

哺乳動物における卵胞発育および排卵
制御機構の内分泌学的解析

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

平成 30 年 3 月
(2018 年)

岡本 麻子

目次

第一章	緒論	3
第二章	ステロイドホルモン合成および代謝能力に着目した優勢卵胞発育機構の検討	
	序論	9
	材料および方法	11
	結果	21
	考察	24
	要約	27
	図および表	29
第三章	排卵期卵巣における Neurotensin の発現と役割の検討	
	序論	39
	材料および方法	41
	結果	48
	考察	53
	要約	56
	図および表	57
第四章	総合考察	72
第五章	総括	78
	略語一覧	80
	謝辞	82
	参考文献	83

第一章

緒論

卵胞発育の開始

哺乳動物の卵巢では，胎児期に百万個程度の卵原細胞が形成されるものの，その大部分は退行し，性成熟を迎えるまでにその数は 40 万個程度に減少する。個体が性成熟を迎えると，卵巢内に存在する卵母細胞（卵）を含む一部の卵胞は発育を開始し，受精能を有する成熟卵へと分化すると共に，選抜された数個の卵が排卵される。しかし，大多数の卵は発育しないまま原始卵胞内に留まるか，発育の途中で退行する。このような，性周期に応じた卵巢内の形態的・生理的变化を誘導し，成熟卵を生み出すメカニズムについては，未だ不明な点が多く存在する。

卵成熟機構の解明には，卵と卵の発育の場となる卵胞の性周期変動，およびこの変動を誘導する因子群の役割について理解する必要がある。卵は胎児期に減数分裂を開始すると，第一減数分裂前期の網状期まで分裂を進行し，個体が性成熟を迎えるまでそれ以降の発育を停止する。第一減数分裂網状期に達した卵は卵胞発育の最初期に一層の扁平な卵巢上皮細胞に取り囲まれ，原始卵胞が形成される。これ以降，卵と卵胞は同調的に発育し，その結果卵の正常な発育が可能となる。原始卵胞はやがて，卵周囲の扁平な卵巢上皮細胞が立方状の細胞（顆粒膜細胞）へと変化し，さらに卵胞の周囲が基底膜で包まれた一次卵胞となる。胎生初期の卵が原始卵胞を経て一次卵胞へと発育する過程には，ノックアウトマウスを用いた解析により以下の多数の因子の関与が示されている。原始卵胞の形成には卵由来の転写制御因子 Factor In the Germline- α (FIG- α) (Soyal et al., 2000) が，原始卵胞から一次卵胞の形成には同じく卵由来の転写制御因子 Newborn Ovary Homeobox (NOBOX) (Rajkovic et al., 2004) や顆粒膜細胞が放出する転写制御因子 Forkhead box L2 (FOXL2) (Uda et al., 2004) が必須であることが報告されている。その後，一次卵胞の顆粒膜細胞は増殖，多層化し二次卵胞へと発育する。卵由来の Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) をコードする *Gdf-9* をノックアウトしたマウスでは一次卵胞での発育停止が報告されていることから (Dong et al., 1996)，二次卵胞への卵胞発育には GDF-9 が重要であると考えられている。二次卵胞が形成されると，基底膜の外側に顆粒膜細胞を取り巻くように，血管ネットワークが形成される (Vollmar et al., 2001)。その後，基底膜の周囲の間質細胞は二層に分かれ，血管新生が生じ上皮様形態を有する内卵胞膜細胞層と繊維芽細胞様形態の外卵胞膜細胞層に分化する (Erickson et al., 1985)。このように胎児期の間に発育を開始した卵胞は，第一減数分裂前期の網状期の卵を内包した状態で，卵や顆粒膜細胞由来の液性因子がパラクライ

ン・オートクライン的に作用することで、原始卵胞から二次卵胞まで発育し、個体は性成熟期を迎える。

胞状卵胞の発育

原始卵胞から二次卵胞までの卵胞発育は下垂体由来の性腺刺激ホルモン (Gonadotropin) である卵胞刺激ホルモン (Follicle Stimulating Hormone; FSH) や黄体形成ホルモン (Luteinizing Hormone; LH) 非依存的な発育である。これに対し、性成熟期を迎えた後に生じる、二次卵胞以降の発育は、FSH や LH が内卵胞膜細胞層にまで発達した血管網を介して卵胞内に作用し、後述するステロイドホルモンやペプチドホルモンなどの卵胞内局所性因子の発現を誘導する Gonadotropin 依存的な発育となる。

動物が出生後、性成熟期に達し、視床下部から性腺刺激ホルモン放出ホルモン (Gonadotropin Releasing Hormone; GnRH) が放出されると、下垂体からは共に微量かつパルス状の LH と FSH の分泌が促進され、二次卵胞以降の卵胞発育が開始される。LH は内卵胞膜細胞に作用し、Androgen 産生を促進する。一方、FSH は顆粒膜細胞に作用し、P450aromatase (CYP19A1) の発現を亢進することで、内卵胞膜細胞由来の Androgen から Estrogen の合成を促す (Young and McNeilly, 2010)。また、Estrogen は顆粒膜細胞に発現する Estrogen 受容体 (Estrogen Receptor; ER) に結合すると、細胞周期促進因子である Cyclin D2 (CCND2) の発現の亢進を介して顆粒膜細胞の増殖を促し、二次卵胞は卵胞腔を有する初期胞状卵胞を形成する (Robker and Richards, 1998)。さらに、Estrogen の合成酵素である CYP19A1 を欠損した (*Ar*KO) マウスでは、顆粒膜細胞がセルトリ細胞様の形状へと変化した異常卵胞を呈することが報告された (Britt et al., 2001; Toda et al., 2001)。以上の結果から、Estrogen は顆粒膜細胞の増殖のみならず、形態維持にも関与し、二次卵胞から初期胞状卵胞への発育を促進するものと考えられる。

初期胞状卵胞から後期胞状卵胞への発育には顆粒膜細胞における FSH と FSH 受容体 (FSH Receptor; FSHR) が関与する。FSH が初期胞状卵胞の顆粒膜細胞に作用すると、Insulin like Growth Factor-1 (IGF-1) の産生を促し、さらなる FSHR の発現を誘導すること (Zhou et al., 1997)、また FSHR 下流の Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) の活性化を介して、顆粒膜細胞のアポトーシスを抑制すること (Gonzalez-Robayna et al., 2000; Cunningham et al., 2003) が報告されている。さらに、胞状卵胞の顆粒膜細胞から放出される Inhibin は脳下垂体への負のフィードバック機構により FSH の放出を抑制する (繁殖生物学, 第 5 章 生殖各期の生理 1. 性周期)。従って、低濃度の FSH 条件において、顆粒膜細胞における FSHR の発現を維持し、アポトーシスが抑制された初期胞状卵胞のみが後期胞状卵胞へ選抜されると考えられている。

排卵

後期胞状卵胞において、顆粒膜細胞が合成する Estrogen の量がピークに達すると、血中へと放出された Estrogen は正のフィードバック機構により視床下部からの GnRH および下垂体からの LH の放出を促進する。これにより、一過的な LH の多量放出 (LH サージ) が生じる。LH サージは卵の減数分裂の再開、卵胞内のステロイドホルモン環境の移行、卵丘細胞の膨潤、卵胞壁の破裂といった、劇的な卵胞内の生理的・形態的变化を短期間の内に誘導する。

