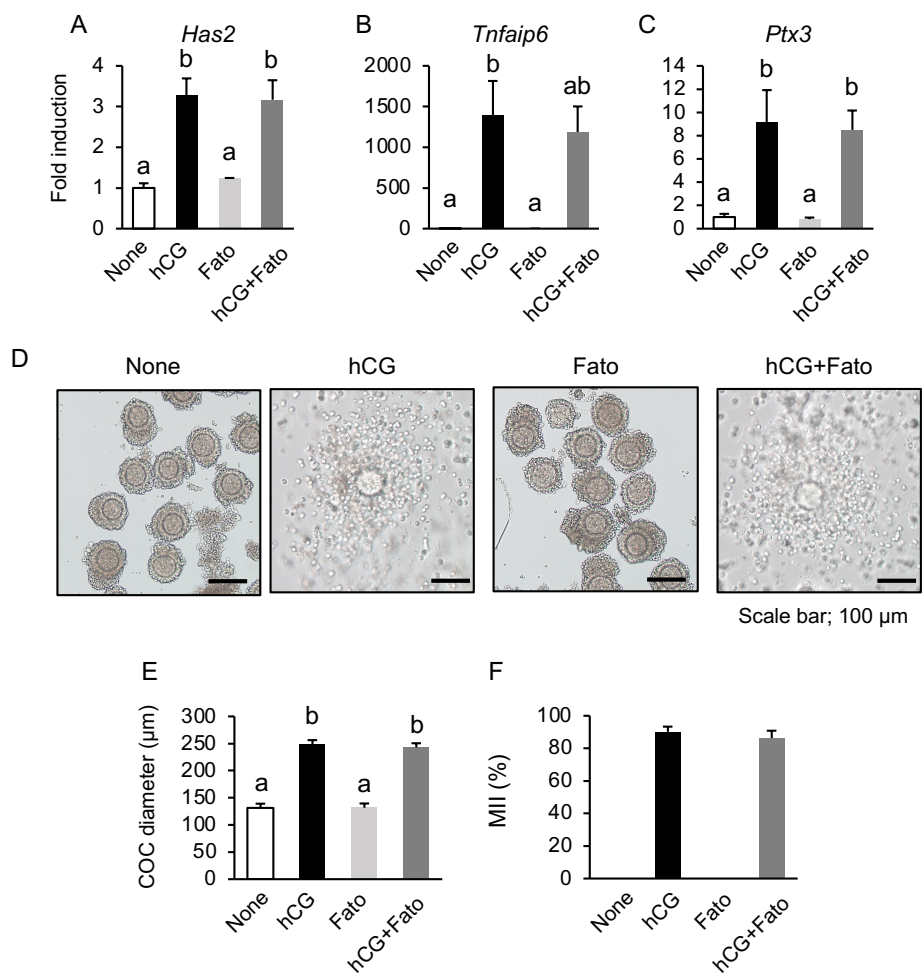


Figure 8. Fatostatin投与が卵丘細胞の膨潤および減数分裂再開に与える影響

マウスにeCGを投与した42時間後にFatostatin (30 mg/kg)を投与し、6時間後に hCGを投与した。hCG 投与 4時間 (A-C)あるいは12 時間後(D-F)のマウス卵巣からCumulus-Oocyte Complex (COC)を回収した。

A-C; COCにおける*Has2* (A), *Tnfaip6* (B), *Ptx3* (C) mRNA発現

D, E; 膨潤したCOCの画像 (D)とCOC直径 (E)

F; 裸化した卵子をDAPI染色後、核相を観察しMII率を測定

a, b: 異符号間に有意差あり ($p < 0.05$)

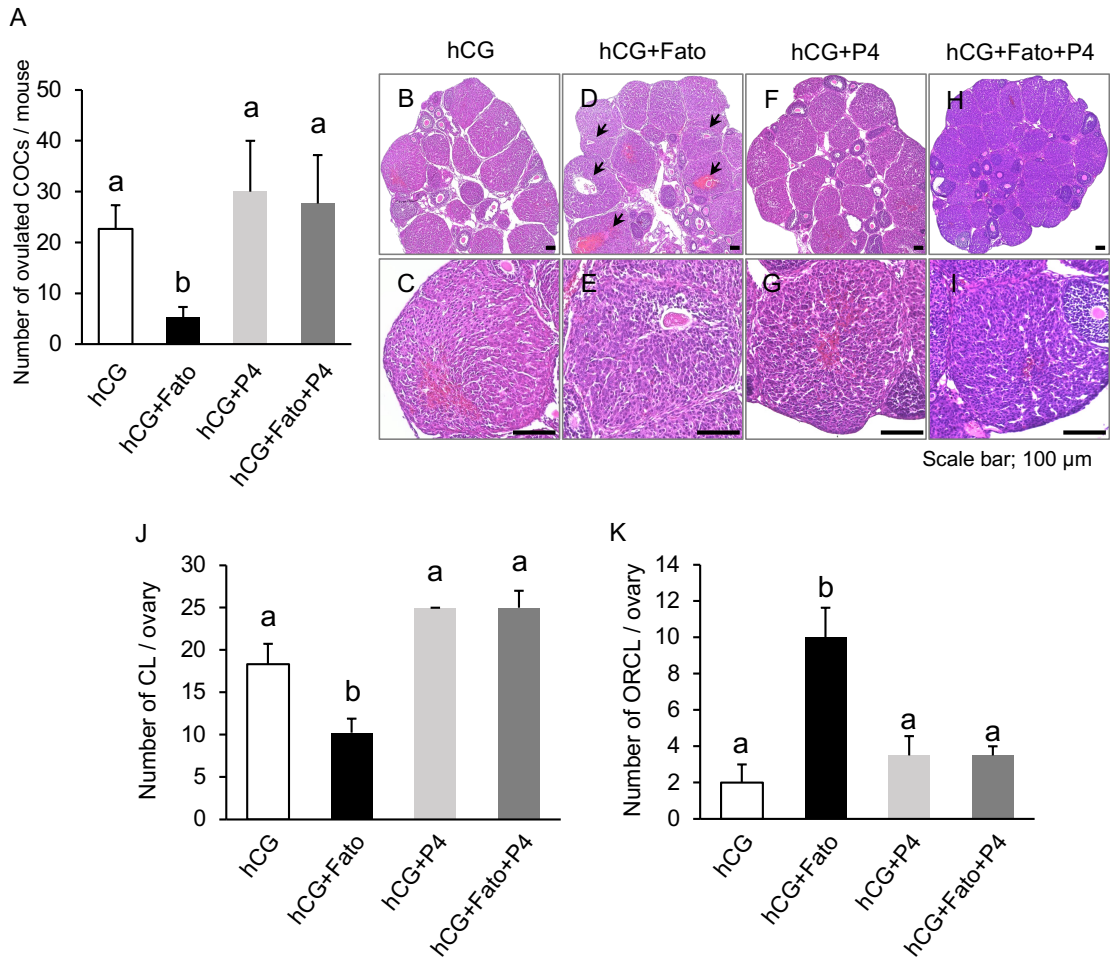


Figure 9. Fatostatin投与が排卵および黄体化に及ぼす影響

マウスにeCGを投与し42時間後にFatostatin (30 mg/kg)を投与し、6時間後に hCG を投与した。hCG 投与 16時間後の卵管 (A)あるいは48 時間後の卵巢(B-K)を回収した。

A; 卵管に排卵された卵子の数

B-K; hCG投与48時間後の卵巢におけるHE染色画像 (B-I), 黄体数 (J)および黄体内に卵子が残存した異常な黄体数 (Oocyte-residual CL; ORCL) (K)

黒矢印; ORCL

a, b: 異符号間に有意差あり ($p < 0.05$)

第三章

LH が誘導する顆粒膜細胞の AMPK の不活性化は、INSIG-1 の消失と SREBP の賦活化を誘導する

序論

第二章から、卵胞発育刺激後のマウスの顆粒膜細胞では SREBP-1, SREBP-2, SCAP, および INSIG-1 が発現し、SREBP-SCAP-INSIG-1 が複合体を形成するため Cholesterol は生合成されないが、その後の排卵刺激により顆粒膜細胞では、INSIG-1 の急速な消失により SREBP が核移行し、Cholesterol 生合成のスイッチが ON となり、これを基質に産生される Progesterone により排卵が誘導されることを明らかにした。本研究結果は、*Pgr* KO マウスに認められる「成熟卵子の排卵不全」と同様の表現系であることから、Progesterone-PGR 経路の上方制御に必須である「排卵刺激後の顆粒膜細胞における INSIG-1 の消失」は、排卵に極めて重要であるが、この詳細な消失メカニズムを明らかとなっていない。

近年まで Cholesterol 同化組織である肝臓において、INSIG-1 の消失メカニズムは不明であった。2019 年に Han らは、肝臓において「細胞内の代謝を司るマスタースイッチ」にあたる AMP-activated Protein Kinase (AMPK) が以下の順序で INSIG-1 のタンパク質を分解することを初めて報告した (Han et al., 2019)。

- ① 細胞外部の Glucose 濃度が低下し、細胞内の ATP が低下し ADP と AMP が増加すると、AMPK の Thr172 残基がリン酸化され活性化状態となり、Glucose Transporter (GLUT) や代謝酵素の発現を亢進させる。
- ② 細胞外 Glucose の増加に伴い、分泌される Insulin および EGF は、肝細胞や筋細胞の細胞膜上の Insulin 受容体 (IR)/EGF 受容体 (EGFR) に結合し、細胞質に存在する Glucose transporter 4 (GLUT4) を細胞膜へ細胞内輸送する結果、細胞内に取り込まれた Glucose が解糖系、TCA サイクル、電子伝達系を介して大量に ATP を産生させる。
- ③ この細胞内の ATP 量の増大は、AMPK の不活性化を誘導し、不活性型 AMPK が INSIG-1 のユビキチン化を誘導し急速に分解する。

第二章において、hCG 刺激後の顆粒膜細胞では INSIG-1 が mRNA レベルでは恒常的であるにも関わらず、タンパク質レベルでは急激に発現量が低下していた。このことから、排卵刺激後の顆粒膜細胞においても肝臓に認められる INSIG-1 タンパク質の翻訳後修飾による分解によるものである可能性が高い。しかし、卵巣では、顆粒膜細胞や卵丘細胞、卵子における GLUT4 の発現・局在や AMPK の存在については報告があるものの (Tosca et al., 2005; Tosca et al., 2006; Tosca et al., 2007; Downs et al., 2010; Tian et al., 2017; Xu et al., 2019), 排卵刺激後の顆粒膜細胞において GLUT4 の細胞膜への移行が生じ、Glucose の取り込み促進に伴

う AMPK の不活性化が生じるのか、また上記現象が、INSIG-1 消失と SREBP の活性化、それにより生じる排卵現象に関与するかについては、明らかにされていない。

そこで第三章では、排卵刺激後の顆粒膜細胞において発現する EGF-like factor により不活性化されると考えられる AMPK が卵子成熟および排卵に及ぼす影響を調べる目的で、以下の *in vivo* 解析および *in vitro* 解析を実施した。まず、排卵 (hCG) 刺激後の顆粒膜細胞において発現する EGF-like factors により活性化する EGFR シグナルの亢進に伴い GLUT4 が細胞膜へ移行するか、また、これに伴い Glucose 利用による ATP 合成が AMPK の不活性化を誘導するかを調べた。次に、hCG 刺激と共に AMPK 活性化剤 (AICAR) を投与し、顆粒膜細胞における SREBP, SCAP, INSIG-1 の発現, SREBP の核内移行, Cholesterol 生合成酵素の発現と Cholesterol 生合成量, Progesterone 産生量に与える影響を調べた。最後に hCG と AICAR を投与したマウスにおける排卵および卵子成熟に及ぼす影響を調べ、AMPK が INSIG-1 消失と SREBP の賦活化に及ぼす影響を調べた。

材料および方法

試薬の調整 (PBS, PBS-T, 生理食塩水, eCG, hCG, 単離培地, 最終培地, ヒアルロニダーゼ), マウスの維持, 顆粒膜細胞と COC の回収, Total RNA 抽出, Quantitative RT-PCR, タンパク質濃度測定, 卵巣切片の作製, HE 染色, 免疫組織化学染色, 細胞内 Cholesterol の抽出と測定, ステロイドホルモンの抽出と Progesterone 濃度の測定, 排卵数, 黄体数および統計処理は, 第二章と同様に行なった。

試薬の調製

・ AG1478 (EGFR チロシンキナーゼ阻害剤)

AG1478 (Cayman CHEMICAL)は, DMSO により 0.33 mg/100 μ l に溶解した。使用直前に, 総投与量に対する DMSO 濃度が 10% (v/v)以下になるように生理食塩水で希釈した。AG1478 は, Xi ら (Xi et al., 2020)の報告に基づいて, 3 週齢の未成熟な雌マウスに eCG 5IU を投与し 44 時間後に 1 kg あたり 10 mg の濃度で投与した。

・ AICAR (AMPK 活性化剤)

AICAR (abcam plc, Cambridge, UK)は, 生理食塩水により 2.5 mg/100 μ l に溶解した後, 先行研究に基づいて (Lanner et al., 2013; Hunter et al., 2018; Townsend et al., 2021), 3 週齢の未成熟雌マウスに eCG 5 IU を投与し 48 時間後に hCG と同時に 1 kg あたり 250 mg の濃度で投与した。

・ LY294002 (PI3K 不活性化剤)

LY294002 (Chemscene Inc., NJ, USA)は, DMSO により 10 mM に溶解し, 最終培地で 10 μ M に希釈し使用した。

・ U0126 (ERK1/2 活性化阻害剤)

U0126 (Cell Signaling Technology)は, DMSO により 10 mM に溶解し, 最終培地で 10 μ M に希釈し使用した。

・ EGF

EGF (Sigma Aldrich)は, DMEM により 100 μ g/ml に溶解し, 最終培地で 100 ng/ml に希釈し使用した。

・ 培養プレートコーティング用培地

顆粒膜細胞の接着を促進する目的で, 培養前日に DMEM に 10% (v/v) FCS と 1% (v/v) 抗生物質を添加し, 培養用プレート (As one)をコーティングした。培養直前にコーティング培地を除去し, 最終培地, グルコース含有培地あるいはグルコース除外培地に交換した。

・ グルコース含有培地およびグルコース除外培地

グルコースの有無が顆粒膜細胞にどのような影響を及ぼすかを明らかにする目的で, グルコース含有培地, およびグルコース除外培地を下記のように作成した。グルコース含有

培地およびグルコース除外培地は, DMEM Low Glucose と DMEM No Glucose (Fujifilm Wako) に 0.5% (v/v) 抗生物質を添加して作成し, 37°C, 5% CO₂ インキュベーターで均衡化した。

- TBS (Tris buffered saline)

超純水に 5 mM Tris, 13.8 mM NaCl, 0.27 mM KCL を溶解した後, pH メータにより pH を測定しながら塩酸を加え pH 7.6 に調整し, メスフラスコ内で超純水を加えてメスアップし TBS を作成した。

- TBS-Tween (TBS-T)

TBS 500 ml に Tween 20 を 1 ml 添加し, TBS-T を作製した。

Western blotting

各処理区のサンプル溶解液は, WCEB によりタンパク質量が 10 µl あたり 20 µg に希釈した後, 試料緩衝液 (SDS-PAGE 用, 2 倍濃縮, 2-ME 含有, Nacalai Tesque) により 2 倍希釈した。その後, 第二章と同様の方法で SDS-PAGE を行い, 展開ゲルを PVDF membrane に転写した。

- PVDF membrane のブロッキング

転写した PVDF membrane は PBS (-) で共洗い後, 10 分間洗浄した。洗浄後, PVDF membrane を 5 ml TBS に 0.15 g BSA (Nacalai tesque) を溶解した 3% (w/v) BSA/TBS で 2 時間ブロッキングした。

- 一次抗体反応

TBS-T 1 ml に 0.03 g BSA を溶解し 3% BSA/TBS-T を作製した。この溶液を用いて, PVDF membrane を 1:10000 で希釈した抗 β-ACTIN 抗体, 1:1000 で希釈した抗 GLUT4 抗体, 抗 AMPK 抗体 (Cell signaling technology), 抗 Phospho-AMPK Thr172 (Cell signaling technology), 抗 Phospho-EGFR (Tyr1056) 抗体 (Cell Signaling Technology), 抗 EGFR 抗体 (Santa Cruz Technology, Inc., TX, USA), 抗 Phospho-p44/42MAPK (T202/Y204) 抗体 (Cell Signaling Technology), 抗 f/n-SREBP-1 抗体, 抗 f/n-SREBP-2 抗体あるいは抗 INSIG-1 抗体に浸して 4 °C で一晩反応させた。

- 洗浄

非特異的に結合した抗体を除去する目的で, 一次抗体と反応させた PVDF membrane を PBS-T で 2 時間以上洗浄した。

- 二次抗体反応

3% (w/v) BSA/TBS-T を用いて 1:3000 で希釈した Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody あるいは 1:5000 で希釈した Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology) を PVDF membrane に浸して常温で 1 時間反応させた。

- 洗浄

非特異的に結合した二次抗体を除去する目的で, 二次抗体と反応させた PVDF membrane を PBS-T で 1 時間振盪した。

・検出

HRP 活性の検出には、第二章と同様の方法により ECL Plus Western Blotting Detection Reagents を用いて行った。まず予め 4°C で保存されていた ECL 試薬 A と試薬 B をそれぞれ 37°C で 30 分保温した後、1:1 で混合した。混合した ECL 試薬を洗浄した PVDF membrane のおもて面に 5 分間反応させた後、PVDF membrane に付着した ECL 試薬を除去し、サララップに巻いた。PVDF membrane の表面を上にしてフィルムカセットに貼り付け、PVDF membrane と X-Ray Film を重ねて感光させた。感光後、X-Ray Film を現像液 (ハイレンドール) に 1 分間、停止液 (3% 酢酸) に 5 分間、定着液 (ハイレンフィクス) に 3 分間浸漬し、水で約 20 分間洗浄した後、乾燥させた。

・定量

検出された標的タンパク質および β -ACTIN バンド画像をスキャナーで取り込み、Gel Pro Analyzer により定量化した。標的タンパク質のバンド画像の濃淡から得られる値を β -ACTIN あるいは AMPK のバンド画像から得られる値で割り、グラフ化した。

顆粒膜細胞の体外培養

eCG 投与 48 時間後のマウスから卵巣を回収し、単離用培地中で 25 ゲージの針で顆粒膜細胞および COC を弾き出した後、単離用培地を全てエッペンドルフチューブに回収し、4,500 rpm で 5 分間遠心した。遠心後、培地を除去し、培養用培地を 100 μ l 加え、静かに混和した後、サンプルとトリパンブルーを 1:1 で混合し、血球計算盤を用いて、生存細胞数をカウントした。コーティング用培地でコーティングした 96 ウェル培養プレートに 1×10^4 個、48 ウェル培養プレートに 2×10^5 個あるいは 12 ウェル培養プレートに 1×10^6 個の細胞数に調整した顆粒膜細胞を播種し、前培養を行った。2 時間後、最終培地で 3 回以上洗浄し、EGF, LY294002, U0126 を添加し培養した。培養後、顆粒膜細胞を免疫蛍光染色、qRT-PCR, Western blotting に供試した。

顆粒膜細胞内 ATP 量の測定

顆粒膜細胞中の ATP 濃度は、『細胞の』ATP 測定キット™ (TOYO INK Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて測定した。まずマウス卵巣から顆粒膜細胞を回収後、50 μ l の WCEB でホモジナイズした後、タンパク質濃度を測定した。その後、サンプルを WCEB で 10 倍希釈し、『細胞の』ATP 測定キット™ (TOYO INK Co., Ltd.) を用いて以下の手順で ATP 濃度を測定した。

1. 96 ウェル黒色プレートに、Blank, Standard あるいはサンプルを 100 μ l 添加した。
2. 全てのウェルに ATP 測定キット内の蛍光試薬を 100 μ l ずつ添加した。
3. VARIOSKAN FLASH (Thermo electron corporation) 内で遮光しながら 30 分間振盪した。
4. 振盪後、Blank を対照として、蛍光強度を測定した。
5. Standard を用いて標準曲線を作製し、細胞内 ATP 濃度を測定した。

6. 細胞内 ATP 濃度をタンパク質濃度で除し、顆粒膜細胞中の ATP 濃度を算出した。

顆粒膜細胞内 Glucose 量の測定

顆粒膜細胞中の Glucose 量は、Glucose Assay Kit-WST を用いて測定した。まずマウス卵巣から顆粒膜細胞を回収後、50 μ l の WCEB でホモジナイズした後、タンパク質濃度を測定した。その後、細胞溶解液を WCEB で 10 倍希釈しサンプルとした。96 ウェルクリアプレートに、Blank, Standard あるいはサンプルを 50 μ l 添加した後、各ウェルに Working solution 50 μ l ずつ添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、VARIOSKAN FLASH (Thermo electron corporation) を用いて 405 nm 波長で吸光度を測定した。Standard から標準曲線を作製し、細胞内の Glucose 濃度を算出した。さらに細胞内 Glucose 濃度をタンパク質濃度で割り、この値を顆粒膜細胞中の Glucose 量とした。