LH 刺激は卵丘細胞と卵のギャップ結合を構成する Connexin-37 あるいは、卵丘細胞や卵丘細胞同士のギャップ結合を構成する Connexin-43 のリン酸化を誘導し、ギャップ結合を閉鎖する (Norris et al., 2008)。これにより、LH 刺激を受けた顆粒膜細胞由来の cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) の卵への流入が減少し、卵核胞崩壊 (Germinal Vesicle Break Down; GVBD) を生じると、卵は第一減数分裂前期から受精前の段階である第二減数分裂中期まで減数分裂を進行する。また、顆粒膜細胞の CYP19A1 は LH サージ後にその発現を低下させ、Estrogen 産生が抑制される (Fitzpatrick et al., 1997) 一方、P450 cholesterol side chain cleavage (P450scc; CYP11A1) や 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (3 β -HSD) の発現は LH サージ後に促進されるため、卵胞内は Estrogen 優勢環境から Progesterone 優勢環境へと移行する (Boerboom and Sirois, 2001)。これまでの研究から、Progesterone の合成阻害剤である Aminoglutethimide や Epostane, Progesterone 受容体拮抗阻害剤である RU486 の投与がマウスとラットにおいて排卵を抑制すること (Lipner and Greep, 1971; Loutradis et al., 1991; Tanaka et al., 1992; Uilenbroek et al., 1992), Progesterone 受容体 (Progesterone Receptor; PGR) を欠損した *Pgr*KO マウスの顆粒膜細胞では、排卵期に発現するマトリクスメタロプロテアーゼの A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs-1 (ADAMTS-1) や Cathepsin L の発現が低下すること、さらに基底膜では ADAMTS-1 の基質となる Versican が発現し、排卵過程において切断されることが示された (Robker et al., 2000; Russell et al., 2003)。これらの結果から Progesterone 依存的な ADAMTS-1 の働きにより Versican が切断されることで、基底膜と顆粒膜細胞の遊離が促進されると考えられる。さらに卵胞腔内へ Progesterone の蓄積に伴い、卵胞が膨張を続けると、その頂上部に薄く透明な部分 (スチグマ) が形成される。やがて卵胞の膨張がピークに達すると、卵胞壁は破裂し排卵が起こる。以上の結果から、Progesterone は卵胞の破裂と排卵に重要な役割を果たすと考えられる。

排卵の誘起に重要な役割を果たす LH であるが、この受容体 (Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Receptor; LHCGR) は顆粒膜細胞に高発現する一方、卵丘細胞や卵には認められない (Amsterdam et al., 1975; Peng et al., 1991)。このことから、LH 刺激を受けた顆粒膜細胞から何らかの二次因子が放出され、COC を刺激することが示唆されてきた。

近年, Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) および human Chorionic Gonadotropin (hCG) 投与により, 排卵を誘起したマウスの顆粒膜細胞を用いたマイクロアレイ解析から, hCG 刺激後の顆粒膜細胞において, Epidermal Growth Factor-like factor (EGF-like factor) の一種である, Amphiregulin (AREG), Eprexulin (EREG), Betacellulin (BTC) の発現が上昇すること, これらの因子が EGF 受容体 (ErbB1) を介して卵丘細胞を刺激することで Extracellular signal Regulated Kinases 1 and 2 (ERK1/2) を活性化し, 卵丘細胞における膨潤関連遺伝子の発現上昇や卵の減数分裂再開を誘導することが明らかとなった (Park et al., 2004; Hernandez-Gonzalez et al., 2006; Shimada et al., 2006; Hsieh et al., 2007)。AREG, EREG および BTC はいずれも細胞外部位に EGF ドメインを有し, これが遊離することで標的細胞の ErbB1 に作用する。この EGF ドメインを特異的に切断する酵素として Tumor necrosis factor- α -Converting Enzyme/ A Disintegrin and Metalloproteinase domain 17 (TACE/ADAM17) が知られており, ブタ COC の体外培養系において, TACE/ADAM17 阻害剤である TAPI-2 の添加は卵丘細胞の膨潤, 卵成熟を顕著に抑制する一方, この抑制は EGF-like factor の添加により解除された (Yamashita et al., 2007)。以上の結果から, LH サージの刺激を受けた顆粒膜細胞において, EGF-like factor とそのリガンド部位切断酵素である TACE/ADAM17 が発現すること, 遊離したリガンド部位が卵丘細胞の ErbB1 を介して ERK1/2 を活性化することで, 卵丘細胞の膨潤, 卵成熟が誘導されることが明らかとなった。

LH サージ刺激によりリン酸化される ERK1/2 はその下流で様々な遺伝子の発現を制御することが知られている。Fan らは (2009), Cre-LoxP システムを用いて, 卵巣特異的に ERK1/2 をノックアウト (*Erk1/2^{gc/-}*) したマウスを作出し, マイクロアレイを用いて排卵刺激後の卵巣で ERK1/2 依存的に制御される遺伝子を網羅的に探索した。その結果, *Erk1/2^{gc/-}* マウスにおいて Steroidogenic Acute Regulatory protein (StAR) や CYP11A1 といった Progesterone 合成に関与する因子に加え, Prostaglandin E2 (PGE2) の合成酵素である Prostaglandin-endoperoxide Synthase-2 (PTGS-2) の発現が顕著に抑制された。また, LH サージ刺激後の卵丘細胞卵複合体 (Cumulus-Oocyte Complex; COC) は卵丘細胞間隙にヒアルロン酸を主成分とした細胞外マトリックスの蓄積を伴い, COC は膨潤するが, *Erk1/2^{gc/-}* マウスではヒアルロン酸合成酵素である Hyaluronan Synthase2 (HAS2) や合成したヒアルロン酸を細胞間隙中に保持するための働きを持つ Pentraxin 3 (PTX3) や Tumor Necrosis Factor, α -Induced Protein 6 (TNFAIP6) の発現が低下し, COC の膨潤が認められなかった。さらに, *Ptx3* ノックアウトマウスは卵丘膨化の抑制のみならず, 排卵卵子数の減少や受精の完全抑制が生じること (Salustri et al., 2004), *Ptgs-2^{-/-}*あるいは PGE2 受容体 (PGE2 receptor; EP2) をノックアウトした *Ep2^{-/-}* マウスでは, TNFAIP6 の発現量が低下し, 卵丘細胞は膨潤せず, 受精も起こらないことが報告されている (Lim et al., 1997; Hizaki et al., 1999; Ochsner et al.,

2003)。これらの報告から、LH サージ刺激により EGF-like factor-ErbB1 経路により誘導される ERK1/2 のリン酸化は卵丘細胞の膨潤のみならず、成熟卵の発育に不可欠であることが示された。

このように後期胞状卵胞に LH サージ刺激が加わると、直接的あるいは顆粒膜細胞からの EGF-like factor の放出を介して、間接的に顆粒膜細胞、卵丘細胞および卵に作用し、卵丘細胞の膨潤、卵の減数分裂再開、卵胞壁の溶解が同調的に進行する結果、受精能および発生能を有する成熟卵の排卵が可能となる。

研究目的

動物から採取した卵と精子を体外において適切な条件で培養し、受精させる技術である体外受精 (*In Vitro* Fertilization; IVF) は、作出した胚を雌の子宮に移植することで産仔を得ることが可能となる。1959 年、Chang がウサギ体外受精卵の移植により産仔の作出に成功した後、この技術は実験動物や家畜で発展し、1978 年にはヒトの体外受精卵を用いた産子の誕生が報告された (Steptoe and Edwards, 1978)。動物から IVF に適した、受精能力や発生能力を有する成熟卵を採取する方法には、動物に人為的なホルモン投与を行い、子宮灌流により卵管から成熟卵を採取する過剰排卵 (Super Ovulation; SOV) 法と動物の卵巢から非外科的に未成熟卵を採取する経腔採卵 (Ovum Pick Up; OPU) 法がある。SOV 法では受精、発生能の高い体内成熟卵の採取が可能な反面、採取できる卵の数が少ない、ホルモン投与により顕著な卵巢腫大や毛細血管透過性の増加を伴う、卵巢過剰刺激症候群 (Ovarian Hyperstimulation Syndrome; OHSS) を発症する可能性がある (Navot et al., 1992; Delvigne and Rozenberg, 2003)。そこで現在、OPU 法により採取した未成熟卵から体外成熟培養 (*In Vitro* Maturation; IVM) 法を用いて成熟卵を作出する方法の利用が進んでいる。IVM 法を用いることで、ホルモン投与による繁殖の同期化を行わない食肉処理場由来の屠畜においても、卵巢に存在する未成熟卵を利用し、多数の産仔を得ることが可能となる。このことから、IVM 法と IVF 法の併用は、畜産分野においては優良形質を有する家畜の効率的生産に有効であると考えられる。また近年、女性の出産年齢の高齢化により、卵の質の低下に起因する不妊や低受胎が増加している。卵の質低下の原因の一部は、体内において正常なホルモン分泌が行われないことに由来すると考えられるため、医療分野においては、適切なホルモン環境に調整した IVM 法を用い、ヒトの卵巢由来の未成熟卵から成熟卵を作出することで、高確率に産子を得る研究もなされている。このように、IVM 法は獣医畜産分野のみならず、ヒトの高度生殖補助医療においても極めて重要な技術である一方、既存の IVM 法によって得られる成熟卵の発生能力は、体内成熟卵に比べて低いことが知られている。その原因の一つとして、生体内では FSH 依存的な卵胞発育の後、LH サージ刺激を経て受精能を獲得し

た成熟卵が排卵される一連の卵成熟のメカニズムが存在するにもかかわらず、既存の IVM 法では卵の発育段階や卵発育の場である卵胞内の環境を考慮することなく、排卵刺激のみにより卵成熟を促していることが考えられる。そこで、本研究では生体内において、卵胞発育期および排卵期の卵胞内で生じる卵成熟誘導メカニズムを解明し、それを基盤とした新規 IVM 法構築のための基礎研究として以下の第二章および第三章の研究を行った。

前述の通り、一般的に卵胞発育や排卵の誘導には卵胞内のステロイドホルモン環境が Estrogen 優勢から Progesterone 優勢へ移行することが重要と考えられている。しかし、卵胞内のステロイドホルモン環境がいつ、どのような機構により Estrogen 優勢から Progesterone 優勢に変化するのかは不明である。そこで本研究の第二章では、Cholesterol を基に産生されるステロイドホルモンの合成と代謝が卵胞発育の過程でどのように進行するのかを調べるために、卵胞発育期のブタからサイズ別に卵胞を回収し、ステロイドホルモンの合成と代謝に関与する遺伝子群の発現とその役割についてブタ卵胞と COC の体外培養系を用いて解析した。

排卵期において LH 刺激を受けた顆粒膜細胞が EGF-like factor を放出し、卵丘細胞の ErbB1 を介して ERK1/2 をリン酸化することが重要である。しかし EGF-like factor の一種である AREG を添加した体外培養系で COC を培養したとき、卵丘細胞の膨潤や培養後の成熟卵の受精率および胚盤胞期胚への到達率は、体内成熟卵のそれと比較し、依然低い。このことから、生体では EGF-like-factor に加え、未知の卵胞内局所性因子が存在、機能することが示唆された。そこで第三章では、野生型マウスの顆粒膜細胞におけるマイクロアレイデータベースの結果から、LH 刺激後に発現量が 2 倍以上に増加する卵成熟促進因子を候補化した。候補化した分泌性因子から Neurotensin (NTS) を見出し、マウスにおける NTS の発現とその役割について解析を行った。

第二章

ステロイドホルモン合成および代謝能力に着目した優勢卵胞発育機構の検討

序論

胎児期の卵巣に多数存在する原始卵胞は個体の発育に伴い、一次卵胞、二次卵胞、初期胞状卵胞を経て、選抜された一部の卵胞のみが後期胞状卵胞へと発育し排卵が誘導されるものの、大部分の卵胞は発育することなく消失する。しかし、一連の発育過程で生じる卵胞選抜機構の解明は未だ不完全である。特に初期胞状卵胞から後期胞状卵胞への発育は、第一減数分裂前期の網状期で減数分裂を停止した卵が分裂を再開し、受精能および発生能を有する成熟卵への発育を伴う、卵胞選抜の最終過程である一方、卵巣内に多数存在する初期胞状卵胞プールから、どのような機構により数個の後期胞状卵胞のみが選抜され、排卵にまで至るのかは不明である。初期胞状卵胞から後期胞状卵胞への発育の特徴の一つは、脳下垂体由来の FSH や LH 刺激依存的な卵胞内でのステロイドホルモン合成である。卵胞内のステロイドホルモン合成は、血中において低密度リポタンパク質 (Low-Density Lipoprotein; LDL) または高密度リポタンパク質 (High-Density Lipoprotein; HDL) として存在する Cholesterol を原料に、始めに Pregnenolone が合成され、その後段階的に Progesterone, Androgen, Estrogen が合成される。個体が性成熟を迎えると、脳下垂体由来の LH の作用により、細胞内に輸送された Cholesterol はミトコンドリア外膜に局在する StAR の働きによりミトコンドリア内膜へと運搬され、CYP11A1 の働きにより Pregnenolone へと変換される。その後、Pregnenolone は細胞内で 3β -HSD の働きにより Progesterone へと変換され、cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1 (CYP17A1) の働きにより Androgen が合成される。Androgen は FSH 刺激をきっかけに CYP19A1 の働きにより Estrogen へと変換される。また卵胞発育の初期では主に Estrogen 産生のための中間体として合成されていた Progesterone は卵胞発育の進行と共に積極的に合成されるようになり、特に LH サージ刺激により CYP19A1 発現の急激な低下と CYP11A1 や 3β -HSD の発現促進が誘導される結果、卵胞内の Estrogen 濃度は低下し Progesterone 濃度が上昇する (Fitzpatrick et al., 1997; Boerboom and Sirois, 2001)。

卵胞発育の過程で産生される Estrogen は顆粒膜細胞の増殖を誘導し、アポトーシスを抑制することが知られているのに対し (Robker and Richards, 1998; Gonzalez-Robayna et al., 2000; Cunningham et al., 2003), 卵胞発育期における Progesterone の役割は不明な点が多い。卵胞発育初期での Progesterone の役割について検討した Fukuda らは (1980), 未成熟ラットへの Progesterone 投与は顆粒膜細胞の核凝集を誘導し、発育初期での卵胞閉鎖を促進するこ

とを報告し、卵胞発育初期段階での Progesterone の曝露は卵胞の発育を抑制することを明らかにした。一方、ラット、マウス、ウサギへの Progesterone 受容体拮抗阻害剤である RU486 の投与や、マウスの体外卵胞培養系への Progesterone 受容体拮抗阻害剤 Org-31710 添加が排卵を抑制したこと (van der Schoot et al., 1987; Loutradis et al., 1991; Chen et al., 1995; Rose et al., 1999), *Pgr*KO マウスでは、基底膜の Versican の切断に関与する ADAMTS-1 の発現が低下したこと (Robker et al., 2000), Progesterone は排卵に極めて重要なステロイドホルモンと考えられる。以上のことから、卵胞の発育段階に応じて卵胞内ステロイドホルモン環境が Estrogen から Progesterone へと切り替わるタイミングが厳密に制御されることが正常な卵胞発育と排卵に必要であると考えられる。

Cholesterol から合成される Progesterone は Estrogen 以外にも 20 α -水酸化ステロイド脱水素酵素 (20 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase; 20 α -HSD; AKR1C1) により生理活性のない水溶性の 20 α -Hydroxyprogesterone (20 α -OHP) へと変換されることが知られている。AKR1C1 を介した Progesterone から 20 α -OHP への変換は、ラットやマウスなどの性周期の短い齧歯類における黄体の迅速な退行に機能することが知られており、これらの動物種では排卵後に交尾が成立しない場合、黄体の AKR1C1 により Progesterone の代謝が促進される結果、黄体は急速に退行し、次の卵胞発育が可能となると考えられる。また Progesterone は妊娠維持に作用し、妊娠末期に Progesterone 産生が低下することで分娩が誘導される。Jayasekara らは (2005), 妊娠後期のヤギの胎盤と子宮においても AKR1C1 が発現すること、また Ishida らは (2007), *Akr1c1* を欠損したマウスでは妊娠期間の血清中の 20 α -OHP 濃度は恒常的に低値のまま変動せず、野生型に比べ性周期と妊娠期間が有意に延長をすることを報告した。以上の結果から、AKR1C1 は Progesterone の急激な代謝を介して黄体退行や分娩開始を誘導することが示唆された。しかし、卵胞発育期において、Estrogen 以外の Progesterone の代謝経路と卵胞発育との関係に関する報告はない。