免疫蛍光染色

卵巣切片が接着したスライドガラスはキシレン中で脱パラフィン後、100%, 90%, 80% Ethanol で親水処理を行った。その後、PBS (-) で洗浄した後、抗原を賦活化するために、卵巣切片を 98°C の 10 mM クエン酸バッファー (pH 6.0) に 30 分間浸した後、ゆっくり冷却した。卵巣切片を PBS (-) で洗浄し、3% (w/v) BSA/PBS (-) で 2 時間、室温でブロッキングした後、3% BSA/PBS (-) を用いて抗 GLUT4 抗体を 1:200 および抗 N-Cadherin (NCAD) 抗体 (Cell Signaling Technology) を 1:1000 に希釈し、4°C で一晩、一次抗体反応を行った。また非特異的な呈色を避けるため、ネガティブコントロールとして 3% BSA/PBS (-) のみを滴下した。一次抗体反応後、PBS (-) で洗浄し、3% BSA/PBS (-) で 1:100 に希釈された二次抗体 (Anti-Rabbit IgG (whole molecule) F(ab')₂ Fragment-Cy3 antibody (Sigma Aldrich) および Anti-Mouse IgG (Whole molecule), F(ab')₂ fragment-FITC antibody (Sigma Aldrich)) を滴下し、遮光しながら室温で 2 時間反応させた。反応後、二次抗体を除き PBS (-) で洗浄した後、VECTORSHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Inc.) で細胞核を染色し、カバーガラスを乗せ蛍光顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i, OLYMPUS) で観察・撮影した (Cy3 波長; 559 nm, FITC 波長; 473 nm, DAPI 波長; 405 nm)。

培養後の顆粒膜細胞における GLUT4, NCAD の発現局在を解析するため、ウェル内の培地を除去した後、4% PFA/PBS (-) を添加し 10 分間静置により顆粒膜細胞を固定した。PBS (-) で洗浄後、細胞膜透過処理する目的で、0.1% Triton-X/PBS (-) を添加し室温で 3 分間静置した。3 分後、すぐに PBS (-) で洗浄し、3% BSA/PBS (-) で 30 分間室温でブロッキングした。その後、3% BSA/PBS (-) で 1:200 に希釈した抗 GLUT4 抗体、1:1000 に希釈した抗 NCAD 抗体を滴下し、4°C で一晩、一次抗体反応を行なった。一次抗体反応後、PBS (-) で洗浄し、3% BSA/PBS (-) で 1:100 に希釈された二次抗体 (Anti-Rabbit IgG (whole molecule) F(ab')₂ Fragment-Cy3 antibody および Anti-Mouse IgG (Whole molecule), F(ab')₂ fragment-FITC antibody) を滴下し、遮光しながら室温で 2 時間反応させた。反応後、二次抗体を除き PBS (-) で洗浄

した後、VECTORSHIELD Mounting Medium with DAPI を滴下し、10 分間静置し細胞核を染色した。その後、VECTORSHIELD Mounting Medium with DAPI を除き、PBS (-)で十分に洗浄し、最後に PBS (-)を 200 μ l 添加し蛍光顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i, OLYMPUS)で観察・撮影した (Cy3 波長; 559 nm, FITC 波長; 473 nm, DAPI 波長; 405 nm)。

結果

実験1. 卵胞発育および排卵を誘導した顆粒膜細胞における EGF-like factors の発現 EGFR のリン酸化, GLUT4 発現, AMPK 活性および INSIG-1 の経時的変化

本実験では、まず、卵胞発育期および排卵期の顆粒膜細胞における EGF-like factors (*Areg*, *Ereg*) の mRNA 発現変化を調べるため、未成熟な雌マウス (Non-stimulated; NS) に卵胞発育を誘導する FSH と同作用を持つ eCG を投与し、48 時間後 (eCG 48h) に排卵を誘起する LH と同作用を示す hCG を投与した後、経時的に顆粒膜細胞を回収した (hCG 0.5, 1, 2h)。 *Areg* mRNA 発現は、eCG 48h と比較して hCG 投与 0.5 時間後に 150 倍以上増加し、 *Ereg* mRNA においても、有意な差は認められなかったものの、発現量が 3 倍程度増加した (Figure 1A, B)。 EGF-like factors の発現増加に伴い、hCG 投与 0.5 時間後に EGFR も強くリン酸化され、hCG 刺激 2 時間後までリン酸化 EGFR を示す濃いバンドが認められた (Figure 1C, D)。 加えて、顆粒膜細胞内の GLUT4 タンパク質発現を示すバンドも、NS と eCG 48h では全く認められず、hCG 投与 0.5 時間後および 1 時間後に顕著に濃いシグナルを検出した (Figure 1C, E)。 次に、卵胞発育期と排卵期の顆粒膜細胞における AMPK の経時的な活性変化を調べるため、AMPK の Thr172 部位がリン酸化された活性型 AMPK (pAMPK (Thr172)) および AMPK の総発現量を Western blotting により解析した。この結果、AMPK の総発現量は NS, eCG 48h, hCG 0.5, 1, および 2h の顆粒膜細胞において変化が認められなかった (Figure 1C)。 他方で、pAMPK (Thr172) を示すバンドは NS において認められ、eCG 投与 48 時間後の顆粒膜細胞においても NS と同程度に強いシグナルのバンドが検出された (Figure 1C)。 しかし、hCG 投与 0.5 時間後の顆粒膜細胞では eCG 48h と比べて pAMPK (Thr172) を示すバンドが薄くなり AMPK 活性が有意に低下し、hCG 投与 1 時間および 2 時間後においても有意に低い値が維持された (Figure 1C, F)。 このとき、INSIG-1 の発現を調べたところ、NS では INSIG-1 タンパク質発現を示すバンドが認められず、eCG 投与 48 時間後に NS と比較して強いシグナルのバンドが認められた (Figure 1C, G)。 一方、hCG 投与 0.5 時間後には eCG 48h と比べて INSIG-1 タンパク質発現が有意に低い値を示し、hCG 投与 2 時間後まで低い値が維持され、pAMPK (Thr172) の変化と同調的に INSIG-1 が減少した (Figure 1C, G)。

実験2. EGFR の下流シグナルが GLUT4 の細胞膜移行および AMPK 不活性化に及ぼす影響

実験 1 において、hCG 刺激直後の顆粒膜細胞では、EGF-like factors による EGFR のリン酸化と同時に AMPK 活性が低下したことから、EGF-like factors が EGFR のリン酸化を介して AMPK が不活性化されると仮説立て実証を試みた。そこで以降の実験では、EGF-like factors-EGFR が GLUT4 の発現亢進と細胞膜への移行を誘導し、AMPK 活性が低下される

か調べる目的で、未成熟な雌マウスに eCG を投与し、44 時間後に EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (AG1478) を投与した後、4 時間後に hCG を投与し卵巣あるいは顆粒膜細胞を回収した (hCG+AG1478)。まず、免疫組織蛍光染色により卵巣内顆粒膜細胞における GLUT4 タンパク質と細胞膜マーカーである N-Cadherin (NCAD) の細胞内局在を解析した結果、hCG を投与していない None 区および AG1478 区では GLUT4 を示す赤い蛍光シグナルがわずかに検出されたが、NCAD (緑色) との共局在は全く認められなかった (Figure 2A)。一方、hCG を投与し 0.5 時間後の顆粒膜細胞では、赤色の強いシグナルが観察され、NCAD の蛍光シグナルと重なることを認めた (Figure 2A)。しかし、AG1478 を投与したマウスに hCG を投与すると、顆粒膜細胞における GLUT4 の蛍光シグナルは、顕著に減弱し、NCAD との共局在も全く認められなかった (Figure 2A)。次に、Figure 2B において、細胞内 Glucose 量を測定した結果、None では、 $0.113 \pm 0.07 \mu\text{mol/protein}$ であったのに対して、hCG 投与区では、 $0.290 \pm 0.04 \mu\text{mol/protein}$ と 2 倍以上増加した。しかし、AG1478 を投与した AG1478 区および hCG+AG1478 区では、それぞれ $0.147 \pm 0.0002 \mu\text{mol/protein}$ 、 $0.160 \pm 0.002 \mu\text{mol/protein}$ と None と同じレベルまで低下した。また、hCG 投与区では、細胞内 Glucose 量の増加に伴い、細胞内 ATP 量が、None と比べて有意に高い値を示したが (None; $3.16 \pm 0.70 \text{ pmol/protein}$ vs hCG; $51.12 \pm 4.65 \text{ pmol/protein}$)、AG1478 を投与すると、細胞内 ATP 量の増加は全く認められず、None と同程度の値を示した (hCG+AG1478; $4.63 \pm 1.07 \text{ pmol/protein}$)。さらに、pAMPK (Thr172) を示すバンドは、hCG を投与したマウス顆粒膜細胞と比較して、hCG を投与しない None 区、AG1478 単独投与区および hCG+AG1478 区において強く検出された (Figure 2D)。加えて、hCG 投与区では INSIG-1 タンパク質発現を示すバンドが検出されなかったのに対して、None、AG1478 および hCG+AG1478 では INSIG-1 タンパク質が発現することを認めた (Figure 2D)。

最後に、N 末端 SREBP-1 (n-SREBP-1) および N 末端 SREBP-2 (n-SREBP-2) の核移行への影響を調べた結果、hCG を投与したマウスの顆粒膜細胞において、n-SREBP-1 あるいは n-SREBP-2 を示す茶色のシグナルが細胞核に局在することを認めたが (Figure 3C, D, K, L)、None、AG1478 あるいは hCG+AG1478 を投与したマウスの顆粒膜細胞では、茶色のシグナルが細胞質に均一に検出され (Figure 3A, B, E, F, G, H, I, J, M, N, O, P)、EGFR の活性化を阻害することにより SREBP の核移行が抑制される結果が得られた。

実験3. AICAR が INSIG-1 発現および n-SREBP の発現と局在に及ぼす影響

顆粒膜細胞における AMPK の不活性化が INSIG-1 消失と SREBP の活性化を誘導するかを調べる目的で、未成熟な雌マウスに eCG を投与し、その 48 時間後に hCG と同時に AICAR を投与した後、2 時間後に顆粒膜細胞を回収した。Figure 4A において、hCG を投与したマウスの顆粒膜細胞における pAMPK (Thr172) を示すバンドは、None と比べて薄くなったが、AICAR あるいは hCG+AICAR を投与すると hCG よりも濃いバンドが認められた。さらに INSIG-1 タンパク質発現を示すバンドは、hCG 投与区では認められなかったが、None、

AICAR および hCG+AICAR 区で認められた (Figure 4A)。次に、不活性型 SREBP-1/2 (f-SREBP-1/2) および活性型 SREBP-1/2 (n-SREBP-1/2) を検出した結果、hCG 投与により f-SREBP-1 および f-SREBP-2 を示すバンドが認められたとともに、n-SREBP-1 と n-SREBP-2 を示すシグナルが検出された (Figure 4A)。他方で、None, AICAR および hCG+AICAR を投与すると、f-SREBP-1 および f-SREBP-2 を示すバンドが認められたが、n-SREBP-1 と n-SREBP-2 を示すバンドは hCG 投与区と比較して減少していた (Figure 4A)。次に、SREBP-1 あるいは SREBP-2 の N 末端が核内に移行するかを免疫組織化学染色法により調べた結果、hCG を投与したマウスの顆粒膜細胞では n-SREBP-1 あるいは n-SREBP-2 を示す茶色のシグナルが細胞核に認められたが (Figure 5C, D, K, L), None, AICAR あるいは hCG+AICAR を投与した顆粒膜細胞では、茶色のシグナルが細胞質に均一に検出され (Figure 5A, B, E, F, G, H, I, J, M, N, O, P), AMPK の阻害により SREBP の核内移行が抑制される結果が得られた。

実験4. AICAR 投与が Cholesterol 新規合成酵素の発現, Cholesterol 新規合成および Progesterone 産生に与える影響

AICAR を投与した結果、INSIG-1 消失と SREBP 賦活化が抑制されたことから、Cholesterol 新規合成および Progesterone 産生に影響を及ぼすと考えられた。そこで、実験 3 と同様のマウスを用いて顆粒膜細胞における Cholesterol 新規合成酵素群 (*Hmgcr*, *Cyp51*, *Dhcr7*) の mRNA 発現を測定した結果、hCG と比較して None, AICAR あるいは hCG+AICAR を投与したマウス顆粒膜細胞では、*Hmgcr*, *Cyp51*, *Dhcr7* mRNA 発現が有意に低下した (Figure 6A-C)。Cholesterol 新規合成酵素群の発現低下に伴い、hCG+AICAR 区の顆粒膜細胞内 Cholesterol 量も hCG 区と比較して有意に減少した (hCG; 30.49 ± 6.14 ng/protein vs hCG+AICAR; 11.75 ± 5.05 ng/protein) (Figure 6D)。さらに、hCG あるいは hCG+AICAR 投与 12 時間後の卵巣における Progesterone 量も hCG と比較して hCG+AICAR 区において有意に低い値を示した (hCG; 674.9 ± 125.6 pg/protein vs hCG+AICAR; 211.9 ± 62.80 pg/protein) (Figure 6E)。

実験5. AICAR が卵子成熟, 排卵と黄体化に及ぼす影響

実験 5 では、AICAR が卵子成熟や排卵、黄体化に及ぼす影響を調べた。hCG あるいは hCG+AICAR を投与し、12 時間後の卵巣における卵丘細胞卵子複合体 (Cumulus-Oocyte Complex; COC) を観察した結果、None および AICAR 単独投与したマウスでは、COC の膨潤が認められなかったが、hCG 刺激により膨潤した COC が観察された (Figure 7A)。しかし、hCG+AICAR を投与すると卵丘細胞の膨化は認められず (Figure 7A), COCs の膨潤直径も hCG 区と比較して有意に減少した (Figure 7B)。さらに、これらの卵子の核相を観察したところ、第二減数分裂中期 (MII) に達した卵子は、hCG 区では 95.5 ± 0.77 % であったのに対して hCG+AICAR 区では 63.9 ± 12.9 % となり、有意に低下した (Figure 7C)。None 区

および AICAR 区では、MII に達した卵子は全く認められなかった (Figure 7C)。Figure 7D では 16 時間後の卵管へ排卵された卵子の数を測定した。その結果、卵管に排卵された卵子数は、None 区および AICAR 区では全く観察されなかったが、hCG 投与区では 53.5 ± 6.49 COCs/mouse に対して、hCG+AICAR 区では 5.18 ± 2.56 COCs/mouse となり、AICAR を投与することにより排卵数が 95 %以上減少した (Figure 7D)。また、hCG あるいは hCG+AICAR を投与し 48 時間後の卵巣において形成された黄体を観察した (Figure 8A)。この結果、hCG+AICAR を投与したマウスの卵巣内黄体数は、hCG 投与と比較して有意に低下していた (hCG; 22.5 ± 4.50 個/ovary vs hCG+AICAR; 1.0 ± 0.58 個/ovary) (Figure 8B)。

考察

血糖上昇により膵臓の β 細胞から分泌される insulin は、肝臓、筋肉、および脂肪細胞において、GLUT4の細胞膜への移行と取り込まれた Glucose の分解による ATP 増加により AMPK の不活性化を誘導し、これが INSIG-1 の消失に伴う SREBP の活性化を誘導する (Jaldin-Fincati et al., 2017; Han et al., 2019; Chadt and Al-Hasani, 2020)。筋肉は成人男性の場合、体重に対して 35~40%弱を占めることから (原田脩平ら, 理学療法—臨床・研究・教育, 第 25 巻 1 号, 2018), これらの糖質の取り込みとそれを基質として脂質を合成する insulin の作用は、血糖値の上昇を直ちに感知し、効率のかつ急速に血糖値を低下させるため極めて理にかなったメカニズムであると言える。本研究結果から、未成熟および卵胞発育期のマウス顆粒膜細胞では、hCG 刺激後 0.5 時間で EGF-like factor の *Areg* mRNA 発現は有意に上昇し、この時間において EGFR も強くリン酸化されていた。さらに hCG 刺激 0.5 時間後に GLUT4 が発現上昇し細胞膜移行に伴って、細胞内 Glucose 量と ATP 量が有意に増加した。加えて、排卵刺激前では顆粒膜細胞の AMPK はリン酸化され高い活性を維持したが、hCG 刺激 0.5 時間後に脱リン酸化され不活性化し、これと同調して INSIG-1 の発現の低下と n-SREBPs の増加が認められ、これらは AG1478 のマウスへの投与により完全に抑制された。筋肉や脂肪細胞では、Insulin は、Insulin receptor 下流の PI3K-Akt 経路を介して GLUT4 の細胞膜への移行を誘導することが明らかになっている (Jaldin-Fincati et al., 2017; Chadt and Al-Hasani, 2020)。卵巣でもこれらの経路は hCG 刺激後に活性化されることから、これらの経路を介したシグナルにより GLUT4 の細胞膜への移行と AMPK の不活性化が誘導されていると考えられた。したがって、卵巣では排卵刺激により卵巣局所で発現上昇する EGF-like factor が卵巣内で排卵を誘導するために急速にその要求量が高まる Progesterone 産生へ Cholesterol 生合成経路の活性化を介して寄与するという新たなメカニズムが存在することが本研究により初めて明らかになった。

第二章において、Fatostatin のマウスへの投与は、SREBP の賦活化を抑制し、Cholesterol 生合成量の減少に伴い Progesterone 産生量が低下した。この Fatostatin の投与は、排卵数が減少するものの、卵子成熟が正常に起こることから、Cholesterol 生合成経路の活性化により産生される Progesterone は、卵子成熟には関与しないが、排卵に極めて重要であることが明らかになった。本章の研究においても、AICAR のマウスへの投与は、INSIG-1 消失を伴う SREBP の賦活化を阻害し、Cholesterol 生合成と Progesterone 産生量が減少し排卵が抑制され、加えて卵丘細胞の膨化、減数分裂再開および黄体化も一部抑制されていた。この表現系は、Fatostatin を投与したマウスでは認められず、AICAR は排卵のみならず、卵子成熟にも影響することが明らかになった。これまでの研究により、この排卵と卵子成熟の両方に影響する経路には ERK1/2 経路が明らかとなっており、顆粒膜細胞特異的な *Erk1/2* 遺伝子欠損 (*Erk1/2^{gc-/-}*) 雌マウスを用いた解析により、ERK1/2 経路は PGE2 が卵子成熟を誘導する一方、

ERK1/2 経路依存的に分泌される Progesterone は排卵を誘導することが明らかになっている (Fan et al., 2009)。本章において、AICAR は、PGE2 産生酵素 (*Ptgs2*) および Progesterone 産生酵素 (*Star* および *Cyp11a1*) の発現を抑制し (Supplemental Figure 1)、この結果得られた卵子成熟と排卵の抑制を伴った表現系は、雌の *Erk1/2^{gc/-}* マウスと類似した結果となっている。加えて、本章では、マウスへの AG1478 投与により GLUT4 の細胞膜移行および AMPK の不活性化が抑制されたこと、顆粒膜細胞の初代培養系において EGF と Glucose の両方を添加すると GLUT4 の細胞膜への移行が促進され、AMPK の不活性化される結果を得ていることから (Supplemental Figure 2)、ERK1/2 は、GLUT4 の細胞膜移行を介して下流の AMPK を不活性化し、この結果、PGE2 産生による卵子成熟と Progesterone 産生による排卵を制御していることが本章により初めて明らかとなった。加えて、Tosca らはラットの顆粒膜細胞の初代培養系を用いて、FSH により誘導される ERK1/2 のリン酸化が AICAR により抑制されることを明らかにしている (Tosca et al., 2005)。同様に本章では、AICAR は hCG により誘導される ERK1/2 のリン酸化を抑制する結果を得ていることから (Supplemental Figure 3)、ERK1/2 は AMPK の不活性化を誘導し、AMPK の不活性化は ERK1/2 の活性化も誘導するというループを形成していると考えられる。したがって、排卵刺激により顆粒膜細胞では、ERK1/2—AMPK のループが PGE2 産生を誘導するとともに INSIG-1 の消失と SREBP の活性化を介した Progesterone 産生を亢進しており、その結果 PGE2 により制御される卵子成熟と Progesterone により制御される排卵が誘導されると考えられる。

本章の結果をまとめると、卵胞発育期の顆粒膜細胞では、細胞内 Glucose 量と ATP 量が低く、AMPK が活性化されていた。一方、排卵刺激後直ちに発現上昇する AREG が EGFR をリン酸化し、下流の ERK1/2 経路の活性化を介して GLUT4 の細胞膜移行に伴う細胞内 Glucose 量と ATP 量の増加、これによる AMPK の不活性化が誘導された。この AMPK の不活性化は、INSIG-1 消失と SREBP の活性化を誘導し、Cholesterol 生合成と Progesterone 産生を急速に高め、排卵が誘導されることを初めて明らかにした。さらに、AMPK の不活性化は、ERK1/2 のリン酸化を促進し、*Ptgs2* 発現の上昇を誘導し、卵子成熟や黄体化を促進することも明らかにした。以上の結果から、排卵刺激により活性化する EGFR-ERK1/2 経路は ERK1/2—AMPK 不活性化のループを誘導し、PGE2 産生による卵子成熟と Progesterone 産生による排卵、黄体化に寄与する極めて重要な経路であることが本研究により初めて明らかになった。