そこで本研究ではこれまでに優勢卵胞では卵胞表面の血管新生が顕著な一方、退行卵胞では血管新生がほとんど認められない点に着目し、ブタ卵巢からサイズ別に血管新生の顕著な優勢卵胞を採取し、顆粒膜細胞における Progesterone の合成と 20 α -OHP への代謝に関与する遺伝子群の発現および卵胞液中の Progesterone 濃度の測定、Progesterone から Estrogen への合成に関与する遺伝子群の発現と卵胞液中の Estrogen 濃度の測定を行い、優勢卵胞の発育過程で生じる Progesterone と Estrogen の合成と代謝の変動の全容解明を試みた。また優勢卵胞内の Progesterone と Estrogen の変動が卵丘細胞の機能性や卵成熟および胚発生に与える影響を検討する目的で、退行卵胞由来の COC を優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境を模倣した IVM 系を用いて培養した。

材料および方法

ブタ卵巢の採取、運搬および卵胞、顆粒膜細胞、COC の回収および COC の体外培養

広島市食肉衛生検査所で屠殺された性成熟前のブタから卵巢を採取し、30℃に維持した 1% (v/v) ペニシリン・ストレプトマイシン (Nacalai tesque) を添加した 0.85% (w/v) 生理食塩水 (超純粋に NaCl [Wako] を溶解) 中に保存し、2 時間以内に研究室に持ち帰った。持ち帰った卵巢から卵胞表面の血管の有無および直径 1-3 mm, 4-7 mm, 8mm 以上のサイズ別に卵胞を切り出した。切り出した卵胞はシャーレ上でピンセットとメスを用いて切り開き、COC を採取後、卵胞液をエッペンドルフチューブに回収し、700 rpm で 15 分間遠心した。遠心後の上清を卵胞液、沈殿残渣を顆粒膜細胞として回収し、-80℃で保存した。

回収した COC は培養培地で洗浄後、100 μ l の培養培地 (NCSU37) を添加した 96 ウェルプレート (Nunc*Microwell Plates Nunclon Delta surface, 96wells) に 20 個ずつ加え、FSH (最終濃度; 1 μ g/ml), Estrogen (最終濃度; 85 ng/ml), Progesterone (最終濃度; 50 ng/ml または 150 ng/ml) を添加してインキュベーター (37℃, 5% CO₂, 湿度飽和条件下) で各時間培養した。

試薬の調整と PBS の作製

FSH (National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases [NIDDK]) は DMEM 培地 (D-MEM [Low Glucose] with L-Glutamine and Phenol Red, Wako) で 100 μ g/ml に溶解し、-20℃で保存したものを、培養培地 (NCSU37) で最終濃度 (1 μ g/ml) に希釈して使用した。Estrogen (β -Estradiol, Sigma-Aldrich) と Progesterone (Sigma-Aldrich) は、無水エタノール (Nacalai tesque) で 1 mg/ml に溶解後、DMEM 培地で Estrogen は 8.5 μ g/ml, Progesterone は 5 μ g/ml および 15 μ g/ml にさらに溶解し、-20℃で保管したものを、培養培地 (NCSU37) で最終濃度 (Estrogen ; 85 ng/ml, Progesterone; 50 ng/ml または 150 ng/ml) に希釈して使用した。

PBS は 0.05% (w/v) ポリビニルピロリドン (Polyvinylpyrrolidone; PVP, Sigma-Aldrich), 1% (v/v) ペニシリン・ストレプトマイシンを混和し、調整した。

成熟培地の調製

培養培地には、10% (v/v) ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum; FBS, Thermo fisher scientific), 1% (v/v) の抗生物質 (Antibiotic-Antimycotic, Life technologies) および 4 mM ヒポキサンチン (Sigma-Aldrich) を添加した修正 NCSU37 培地を用いた (Shimada et al., 2004)。なお、培養培地は培養開始 3 時間以上前に 96 ウェルプレートに移し、インキュベーター内 (37℃, 5%

CO₂, 湿度飽和条件下) でガス平衡により使用開始時の培養培地の pH を 7.4 に調節した。

RNA の回収

RNA 回収は, RNeasy mini kit (Qiagen sciences) を用いた。サンプルを入れたエッペンドルフチューブに RLT Buffer を 350 µl 加え, 25 G の注射針 (TERMUMO) を装着した 1 ml の注射筒 (TERUMO) で 5 回出し入れした。そこに 70% (v/v) エタノール (Wako) /DEPC 処理水 (Nacalai tesque) を 350 µl 加えて混合後, 溶液を付属のフィルターカラムに移し入れ, 4°C, 15,000 rpm で 1 分間遠心した。フィルターカラムの下に落ちた液を除去し, フィルターカラムに RW1 を 700 µl 加え, 再び 4°C, 15,000 rpm で 1 分間遠心した。フィルターカラムを新しく用意した下うけにセットし, RPE を 500 µl 加え, 4°C, 15,000 rpm で 1 分間遠心した。フィルターカラムの下に落ちた液を除去し, 再度 RPE を 500 µl 加えて 4°C, 15,000 rpm で 2 分間遠心した。フィルターカラムをエッペンドルフチューブにセットし, RNase free water を 20 µl 加えて 1 分間静置した後, 4°C, 15,000 rpm で 1 分間遠心した。回収した Total RNA は, Micro-Spectrophotometer (CB-2800 Nucleic Acid Analyzer, Medclub Scientific) で RNA 濃度を測定後, DEPC 処理水で 5 ng/µl に濃度を調整し, -80°C で保存した。

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Two-step 法により, RT-PCR を行った。

始めに Total RNA から cDNA を生成した。Total RNA サンプル一つにつき, AMV RT 5X Reaction Buffer (Promega) を 4 µl, dNTP (Promega) を 0.8 µl, Oligo(dT)15 Primer (Promega) を 0.5 µl, AMV RT (Promega) を 0.25 µl, DEPC 処理水を 7.2 µl, さらに回収後, 濃度調整した Total RNA サンプルを 7.25 µl 混合した, 計 20 µl の溶液をサーマルサイクラー (ThermoGen) を用いて, 42°C で 1 時間 15 分間, 94°C で 5 分間反応させ, Total RNA から cDNA を生成した。生成した cDNA は -20°C で保存した。

上記の手段で逆転写を行った後, Real-time Polymerase chain reaction (Real-time PCR; RT-PCR) 法を用いて cDNA を増幅した。cDNA サンプル一つにつき, KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix 2X Universal (KAPABIOSYSTEMS) を 7.5 µl, prime F・R を各 0.6 µl, 超純水を 5.1 µl, さらに cDNA サンプルを 1.2 µl 混合した, 計 15 µl の溶液を, MiniOpticon Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) を用いて以下の方法で cDNA を増幅させた。95°C で 30 秒間に続き, 95°C で 5 秒間と X°C で 45 秒間のアニーリングを 40 サイクル行い, cDNA を増幅させた。発現量の解析は CFX Manager Software Version 3.0 (Bio-Rad) を用いて行った。なお, 各サンプルにおいて, 18s mRNA を内部標準とした。また, 各遺伝子に対するプライマーとアニーリング温度 (X°C) は Table 1. に記した。

卵胞液中のステロイドホルモンの抽出および Progesterone と Estrogen 濃度の測定

卵胞液 150 μ l に DMEM を 450 μ l 加えて希釈したサンプルに 0.3 N の NaOH (Nacalai tesque) を 600 μ l 加え、10 分間静置した。これを試験管に移し、ジクロロメタン (Wako) 13 ml 加え、5 分間激しく混和し、5,500 rpm で 15 分間遠心した。分離したジクロロメタン分画を回収し、エッペンドルフチューブに分注した後、遠心濃縮機 (トミー精工) によってジクロロメタン層を吸引除去し、固相化した。これを 200 μ l の 50% (v/v) メタノール (Sigma-Aldrich)/超純粋で再溶解した。再溶解したサンプル中の Progesterone 濃度と Estrogen 濃度はそれぞれ Progesterone EIA Kit (Cayman chemical) と Estradiol EIA Kit (Cayman chemical) を用いて測定した。

卵胞切片の作成

切り出した卵胞を 4% (w/v) パラホルムアルデヒド (片山化学工業株式会社) /PBS (-) 中で 4 時間振盪固定した後、0.1 M の Tris-HCl (pH 7.2) 中で水洗した。その後 50%, 70%, 90%, 95%, 99% (v/v) エタノール/超純水中で脱水、キシレン (Wako) 中で脱アルコールした後、パラフィン (サクラファインテックジャパン) 浸透し、卵胞をパラフィン中に包埋した。パラフィン包埋された卵胞をトリミングし、ブロックを作製した。作製したブロックから LEICA RM2125RTS (LEICA) を用いて、厚さを 5 μ m の卵胞切片を切り出した。切り出した切片は 37°C の温水に浮かべ伸展させた後、Mas コートスライドガラス (Matsunami Glass) にのせ、風乾させた。