Table 1. qRT-PCRに用いたプライマーの塩基配列、アニーリング温度、
プロダクトサイズおよびアクセッションナンバー

mRNA	Primer sequences	Product size(bp)	Anneling temperature(X° C)	Accession No.
<i>Rpl19</i>	F:5'-CTG AAG GTC AAA GGG AAT GTG-3' R:5'-GGA CAC AGT CTT GAT GAT CTC-3'	196	60	BC058135
<i>Areg</i>	F: 5'-CGG TGG AAC CAA TGA GAA CT-3' R: 5'-TTT CGC TTA TGG TGG AAA CC-3'	198	62	NM_009704
<i>Ereg</i>	F: 5'-CCG TTT TCC TGG TAC ATG CT-3' R: 5'-GCA TGT GTC CTT GTG TTT GC-3'	187	60	NM_007950
<i>Hmgcr</i>	F: 5'-TGG AGA TCA TGT GCT GCT TC-3' R: 5'-GCG ACT ATG AGC GTG AAC AA-3'	154	60	NM008255
<i>Cyp51</i>	F: 5'-TTG AGA ATT TGA GGC CAA CC-3' R: 5'-CTG GAT CTC ATG GAG GCA TT-3'	172	60	NM020010
<i>Dhcr7</i>	F: 5'-CGC TCC CAA AGT CAA GAG TC-3' R: 5'-GTG TCT TGG CCC AAA TGT CT-3'	233	60	NM007856
<i>Star</i>	F: 5'-GCA GCA GGC AAC CTG GTG-3' R: 5'-TGA TTG TCT TCG GCA GCC-3'	249	60	NM011485
<i>Cyp11a1</i>	F: 5'-GGG AGA CAT GGC CAA GAT GG-3' R: 5'-CAG CCA AAG CCC AAG TAC CG-3'	279	60	BC068264
<i>Hsd3b1</i>	F: 5'-GGT GCA GGA GAA AGA ACT GC-3' R: 5'-TGA CAT CAA TGA CAG CAG CA-3'	197	60	NM001304800
<i>Ptgs2</i>	F: 5'-TGC AGA ATT GAA AGC CCT CT-3' R: 5'-GCT CGG CTT CCA GTA TTG AG-3'	181	60	NM_011198

Table 2. Western Blotting (WB), 免疫組織化学染色 (Immunohistochemistry; IHC), 免疫蛍光染色 (Immunofluorescence; IF)に用いた抗体情報

Antibody	Cat No.	Company	Dilution used		
			WB	IHC	IF
EGFR	sc-03	Santa Cruz Biotechnology	1 : 1000		
Phospho-EGF Receptor	#3777	Cell Signaling Technology	1 : 1000		
GLUT4	NBP1-49533	Novus Biologicals	1 : 1000		1 : 200
Phospho-AMPK α (Thr172)	#2535	Cell Signaling Technology	1 : 1000		
AMPK α	#2532	Cell Signaling Technology	1 : 1000		
N-Cadherin	#14215	Cell Signaling Technology			1 : 1000
SREBP-1 (Full-length/N-terminal)	SAB2102992	Sigma-Aldrich	1 : 1000	1 : 100	
SREBP-2 (Full-length/N-terminal)	10007663	Cayman Chemical	1 : 1000	1 : 100	
INSIG-1	NB110-55244SS	Novus Biologicals	1 : 1000		
β -ACTIN	#4967	Cell Signaling Technology	1 : 10000		
pERK1/2	#9106	Cell Signaling Technology	1 : 1000		
Anti-rabbit IgG HRP-linked antibody	#7074	Cell Signaling Technology	1 : 3000		
Anti-mouse IgG HRP-linked antibody	#7076	Cell Signaling Technology	1 : 5000		
Anti-Rabbit IgG(Whole molecule), F(ab') ₂ fragment-Cy3 antibody	C2306	Sigma-Aldrich			1 : 100
Anti-Mouse IgG(Whole molecule), F(ab') ₂ fragment-FITC antibody	F2883	Sigma-Aldrich			1 : 100

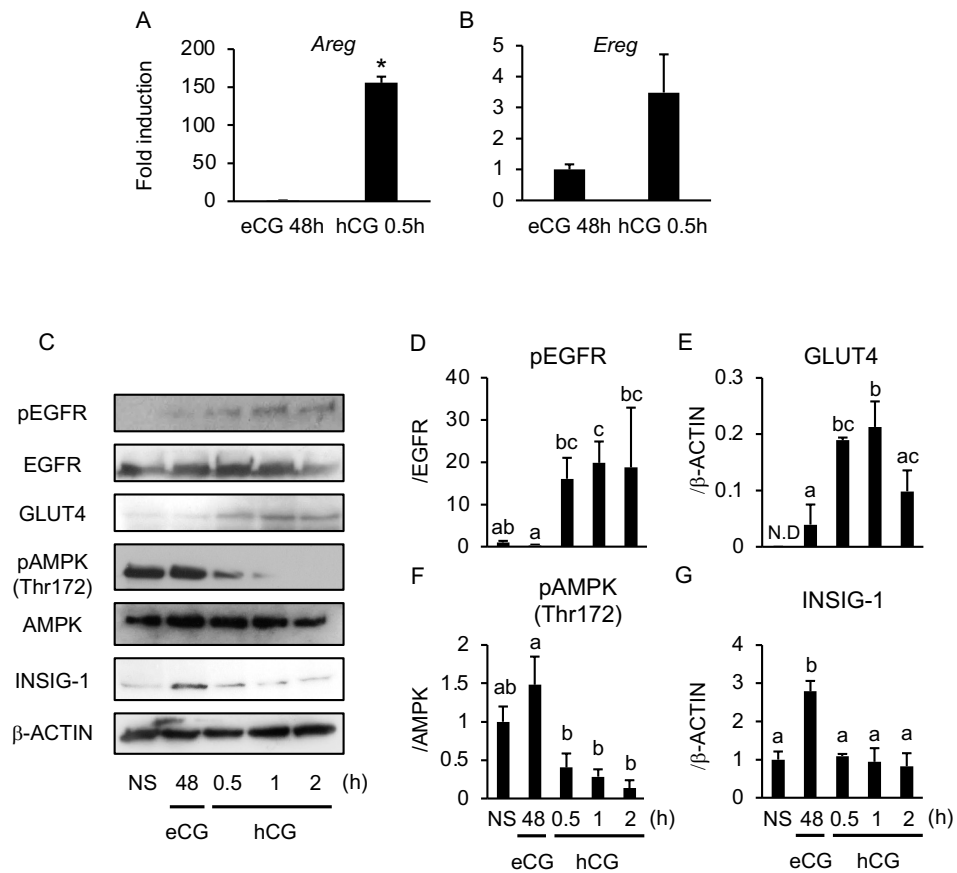


Figure 1. 卵胞発育および排卵を誘導した顆粒膜細胞におけるEGF-like factors, EGFRのリン酸化, GLUT4発現, AMPK活性およびINSIG-1の経時的な変化

マウス (Non-stimulated; NS)にeCGを投与し, 48 時間後 (eCG 48h)にhCGを投与した後, 卵巣から顆粒膜細胞を経時的に回収した (hCG 0.5, 1, 2h)。

A, B; 顆粒膜細胞における *Areg* (A), *Ereg* (B) mRNA発現

C-G; 顆粒膜細胞におけるpEGFR (C, D), GLUT4タンパク質発現 (C, E), pAMPK (Thr172) (C, F), INSIG-1タンパク質発現 (C, G)を示すバンド画像と定量化されたバンドの濃淡を数値化したグラフ

遺伝子発現およびタンパク質発現を示すデータは, NSの平均値を1.0とした時の相対値として表記した

a, b, c: 異符号間に有意差あり ($p < 0.05$)

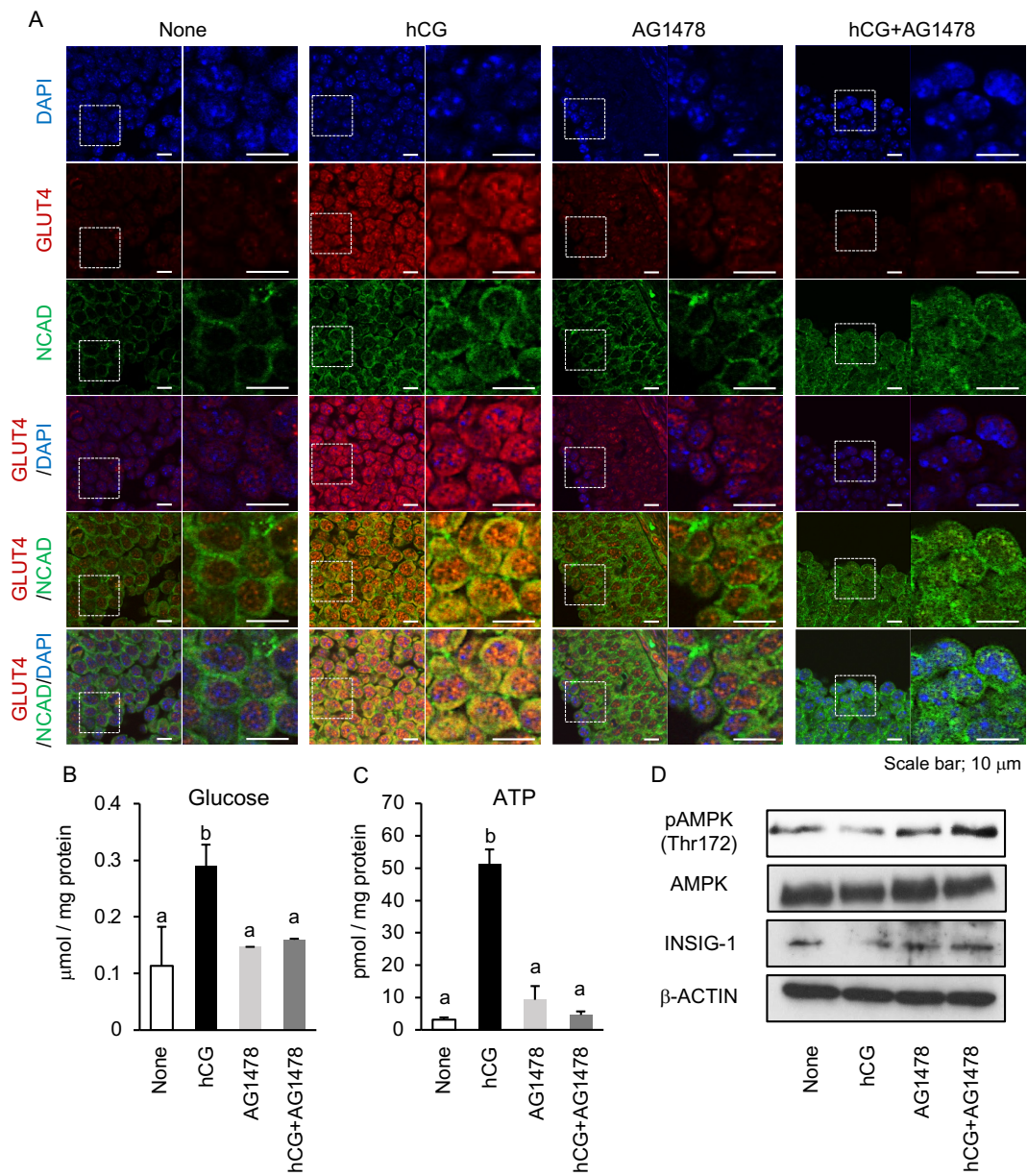


Figure 2. EGF-like factorsによるEGFRのリン酸化はGLUT4の細胞膜移行とGlucose利用性向上させAMPK活性を低下させる

マウス (Non-stimulated; NS)にeCGを投与し、44 時間後に生理食塩水あるいはAG1478 10 mg/kgを投与した後、4時間後にhCGを投与し、0.5時間後に卵巣あるいは顆粒膜細胞を回収した。

A; 卵巣におけるGLUT4の発現局在を示す蛍光画像 (Red; GLUT4, Blue; DAPI, Green; NCAD)

B, C; 顆粒膜細胞内のGlucose量 (B)とATP量 (C)

D; 顆粒膜細胞におけるpAMPK (Thr172)とINSIG-1タンパク質発現を示すバンド画像

a, b; 異符号間に有意差あり ($p < 0.05$)

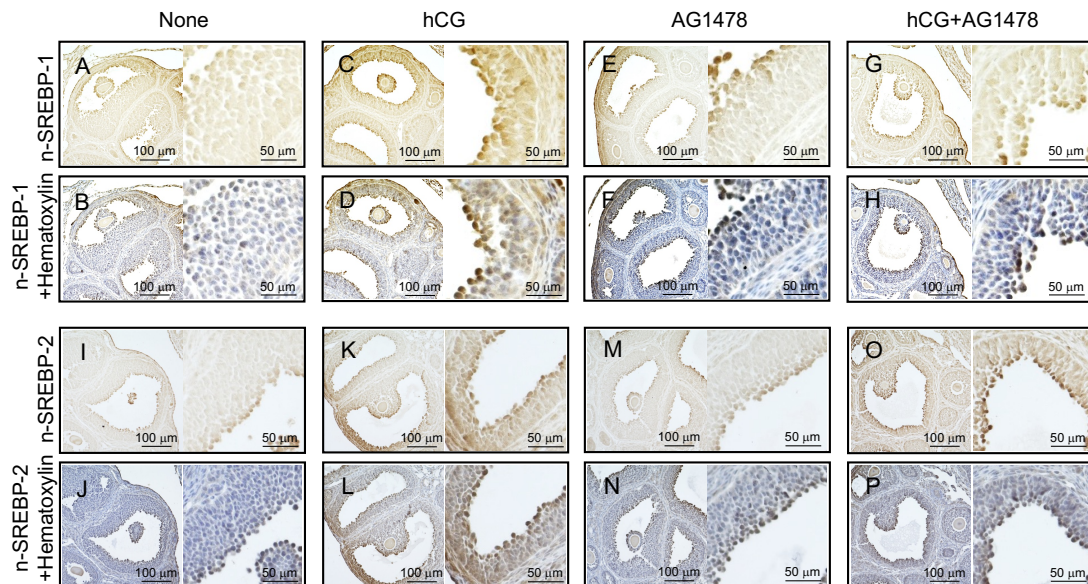


Figure 3. EGF-like factorsによるEGFRのリン酸化はGLUT4の細胞膜移行とGlucose利用性向上させAMPK活性を低下させる

マウス (Non-stimulated; NS)にeCGを投与し、44 時間後に生理食塩水あるいはAG1478 10 mg/kgを投与した後、4時間後にhCGを投与し、0.5時間後に卵巣あるいは顆粒膜細胞を回収した。

A, C, E, G; None (A), hCG (C), AG1478 (E) あるいはhCG+AG1478 (G)の卵巣における n-SREBP-1の染色像

B, D, F, H; None (B), hCG (D), AG1478 (F) あるいはhCG+AG1478 (H)の卵巣における n-SREBP-1の染色+ヘマトキシリン染色像

I, K, M, O; None (I), hCG (K), AG1478 (M) あるいはhCG+AG1478 (O)の卵巣における n-SREBP-2の染色像

J, L, N, P; None (J), hCG (L), AG1478 (N) あるいはhCG+AG1478 (P)の卵巣における n-SREBP-2の染色+ヘマトキシリン染色像

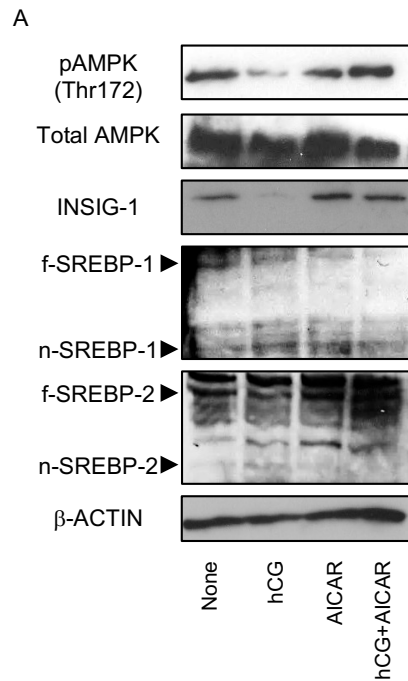


Figure 4. AICARがINSIG-1発現およびn-SREBPの発現と局在に及ぼす影響

マウスにeCGを投与し、48 時間後にhCGと同時にAMPK活性化剤 (AICAR)を250 mg/kg投与した後、2時間後に顆粒膜細胞を回収した (A)。

A; 顆粒膜細胞における活性型AMPK (pAMPK (Thr172)), INSIG-1タンパク質発現, 不活性型SREBP-1/2 (f-SREBP-1/2), および活性型SREBP-1/2 (n-SREBP-1/2)を示すバンド画像

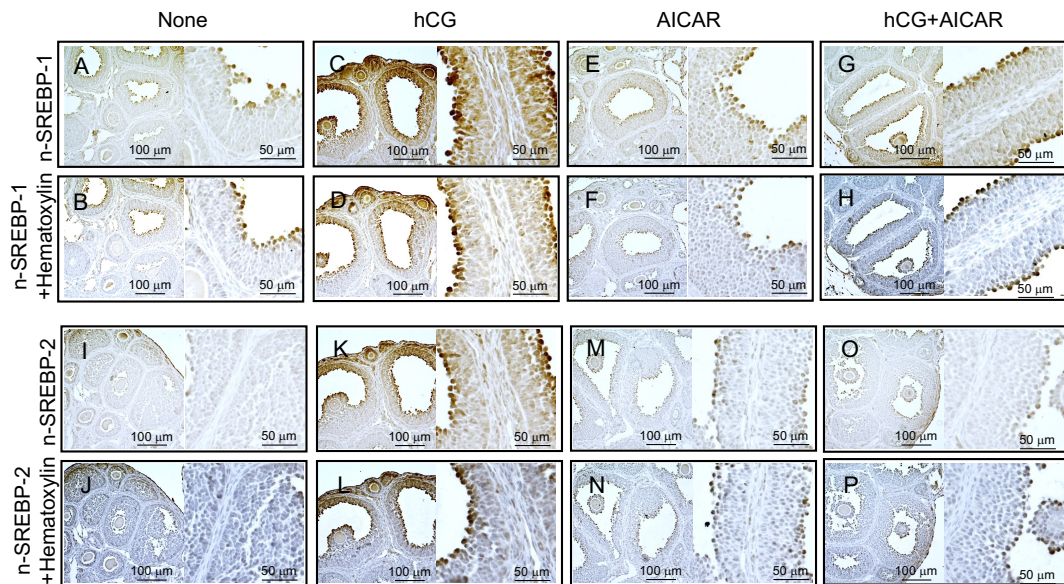


Figure 5. AICARがn-SREBP-1とn-SREBP-2の局在に及ぼす影響

マウスにeCGを投与し48時間後にhCGと同時に生理食塩水 (hCG)あるいはAICAR 250 mg/kg (hCG+AICAR)を投与した後、2時間後の卵巣を免疫組織化学染色によりn-SREBP-1とn-SREBP-2の局在を解析

A, C, E, G; None (A), hCG (C), AG1478 (E) あるいはhCG+AG1478 (G)の卵巣における n-SREBP-1の染色像

B, D, F, H; None (B), hCG (D), AG1478 (F) あるいはhCG+AG1478 (H)の卵巣における n-SREBP-1の染色 + ヘマトキシリン染色像

I, K, M, O; None (I), hCG (K), AG1478 (M) あるいはhCG+AG1478 (O)の卵巣における n-SREBP-2の染色像

J, L, N, P; None (J), hCG (L), AG1478 (N) あるいはhCG+AG1478 (P)の卵巣における n-SREBP-2の染色 + ヘマトキシリン染色像

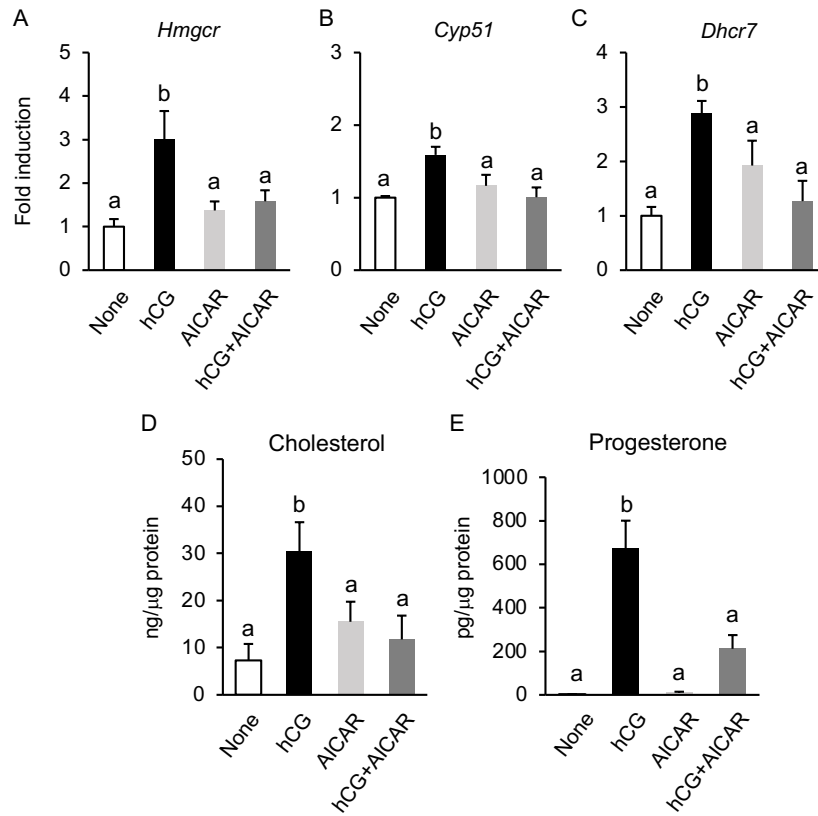


Figure 6. AICARがCholesterol合成酵素の発現，Cholesterol量およびProgesterone量へ及ぼす影響

マウスにeCGを投与し48時間後にhCGと同時に生理食塩水 (hCG)あるいはAICAR 250 mg/kg (hCG+AICAR)を投与した後，2時間後に顆粒膜細胞 (A-D)あるいは12時間後に卵巣を回収した (E)。