TUNEL 染色

卵胞パラフィン切片はキシレンとエタノールにて脱パラフィンした後、PBS (-) で水洗した。10% H₂O₂ (Nacalai tesque) /メタノール中にスライドガラスを浸し、室温で 15 分静置後、プロテイナーゼ K 溶液 (プロテイナーゼ K [Proteinase K, Roche Diagnostics GmbH] 20 μ g/ml を 10 mM の Tris-HCl で 1,000 倍に希釈) を 100 μ l 試料にのせ、37°C で 15 分間静置した。PBS (-) で洗浄後、*In Situ* Cell Death Detection Kit, POD (Roche Diagnostics GmbH) 内の酵素溶液を標準溶液で 10 倍希釈して試料に滴下し、37°C で 60 分間インキュベートした。PBS (-) で洗浄後、DAB 溶液 (DAB 錠剤 [Wako] 1 錠を 5 ml の超純粋に溶解後、H₂O₂ を 10 μ l 添加) を滴下し、試料の染色を行った。染色後、ヘマトキシリン (ギルマヘマトキシリン IV, サクラファインテックジャパン) に 30 秒間浸し、エタノール、キシレンの順に浸し、封入剤とカバーガラスを用いて封入した。

蛍光 TUNEL 染色

ガラスボトムシャーレ (Matsunami Glass) で COC を培養後、培地を除去し塗抹標本を作製した。4% (w/v) パラホルムアルデヒド/PBS (-) で 1 時間固定し、PBS (-) で洗浄した後、3% H_2O_2 /メタノール中で 10 分間ブロッキングした。その後、0.1% Triton-X (Sigma-Aldrich) /PBS (-) を添加し 2°C で 2 分間静置し、PBS (-) で洗浄した後、試料の周りを乾燥させ、*In Situ* Cell Death Detection kit, Fluorescein (Roche Diagnostics GmbH) 内の酵素溶液を標準溶液で 10 倍希釈して試料に滴下し、37°C で 1 時間インキュベートした。PBS (-) で洗浄後、余分な水分を除去し、DAPI (VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories, Inc.) を滴下して核染色を行った。これを蛍光顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i, OLYMPUS) で撮影後、陽性細胞数をカウントした。

抗 PCNA 抗体を用いた培養後の卵丘細胞の免疫蛍光染色

ガラスボトムシャーレで COC を培養後、培地を除去し塗抹標本を作製した。4% (w/v) パラホルムアルデヒドで 15 分間固定し、PBS (-) で洗浄した後、0.1% Triton-X / PBS (-) で 30 分間の膜透過処理を行った。PBS (-) で洗浄後、5% BSA (Sigma Aldrich) / PBS (-) で 90 分間ブロッキングした。その後、一次抗体 (1:100, PCNA [PC10] Mouse mAb, Cell Signaling Technology) で覆い室温で 4 時間静置した。その後 PBS (-) で洗浄し、二次抗体 (1:100, Anti-mouse IgG [whole molecule] F [ab']₂ Fragment- Cy3 antibody produced in sheep, Sigma Aldrich) で覆い室温で 2 時間静置した。PBS (-) で洗浄後、DAPI を滴下し、Cy3 と DAPI の二重染色を行った。蛍光顕微鏡を用いた観察により、1 COC あたりの DAPI で染まった卵丘細胞の核と PCNA で染まった核が一致しているものを PCNA 陽性細胞とし、その割合を算出した。

体外培養後の COC 膨潤直径

卵丘細胞の膨潤直径測定は、48 時間培養後の COC を倒立位相差顕微鏡 (Nikon, PHASE CONTRAST-2 ELWD 0.3) で撮影した後、対物マイクロメーターと接眼マイクロメーターにより、COC の最大直径を測定した。

タンパク濃度の測定

培養後の卵丘細胞中のタンパク質濃度測定は、Bio-Rad DO Protein Assay Regents Package (Bio-Rad) を用いて行った。回収したサンプルに Whole-cell extract buffer (超純水に 100 mM NaCl, 100 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ [Nacalai teswue], 50 mM NaF [Nacalai tesque], 0.1 mM NaVO_4 [Sigma Aldrich], 10 % [v/w] グリセロール [Wako], 5 mM EDTA [同仁化学研究所], 5 mM EGTA

[Nacalai tesque] を溶解) を 20 μ l 添加し、溶解液を作製した。20 μ l の溶解液内の 2 μ l をエッペンドルフチューブに取った。同様に、Standard (5.84, 2.92, 1.46, 0.73, 0.365 mg/ml) を 2 μ l 取った。キット内の Reagent A+Reagent S 溶液 (Reagent A 1 ml に Reagent S を 20 μ l 添加) を各サンプルに 25.4 μ l 添加し、ボルテックスを用いて混合した。5 分間静置後、Reagent B を 200 μ l 添加し、再びボルテックスを用いて混合した。15 分間静置後、Micro Well Plate (GDMP-96F, AS ONE) に 100 μ l ずつダブルアッセイし、Microplate Reader (Benchmark, Bio-Rad) で吸光度 (波長 ; 750 nm) を測定した。Standard を用いて作成した検量線を基に、サンプルに含まれるタンパク質濃度を算出した。

ERK1/2 の Western blotting

・ SDS-PAGE

Whole-cell extract buffer を添加して作製した溶解液に Sample Buffer Solution (Nacalai tesque) を加え、アプライするタンパク量を 5 μ g に調整し、Power Pac HC (Bio-Rad) を用いて 10%ポリアクリルアミドゲルで展開した。ポリアクリルアミドゲルの組成は以下の通りである。

濃縮ゲル

超純水	2.89 ml
アクリルアミド (Nacalai tesque)	0.79 ml
Tris-HCl (Bio-Rad) (pH6.8)	1.25 ml
10% SDS (Nacalai tesque)	50 μ l
10% Ammonium persulfate (APS) (Sigma Aldrich)	17 μ l
Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Nacalai tesque)	5 μ l

展開ゲル

超純水	3.22 ml
アクリルアミド	2.7 ml
Tris-HCl (Bio-Rad) (pH8.8)	2 ml
10% SDS	80 μ l
10% APS	27 μ l
TEMED	4 μ l

泳動バッファーには、25 mM Tris (Nacalai tesque), 192 mM Glycine (Wako), 0.1% (w/v) SDS (Nacalai tesque) を用いた。

- ・転写

転写バッファーには 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 10% (v/v) メタノールを用いた。PVDF membrane (Polyvinylidene difluoride membrane, Hybond-P, GE Healthcare) は, メタノールで 5 分間洗浄後, 超純水中で 15 分間振揺させ, 転写バッファーに移して使用するまでに 15 分間以上振揺して前処理を行った。使用する濾紙は, ゲルの大きさに合わせて切断後, 使用するまで転写バッファー内で 10 分間振揺した。転写装置 (Bio-Rad) の陰極上に濾紙を重ね, その上に前処理した PVDF membrane を置いた。その上に, 電気泳動後のゲルを重ね, さらにその上から濾紙を重ねて 100 mA, 4°C で一晩転写させた。

- ・ PVDF membrane のブロッキング

転写した PVDF membrane を PBS (-) で 10 分間洗浄した。5% (w/v) のスキムミルク (森永乳業株式会社) を PBS (-) で溶解し, 洗浄した PVDF membrane をこの 5% ミルクで 2 時間ブロッキングした。

- ・一次抗体反応

ブロッキングした PVDF membrane を, PBS-T (PBS に 0.2 % [v/v] Tween-20 [Sigma Aldrich] を添加) に溶解した 2.5% スキムミルクを用いて 1:1,000 に希釈した抗 pERK1/2 抗体 (Phospho-p44/42 MAPK [ERK1/2] Mouse mAb, Cell Signaling Technology), 抗 tERK1/2 抗体 (p44/42 MAPK [ERK1/2] Rabbit mAb, Cell Signaling Technology) 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 中で 2 時間振揺させ洗浄した。