A-C; 顆粒膜細胞における*Hmgcr* (A), *Cyp51* (B), *Dhcr7* (C) mRNA発現

D; 顆粒膜細胞におけるCholesterol量

E; 卵巣におけるProgesterone量

遺伝子発現を示すデータは，NSの平均値を1.0とした時の相対値として表記した

*; 処理区間に有意差あり (p<0.05)

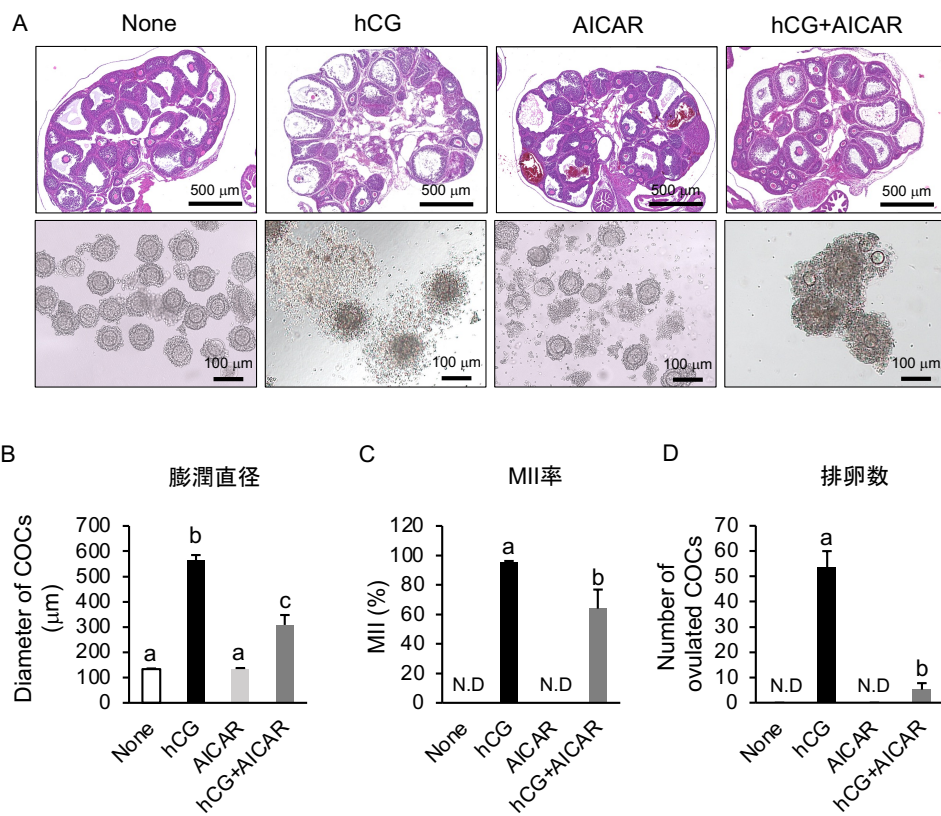


Figure 7. AICAR投与が卵子成熟および排卵へ及ぼす影響

マウスにeCGを投与し48時間後にhCGと同時に生理食塩水 (hCG)あるいはAICAR 250 mg/kg (hCG+AICAR)を投与した後、12時間後に卵巢とCOCs (A-C)あるいは16時間後に卵管に排卵されたCOCs (D)を回収した。

A; 卵巢のHematoxylin & Eosin (HE)染色画像および卵巢から回収されたCOCsの画像

B, C; COCsの膨潤直径 (B)およびMIIに達した卵子の割合 (C)

D; 卵管に排卵された卵子の数

a, b, c; 処理区間に有意差あり (p<0.05)

ND; Not Detected

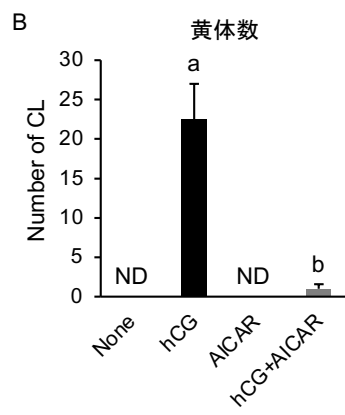
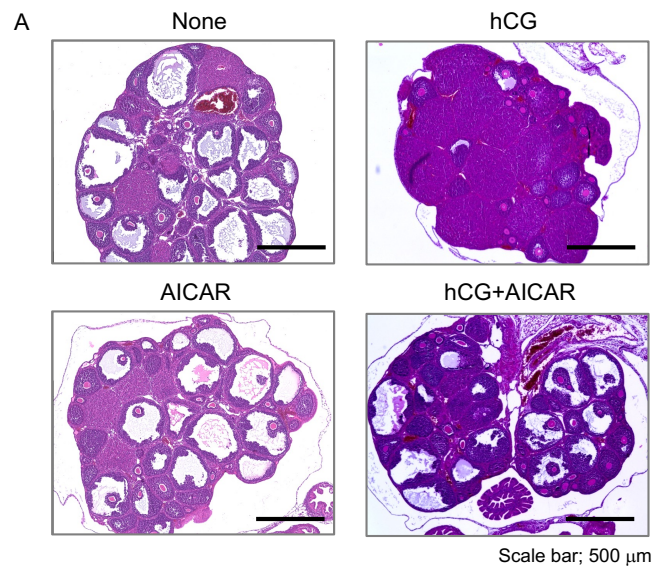


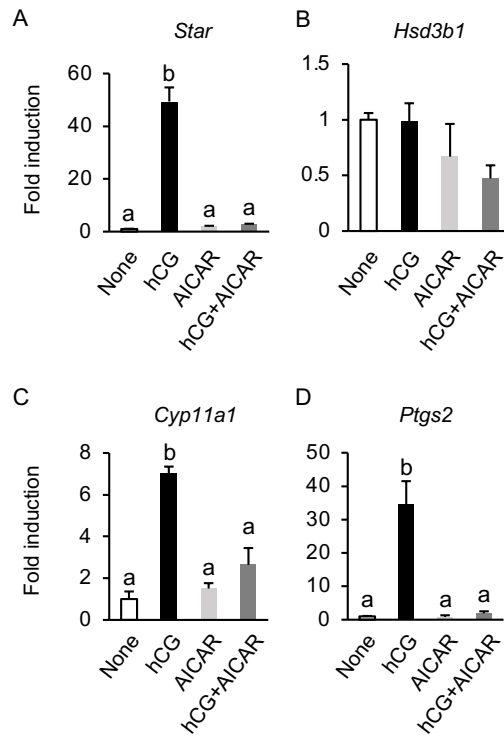
Figure 8. AICAR投与が黄体化へ及ぼす影響

マウスにeCGを投与し48時間後にhCGと同時に生理食塩水 (hCG)あるいはAICAR 250 mg/kg (hCG+AICAR)を投与した後、48時間後の卵巢を回収した (A, B)。

A, B; 卵巢のHE染色画像 (A)および卵巢内の黄体数 (B)

a, b; 処理区間に有意差あり ($p < 0.05$)

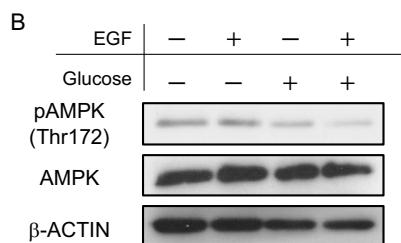
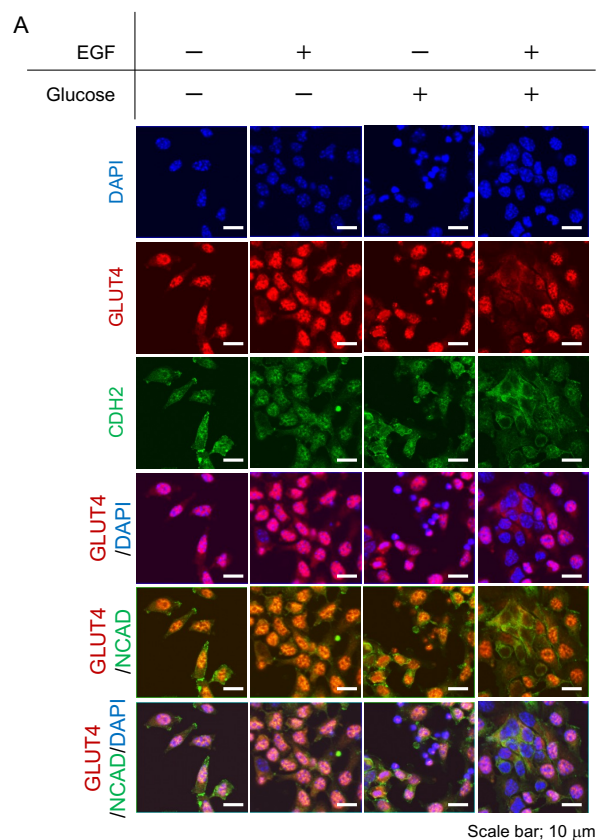
ND; Not Detected



Supplemental Figure 1. Progesterone産生酵素 (A, B, C) およびProstaglandin産生酵素 (D)の発現に及ぼす影響

マウスにeCGを投与し、48 時間後にhCGと同時にAMPK活性化剤 (AICAR)を250 mg/kg 投与した後、2時間後に顆粒膜細胞を回収した (A-D)。

A-D; 顆粒膜細胞における*Star* (B), *Hsd3b1* (C), *Cyp11a1* (D), *Ptgs2* (D) mRNA発現
a, b; 処理区間に有意差あり (p<0.05)

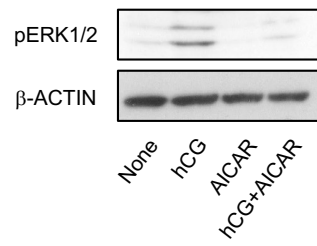


Supplemental Figure 2. GlucoseおよびEGFの添加がGLUT4の細胞膜移行およびAMPK活性に及ぼす影響

マウスにeCGを投与し、48時間後に卵巣から顆粒膜細胞を回収し、0.5時間前培養後にEGF (100 ng/ml)/Glucose (5 mM)添加 (EGF (+)/Glucose (+))あるいは無添加 (EGF (-)/Glucose (-))培地で培養し、0.5時間培養した (A, B)。

A; 顆粒膜細胞におけるGLUT4の発現局在を示す蛍光画像 (Red; GLUT4, Blue; DAPI, Green; NCAD)

B; 顆粒膜細胞における活性型AMPK (pAMPK (Thr172))を示すバンド画像



Supplemental Figure 3. AICARがERK1/2経路の活性に及ぼす影響

マウスにeCGを投与し、48 時間後にhCGと同時にAMPK活性化剤 (AICAR)を250 mg/kg投与した後、2時間後に顆粒膜細胞を回収した。回収後の顆粒膜細胞におけるpERK1/2およびβ-ACTINをWestern blottingにより検出した。

第四章 総合考察

本研究の新知見とそれに基づく排卵および卵子成熟への影響の検討

本研究では、排卵刺激後、急激に発現上昇する AREG が EGFR に結合し ERK1/2 経路を活性化させ、GLUT4 の発現上昇と細胞膜移行に伴い細胞内 Glucose 量と ATP 量が増加し AMPK が不活性化すること、これにより INSIG-1 消失を誘導し SREBP-1/2 を賦活化し、Cholesterol 生合成と Progesterone 産生が促進され卵子成熟と排卵が促進されることが明らかになった。これらの結果から、排卵期の顆粒膜細胞では①Glucose 代謝能が増加すること、②SREBP が活性化されることが明らかになった (図 1)。したがって、Glucose 取り込みとその代謝および SREBP により転写促進される以下の経路が上方制御されることが、卵子成熟や排卵に極めて重要であると強く示唆された。

① Glucose 代謝能の増加より活性化する経路 (図 2)

卵胞発育期において、卵胞液に含まれる Glucose は、卵胞サイズの増大に比例して増加する (Sutton-McDowall et al., 2005; Nandi et al., 2008)。本研究において、GLUT4 は、hCG 投与後のマウス顆粒膜細胞および卵丘細胞で急速に発現した後に細胞膜へ移行し、Glucose 代謝促進に伴い AMPK の不活性化を介して卵子成熟および排卵を誘導していることが明らかになった。これまでの研究から、COC 培養時において Glucose の添加は卵子の発生能に重要であるが (O'Brien et al., 1996; Steeves and Gardner, 1999; Sutton et al., 2003)、卵子には GLUT1, GLUT3, および GLUT8 が発現しているものの、卵子の Glucose 取り込み能力は低いことが明らかになっている (Dan-Goor et al., 1997; Augustin et al., 2001; Zheng et al., 2007; Pisani et al., 2008)。一方、卵丘細胞には、最も Glucose と親和性の高いトランスポーターである GLUT4 が発現することが報告されている (Williams et al., 2001; Robert et al., 2004; Nishimoto et al., 2006)。これらのことから、Glucose の取り込みは主に卵子には、ほとんど無く卵丘細胞に委ねられていると考えられている。したがって、排卵期の Glucose の顆粒膜細胞の取り込みは、顆粒膜細胞や卵丘細胞、卵子の以下のような経路の活性化を担っているものと考えられる。

①-1 ピルビン酸代謝による卵子のエネルギー合成

Glucose の卵子における利用性については古くから明らかにされており、卵子自身は Glucose を利用することができないが、卵丘細胞において Glucose 代謝により合成されるピルビン酸が卵子に gap junction を介してもたらされ、TCA サイクル、電子伝達系などの酸化的リン酸化反応により ATP を供給し、卵子の成熟に重要であることが明らかになっている (Biggers et al., 1967; Brinster, 1971; Gardner et al., 1996; Richani et al., 2014; Richani et al., 2021)。以上から、卵子の成熟や発生能重要と考えられるピルビン酸の合成を考慮することは極めて重要であると考えられる。

①-2 ペントースリン酸経路と卵子の関係

また、卵丘細胞に取り込まれた Glucose の一部は、ペントースリン酸経路を介して NADPH を産生する。卵子成熟に重要である卵子のピルビン酸の酸化リン酸化は、酸素の消費と共に Reactive Oxygen Species (ROS) の産生を増大させるが、ペントースリン酸経路で産生される NADPH は、ROS の除去を促進する卵子内の酸化型グルタチオンを還元し、卵子の DNA 損傷によるアポトーシスを防ぐことが知られている (Richani et al., 2021)。加えて、同様にペントースリン酸経路で産生される Ribose 5-phosphate は、核酸の合成に利用され、卵子の減数分裂再開と DNA 修復を誘導する (Downs et al., 1998; Downs and Utecht, 1999; Cetica et al., 2002)。したがって、卵子のアポトーシス抑制と減数分裂再開に関与することが示唆されるペントースリン酸経路を卵丘細胞で活性化させることは極めて重要である。

①-3 卵丘細胞の Glucose 代謝によるヒアルロン酸合成

卵丘細胞は、解糖系やペントースリン酸経路を介して Glucose を卵子が利用できる物質に変換・供給し、卵子の質を担保するが (Richani et al., 2021)、卵丘細胞自身も Glucose をヘキソキナーゼ経路により消費し、長鎖ヒアルロン酸合成に利用される (Salustri et al., 1989; Chen et al., 1990)。長鎖ヒアルロン酸は、排卵刺激後の卵丘細胞の間隙に細胞外マトリックスの主成分として蓄積し、卵丘細胞の膨潤および卵子の減数分裂再開を誘導することが知られる物質であるが (Sutton-McDowall et al., 2004; Assidi et al., 2008; Gebhardt et al., 2011)、それ以外の働きとして、排卵時に COC を卵管へ放出する物理的衝撃を和らげる働きと共に、その保湿度の高さによる粘着力により精子と COC の接着を促進する働きがあると考えられている (Ranganathan et al., 1994; Ranganathan et al., 1995; Ghosh et al., 2007)。さらにこれに加え、長鎖ヒアルロン酸は、受精時の精子の頭部から分泌されるヒアルロニダーゼにより断片化され、短鎖ヒアルロン酸となり卵丘細胞の膜上に発現する Toll-like receptor 2 (TLR2) と TLR4 に結合し、ケモカインとサイトカインを分泌させる結果、精子のハイパーアクチベーションを引き起こし、受精を促進する (Shimada et al., 2008)。したがって、卵丘細胞の膨潤を介した卵子の保護と精子と卵子の受精率向上に重要と考えられる Glucose 代謝によるヒアルロン酸合成活性の最大化は重要であると言える。

①-4 COC におけるポリオール経路の役割

体細胞において、取り込まれた Glucose は、ポリオール経路を介してソルビトールとフルクトースに変換される (Krause and Wegner, 2020)。2022 年、Sano らは、ポリオール経路の活性化により産生されるフルクトースが、Glucose 代謝酵素の転写因子である Carbohydrate response element binding protein (ChREBP) の核内移行を促進し、細胞内 Glucose 量および代謝活性の調節を誘導することを明らかにした (Sano et al., 2022)。本研究により、排卵時の顆粒膜細胞や卵丘細胞では、Glucose 代謝が活性化することから、ポリオール経路が活性化し、

顆粒膜細胞や卵丘細胞などの体細胞,あるいは卵子自身の代謝活性を上昇させ,これらの細胞における Glucose 代謝の調節を行い,卵子の発生能獲得を調節している可能性がある。

②SREBP による脂肪酸合成と卵子成熟への影響 (図 3)

本研究では,排卵刺激後の SREBP 賦活化は,排卵を誘導する Progesterone の産生に大きく貢献することが明らかになったが, SREBP により活性化される経路には Cholesterol 生合成経路のみならず,様々な経路を活性化することが知られる。肝臓において, SREBP-1 は, ATP-Citrate lyase や Acetyl-CoA synthase の発現を亢進し,クエン酸や酢酸から Acetyl-CoA を産生するとともに, Cholesterol 新規合成酵素群および脂肪酸産生酵素群の発現を上昇させ, Acetyl-CoA を基質に Cholesterol と脂肪酸を産生する (Horton et al., 2003)。本総合考察を行うに際して行なった予備実験においても, Acetyl-CoA からパルミチン酸,ステアリン酸,オレイン酸を合成する酵素群(*Acc, Fasn, Elovl6, Scd1*)の顆粒膜細胞の発現は hCG により増加し,この発現は, SREBP 依存的に抑制されることを明らかにしている (Supplemental Figure 4)。このことから, LH 刺激後の顆粒膜細胞においても合成される脂肪酸も卵子成熟や卵子の胚発生能向上に寄与すると考えられる。

②-1 脂肪酸のβ酸化による卵子成熟

卵胞液では,排卵刺激前と比較して排卵刺激後にパルミチン酸やステアリン酸の濃度が増加することが報告されている (Valckx et al., 2014; Abdulrahman Alrabiah et al., 2022)。卵胞液中に蓄積した脂肪酸は,卵丘細胞および卵子に取り込まれ,ミトコンドリア内でβ酸化により 1 分子の脂肪酸から 106 mol 以上の ATP が産生され,卵子の減数分裂再開に利用される (Downs et al., 2009; Sanchez-Lazo et al., 2014)。さらに, L-カルニチンは,脂肪酸のミトコンドリアへの輸送が促進させ,β酸化により大量に ATP が産生させる結果,卵子成熟率の向上に寄与することも報告されている (Dunning et al., 2012)。以上の結果から,脂肪酸は,卵子の減数分裂再開や卵子成熟に重要な役割を担っていると考えられている。

②-2 脂肪酸と初期胚発生の関係

卵子成熟過程に供給される脂肪酸の一部は,卵子内の脂肪小滴に蓄えられる。ブタやウシ,ヒツジの卵子では,受精後,貯蔵された脂肪酸は,β酸化により ATP 産生に利用され,これにより卵割を繰り返し胚盤胞へと発生することが可能となることが報告されている (McEvoy et al., 2000; Sturmev et al., 2006; Ferguson and Leese, 2006; Ambrousi et al., 2009; Jeong et al., 2009; Prates et al., 2014)。しかし,マウスやヒトでは,その他の動物種と比較して卵子内に貯蔵される脂肪酸量が少ないため (Bigger et al., 1967; Conaghan et al., 1993; Harris et al., 2009),β酸化ではなく,未受精卵から 2 細胞期まではピルビン酸,8 細胞期以降は Glucose を消費して,卵割を進行させ胚盤胞まで発生する (Whittingham and Biggers, 1967; Whittingham, 1969; Ginsberg and Hillman, 1975)。以上の結果は,初期胚発生を誘導するためのエネルギー

源には種特異性が存在し、齧歯類やヒトでは Glucose 代謝により得られるピルビン酸に多くを依存するが、家畜の卵子では脂肪酸が初期胚発生の基質として重要であり、この含有量を向上させることが重要であることを示唆している。