- ・二次抗体反応

洗浄した PVDF membrane を, PBS-T に溶解した 2.5 % スキムミルクを用いて 1:5,000 に希釈した Anti-mouse IgG, Horseradish peroxidase (HRP) -linked Antibody (Cell Signaling Technology), あるいは 1:3,000 に希釈した Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology) を用いて室温で 1 時間反応させた。

- ・洗浄

非特異的に結合した抗体を除去する目的で, 二次抗体と反応させた PVDF membrane を PBS-T 中において室温で 1 時間振揺させた。

- ・検出

HRP 活性の検出には, ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を用いて行った。検出を行う前に冷暗室に保存してある ECL 試薬 A と試薬 B とを加えて十分に混合させた。洗浄した PVDF membrane 上に混合した ECL 試薬を均一に広げて, 室温条件で 5

分間反応させ、5 分後、反応を停止させるために PVDF membrane に付着した反応液を除去した。暗室で、X-Ray Film (X-U, 富士フイルム) をセットしたフィルムカセット (PL-B, 岡本製作所) の上に反応液を除去した PVDF membrane を表が X-Ray Film 側になるようにセットし、感光させた。感光後のフィルムはスキャナーにより取り込んだ後、Gel-Pro analyzer (Media Cybernetics) を用いて各バンドの濃さを測定した。

卵のホルマウント標本の作製

培養後 48 時間後の COC を回収後、ボルテックスミキサーを用いて卵丘細胞を除去した。卵丘細胞を取り除いた卵を PBS で洗浄後、スライドガラス上に少量の PBS と共に 10 個の卵を乗せ、ワセリンパラフィンで 4 つの角につけたカバーガラスをかぶせ 50%酢酸エタノール (PBS : 酢酸 : エタノール=4 : 1 : 2), 100%エタノール (酢酸 : エタノール=1 : 3) を濾紙で吸い取りながら順に流し込み、100%酢酸エタノール内で 48 時間以上固定した。固定後、カルノア液 (酢酸 : エタノール : クロロホルム=1 : 3 : 1) で卵の脂質を溶解させた後、酢酸オルセインで染色し、カルノア液で余分な染色液を除去し、卵の核相を判定した。

卵の核相の観察

卵の核相を正立位相差顕微鏡 (OLYMPUS) (×400) を用いて観察し、囲卵腔内へ第一極体の放出した卵子を MII 率として判定した。

受精試験

・培地の作製

精子前培養、媒精に用いた HTF medium は以下のように作製した。超純水 100 ml に NaCl 593.75 mg, KCl (Nacalai tesque) 34.96 mg, KH_2PO_4 (Wako) 5.035 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Nacalai tesque) 4.929 mg, NaHCO_3 (Nacalai tesque) 210.025 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Nacalai tesque) 29.99 mg, D-(+)-グルコース (Nacalai tesque) 50.084 mg, Pyruvic Acid Sodium Salto (Nacalai tesque) 3.61 mg, Sodium DL-lactate solution syrup, BioReagent, 60% (w/w), synthetic, suitable for cell culture (ml/L) (Sigma Aldrich) 0.342 ml, Phenol red (Nacalai tesque) 少量, BSA 400 mg, ペニシリンストレプトマイシン 1 ml を加え、12 時間以上インキュベーター内で平衡化させて用いた。

発生培地は PZM-5 (株式会社機能性ペプチド研究所) を使用した。

精子の前培養用培地には、受精培地に 10%の FBS を添加し用いた。

- ・精子の前培養

ブタ新鮮精液 (Swine genetics) 15 ml を 15 ml プラスチック遠沈管に入れ、2,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去した。クリーンベンチ内で精子の前培養用培地 3 ml を精子の入った遠沈管に入れピペティングし、45 分間培養した。

- ・卵の前培養

50 mm プラスチックシャーレに受精培地を 50 μ l ずつドロップ状に作製し、その上から培地の蒸発を防ぐために培地をミネラルオイル (Sigma Aldrich) で覆った。成熟培養が終了した COC を受精培地で洗浄した後、ドロップに移し、30 分間培養した。

- ・精子数のカウントと受精

Swim up 法により、前培養後の精子の内、遠沈管の中央部に存在する精子のみを受精試験に用いた。中央部の精子 1 ml をエッペンドルフチューブに入れ、受精培地を用いて 10 倍希釈した。その後、精子 5 μ l とトリパンブルー 5 μ l を合わせ、全量血球計算盤 (Erma Optical Works) を用いて生存精子を正立顕微鏡下でカウントした。この時、透明で動いているものを生存精子、トリパンブルーで染色されたものを死滅精子とした。精子数のカウントをした後、受精培地を用いて精子を希釈し (1×10^6 sperm/ml)、前培養後の卵を入れたドロップに 50 μ l 加え、6 時間共培養し受精させた。受精後、パスツールピペットを用いて卵に付着している精子を除去し、PZM-5 で洗浄した。その後、50 mm プラスチックシャーレに PZM-5 の 100 μ l のドロップを作製し、培地の蒸発を防ぐためにミネラルオイルを満たした PZM-5 のドロップ内に受精卵を移しインキュベーターで培養した。

- ・核相の観察

培養後、4%パラホルムアルデヒドで 30 分間固定し PBS で洗浄した。洗浄後、アクチナーゼで透明体を除去し、PBS で洗浄した後、10% Triton-X/ PBS で膜透過処理を行い、PBS で洗浄した。その後、1 mg/ml のヘキスト 33342 で 10 分間静置させ染色し、グリセロール浸漬させ、蛍光顕微鏡で観察した。

統計処理

実験はそれぞれ 3 回以上繰り返し、その結果は、Excel 統計 (Microsoft) を用いて統計分析した。算出した結果は平均 \pm 標準偏差で表示した。

3 群以上の比較は、一元配置分散分析の後、Fisher の最小有意差法で算出し、5%水準で有意差があると判定した。ただし、MII 率、胚盤胞率、PCNA 陽性細胞率に関しては、arc-sin 変換後、一元配置分散分析を行った。

実験計画

【実験 1】優勢卵胞の顆粒膜細胞における Progesterone 合成遺伝子 (*Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1*), 20 α -OHP 合成遺伝子 (*Akr1c1*) の発現および卵胞液中の Progesterone 濃度の検討

優勢卵胞の発育過程における顆粒膜細胞の Progesterone 合成遺伝子 *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1* mRNA の発現, Progesterone から 20 α -OHP への合成に関与する *Akr1c1* mRNA の発現および卵胞液中の Progesterone 濃度の変化を調べる目的で, 血管新生の顕著な優勢卵胞を 1-3 mm, 4-7 mm, 8 mm 以上のサイズ別に分類し, それぞれの顆粒膜細胞と卵胞液を回収した。回収した顆粒膜細胞から Total RNA を抽出し, qRT-PCR 法を用いて *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1*, *Akr1c1* の遺伝子発現を調べた。また, 回収した卵胞液からステロイド分画を抽出し, ELISA 法を用いて Progesterone 濃度を測定した。

【実験 2】優勢卵胞の顆粒膜細胞における Estrogen 合成遺伝子の発現および卵胞液中の Estrogen 濃度の検討

優勢卵胞の発育過程での顆粒膜細胞において, Progesterone から Estrogen への合成に関与する *Cyp17a1*, *Cyp19a1* mRNA の発現および卵胞液中の Estrogen 濃度の変化を調べる目的で, 血管新生の顕著な優勢卵胞を 1-3 mm, 4-7 mm, 8 mm 以上のサイズ別に分類し, それぞれの顆粒膜細胞と卵胞液を回収した。回収した顆粒膜細胞から Total RNA を抽出し, qRT-PCR 法を用いて, *Cyp17a1*, *Cyp19a1* の遺伝子発現を調べた。また, 回収した卵胞液からステロイド分画を抽出し, ELISA 法を用いて Estrogen 濃度を測定した。

【実験 3】優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境が顆粒膜細胞と卵丘細胞の生存に与える影響