③-1 SREBP による脂質合成を介したタンパク質の翻訳後修飾の促進

SREBP によって制御される Cholesterol 生合成経路や脂肪酸産生経路の中間生成物は、タンパク質の翻訳後修飾に関与しており、標的タンパク質の活性化や安定化に貢献し得る。Cholesterol 生合成経路の中間生成物であるファルネシル 2-リン酸は、ドリコールに変換され、このドリコールを介してタンパク質の糖鎖修飾 (グリコシル化) が誘導され、タンパク質の安定化に寄与することが知られている (Cantagrel and Lefeber, 2011)。SREBP の正の制御因子である SCAP もグリコシル化されることが知られており、SCAP がグリコシル化されると SREBP が切断され転写活性が上昇する (Cheng et al., 2015)。本研究では、Glucose 取り込み後に INSIG-1 が消失し、SREBP が賦活化することを示したが、排卵期の顆粒膜細胞では Glucose 量が著しく増加することから、SCAP の糖鎖修飾も十分に考えられ、INSIG-1 消失と SCAP のグリコシル化の両方が SREBP の賦活化を促進することが示唆される。また、ファルネシル 2-リン酸は、ゲラニルゲラニル 2 リン酸に変換され、これがプレニル基の供与体として機能する結果、細胞膜貫通型受容体およびリソソームや小胞に結合するタンパク質をプレニル化し、細胞膜への親和性を向上させる (Ha and Lee 2020)。加えて、脂肪酸合成により産生されるパルミチン酸は、タンパク質にパルミチン酸を付加するパルミトイル化およびグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーの構築に利用され、G タンパク質共役型受容体やその他の細胞膜貫通型受容体の膜輸送を促進するとともに細胞膜におけるタンパク質の安定性の向上に寄与する (Fujita and Kinoshita, 2012; Ko and Dixon, 2018; Kinoshita T, 2020)。顆粒膜細胞や卵丘細胞では、上記の翻訳後修飾機構やその重要性を示す報告はないが、細胞膜上に発現する FSH 受容体や LH 受容体、EGF 受容体にリガンドが結合することで、卵胞発育や卵子成熟、排卵が誘導されることから、卵巣においてもタンパク質の翻訳後修飾は極めて重要であると考えられる。また、GPI アンカーを産生する酵素を卵子特異的に遺伝子欠損させたマウスは、受精が抑制され完全な不妊を示す (Alfieri et al., 2003)。したがって、SREBP により活性化される Cholesterol 生合成経路と脂肪酸産生経路の中間生成物が、タンパク質の翻訳後修飾に利用され、顆粒膜細胞、卵丘細胞および卵子に発現する膜貫通型受容体を膜輸送し安定化させる結果、卵胞発育、排卵および受精に重要であると考えられる。

③-2 卵子膜における脂質の役割

細胞膜は Cholesterol や脂肪酸を含む多くの脂質で構成されており、これらの脂質が無秩序に分布していると考えられてきたが、近年、細胞膜に存在する脂質が整列した脂質ラフトが形成され、この脂質ラフトに上記で記した翻訳後修飾された膜貫通型タンパク質が局在

化しやすくなることが明らかとなっている (Lingwood and Simons, 2010)。実際に、精子では、受精能獲得時に脂質ラフトが生じ、Juno のリガンドである Izumo-1 が精子頭部に局在し、初めて卵子と受精可能となる (Inoue et al., 2005)。卵子においても、Juno は未成熟な卵子から減数分裂が再開した卵子まで定常的に発現しているにもかかわらず (Suzuki et al., 2017)、成熟した卵子の細胞膜にのみ Juno タンパク質の局在化が認められる (Jean et al., 2019)。一方、卵子の細胞膜から Cholesterol を除去すると Juno タンパク質の発現局在は認められず (Hao et al., 2021; Xu et al., 2022)、受精率は著しく減少する。したがって、SREBP により産生される脂質とタンパク質の翻訳後修飾は、卵子の膜構造を変化させることで、受精や胚発生を促すことも示唆された。

本研究により得られた新知見に基づいた応用例

① 高品質な卵子を目指した IVM 培地

上記のように、LH サージ後の COC に供給される Glucose が、解糖系や酸化的リン酸化、ペントースリン酸経路、ヘキソキナーゼ経路により消費され、卵子の減数分裂再開、受精および胚発生に重要である。実際に、マウスの COC を低 Glucose 濃度 (0-1.5 mM) の IVM 培地で培養すると、ATP 産生量、核酸合成およびヒアルロン酸合成量が低下する結果、卵子の減数分裂再開が抑制される (Sutton-McDowall et al., 2010)。他方で、10 mM < Glucose を含む IVM でマウス COC を培養すると、卵子内 ROS 量が顕著に増加し、卵子成熟および胚発生能が著しく低下する (Sutton-McDowall et al., 2010)。このことから、成熟過程における COC は、適切な濃度の Glucose を要求するが、生体内の卵胞内では、血管から絶えず Glucose が供給されるため、IVM 時には Glucose 濃度だけでなく安定的な Glucose の供給も検討することで、卵子成熟率の向上につながると考えられる。さらに、COC におけるポリオール経路の存在と活性化メカニズムおよびその意義を解明することにより、相乗的に卵子の成熟率を向上させることが可能となることが強く示唆される。

② LUF に対する新たな治療法の可能性

本研究において、SREBPs の賦活化抑制剤である Fatostatin をマウスに投与すると、排卵刺激後の N 末端 SREBP が切断されず Cholesterol 新規合成が抑制され、Progesterone 産生酵素 (*Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1*) の遺伝子発現に影響はないが、Progesterone 産生量も有意に減少した。加えて、Fatostatin 投与により卵子は正常に成熟するものの排卵は行われず、黄体化は誘導され、この結果、黄体内に卵子が取り残される異常黄体が形成され、LUF と酷似した表現系を示していた。LUF では、Progesterone 産生の減少が起因とされる排卵不全症の一つであるが、その原因は不明であり、LUF を根治する治療法も未確立である。現在、LUF 患者の診断には超音波検査や体温測定、血中 Progesterone 濃度の測定が実施されているが、これらは LUF の表現系をマーカーとして拾い上げているだけで、LUF の発症原因は特定されず、LUF の完治・寛解には至らない。本研究では、Fatostatin 投与により、LUF と同様の表現系

となった知見から、以下の2点がLUFの発症原因であると考えられる。

1. 卵胞発育期の顆粒膜細胞における SREBP, SCAP, INSIG-1 いずれかの発現不足
 2. 排卵刺激後の INSIG-1 消失および SREBP 活性化不全に伴う Progesterone 産生能の低下
- さらに、本研究において Fatostatin を投与したマウスに Progesterone を投与すると、排卵数が回復したことから、卵巣細胞の細胞診断が可能になり上記原因が特定されれば、そのような LUF 患者に対する Progesterone 投与は排卵誘導に有効な手段になると考えられる。一方、上記で論述した通り、SREBP は、Cholesterol 生合成経路だけでなく、脂肪酸合成経路も活性化させ、合成される脂肪酸が、卵子の減数分裂再開や受精能、胚発生能の獲得に働くと考えられる。このことから、LUF 患者に対して、Progesterone 投与による排卵誘導だけでなく、特に、抗酸化力が高く、ROS を除去し卵子の高い代謝活性を維持させる不飽和脂肪酸の投与や摂食による脂肪酸の補給が、高品質な卵子を生み出し、受精率や胚発生率を向上させると考えられる。

③ 代謝異常と SREBP による不妊症発症リスクの上昇の可能性

本研究では、排卵刺激後に顆粒膜細胞内に取り込まれた Glucose が消費され ATP が増大し不活性化する AMPK が、SREBP の賦活化に重要であったことから、適度な Glucose の取り込みと代謝は SREBP の賦活化に極めて重要である。一方、肥満や二型糖尿病患者のような Body mass index (BMI) が高い女性では、不妊症を発症する割合が高く、卵胞液中の Glucose 濃度および脂質濃度が増加する (Robker et al., 2009; Valckx et al., 2014)。したがって、過剰な Glucose による脂質代謝異常が不妊症の原因の一つとなると考えられる。Hasty や Cheng らは、肝臓やがん細胞において、Glucose 濃度の増加に伴い N 末端 SREBP が切断され、Cholesterol と脂肪酸が新規合成されることを報告している (Hasty et al., 2000; Cheng et al., 2015)。顆粒膜細胞は、肝臓と同様の機構により SREBP が活性化することを本研究で明らかにしたことから、血中 Glucose 濃度の高い肥満や二型糖尿病患者の顆粒膜細胞においても SREBP の転写活性が上昇し、Cholesterol や脂肪酸が大量に産生される可能性が高い。Yesilaltay らは、卵胞液中の過剰な Cholesterol が卵子に蓄積する結果、自発的に減数分裂が再開・完了するため、単為発生胚となり受精できずに不妊を引き起こすことを報告している (Yesilaltay et al., 2014)。加えて、卵子が高濃度の脂肪酸に晒されると、卵丘細胞の膨化や卵子成熟の抑制と共に ROS が産生され、胚発生能が著しく低下することも報告されている (Marei et al., 2009; Marei et al., 2017a; Marei et al., 2017b)。卵胞が途中で発育を停止する多能性卵巣症候群 (PCOS; Polycystic Ovarian Syndrome) は、女性の 5~10% で発症するといわれる不妊症であるが、当研究室では高スクロース飲水、高脂肪食により二型糖尿病を発症したモデルマウスでは、PCOS を発症すること、この PCOS 発症モデルマウスでは、卵胞発育期の顆粒膜細胞で SREBP が異常に早期活性化し、これが Androgen 産生を誘導することを明らかにしている。したがって、肥満や二型糖尿病のリスク因子は、発生能を十分に有さない卵子の排卵不全、特に PCOS の原因となっている可能性が高く、この早急な原因究明とこれに基

づく根本的な予防法・治療法の確立が急がれる。

まとめ

本研究では、排卵刺激後の顆粒膜細胞において、細胞内 Glucose 量と ATP 量の増加に伴い AMPK が不活性化され、INSIG-1 が消失し SREBP が賦活化する結果、Cholesterol が新規合成され、Progesterone 産生に寄与することを明らかにした。この結果から、顆粒膜細胞と卵丘細胞に供給される Glucose 量が、妊孕性の維持に極めて重要と考えられた。さらに、SREBP の賦活化は、Cholesterol 生合成経路のみならず、脂肪酸産生経路を活性化し、卵子成熟や受精、胚発生に必要不可欠なエネルギー源の供給、タンパク質の脂質化および膜構造の変化に寄与することが示唆された。また、本研究では、卵胞発育期の顆粒膜細胞において SREBP-1/2, SCAP, INSIG-1 が発現すること、加えて、LH サージ後に SREBP が賦活化することが、成熟卵子の排卵に極めて重要であったことから、これらを標的とした LUF に対する診断項目の充足と不妊治療法の確立に寄与することが考えられた。さらに、不妊症発症リスクが高い肥満や二型糖尿病の患者では、卵巣における Glucose 依存的な SREBP 賦活化が、不妊症発症の要因になると示唆された。

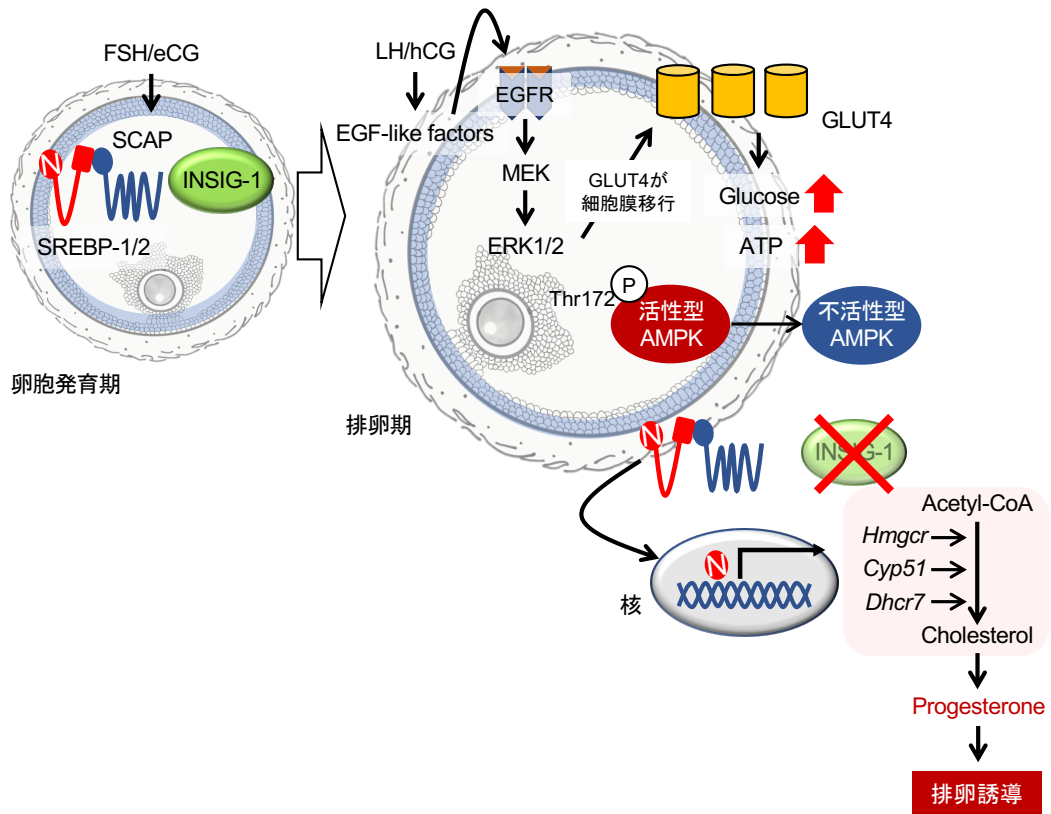


図 1. 卵胞発育期および排卵期の顆粒膜細胞におけるSREBP, SCAP, INSIG-1の発現とINSIG-1消失によるSREBPの賦活化によるProgesterone産生機序

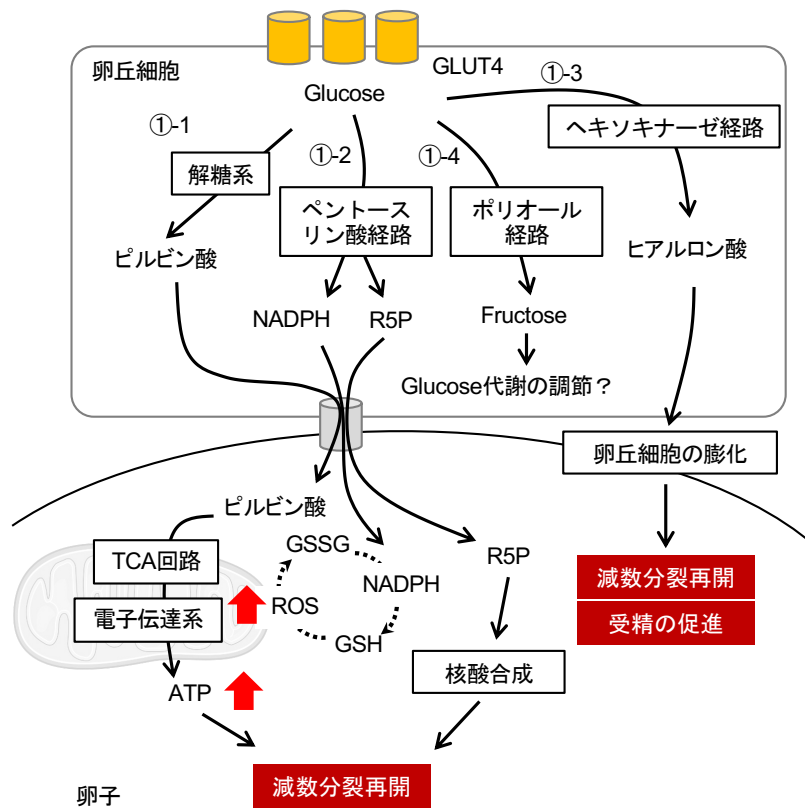


図 2. 卵丘細胞および卵子において活性化されるGlucose代謝経路の役割

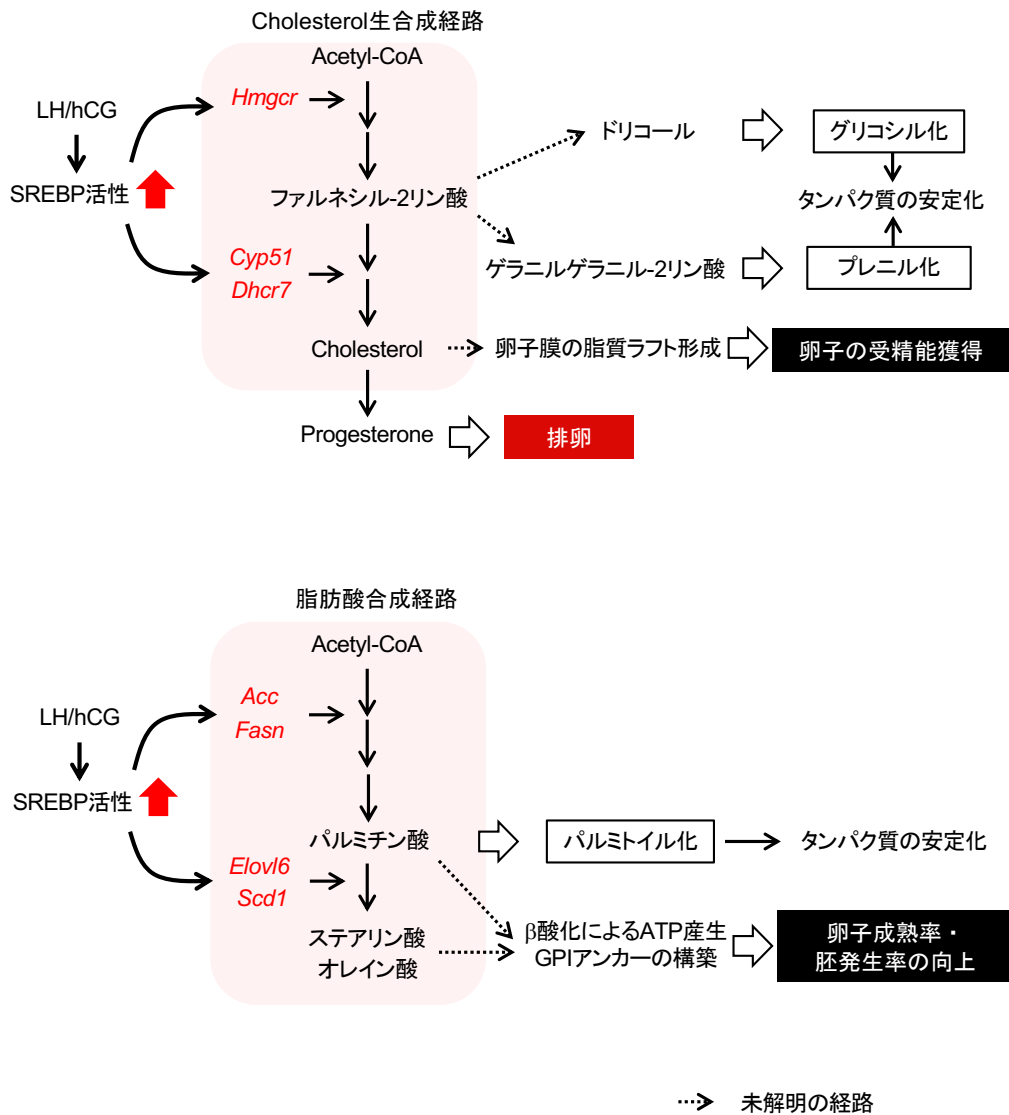
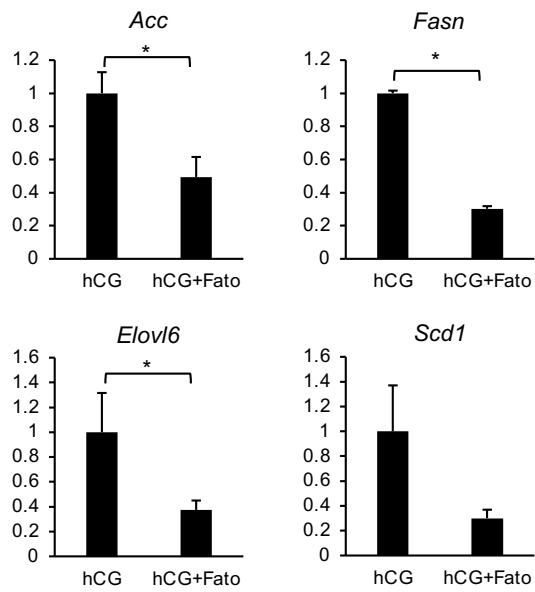


図3. 排卵刺激後のSREBP賦活化により誘導される脂質合成が卵子成熟，受精，胚発生に与える影響



Supplemental Figure 4. マウス顆粒膜細胞における脂肪酸合成酵素の発現

マウスにcCGを投与し、42時間後にFatostatin (30 mg/kg)を投与した後、6時間後に hCGを投与し、顆粒膜細胞を回収

データは、hCGの平均値を1.0とした時の相対値として表記

Fato; SREBP活性化阻害剤

*: 処理区間に有意差あり(p<0.05)

第五章

総括

第一章: 緒論

排卵不全症の一つである LUF は、健常な女性の 5~10%と高頻度に認められるが、その発症原因は明確にされていない。哺乳動物において、排卵は、LH サージ後の顆粒膜細胞で Cholesterol を基に産生される Progesterone が、PGR に結合することで誘導される。これまで、Progesterone の基質となる Cholesterol は、Cholesterol の同化組織である肝臓で作られたものが卵巣に運搬され、Progesterone の産生に利用されると考えられてきた。しかし、Transcriptome 解析により肝臓において Cholesterol の新規合成を制御する転写因子 SREBP が、卵胞発育期から排卵期の顆粒膜細胞で発現することを見出した。そこで、本研究では、卵胞発育期および排卵期の顆粒膜細胞において発現する SREBP に着目した新規 Progesterone 産生メカニズムと排卵機序の解明を試みた。