優勢卵胞と退行卵胞の卵胞内環境が顆粒膜細胞や卵丘細胞の生存に与える影響を調べる目的で, 血管新生の顕著な優勢卵胞と血管新生の認められない退行卵胞を回収後, 卵胞のパラフィン切片を作製し, TUNEL 染色法を用いて卵胞内における死細胞の局在を調べた。また, 体外培養系において優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境が卵丘細胞の生存に関与するかを調べる目的で, 退行卵胞から回収した COC を Fig. 4 で示した, FSH のみを添加したコントロール区または, 実験 1 と実験 2 で測定した Progesterone と Estrogen 濃度を参考に作製した優勢卵胞環境区において 48 時間体外培養し, TUNEL 染色法を用いて卵丘細胞における死細胞数を調べた。

実験 4 から実験 7 では、退行卵胞由来の COC を Fig. 4 で示した FSH のみを添加したコントロール区または、実験 1 と実験 2 で測定した Progesterone と Estrogen 濃度を参考に作製した優勢卵胞区を用いて体外培養した。

【実験 4】優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境が卵丘細胞の増殖に与える影響

優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境が卵丘細胞の増殖に与える影響を調べる目的で、退行卵胞由来の COC をコントロール区および優勢卵胞区で 24 時間体外培養し、免疫蛍光染色法を用いて卵丘細胞における細胞増殖マーカーの PCNA 陽性細胞率、回収した卵丘細胞から Total RNA を抽出し、qRT-PCR 法を用いて、*Ccnd2* の遺伝子発現を調べた。

【実験 5】優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境が卵丘細胞の膨潤と膨潤関連遺伝子(*Has2*, *Tnfaip6*, *Ptx3*) の発現に与える影響

優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境が卵丘細胞の膨潤に与える影響を調べる目的で、退行卵胞から回収した COC をコントロール区および優勢卵胞区で 24 時間または 48 時間体外培養した。培養 24 時間後に回収した卵丘細胞から Total RNA を抽出し、qRT-PCR 法を用いて膨潤関連遺伝子 *Has2*, *Tnfaip6*, *Ptx3* mRNA の発現および培養 48 時間後の COC 直径を測定した。

【実験 6】優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境が卵丘細胞の EGF-like factor 遺伝子(*Areg*, *Ereg*) の発現, *ERK1/2* のリン酸化に与える影響

優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境が卵丘細胞の成熟マーカーの発現に与える影響を調べる目的で、退行卵胞から回収した COC をコントロール区および優勢卵胞区で 3 時間または 24 時間培養した。培養 3 時間後に回収した卵丘細胞から Total RNA を抽出し、qRT-PCR 法を用いて *Areg*, *Ereg* mRNA の遺伝子発現および培養 24 時間後に回収した卵丘細胞からタンパク質を抽出し Western Blot 法を用いて *ERK1/2* のリン酸化を測定した。

【実験 7】優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境が卵成熟と胚発生に与える影響

優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境が卵成熟や胚発生に与える影響を調べる目的で、退行卵胞から回収した COC をコントロール区および優勢卵胞区で 48 時間体外培養し、卵の MII 率を測定した。また、一部の COC はブタ新鮮精液を用いた受精試験に供試し、7 日間の発生培養の後、桑実胚期の胚を判定し、胚盤胞率を調べた。

結果

【実験 1】優勢卵胞の顆粒膜細胞における Progesterone 合成遺伝子 (*Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1*), 20 α -OHP 合成遺伝子 (*Akr1c1*) の発現および卵胞液中の Progesterone 濃度の検討

Star, *Cyp11a1*, *Hsd3b1* の全ての mRNA 発現は, 1-3 mm や 8 mm 以上の顆粒膜細胞に比べ, 4-7 mm で若干上昇したものの, サイズ間に有意な差は認められなかった (Fig. 1 A-C)。 *Akr1c1* mRNA 発現は 1-3 mm に比べ, 4-7 mm の顆粒膜細胞において約 2 倍に上昇し, 8 mm 以上では基底レベル以下にまで急激かつ有意に減少した (Fig. 1 D)。また卵胞液中の Progesterone 濃度は 1-3 mm では 13.4 ± 10.6 ng/ml と低濃度を示したものの, その濃度は 4-7 mm では 48.8 ± 15.6 ng/ml へと有意に増加し, 8 mm 以上においては, 137.1 ± 16.9 ng/ml にまで達し, 卵胞直径の拡大に伴い Progesterone 濃度は上昇した (Fig. 1 E)。

【実験 2】優勢卵胞の顆粒膜細胞における Estrogen 合成遺伝子の発現および卵胞液中の Estrogen 濃度の検討

Cyp17a1 mRNA の発現は 1-3 mm と 4-7 mm の顆粒膜細胞では低い値を示した一方, 8 mm 以上で急激に上昇した (Fig. 2 A)。*Cyp19a1* mRNA 発現は 1-3 mm の顆粒膜細胞では低い値を示し, 4-7 mm の顆粒膜細胞において急激かつ有意に上昇したが, その後 8 mm 以上では基底レベル以下にまで劇的に減少した (Fig. 2 B)。卵胞液中の Estrogen 濃度は 1-3 mm では 22.0 ± 7.0 ng/ml であったのに対し, 4-7 mm では 84.3 ± 18.6 ng/ml に有意に上昇し, この高い値は 8 mm 以上の卵胞 (88.7 ± 46.6 ng/ml) においても維持された (Fig. 2 C)。

【実験 3】優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境が顆粒膜細胞と卵丘細胞の生存に与える影響

生体において優勢卵胞と退行卵胞の卵胞内部の環境が顆粒膜細胞や卵丘細胞の生存に与える影響を調べる目的で, 優勢卵胞と退行卵胞における TUNEL 陽性細胞の有無と局在を解析した。その結果, 優勢卵胞では TUNEL 陽性細胞が全く認められなかったのに対し, 退行卵胞では顆粒膜細胞と卵丘細胞で TUNEL 陽性シグナルが多数認められた (Fig. 3)。

優勢卵胞内では細胞死が生じないことから, 優勢卵胞のステロイドホルモン環境にはアポトーシスを抑制する作用があると考えられた。そこで Fig. 4 で示したコントロール区と優勢卵胞区で退行卵胞由来の COC を 48 時間体外培養し, 培養後の卵丘細胞における TUNEL 陽性細胞数を比較した。その結果, 培養前の卵丘細胞では一部の細胞が TUNEL 陽性シグナルを示し, 回収直後の卵丘細胞の一部でアポトーシスが認められた。また, TUNEL 陽性シグナルはコントロール区での培養後にも多数認められた。一方, 優勢卵胞区での培養後で

は、培養前と比較し TUNEL 陽性シグナルは消失し、ほとんどの卵丘細胞は生存していた (Fig. 5 A)。また、COC1 個当たりの TUNEL 陽性細胞数を測定した結果、コントロール区では約 50 個であった細胞数は優勢卵胞区での培養により約 3 個へと有意に抑制された (Fig. 5 B)。

【実験 4】優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境が卵丘細胞の増殖に与える影響

実験 3 の結果から、優勢卵胞区での培養は卵丘細胞の抗アポトーシス作用を有したことから、卵丘細胞の増殖にも寄与することが考えられた。そこで Fig. 4 で示したコントロール区と優勢卵胞区において退行卵胞由来の COC を 24 時間培養し、培養後の卵丘細胞の PCNA 陽性細胞率、*Ccnd2* mRNA 発現を比較した。その結果、PCNA 陽性細胞はコントロール区ではほとんど認められなかったのに対し、優勢卵胞区では陽性細胞が多数認められた (Fig. 6 A, B)。また、全卵丘細胞に対する PCNA 陽性細胞の割合はコントロール区では約 4%であったのに対し、優勢卵胞区ではおよそ 15%にまで有意に上昇した (Fig. 6 C)。さらに卵丘細胞での *Ccnd2* mRNA 発現はコントロール区に比べ優勢卵胞区で 10 倍以上に有意に増加した (Fig. 6 D)。

【実験 5】優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境が卵丘細胞の膨潤と膨潤関連遺伝子 (*Has2*, *Tnfrsf10b*, *Ptx3*) の発現に与える影響