第二章: 顆粒膜細胞に発現する脂質転写因子 SREBP と制御因子 (SCAP, INSIG-1)の経時的発現変化とその役割

肝臓において Cholesterol 新規合成を制御する SREBP-1 と SREBP-2 は、正の制御因子 SCAP と結合することにより Cholesterol 新規合成酵素群の発現が亢進され、Cholesterol が新規合成される。一方、SREBP-SCAP 複合体に INSIG-1 が結合し三量体を形成すると Cholesterol の新規合成は抑制される。本章では、卵胞発育期および排卵期のマウス顆粒膜細胞における SREBP-1, SREBP-2, SCAP, INSIG-1 の経時的な発現変化を調べた結果、後期胞状卵胞の顆粒膜細胞において SREBP-1, SREBP-2, SCAP, INSIG-1 のタンパク質が高発現し三量体を形成したが、排卵刺激後、INSIG-1 タンパク質が消失し、SREBP-1/2 の N 末端が切断され核内に移行することが明らかとなった。さらに、SREBP の賦活化に伴い Cholesterol 新規合成酵素群 (*Hmgcr*, *Cyp51*, *Dhcr7*) の遺伝子発現が上昇し Cholesterol 量も増加した。次に、顆粒膜細胞で発現する SREBP が、肝臓と同様に Cholesterol の新規合成に働くのかを調べるため、SREBP の活性化阻害剤である Fatostatin をマウスに投与した。この結果、Fatostatin を投与したマウスの顆粒膜細胞では、hCG 刺激後の N 末端 SREBP-1/2 の切断が阻害されたとともに、Cholesterol の新規合成経路が完全に抑制され卵巣内 Progesterone 量も有意に減少した。さらに、顆粒膜細胞の初代培養系を利用して *Scap* siRNA により *Scap* をノックダウンした結果、*in vivo* と同様に Cholesterol の新規合成と Progesterone 産生が抑制された。最後に、Fatostatin による卵子成熟、排卵および黄体化への影響を調べた結果、卵丘細胞の膨化や減数分裂再開に影響はなかったが、排卵数が著しく減少し黄体内に卵子が留まった異常な黄体が形成された。他方で、Fatostatin を投与したマウスに Progesterone を投与すると、排卵数と黄体数が回復した。以上の結果から、後期胞状卵胞の顆粒膜細胞では、SREBP-1, SREBP-2, SCAP, INSIG-1 が発現し三量体を形成しているため、Cholesterol 新規合成経路は活性化しない。

しかし、LH サージ後、INSIG-1 が消失し N 末端 SREBP-1/2 が切断され核内に移行する結果、Cholesterol 新規生合成酵素群の発現が上昇し Cholesterol が新規合成され、これを基に Progesterone が産生され排卵が誘導されることが明らかとなった。

第三章: LH が誘導する顆粒膜細胞の AMPK の不活性化は、INSIG-1 消失と SREBP の賦活化を誘導する

第二章の研究結果から、INSIG-1 消失は排卵を誘導するために極めて重要であることが明らかになったが、排卵刺激後の INSIG-1 消失メカニズムは明らかになっていない。肝臓や筋肉、脂肪組織では、インスリン依存的に GLUT4 が細胞膜に移行し、Glucose 代謝による ATP 増加により AMPK が不活性化し、この不活性化された AMPK が、INSIG-1 を消失させ、SREBP の切断と核内移行を誘導する。卵巣では、排卵を誘導するキープクターとして知られる EGF-like factor である *Areg* mRNA 発現は、hCG 投与 0.5 時間後の顆粒膜細胞において高発現し、インスリンと同様のチロシンキナーゼ型受容体である EGFR を強くリン酸化することから、本章では、肝臓などと同様なメカニズムで生じる AMPK の不活性化が INSIG-1 の消失と SREBP の活性化に関与するかを検討した。その結果、hCG 刺激 0.5 時間後の顆粒膜細胞では、hCG 刺激前と比較して GLUT4 が発現上昇し、細胞内 Glucose 量と ATP 量が増加した。また、排卵刺激前の顆粒膜細胞では、AMPK がリン酸化され高い活性が維持されたが、hCG 刺激後に AMPK が不活性化され、これと同調して INSIG-1 の発現の急激な低下と SREBP の核内移行が認められた。これらの現象は、AG1478 のマウスへの投与により完全に抑制された。さらに、LH 様作用の hCG とともに AMPK の活性化剤をマウスへ投与すると、hCG 単独投与により顆粒膜細胞で生じる INSIG-1 の消失、SREBP の活性化および Cholesterol 生合成酵素群の発現亢進を完全に抑制し、Cholesterol 合成量および Progesterone 産生量を著しく低下させることが明らかになった。したがって、本章において、排卵刺激後の顆粒膜細胞において、局所的かつ急激に発現上昇する EGF-like factors が、ERK1/2 経路を介して Glucose 代謝による AMPK の不活性化を誘導し、この不活性化された AMPK が、INSIG-1 消失とそれに伴う SREBP の賦活化を誘導することが明らかになった。さらに、この SREBP の賦活化は、Cholesterol 生合成経路の活性化を誘導し Progesterone が産生されること、これにより卵子が排卵されることを初めて明らかにした。

第四章: 総合考察

本研究の結果から、排卵期の顆粒膜細胞において、Glucose 代謝能が増大すること、これにより、INSIG-1 が消失し SREBP が活性化することが成熟卵子の排卵に極めて重要であると考えられた。顆粒膜細胞を起源とする卵丘細胞においても、Glucose 取り込みとその代謝能が高く、顆粒膜細胞および卵丘細胞における Glucose 代謝経路の活性化が、卵子の減数分裂再開と受精能・胚発生の獲得にどのように関与するかを考察した。加えて、顆粒膜細胞に発現する SREBP は、Cholesterol 生合成経路だけでなく、脂肪酸合成経路も活性化させ、卵丘細胞および卵子に供給することで、卵子成熟、排卵、受精および胚発生に必要な不可欠な

エネルギー供給, タンパク質の脂質化, 膜構造の変化に寄与することが示唆された。さらに, 本研究では, 卵胞発育期の顆粒膜細胞において, SREBP, SCAP, INSIG-1 が発現すること, その後, LH サージ後に INSIG-1 が消失し SREBP が賦活化することが Progesterone 産生と排卵に極めて重要であったことから, これらを標的とした LUF に対する診断項目の充足と不妊治療法の確立に寄与すると考えられた。最後に, 不妊症発症リスクが高い肥満や 2 型糖尿病の患者では, 卵巣において Glucose 依存的に賦活化する SREBP が, 不妊症発症の要因となることが示唆された。

謝辞

本研究の遂行にあたり、実験技術や解析方法などの技術面だけでなく、実験計画や得られた結果に対する考え方、論文執筆に至るまで、研究者として自立できるよう終始丁寧にご指導ご鞭撻を賜りました県立広島大学大学院総合学術研究科 動物生殖生理学研究室 准教授 山下泰尚 博士に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行に際し、ご教示を頂きました広島大学大学院統合生命科学研究科 教授 島田昌之 教授、県立広島大学大学院 名誉教授 堀内俊孝 博士、教授 齋藤靖和 博士、教授 稲垣匡子 博士、准教授 阿部靖之 博士、川合智子 博士に深謝申し上げます。

広島大学大学院統合生命科学研究科 特任助教 岡本麻子 博士には、実験手技や研究に関する知識を優しく丁寧にご教授頂きました。県立広島大学大学院 博士研究員 藤内慎悟 博士には、実験をお力添えいただき、日々研究に取り組む姿勢から多くのことを学ばせて頂きました。同研究室の同期である岩田玲佳 女史、尾崎美空 女史、近藤仁貴 氏、楯幸子 女史、後輩である田中里沙 女史、山岡愛実 女史、関葉月 女史、玉木梨楓 女史、矢野華梨 女史は、共に夜遅くまで研究し、研究活動の励みになりました。また、同研究室のOB、OG、後輩の方々には、マウスの管理やサンプル回収、試薬の準備や備品等、研究環境の保持にご助力頂きました。心より御礼申し上げます。

最後に9年間の大学・大学院生活を資金面だけでなく、精神面や健康管理を気遣い、見守って下さった家族に心より深く感謝申し上げます。

引用文献

Abdulrahman Alrabiah N, Simintiras CA, Evans ACO, Lonergan P, Fair T.

Biochemical alterations in the follicular fluid of bovine peri-ovulatory follicles and association with final oocyte maturation.

Reprod Fertil. 2022 Dec 1:RAF-22-0090. doi: 10.1530/RAF-22-0090. Epub ahead of print. PMID: 36547396.

Alfieri JA, Martin AD, Takeda J, Kondoh G, Myles DG, Primakoff P.

Infertility in female mice with an oocyte-specific knockout of GPI-anchored proteins.

J Cell Sci. 2003 Jun 1;116(Pt 11):2149-55. doi: 10.1242/jcs.00430. Epub 2003 Apr 8. PMID: 12692150.

Ambrosi B, Lacalandra GM, Iorga AI, De Santis T, Mugnier S, Matarrese R, Goudet G, Dell'aquila ME.

Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI.

Theriogenology. 2009 Apr 15;71(7):1093-104. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.12.002. Epub 2009 Jan 23. PMID: 19167745.

Argov N, Sklan D.

Expression of mRNA of lipoprotein receptor related protein 8, low density lipoprotein receptor, and very low density lipoprotein receptor in bovine ovarian cells during follicular development and corpus luteum formation and regression.

Mol Reprod Dev. 2004 Jun;68(2):169-75. doi: 10.1002/mrd.20072. PMID: 15095337.

Assidi M, Dufort I, Ali A, Hamel M, Algriany O, Dielemann S, Sirard MA.

Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro.

Biol Reprod. 2008 Aug;79(2):209-22. doi: 10.1095/biolreprod.108.067686. Epub 2008 Apr 16. PMID: 18417710.

Augustin R, Pocar P, Navarrete-Santos A, Wrenzycki C, Gandolfi F, Niemann H, Fischer B.

Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos.

Mol Reprod Dev. 2001 Nov;60(3):370-6. doi: 10.1002/mrd.1099. PMID: 11599048.

Azhar S, Tsai L, Maffe W, Reaven E.

Cultivation of rat granulosa cells in a serum-free chemically defined medium--a useful model to study lipoprotein metabolism.

Biochim Biophys Acta. 1988 Nov 25;963(2):139-50. doi: 10.1016/0005-2760(88)90275-5. PMID: 2848582.

Azhar S, Tsai L, Medicherla S, Chandrasekher Y, Giudice L, Reaven E.

Human granulosa cells use high density lipoprotein cholesterol for steroidogenesis.

J Clin Endocrinol Metab. 1998 Mar;83(3):983-91. doi: 10.1210/jcem.83.3.4662. PMID: 9506760.

Azmoodeh A, Pejman Manesh M, Akbari Asbagh F, Ghaseminejad A, Hamzehgardeshi Z.

Effects of Letrozole-HMG and Clomiphene-HMG on Incidence of Luteinized Unruptured Follicle Syndrome in Infertile Women Undergoing Induction Ovulation and Intrauterine Insemination: A Randomised Trial.

Glob J Health Sci. 2015 Sep 1;8(4):244-52. doi: 10.5539/gjhs.v8n4p244. PMID: 26573024; PMCID: PMC4873591.

Baltus AE, Menke DB, Hu YC, Goodheart ML, Carpenter AE, de Rooij DG, Page DC.

In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication.

Nat Genet. 2006 Dec;38(12):1430-4. doi: 10.1038/ng1919. Epub 2006 Nov 19. PMID: 17115059.

Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP.

The pattern of energy metabolism in the mouse oöcyte and zygote.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1967 Aug;58(2):560-7. doi: 10.1073/pnas.58.2.560. PMID: 5233459; PMCID: PMC335672.

BLIGH EG, DYER WJ.

A rapid method of total lipid extraction and purification.

Can J Biochem Physiol. 1959 Aug;37(8):911-7. doi: 10.1139/o59-099. PMID: 13671378.

Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, Yashiro K, Chawengsaksophak K, Wilson MJ, Rossant J, Hamada H, Koopman P.

Retinoid signaling determines germ cell fate in mice.

Science. 2006 Apr 28;312(5773):596-600. doi: 10.1126/science.1125691. Epub 2006 Mar 30. PMID:

16574820.

Brinster RL.

Oxidation of pyruvate and glucose by oocytes of the mouse and rhesus monkey.

J Reprod Fertil. 1971 Feb;24(2):187-91. doi: 10.1530/jrf.0.0240187. PMID: 4994572.

Brown MS, Radhakrishnan A, Goldstein JL.

Retrospective on Cholesterol Homeostasis: The Central Role of Scap.

Annu Rev Biochem. 2018 Jun 20;87:783-807. doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-011852. Epub 2017 Aug 25. PMID: 28841344; PMCID: PMC5828883.

Cantagrel V, Lefeber DJ.

From glycosylation disorders to dolichol biosynthesis defects: a new class of metabolic diseases.

J Inherit Metab Dis. 2011 Aug;34(4):859-67. doi: 10.1007/s10545-011-9301-0. Epub 2011 Mar 8. PMID: 21384228; PMCID: PMC3137772.

Casarini L, Crépieux P.

Molecular Mechanisms of Action of FSH.

Front Endocrinol (Lausanne). 2019 May 14;10:305. doi: 10.3389/fendo.2019.00305. PMID: 31139153; PMCID: PMC6527893.

Cetica P, Pintos L, Dalvit G, Beconi M.

Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro.

Reproduction. 2002 Nov;124(5):675-81. PMID: 12417006.

Chadt A, Al-Hasani H.

Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease.

Pflugers Arch. 2020 Sep;472(9):1273-1298. doi: 10.1007/s00424-020-02417-x. Epub 2020 Jun 26. PMID: 32591906; PMCID: PMC7462924.

Chang XL, Liu L, Wang N, Chen ZJ, Zhang C.

The function of high-density lipoprotein and low-density lipoprotein in the maintenance of mouse ovarian steroid balance.

Biol Reprod. 2017 Jan 1;97(6):862-872. doi: 10.1093/biolre/iox134. PMID: 29092018.

Chen L, Wert SE, Hendrix EM, Russell PT, Cannon M, Larsen WJ.

Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass.

Mol Reprod Dev. 1990 Jul;26(3):236-47. doi: 10.1002/mrd.1080260307. PMID: 2115793.

Cheng C, Ru P, Geng F, Liu J, Yoo JY, Wu X, Cheng X, Euthine V, Hu P, Guo JY, Lefai E, Kaur B, Nohturfft A, Ma J, Chakravarti A, Guo D.

Glucose-Mediated N-glycosylation of SCAP Is Essential for SREBP-1 Activation and Tumor Growth. Cancer Cell.

2015 Nov 9;28(5):569-581. doi: 10.1016/j.ccell.2015.09.021. PMID: 26555173; PMCID: PMC4643405.

Cherian-Shaw M, Puttabyatappa M, Greason E, Rodriguez A, VandeVoort CA, Chaffin CL.

Expression of scavenger receptor-BI and low-density lipoprotein receptor and differential use of lipoproteins to support early steroidogenesis in luteinizing macaque granulosa cells.

Endocrinology. 2009 Feb;150(2):957-65. doi: 10.1210/en.2008-0619. Epub 2008 Oct 1. PMID: 18832102; PMCID: PMC2646541.

Colvin JS, Green RP, Schmahl J, Capel B, Ornitz DM.

Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9.

Cell. 2001 Mar 23;104(6):875-89. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00284-7. PMID: 11290325.

Conaghan J, Handyside AH, Winston RM, Leese HJ.

Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro.

J Reprod Fertil. 1993 Sep;99(1):87-95. doi: 10.1530/jrf.0.0990087. PMID: 8283458.

Cowan RG, Quirk SM.

Cells responding to hedgehog signaling contribute to the theca of ovarian follicles.

Reproduction. 2021 Apr;161(4):437-448. doi: 10.1530/REP-20-0471. PMID: 33720037; PMCID: PMC8062058.

Dan-Goor M, Sasson S, Davarashvili A, Almagor M.

Expression of glucose transporter and glucose uptake in human oocytes and preimplantation embryos.

Hum Reprod. 1997 Nov;12(11):2508-10. doi: 10.1093/humrep/12.11.2508. PMID: 9436695.

Davis BJ, Lennard DE, Lee CA, Tiano HF, Morham SG, Wetsel WC, Langenbach R.

Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1beta.

Endocrinology. 1999 Jun;140(6):2685-95. doi: 10.1210/endo.140.6.6715. PMID: 10342859.

De Cian MC, Gregoire EP, Le Rolle M, Lachambre S, Mondin M, Bell S, Guigon CJ, Chassot AA, Chaboissier MC.

R-spondin2 signaling is required for oocyte-driven intercellular communication and follicular growth.

Cell Death Differ. 2020 Oct;27(10):2856-2871. doi: 10.1038/s41418-020-0547-7. Epub 2020 Apr 27. PMID: 32341451; PMCID: PMC7493947.

Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone-Corsi P.

Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Nov 10;95(23):13612-7. doi: 10.1073/pnas.95.23.13612. PMID: 9811848; PMCID: PMC24867.

DiNapoli L, Batchvarov J, Capel B.

FGF9 promotes survival of germ cells in the fetal testis.

Development. 2006 Apr;133(8):1519-27. doi: 10.1242/dev.02303. Epub 2006 Mar 15. PMID: 16540514.

Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM.

Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis.

Nature. 1996 Oct 10;383(6600):531-5. doi: 10.1038/383531a0. PMID: 8849725.

Downs SM, Humpherson PG, Leese HJ.

Meiotic induction in cumulus cell-enclosed mouse oocytes: involvement of the pentose phosphate pathway.

Biol Reprod. 1998 Apr;58(4):1084-94. doi: 10.1095/biolreprod58.4.1084. PMID: 9546744.

Downs SM, Mosey JL, Klinger J.

Fatty acid oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes.

Mol Reprod Dev. 2009 Sep;76(9):844-53. doi: 10.1002/mrd.21047. PMID: 19455666; PMCID: PMC3995453.

Downs SM, Utecht AM.

Metabolism of radiolabeled glucose by mouse oocytes and oocyte-cumulus cell complexes.

Biol Reprod. 1999 Jun;60(6):1446-52. doi: 10.1095/biolreprod60.6.1446. PMID: 10330104.

Downs SM, Ya R, Davis CC.

Role of AMPK throughout meiotic maturation in the mouse oocyte: evidence for promotion of polar body formation and suppression of premature activation.

Mol Reprod Dev. 2010 Oct;77(10):888-99. doi: 10.1002/mrd.21229. PMID: 20830737; PMCID: PMC3995477.

Dunning KR, Watson LN, Sharkey DJ, Brown HM, Norman RJ, Thompson JG, Robker RL, Russell DL.

Molecular filtration properties of the mouse expanded cumulus matrix: controlled supply of metabolites and extracellular signals to cumulus cells and the oocyte.

Biol Reprod. 2012 Oct 18;87(4):89. doi: 10.1095/biolreprod.111.096271. PMID: 22837478.

Endo T, Mikedis MM, Nicholls PK, Page DC, de Rooij DG.

Retinoic Acid and Germ Cell Development in the Ovary and Testis.

Biomolecules. 2019 Nov 24;9(12):775. doi: 10.3390/biom9120775. PMID: 31771306; PMCID: PMC6995559.

Engelking LJ, Kuriyama H, Hammer RE, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL, Liang G.

Overexpression of Insig-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis.

J Clin Invest. 2004 Apr;113(8):1168-75. doi: 10.1172/JCI20978. PMID: 15085196; PMCID: PMC385408.

Engelking LJ, Liang G, Hammer RE, Takaishi K, Kuriyama H, Evers BM, Li WP, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS.

Schoenheimer effect explained--feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins.

J Clin Invest. 2005 Sep;115(9):2489-98. doi: 10.1172/JCI25614. Epub 2005 Aug 11. PMID: 16100574; PMCID: PMC1184040.

Fan HY, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS.

MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility.

Science. 2009 May 15;324(5929):938-41. doi: 10.1126/science.1171396. PMID: 19443782; PMCID: PMC2847890.

Ferguson EM, Leese HJ.

A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development.

Mol Reprod Dev. 2006 Sep;73(9):1195-201. doi: 10.1002/mrd.20494. PMID: 16804881.

Fraser HM.

Regulation of the ovarian follicular vasculature.

Reprod Biol Endocrinol. 2006 Apr 12;4:18. doi: 10.1186/1477-7827-4-18. PMID: 16611363; PMCID: PMC1459163.

Fujita M, Kinoshita T.

GPI-anchor remodeling: potential functions of GPI-anchors in intracellular trafficking and membrane dynamics.

Biochim Biophys Acta. 2012 Aug;1821(8):1050-8. doi: 10.1016/j.bbali.2012.01.004. Epub 2012 Jan 11. PMID: 22265715.

Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J.

Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells.

Fertil Steril. 1996 Feb;65(2):349-53. doi: 10.1016/s0015-0282(16)58097-2. PMID: 8566260.

Gaytán F, Bellido C, Gaytán M, Morales C, Sánchez-Criado JE.

Differential effects of RU486 and indomethacin on follicle rupture during the ovulatory process in the rat.

Biol Reprod. 2003 Jul;69(1):99-105. doi: 10.1095/biolreprod.102.013755. Epub 2003 Feb 19. PMID: 12606368.

Gebhardt KM, Feil DK, Dunning KR, Lane M, Russell DL.

Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer.

Fertil Steril. 2011 Jul;96(1):47-52.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.04.033. Epub 2011 May 14. PMID: 21575950.

Ghosh I, Chattopadhyaya R, Kumar V, Chakravarty BN, Datta K.

Hyaluronan binding protein-1: a modulator of sperm-oocyte interaction.

Soc Reprod Fertil Suppl. 2007;63:539-43. PMID: 17566298.

Ginsberg L, Hillman N.

Shifts in ATP synthesis during preimplantation stages of mouse embryos.

J Reprod Fertil. 1975 Apr;43(1):83-90. doi: 10.1530/jrf.0.0430083. PMID: 1168712.

Grummer RR, Carroll DJ.

A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function.

J Anim Sci. 1988 Dec;66(12):3160-73. doi: 10.2527/jas1988.66123160x. PMID: 3068221.

Gwynne JT, Mahaffee DD.

Rat adrenal uptake and metabolism of high density lipoprotein cholesteryl ester.

J Biol Chem. 1989 May 15;264(14):8141-50. PMID: 2542267.

Ha NT, Lee CH.

Roles of Farnesyl-Diphosphate Farnesyltransferase 1 in Tumour and Tumour Microenvironments.

Cells. 2020 Oct 25;9(11):2352. doi: 10.3390/cells9112352. PMID: 33113804; PMCID: PMC7693003.

Haas JT, Miao J, Chanda D, Wang Y, Zhao E, Haas ME, Hirschey M, Vaitheesvaran B, Farese RV Jr, Kurland IJ, Graham M, Crooke R, Fougelle F, Biddinger SB.

Hepatic insulin signaling is required for obesity-dependent expression of SREBP-1c mRNA but not for feeding-dependent expression.

Cell Metab. 2012 Jun 6;15(6):873-84. doi: 10.1016/j.cmet.2012.05.002. PMID: 22682225; PMCID: PMC3383842.

Habara O, Logan CY, Kanai-Azuma M, Nusse R, Takase HM.

WNT signaling in pre-granulosa cells is required for ovarian folliculogenesis and female fertility.

Development. 2021 May 1;148(9):dev198846. doi: 10.1242/dev.198846. Epub 2021 Apr 29. PMID: 33914868; PMCID: PMC8126407.

Han Y, Hu Z, Cui A, Liu Z, Ma F, Xue Y, Liu Y, Zhang F, Zhao Z, Yu Y, Gao J, Wei C, Li J, Fang J, Li J, Fan JG, Song BL, Li Y.

Post-translational regulation of lipogenesis via AMPK-dependent phosphorylation of insulin-

induced gene.

Nat Commun. 2019 Feb 7;10(1):623. doi: 10.1038/s41467-019-08585-4. PMID: 30733434; PMCID: PMC6367348.

Hao T, Zhang P, Hao H, Du W, Pang Y, Zhao S, Zou H, Zhu H, Yu W, Li S, Zhao X.

The combination treatment of cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin and methyl- β -cyclodextrin significantly improves the fertilization capacity of vitrified bovine oocytes by protecting fertilization protein JUNO.

Reprod Domest Anim. 2021 Mar;56(3):519-530. doi: 10.1111/rda.13890. Epub 2021 Jan 18. PMID: 33405303.

Harris SE, Leese HJ, Gosden RG, Picton HM.

Pyruvate and oxygen consumption throughout the growth and development of murine oocytes.

Mol Reprod Dev. 2009 Mar;76(3):231-8. doi: 10.1002/mrd.20945. PMID: 18618608.

Hasty AH, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Perrey S, Yoshikawa T, Osuga J, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N.

Sterol regulatory element-binding protein-1 is regulated by glucose at the transcriptional level.

J Biol Chem. 2000 Oct 6;275(40):31069-77. doi: 10.1074/jbc.M003335200. PMID: 10913129.

Hillier SG, Yong EL, Illingworth PJ, Baird DT, Schwall RH, Mason AJ.

Effect of recombinant inhibin on androgen synthesis in cultured human thecal cells.

Mol Cell Endocrinol. 1991 Feb;75(2):R1-6. doi: 10.1016/0303-7207(91)90234-j. Erratum in: Mol Cell Endocrinol 1991 Aug;79(1-3):177. PMID: 2050269.

Hizaki H, Segi E, Sugimoto Y, Hirose M, Saji T, Ushikubi F, Matsuoka T, Noda Y, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S, Ichikawa A.

Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(2).

Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Aug 31;96(18):10501-6. doi: 10.1073/pnas.96.18.10501. PMID: 10468638; PMCID: PMC17918.

Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H.

Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 May 26;95(11):5987-92. doi: 10.1073/pnas.95.11.5987. PMID: 9600904; PMCID: PMC27572.

Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, Goldstein JL.

Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Oct 14;100(21):12027-32. doi: 10.1073/pnas.1534923100. Epub 2003 Sep 25. PMID: 14512514; PMCID: PMC218707.

Horton JD, Shimomura I.

Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis.

Curr Opin Lipidol. 1999 Apr;10(2):143-50. doi: 10.1097/00041433-199904000-00008. PMID: 10327282.

Hua X, Nohturfft A, Goldstein JL, Brown MS.

Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein.

Cell. 1996 Nov 1;87(3):415-26. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81362-8. PMID: 8898195.

Hunter RW, Hughey CC, Lantier L, Sundelin EI, Peggie M, Zeqiraj E, Sicheri F, Jessen N, Wasserman DH, Sakamoto K.

Metformin reduces liver glucose production by inhibition of fructose-1-6-bisphosphatase.

Nat Med. 2018 Sep;24(9):1395-1406. doi: 10.1038/s41591-018-0159-7. Epub 2018 Aug 27. PMID: 30150719; PMCID: PMC6207338.

Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M.

The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs.

Nature. 2005 Mar 10;434(7030):234-8. doi: 10.1038/nature03362. PMID: 15759005.

Jaldin-Fincati JR, Pavarotti M, Frendo-Cumbo S, Bilan PJ, Klip A.

Update on GLUT4 Vesicle Traffic: A Cornerstone of Insulin Action.

Trends Endocrinol Metab. 2017 Aug;28(8):597-611. doi: 10.1016/j.tem.2017.05.002. Epub 2017 Jun 8. PMID: 28602209.

Jeong WJ, Cho SJ, Lee HS, Deb GK, Lee YS, Kwon TH, Kong IK.

Effect of cytoplasmic lipid content on in vitro developmental efficiency of bovine IVP embryos.

Theriogenology. 2009 Sep 1;72(4):584-9. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.04.015. Epub 2009 Jun 6. PMID: 19501898.

Kanayama K, Sankai T, Nariai K, Endo T, Sakuma Y.

Effects of anti-progesterone compound RU486 on ovulation in immature mice treated with PMSG/hCG.

Res Exp Med (Berl). 1994;194(4):217-20. doi: 10.1007/BF02576382. PMID: 7800930.

Kawashima I, Umehara T, Noma N, Kawai T, Shitanaka M, Richards JS, Shimada M.

Targeted disruption of Nrg1 in granulosa cells alters the temporal progression of oocyte maturation.

Mol Endocrinol. 2014 May;28(5):706-21. doi: 10.1210/me.2013-1316. Epub 2014 Mar 20. PMID: 24650175; PMCID: PMC4004775.

Killick S, Elstein M.

Pharmacologic production of luteinized unruptured follicles by prostaglandin synthetase inhibitors.

Fertil Steril. 1987 May;47(5):773-7. doi: 10.1016/s0015-0282(16)59163-8. PMID: 3552753.

Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, Chaboissier MC, Poulat F, Behringer RR, Lovell-Badge R, Capel B.

Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination.

PLoS Biol. 2006 Jun;4(6):e187. doi: 10.1371/journal.pbio.0040187. Epub 2006 May 23. PMID: 16700629; PMCID: PMC1463023.

Kinoshita T.

Biosynthesis and biology of mammalian GPI-anchored proteins.

Open Biol. 2020 Mar;10(3):190290. doi: 10.1098/rsob.190290. Epub 2020 Mar 11. PMID: 32156170; PMCID: PMC7125958.

Ko C, Gieske MC, Al-Alem L, Hahn Y, Su W, Gong MC, Iglarz M, Koo Y.

Endothelin-2 in ovarian follicle rupture. Endocrinology.

2006 Apr;147(4):1770-9. doi: 10.1210/en.2005-1228. Epub 2006 Jan 12. PMID: 16410304.

Ko PJ, Dixon SJ.

Protein palmitoylation and cancer.

EMBO Rep. 2018 Oct;19(10):e46666. doi: 10.15252/embr.201846666. Epub 2018 Sep 19. PMID: 30232163; PMCID: PMC6172454.

Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC.

Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Feb 21;103(8):2474-9. doi: 10.1073/pnas.0510813103. Epub 2006 Feb 6. PMID: 16461896; PMCID: PMC1413806.

Krause N, Wegner A.

Fructose Metabolism in Cancer. Cells.

2020 Dec 8;9(12):2635. doi: 10.3390/cells9122635. PMID: 33302403; PMCID: PMC7762580.

Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM.

Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility.

Nat Genet. 1997 Feb;15(2):201-4. doi: 10.1038/ng0297-201. PMID: 9020850.

Lai WA, Yeh YT, Lee MT, Wu LS, Ke FC, Hwang JJ.

Ovarian granulosa cells utilize scavenger receptor SR-BI to evade cellular cholesterol homeostatic control for steroid synthesis.

J Lipid Res. 2013 Feb;54(2):365-78. doi: 10.1194/jlr.M030239. Epub 2012 Nov 28. PMID: 23197320; PMCID: PMC3588866.

Lanner JT, Georgiou DK, Dagnino-Acosta A, Ainbinder A, Cheng Q, Joshi AD, Chen Z, Yarotsky V, Oakes JM, Lee CS, Monroe TO, Santillan A, Dong K, Goodyear L, Ismailov II, Rodney GG, Dirksen RT, Hamilton SL.

AICAR prevents heat-induced sudden death in RyR1 mutant mice independent of AMPK activation.

Nat Med. 2012 Jan 8;18(2):244-51. doi: 10.1038/nm.2598. PMID: 22231556; PMCID: PMC3274651.

Leavens KF, Birnbaum MJ.

Insulin signaling to hepatic lipid metabolism in health and disease.

Crit Rev Biochem Mol Biol. 2011 Jun;46(3):200-15. doi: 10.3109/10409238.2011.562481. Epub 2011 Apr 5. PMID: 21599535.

Lee JN, Gong Y, Zhang X, Ye J.

Proteasomal degradation of ubiquitinated Insig proteins is determined by serine residues flanking ubiquitinated lysines.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 28;103(13):4958-63. doi: 10.1073/pnas.0600422103. Epub 2006 Mar 20. PMID: 16549805; PMCID: PMC1405624.

Lee JN, Song B, DeBose-Boyd RA, Ye J.

Sterol-regulated degradation of Insig-1 mediated by the membrane-bound ubiquitin ligase gp78.

J Biol Chem. 2006 Dec 22;281(51):39308-15. doi: 10.1074/jbc.M608999200. Epub 2006 Oct 16. PMID: 17043353.

Li C, Liu Z, Li W, Zhang L, Zhou J, Sun M, Zhou J, Yao W, Zhang X, Wang H, Tao J, Shen M, Liu H.

The FSH-HIF-1 α -VEGF Pathway Is Critical for Ovulation and Oocyte Health but Not Necessary for Follicular Growth in Mice.

Endocrinology. 2020 Apr 1;161(4):bqaa038. doi: 10.1210/endocr/bqaa038. PMID: 32141513.

Lingwood D, Simons K.

Lipid rafts as a membrane-organizing principle.

Science. 2010 Jan 1;327(5961):46-50. doi: 10.1126/science.1174621. PMID: 20044567.

Liu C, Rodriguez KF, Brown PR, Yao HH.

Reproductive, Physiological, and Molecular Outcomes in Female Mice Deficient in Dhh and Ihh.

Endocrinology. 2018 Jul 1;159(7):2563-2575. doi: 10.1210/en.2018-00095. PMID: 29788357; PMCID: PMC6287595.

Liu TF, Tang JJ, Li PS, Shen Y, Li JG, Miao HH, Li BL, Song BL.

Ablation of gp78 in liver improves hyperlipidemia and insulin resistance by inhibiting SREBP to decrease lipid biosynthesis.

Cell Metab. 2012 Aug 8;16(2):213-25. doi: 10.1016/j.cmet.2012.06.014. PMID: 22863805.

Liu Z, Rudd MD, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Fan HY, Zeleznik AJ, Richards JS.

FSH and FOXO1 regulate genes in the sterol/steroid and lipid biosynthetic pathways in granulosa cells.

Mol Endocrinol. 2009 May;23(5):649-61. doi: 10.1210/me.2008-0412. Epub 2009 Feb 5. Erratum in: Mol Endocrinol. 2009 Sep;23(9):1522. PMID: 19196834; PMCID: PMC2675958.

Loutradis D, Bletsas R, Aravantinos L, Kallianidis K, Michalas S, Psychoyos A.

Preovulatory effects of the progesterone antagonist mifepristone (RU486) in mice.

Hum Reprod. 1991 Oct;6(9):1238-40. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137519. PMID: 1752924.

Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA Jr, Shyamala G, Conneely

OM, O'Malley BW.

Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities.

Genes Dev. 1995 Sep 15;9(18):2266-78. doi: 10.1101/gad.9.18.2266. PMID: 7557380.

Marei WF, Wathes DC, Fouladi-Nashta AA.

The effect of linolenic Acid on bovine oocyte maturation and development.

Biol Reprod. 2009 Dec;81(6):1064-72. doi: 10.1095/biolreprod.109.076851. Epub 2009 Jul 8. PMID: 19587335.

Marei WFA, Alvarez MA, Van Hoeck V, Gutierrez-Adan A, Bols PEJ, Leroy JLMR.

Effect of nutritionally induced hyperlipidaemia on in vitro bovine embryo quality depends on the type of major fatty acid in the diet.

Reprod Fertil Dev. 2017b Sep;29(9):1856-1867. doi: 10.1071/RD16297. PMID: 27832581.

Marei WFA, De Bie J, Mohey-Elsaeed O, Wydooghe E, Bols PEJ, Leroy JLMR.

Alpha-linolenic acid protects the developmental capacity of bovine cumulus-oocyte complexes matured under lipotoxic conditions in vitro.

Biol Reprod. 2017a Jun 1;96(6):1181-1196. doi: 10.1093/biolre/iox046. PMID: 28520897.

Marik J, Hulka J.

Luteinized unruptured follicle syndrome: a subtle cause of infertility.

Fertil Steril. 1978 Mar;29(3):270-4. doi: 10.1016/s0015-0282(16)43151-1. PMID: 147778.

Matson PL, Collins WP.

Aromatase activity in ovarian follicles of the golden hamster.

J Reprod Fertil. 1984 Sep;72(1):101-5. doi: 10.1530/jrf.0.0720101. PMID: 6471042.

Matsuda M, Korn BS, Hammer RE, Moon YA, Komuro R, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS, Shimomura I.

SREBP cleavage-activating protein (SCAP) is required for increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation.

Genes Dev. 2001 May 15;15(10):1206-16. doi: 10.1101/gad.891301. PMID: 11358865; PMCID: PMC313801.

McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS, Speake BK.

Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona

pellucida.

J Reprod Fertil. 2000 Jan;118(1):163-70. PMID: 10793638.

Menon B, Gulappa T, Menon KM.

miR-122 Regulates LH Receptor Expression by Activating Sterol Response Element Binding Protein in Rat Ovaries.

Endocrinology. 2015 Sep;156(9):3370-80. doi: 10.1210/en.2015-1121. Epub 2015 Jun 30. PMID: 26125464; PMCID: PMC4541618.

Merath KM, Chang B, Dubielzig R, Jeannotte R, Sidjanin DJ.

A spontaneous mutation in Srebf2 leads to cataracts and persistent skin wounds in the lens opacity 13 (lop13) mouse.

Mamm Genome. 2011 Dec;22(11-12):661-73. doi: 10.1007/s00335-011-9354-2. Epub 2011 Aug 21. PMID: 21858719; PMCID: PMC3251904.

Murata M, Tamura A, Kodama H, Hirano H, Takahashi O, Tanaka T.

Possible involvement of very low density lipoproteins in steroidogenesis in the human ovary.

Mol Hum Reprod. 1998 Aug;4(8):797-801. doi: 10.1093/molehr/4.8.797. PMID: 9733438.

Nagaoka SI, Nakaki F, Miyauchi H, Nosaka Y, Ohta H, Yabuta Y, Kurimoto K, Hayashi K, Nakamura T, Yamamoto T, Saitou M.

ZGLP1 is a determinant for the oogenic fate in mice.

Science. 2020 Mar 6;367(6482):eaaw4115. doi: 10.1126/science.aaw4115. Epub 2020 Feb 13. PMID: 32054698.

Nakanishi T, Okamoto A, Ikeda M, Tate S, Sumita M, Kawamoto R, Tonai S, Lee JY, Shimada M, Yamashita Y.

Cortisol induces follicle regression, while FSH prevents cortisol-induced follicle regression in pigs.

Mol Hum Reprod. 2021 Jul 1;27(7):gaab038. doi: 10.1093/molehr/gaab038. PMID: 34057472.

Nandi S, Girish Kumar V, Manjunatha BM, Ramesh HS, Gupta PS.

Follicular fluid concentrations of glucose, lactate and pyruvate in buffalo and sheep, and their effects on cultured oocytes, granulosa and cumulus cells.

Theriogenology. 2008 Jan 15;69(2):186-96. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.08.036. Epub 2007 Oct 24. PMID: 17950822.

Nishimoto H, Matsutani R, Yamamoto S, Takahashi T, Hayashi KG, Miyamoto A, Hamano S, Tetsuka M.

Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1, 3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum.

J

Endocrinol. 2006 Jan;188(1):111-9. doi: 10.1677/joe.1.06210. PMID: 16394180.

Noma N, Kawashima I, Fan HY, Fujita Y, Kawai T, Tomoda Y, Mihara T, Richards JS, Shimada M.

LH-induced neuregulin 1 (NRG1) type III transcripts control granulosa cell differentiation and oocyte maturation.

Mol Endocrinol. 2011 Jan;25(1):104-16. doi: 10.1210/me.2010-0225. Epub 2010 Nov 3. PMID: 21047912; PMCID: PMC3089030.

Norris RP, Freudzon M, Mehlmann LM, Cowan AE, Simon AM, Paul DL, Lampe PD, Jaffe LA.

Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption.

Development. 2008 Oct;135(19):3229-38. doi: 10.1242/dev.025494. PMID: 18776144; PMCID: PMC2572224.

O'Brien JK, Dwarthe D, Ryan JP, Maxwell WM, Evans G.

Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep.

Reprod Fertil Dev. 1996;8(7):1029-37. doi: 10.1071/rd9961029. PMID: 8916278.

Okamoto A, Ikeda M, Kaneko A, Kishida C, Shimada M, Yamashita Y.

The Novel Pig In Vitro Maturation System to Improve Developmental Competence of Oocytes Derived from Atretic Non-Vascularized Follicle.

Biol Reprod. 2016 Oct 1;95(4):7. doi: 10.1095/biolreprod.116.138982. Epub 2016 Aug 17. PMID: 27535959.

Park CJ, Lin PC, Zhou S, Barakat R, Bashir ST, Choi JM, Cacioppo JA, Oakley OR, Duffy DM, Lydon JP, Ko CJ.

Progesterone Receptor Serves the Ovary as a Trigger of Ovulation and a Terminator of Inflammation.

Cell Rep. 2020 Apr 14;31(2):107496. doi: 10.1016/j.celrep.2020.03.060. PMID: 32294429; PMCID: PMC7211423.

Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M.

EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle.

Science. 2004 Jan 30;303(5658):682-4. doi: 10.1126/science.1092463. Epub 2004 Jan 15. PMID: 14726596.

Pisani LF, Antonini S, Pocar P, Ferrari S, Brevini TA, Rhind SM, Gandolfi F.

Effects of pre-mating nutrition on mRNA levels of developmentally relevant genes in sheep oocytes and granulosa cells.

Reproduction. 2008 Sep;136(3):303-12. doi: 10.1530/REP-07-0394. Epub 2008 May 30. PMID: 18515315.

Prates EG, Nunes JT, Pereira RM.

A role of lipid metabolism during cumulus-oocyte complex maturation: impact of lipid modulators to improve embryo production.

Mediators Inflamm. 2014;2014:692067. doi: 10.1155/2014/692067. Epub 2014 Mar 6. PMID: 24733963; PMCID: PMC3964899.

Rajapaksha WR, McBride M, Robertson L, O'Shaughnessy PJ.

Sequence of the bovine HDL-receptor (SR-BI) cDNA and changes in receptor mRNA expression during granulosa cell luteinization in vivo and in vitro.

Mol Cell Endocrinol. 1997 Oct 31;134(1):59-67. doi: 10.1016/s0303-7207(97)00173-1. PMID: 9406850.

Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM.

NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression.

Science. 2004 Aug 20;305(5687):1157-9. doi: 10.1126/science.1099755. PMID: 15326356.

Rajkumar K, Klingshorn P, Chedrese PJ, Murphy BD.

Prolactin, LH, and estradiol-17 beta in utilization of lipoprotein substrate by porcine granulosa cells in vitro.

Can J Physiol Pharmacol. 1988 May;66(5):561-6. doi: 10.1139/y88-086. PMID: 3416226.

Ranganathan S, Bharadwaj A, Datta K.

Hyaluronan mediates sperm motility by enhancing phosphorylation of proteins including hyaluronan binding protein.

Cell Mol Biol Res. 1995;41(5):467-76. PMID: 8867795.

Ranganathan S, Ganguly AK, Datta K.

Evidence for presence of hyaluronan binding protein on spermatozoa and its possible involvement in sperm function.

Mol Reprod Dev. 1994 May;38(1):69-76. doi: 10.1002/mrd.1080380112. PMID: 7519432.

Rawson RB, Zelenski NG, Nijhawan D, Ye J, Sakai J, Hasan MT, Chang TY, Brown MS, Goldstein JL.

Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs.

Mol Cell. 1997 Dec;1(1):47-57. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80006-4. PMID: 9659902.

Reaven E, Tsai L, Azhar S.

Cholesterol uptake by the 'selective' pathway of ovarian granulosa cells: early intracellular events.

J Lipid Res. 1995 Jul;36(7):1602-17. PMID: 7595083.

Reaven E, Zhan L, Nomoto A, Leers-Sucheta S, Azhar S.

Expression and microvillar localization of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and selective cholesteryl ester uptake in Leydig cells from rat testis.

J Lipid Res. 2000 Mar;41(3):343-56. PMID: 10706582.

Ren Y, Cowan RG, Migone FF, Quirk SM.

Overactivation of hedgehog signaling alters development of the ovarian vasculature in mice.

Biol Reprod. 2012 Jun 7;86(6):174. doi: 10.1095/biolreprod.112.099176. PMID: 22402963; PMCID: PMC3386146.

Richani D, Dunning KR, Thompson JG, Gilchrist RB.

Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus cells: essential role in determining oocyte developmental competence.

Hum Reprod Update. 2021 Jan 4;27(1):27-47. doi: 10.1093/humupd/dmaa043. PMID: 33020823.

Richani D, Sutton-McDowall ML, Frank LA, Gilchrist RB, Thompson JG.

Effect of epidermal growth factor-like peptides on the metabolism of in vitro- matured mouse oocytes and cumulus cells.

Biol Reprod. 2014 Mar 6;90(3):49. doi: 10.1095/biolreprod.113.115311. PMID: 24451986.

Richards JS, Ascoli M.

Endocrine, Paracrine, and Autocrine Signaling Pathways That Regulate Ovulation.

Trends Endocrinol Metab. 2018 May;29(5):313-325. doi: 10.1016/j.tem.2018.02.012. Epub 2018 Mar 27. PMID: 29602523.

Rico C, Dodelet-Devillers A, Paquet M, Tsoi M, Lapointe E, Carmeliet P, Boerboom D.

HIF1 activity in granulosa cells is required for FSH-regulated Vegfa expression and follicle survival in mice.

Biol Reprod. 2014 Jun;90(6):135. doi: 10.1095/biolreprod.113.115634. Epub 2014 May 22. PMID: 24855100.

Roberts R, Stark J, Iatropoulou A, Becker DL, Franks S, Hardy K.

Energy substrate metabolism of mouse cumulus-oocyte complexes: response to follicle-stimulating hormone is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway and is associated with oocyte maturation.

Biol Reprod. 2004 Jul;71(1):199-209. doi: 10.1095/biolreprod.103.023549. Epub 2004 Mar 17. PMID: 15028625.

Robker RL, Akison LK, Bennett BD, Thrupp PN, Chura LR, Russell DL, Lane M, Norman RJ.

Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women.

J Clin Endocrinol Metab. 2009 May;94(5):1533-40. doi: 10.1210/jc.2008-2648. Epub 2009 Feb 17. PMID: 19223519.

Robker RL, Richards JS.

Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1.

Mol Endocrinol. 1998 Jul;12(7):924-40. doi: 10.1210/mend.12.7.0138. PMID: 9658398.

Robker RL, Russell DL, Espey LL, Lydon JP, O'Malley BW, Richards JS.

Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Apr 25;97(9):4689-94. doi: 10.1073/pnas.080073497. PMID: 10781075; PMCID: PMC18294.

Rong S, McDonald JG, Engelking LJ.

Cholesterol auxotrophy and intolerance to ezetimibe in mice with SREBP-2 deficiency in the intestine.

J Lipid Res. 2017 Oct;58(10):1988-1998. doi: 10.1194/jlr.M077610. Epub 2017 Jun 19. PMID: 28630260; PMCID: PMC5625122.

Rui L.

Energy metabolism in the liver.

Compr Physiol. 2014 Jan;4(1):177-97. doi: 10.1002/cphy.c130024. PMID: 24692138; PMCID: PMC4050641.

Sakai J, Nohturfft A, Goldstein JL, Brown MS.

Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies.

J Biol Chem. 1998 Mar 6;273(10):5785-93. doi: 10.1074/jbc.273.10.5785. PMID: 9488713.

Saltiel AR.

New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes.

Cell. 2001 Feb 23;104(4):517-29. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00239-2. PMID: 11239409.

Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC.

Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification.

J Biol Chem. 1989 Aug 15;264(23):13840-7. PMID: 2503506.

Sánchez-Criado JE, Bellido C, Galiot F, López FJ, Gaytán F.

A possible dual mechanism of the anovulatory action of antiprogestosterone RU486 in the rat.

Biol Reprod. 1990 May-Jun;42(5-6):877-86. doi: 10.1095/biolreprod42.6.877. PMID: 2116924.

Sanchez-Lazo L, Brisard D, Elis S, Maillard V, Uzbekov R, Labas V, Desmarchais A, Papillier P, Monget P, Uzbekova S.

Fatty acid synthesis and oxidation in cumulus cells support oocyte maturation in bovine.

Mol Endocrinol. 2014 Sep;28(9):1502-21. doi: 10.1210/me.2014-1049. Epub 2014 Jul 24. PMID: 25058602; PMCID: PMC5414796.

Sano H, Nakamura A, Yamane M, Niwa H, Nishimura T, Araki K, Takemoto K, Ishiguro KI, Aoki H, Kato Y, Kojima M.

The polyol pathway is an evolutionarily conserved system for sensing glucose uptake.

PLoS Biol. 2022 Jun 10;20(6):e3001678. doi: 10.1371/journal.pbio.3001678. PMID: 35687590; PMCID: PMC9223304.

Sargent KM, Lu N, Clopton DT, Pohlmeier WE, Brauer VM, Ferrara N, Silversides DW, Cupp AS.

Loss of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) isoforms in granulosa cells using pDmrt-1-Cre or Amhr2-Cre reduces fertility by arresting follicular development and by reducing litter size in female mice.

PLoS One. 2015 Feb 6;10(2):e0116332. doi: 10.1371/journal.pone.0116332. PMID: 25658474; PMCID: PMC4320103.

Sekar N, Garmey JC, Veldhuis JD.

Mechanisms underlying the steroidogenic synergy of insulin and luteinizing hormone in porcine granulosa cells: joint amplification of pivotal sterol-regulatory genes encoding the low-density lipoprotein (LDL) receptor, steroidogenic acute regulatory (stAR) protein and cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc) enzyme.

Mol Cell Endocrinol. 2000 Jan 25;159(1-2):25-35. doi: 10.1016/s0303-7207(99)00203-8. PMID: 10687849.

Sekido R, Lovell-Badge R.

Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer.

Nature. 2008 Jun 12;453(7197):930-4. doi: 10.1038/nature06944. Epub 2008 May 4. Erratum in: Nature. 2008 Dec 11;456(7223):824. PMID: 18454134.

Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Richards JS.

Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor.

Mol Endocrinol. 2006 Jun;20(6):1352-65. doi: 10.1210/me.2005-0504. Epub 2006 Mar 16. PMID: 16543407.

Shimada M, Yanai Y, Okazaki T, Noma N, Kawashima I, Mori T, Richards JS.

Hyaluronan fragments generated by sperm-secreted hyaluronidase stimulate cytokine/chemokine production via the TLR2 and TLR4 pathway in cumulus cells of ovulated COCs, which may enhance fertilization.

Development. 2008 Jun;135(11):2001-11. doi: 10.1242/dev.020461. Epub 2008 Apr 23. PMID: 18434414.

Shimada M, Yanai Y, Okazaki T, Yamashita Y, Sriraman V, Wilson MC, Richards JS.

Synaptosomal-associated protein 25 gene expression is hormonally regulated during ovulation and is involved in cytokine/chemokine exocytosis from granulosa cells.

Mol Endocrinol. 2007 Oct;21(10):2487-502. doi: 10.1210/me.2007-0042. Epub 2007 Jun 26. PMID: 17595323.

Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS, Goldstein JL.

Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a.

J Clin Invest. 1996 Oct 1;98(7):1575-84. doi: 10.1172/JCI118951. PMID: 8833906; PMCID: PMC507590.

Shimano H, Shimomura I, Hammer RE, Herz J, Goldstein JL, Brown MS, Horton JD.

Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene.

J Clin Invest. 1997 Oct 15;100(8):2115-24. doi: 10.1172/JCI119746. PMID: 9329978; PMCID: PMC508404.

Shimano H.

Sterol regulatory element-binding protein family as global regulators of lipid synthetic genes in energy metabolism.

Vitam Horm. 2002;65:167-94. doi: 10.1016/s0083-6729(02)65064-2. PMID: 12481547.

Shimano H.

Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes.

Prog Lipid Res. 2001 Nov;40(6):439-52. doi: 10.1016/s0163-7827(01)00010-8. PMID: 11591434.

Song BL, Sever N, DeBose-Boyd RA.

Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with Insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase.

Mol Cell. 2005 Sep 16;19(6):829-40. doi: 10.1016/j.molcel.2005.08.009. PMID: 16168377.

Soyal SM, Amleh A, Dean J.

FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation.

Development. 2000 Nov;127(21):4645-54. doi: 10.1242/dev.127.21.4645. PMID: 11023867.

Spicer LJ, Sudo S, Aad PY, Wang LS, Chun SY, Ben-Shlomo I, Klein C, Hsueh AJ.

The hedgehog-patched signaling pathway and function in the mammalian ovary: a novel role for hedgehog proteins in stimulating proliferation and steroidogenesis of theca cells.

Reproduction. 2009 Aug;138(2):329-39. doi: 10.1530/REP-08-0317. Epub 2009 May 11. PMID: 19433502.

Steeves TE, Gardner DK.

Metabolism of glucose, pyruvate, and glutamine during the maturation of oocytes derived from pre-pubertal and adult cows.

Mol Reprod Dev. 1999 Sep;54(1):92-101. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199909)54:1<92::AID-MRD14>3.0.CO;2-A. PMID: 10423304.

Sturmey RG, O'Toole PJ, Leese HJ.

Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial:lipid association in the porcine oocyte.

Reproduction. 2006 Dec;132(6):829-37. doi: 10.1530/REP-06-0073. PMID: 17127743.

Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG.

Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity.

Hum Reprod Update. 2003 Jan-Feb;9(1):35-48. doi: 10.1093/humupd/dmg009. PMID: 12638780.

Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG.

Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone.

Reproduction. 2004 Sep;128(3):313-9. doi: 10.1530/rep.1.00225. PMID: 15333782.

Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG.

Effect of hexoses and gonadotrophin supplementation on bovine oocyte nuclear maturation during in vitro maturation in a synthetic follicle fluid medium.

Reprod Fertil Dev. 2005;17(4):407-15. doi: 10.1071/rd04135. PMID: 15899152.

Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG.

The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence.

Reproduction. 2010 Apr;139(4):685-95. doi: 10.1530/REP-09-0345. Epub 2010 Jan 20. PMID: 20089664.

Suzuki B, Sugano Y, Ito J, Saito H, Niimura S, Yamashiro H.

Location and expression of Juno in mice oocytes during maturation.

JBRA Assist Reprod. 2017 Dec 1;21(4):321-326. doi: 10.5935/1518-0557.20170065. PMID: 29124919; PMCID: PMC5714599.

Tian Y, Ding Y, Liu J, Heng D, Xu K, Liu W, Zhang C.

Nitric Oxide-Mediated Regulation of GLUT by T3 and Follicle-Stimulating Hormone in Rat Granulosa Cells.

Endocrinology. 2017 Jun 1;158(6):1898-1915. doi: 10.1210/en.2016-1864. PMID: 28324019.

Tilley SL, Audoly LP, Hicks EH, Kim HS, Flannery PJ, Coffman TM, Koller BH.

Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin E2 receptor.

J Clin Invest. 1999 Jun;103(11):1539-45. doi: 10.1172/JCI6579. PMID: 10359563; PMCID: PMC408376.

Tosca L, Chabrolle C, Uzbekova S, Dupont J.

Effects of metformin on bovine granulosa cells steroidogenesis: possible involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (AMPK).

Biol Reprod. 2007 Mar;76(3):368-78. doi: 10.1095/biolreprod.106.055749. Epub 2006 Nov 22. PMID: 17123942.

Tosca L, Crochet S, Ferré P, Fougelle F, Tesseraud S, Dupont J.

AMP-activated protein kinase activation modulates progesterone secretion in granulosa cells from hen preovulatory follicles.

J Endocrinol. 2006 Jul;190(1):85-97. doi: 10.1677/joe.1.06828. PMID: 16837613.

Tosca L, Froment P, Solnais P, Ferré P, Fougelle F, Dupont J.

Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates progesterone secretion in rat granulosa cells.

Endocrinology. 2005 Oct;146(10):4500-13. doi: 10.1210/en.2005-0301. Epub 2005 Jul 14. PMID: 16020477.

Townsend LK, Weber AJ, Day EA, Shamshoum H, Shaw SJ, Perry CGR, Kemp BE, Steinberg GR, Wright DC.

AMPK mediates energetic stress-induced liver GDF15.

FASEB J. 2021 Jan;35(1):e21218. doi: 10.1096/fj.202000954R. PMID: 33337559.

Trigatti B, Rayburn H, Viñals M, Braun A, Miettinen H, Penman M, Hertz M, Schrenzel M, Amigo L, Rigotti A, Krieger M.

Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Aug 3;96(16):9322-7. doi: 10.1073/pnas.96.16.9322. PMID: 10430941; PMCID: PMC17781.

Tsai YC, Leichner GS, Pearce MM, Wilson GL, Wojcikiewicz RJ, Roitelman J, Weissman AM.

Differential regulation of HMG-CoA reductase and Insig-1 by enzymes of the ubiquitin-proteasome system.

Mol Biol Cell. 2012 Dec;23(23):4484-94. doi: 10.1091/mbc.E12-08-0631. Epub 2012 Oct 19. PMID: 23087214; PMCID: PMC3510011.

Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP.

Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling.

Nature. 1999 Feb 4;397(6718):405-9. doi: 10.1038/17068. PMID: 9989404.

Valckx SD, Arias-Alvarez M, De Pauw I, Fievez V, Vlaeminck B, Franssen E, Bols PE, Leroy JL.

Fatty acid composition of the follicular fluid of normal weight, overweight and obese women undergoing assisted reproductive treatment: a descriptive cross-sectional study.

Reprod Biol Endocrinol. 2014 Feb 5;12:13. doi: 10.1186/1477-7827-12-13. PMID: 24498875; PMCID: PMC3916060.

van der Schoot P, Bakker GH, Klijn JG.

Effects of the progesterone antagonist RU486 on ovarian activity in the rat.

Endocrinology. 1987 Oct;121(4):1375-82. doi: 10.1210/endo-121-4-1375. PMID: 3653032.

van Pelt AM, de Rooij DG.

Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells.

Endocrinology. 1991 Feb;128(2):697-704. doi: 10.1210/endo-128-2-697. PMID: 1989855.

Whittingham DG, Biggers JD.

Fallopian tube and early cleavage in the mouse.

Nature. 1967 Mar 4;213(5079):942-3. doi: 10.1038/213942a0. PMID: 6030073.

Whittingham DG.

The failure of lactate and phosphoenolpyruvate to support development of the mouse zygote in vitro.

Biol Reprod. 1969 Dec;1(4):381-6. doi: 10.1095/biolreprod1.4.381. PMID: 4943421.

Wijgerde M, Ooms M, Hoogerbrugge JW, Grootegoed JA.

Hedgehog signaling in mouse ovary: Indian hedgehog and desert hedgehog from granulosa cells induce target gene expression in developing theca cells.

Endocrinology. 2005 Aug;146(8):3558-66. doi: 10.1210/en.2005-0311. Epub 2005 May 5. PMID: 15878962.

Williams SA, Blache D, Martin GB, Foot R, Blackberry MA, Scaramuzzi RJ.

Effect of nutritional supplementation on quantities of glucose transporters 1 and 4 in sheep granulosa and theca cells.

Reproduction. 2001 Dec;122(6):947-56. PMID: 11732990.

Xi G, An L, Wang W, Hao J, Yang Q, Ma L, Lu J, Wang Y, Wang W, Zhao W, Liu J, Yang M, Wang X, Zhang Z, Zhang C, Chu M, Yue Y, Yao F, Zhang M, Tian J.

The mRNA-destabilizing protein Tristetraprolin targets "meiosis arrester" *Nppc* mRNA in mammalian preovulatory follicles.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Jun 1;118(22):e2018345118. doi: 10.1073/pnas.2018345118. PMID: 34031239; PMCID: PMC8179146.

Xu B, Hu Y, Luo YT, Xu H, Qi SH, Zhang YY, Zhao D, Yuan DZ.

Changes in Expression of Follicular Glucose Transporters May Be Involved in Ovarian Function Impairment during Diabetic Hyperglycemia.

Ann Clin Lab Sci. 2019 Nov;49(6):785-793. PMID: 31882430.

Xu X, Hao T, Komba E, Yang B, Hao H, Du W, Zhu H, Zhang H, Zhao X.

Improvement of Fertilization Capacity and Developmental Ability of Vitrified Bovine Oocytes by JUNO mRNA Microinjection and Cholesterol-Loaded Methyl- β -Cyclodextrin Treatment.

Int J Mol Sci. 2022 Dec 29;24(1):590. doi: 10.3390/ijms24010590. PMID: 36614032; PMCID: PMC9820539.

Yamashita Y, Hishinuma M, Shimada M.

Activation of PKA, p38 MAPK and ERK1/2 by gonadotropins in cumulus cells is critical for induction of EGF-like factor and TACE/ADAM17 gene expression during in vitro maturation of porcine COCs.

J Ovarian Res. 2009 Dec 24;2:20. doi: 10.1186/1757-2215-2-20. PMID: 20034375; PMCID: PMC2803446.

Yamashita Y, Kawashima I, Gunji Y, Hishinuma M, Shimada M.

Progesterone is essential for maintenance of Tace/Adam17 mRNA expression, but not EGF-like factor, in cumulus cells, which enhances the EGF receptor signaling pathway during in vitro maturation of porcine COCs.

J Reprod Dev. 2010 Jun;56(3):315-23. doi: 10.1262/jrd.09-199h. Epub 2010 Feb 18. PMID: 20168049.

Yamashita Y, Kawashima I, Yanai Y, Nishibori M, Richards JS, Shimada M.

Hormone-induced expression of tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/A disintegrin and metalloprotease-17 impacts porcine cumulus cell oocyte complex expansion and meiotic maturation via ligand activation of the epidermal growth factor receptor.

Endocrinology. 2007 Dec;148(12):6164-75. doi: 10.1210/en.2007-0195. Epub 2007 Sep 27. PMID: 17901238.

Yamashita Y, Nishibori M, Terada T, Isobe N, Shimada M.

Gonadotropin-induced delta14-reductase and delta7-reductase gene expression in cumulus cells during meiotic resumption of porcine oocytes.

Endocrinology. 2005 Jan;146(1):186-94. doi: 10.1210/en.2004-0617. Epub 2004 Sep 30. PMID: 15459117.

Yamashita Y, Shimada M.

The release of EGF domain from EGF-like factors by a specific cleavage enzyme activates the EGFR-MAPK3/1 pathway in both granulosa cells and cumulus cells during the ovulation process.

J Reprod Dev. 2012;58(5):510-4. doi: 10.1262/jrd.2012-056. PMID: 23124701.

Yesilaltay A, Dokshin GA, Busso D, Wang L, Galiani D, Chavarria T, Vasile E, Quilaqueo L, Orellana

JA, Walzer D, Shalgi R, Dekel N, Albertini DF, Rigotti A, Page DC, Krieger M.

Excess cholesterol induces mouse egg activation and may cause female infertility.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Nov 18;111(46):E4972-80. doi: 10.1073/pnas.1418954111. Epub 2014 Nov 3. PMID: 25368174; PMCID: PMC4246315.

Zhang G, Veldhuis JD.

Requirement for proximal putative Sp1 and AP-2 cis-deoxyribonucleic acid elements in mediating basal and luteinizing hormone- and insulin-dependent in vitro transcriptional activation of the CYP17 gene in porcine theca cells.

Endocrinology. 2004 Jun;145(6):2760-6. doi: 10.1210/en.2003-1545. Epub 2004 Mar 4. PMID: 15001547.

Zheng P, Vassena R, Latham KE.

Effects of in vitro oocyte maturation and embryo culture on the expression of glucose transporters, glucose metabolism and insulin signaling genes in rhesus monkey oocytes and preimplantation embryos.

Mol Hum Reprod. 2007 Jun;13(6):361-71. doi: 10.1093/molehr/gam014. Epub 2007 Apr 7. PMID: 17416905.

Zhou J, Kumar TR, Matzuk MM, Bondy C.

Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary.

Mol Endocrinol. 1997 Dec;11(13):1924-33. doi: 10.1210/mend.11.13.0032. PMID: 9415397.

Zimmermann RC, Hartman T, Kavic S, Pauli SA, Bohlen P, Sauer MV, Kitajewski J.

Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development.

J Clin Invest. 2003 Sep;112(5):659-69. doi: 10.1172/JCI18740. PMID: 12952915; PMCID: PMC182212.

原田 脩平, 佐野 幸子, 井上 貴裕.

「体組成計による筋肉量・脂肪量の測定報告—性別による違いと加齢変化—」, 理学療法—臨床・研究・教育, 第25巻1号, p.98-102, 2018, <https://doi.org/10.11350/ptcse.25.98>

山下泰尚,

博士論文「ブタ卵胞卵子の減数分裂再開・進行過程における卵丘細胞の機能性変化に関する分子生物学的研究」

第4章, 卵丘細胞の Cholesterol 生合成経路の活性制御機構の検討, p.49-68, 2007

星野由美

「—総説— 卵成熟における紡錘体の形成メカニズムと加齢による紡錘体への影響」

日本 IVF 学会雑誌 Vol. 17, No2, 2-7, 2014

内閣府

「少子化対策の現状と課題について」

2014,<https://www8.cao.go.jp/shoushi/shoushika/whitepaper/measures/w-2014/26pdfhonpen/26honpen.html>