実験 3, 4 の結果から、優勢卵胞区での培養は卵丘細胞の生存と増殖に寄与すると考えられた。そこで、卵成熟の指標の一つである卵丘細胞の膨潤に与える影響に検討した結果、COC 直径はコントロール区では $207.2 \pm 12.8 \mu\text{m}$ となり、卵丘細胞の膨潤は十分に誘導されなかった。一方、優勢卵胞区で培養した COC の直径は $377.8 \pm 24.6 \mu\text{m}$ となりコントロール区に比べて有意に拡大し、顕著な卵丘細胞の膨潤が認められた (Fig. 7 A, B)。さらに卵丘細胞の膨潤関連遺伝子である *Has2*, *Tnfrsf10b*, *Ptx3* の発現もコントロール区と比較して優勢卵胞区で有意に増加した (Fig. 7 C)。

【実験 6】優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境が卵丘細胞の EGF-like factor 遺伝子 (*Areg*, *Ereg*) の発現、ERK1/2 のリン酸化に与える影響

当研究グループではこれまでに卵丘細胞において EGF-like Factor による EGF 受容体を介した ERK1/2 のリン酸化が卵成熟にとって極めて重要であることを報告している (Yamashita et al., 2007; Yamashita et al., 2014)。そこで培養後の卵丘細胞における *Areg* と *Ereg* mRNA 発現および ERK1/2 のリン酸化レベルを比較した。その結果、*Areg* mRNA の発現はコントロール区と比較して優勢卵胞区で有意に増加した。一方 *Ereg* mRNA 発現はコントロール区と優勢卵胞区で有意な差は認められなかった (Fig. 8 A)。また ERK1/2 のリン酸

化シグナルはコントロール区と比較して優勢卵胞区で有意に増加した (Fig. 8 B, C)。

【実験 7】 優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境が卵成熟と胚発生に与える影響

これまでの実験結果から、優勢卵胞区での培養は卵丘細胞の機能性向上を誘導することが明らかになった。また卵丘細胞の機能性向上は卵成熟とその後の胚発生に影響することから、優勢卵胞区での培養がこれらに与える影響を検討した。その結果、MII 率はコントロール区において $16.7 \pm 6.4\%$ と低い値であったが、優勢卵胞区では $62.1 \pm 5.1\%$ へと有意にかつ劇的に増加した (Fig. 9 A)。また、胚盤胞率はコントロール区において低い値であったが、優勢卵胞区での培養により 5 倍の約 35% にまで有意に増加した (Fig. 9 B)。

考察

初期胞状卵胞から後期胞状卵胞への発育は受精能および発生能を有する成熟卵の発育を伴う、卵胞選抜の最終段階である。ブタでは 0.5 mm 程度の卵胞で初期胞状卵胞が形成され (Oi et al., 2015), 8-12 mm 程度にまで発育した後期胞状卵胞で排卵が生じる。ブタにおいて卵胞サイズと卵の成熟率との関連について検討した Marchal らは (2002), 3 mm 未満の卵胞では卵の減数分裂再開能が低く, 受精・発生能を有していない一方, 卵胞サイズの拡大に従い卵成熟率, 受精率および胚発生率が向上することを報告した。このことから, 卵の成熟は卵胞の発育と密接に関係しており, 卵胞発育の間に生じる卵胞内部の環境変化が受精後に十分な発生能を有する成熟卵の形成に重要であると考えられている。

本研究の結果から, Progesterone 合成遺伝子は卵胞サイズに関わらず, 恒常的に発現していた。しかしながら, Progesterone の濃度は卵胞サイズの拡大に伴い上昇したことから, ブタにおいて卵胞発育に伴う Progesterone 優勢環境への移行は, 卵胞発育初期での Progesterone の代謝促進によって誘導されることが示唆された。実際に, Progesterone から Estrogen を合成する *Cyp19a1* の発現と, Progesterone を 20 α -OHP へと代謝する *Akr1c1* の発現は 4-7 mm の卵胞の顆粒膜細胞で高発現していたが, 8 mm 以上の卵胞ではこれらの遺伝子発現は有意に低い値を示した。このことから, Progesterone 濃度は卵胞発育前期から中期にかけて低い値で維持され, このためには合成された Progesterone が AKR1C1 により代謝されることが重要であると考えられた。実際, 当研究室の門川は (2015), AKR1C1 阻害剤である 5PBSA を卵胞発育期を模倣したブタ COC の体外培養時に添加して培養すると, 卵丘細胞の膨潤が抑制され, 卵丘細胞のアポトーシスが誘導されることを認めた。さらに, 未成熟マウスへ Progesterone を腹腔内投与すると卵胞退行が生じることも報告されていることから (Fukuda et al., 1980), 卵胞発育期において Progesterone 産生を抑制し, Estrogen 優勢環境を構築するためには Progesterone 合成経路ではなく, AKR1C1 による Progesterone 代謝経路が機能することが極めて重要であると考えられる。

4-7 mm の退行卵胞由来の COC を 4-7 mm と 8 mm 以上の優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境を模倣した優勢卵胞区で培養すると培養前に認められた死細胞の数が減少した一方, 卵丘細胞の増殖が促進され, 卵丘細胞の機能性および卵成熟率も上昇した。以上の結果は, 退行卵胞由来の卵においても潜在的な成熟能が存在すること, 4-7mm の卵胞発育途中であれば後天的なステロイドホルモン環境の改善により卵成熟が回復することを表し, 卵胞発育期に誘導される卵成熟はステロイドホルモンにより制御されることが示された。また, 本実験で用いた Progesterone と Estrogen を複合添加した優勢卵胞区に対し, 優勢卵胞の Progesterone 環境および Estrogen 環境をそれぞれ模倣した, Progesterone と Estrogen

の単独添加では卵丘細胞の膨潤および卵成熟は生じなかった (Okamoto et al., 2016)。このことから優勢卵胞の選抜には、卵胞および卵の発育段階に応じて至適濃度の Progesterone と Estrogen が同時に存在することが不可欠であることが明らかになった。

本研究の結果は、優勢卵胞環境が卵丘細胞のアポトーシスを抑制し、卵丘細胞の増殖と機能性の亢進および卵の成熟を促進する一方、退行卵胞では顆粒膜細胞と卵丘細胞のアポトーシスが生じ、FSH のみの添加では卵丘細胞の増殖および卵成熟は誘導されないことを示した。このことから、優勢卵胞には抗アポトーシス機構が存在する一方、退行卵胞ではこの機構が破綻し、アポトーシスが誘導されると考えられたが、そのメカニズムは不明である。アポトーシスは主に外因性経路または内因性経路により実行カスパーゼである Caspase3 が活性化することで誘導される。外因性経路では Fas Ligand (FasL) などの外因性のシグナルが Fas を含む受容体を介して開始カスパーゼの Caspase8 の活性化を誘導することで、内因性経路では放射線や低酸素といった物理的ストレスによりアポトーシス促進因子 Bad, Bak, Bax が生存促進因子 Bcl-2 や Bcl-XL の活性を阻害することでミトコンドリアからの Cytochrome c の放出を促進し、開始カスパーゼの Caspase9 を活性化することで、Caspase3 活性を促進する (Elmore, 2007)。また、Progesterone は多くの細胞種においてアポトーシスを誘導することが報告されている。Syed と Ho (2003) は不死化した卵巢表皮細胞への Progesterone の添加が、FasL の発現上昇を伴い、アポトーシスを誘導することを報告した。しかしながら、Progesterone とアポトーシスとの直接的関連の解明は未だ不十分である。Progesterone は前述のような Estrogen への合成および AKR1C1 による 20 α -OHP への代謝経路に加え、グルココルチコイドの一種である、Cortisol や Corticosterone への代謝経路を有することが知られている。また、Cortisol や Corticosterone のどちらが産生されるかは動物種により異なり、マウスやラットなどの齧歯類では Corticosterone、それ以外の哺乳動物では Cortisol がその作用を担っている。これまでにグルココルチコイドの添加は骨細胞のアポトーシスを誘導すること、マウスへのグルココルチコイド投与は嗅覚受容神経のアポトーシスを誘導することが報告されている (Takanosawa et al., 2009; Moriishi and Komori, 2014)。さらに、優勢卵胞と退行卵胞での Cortisol 産生と代謝能の違い、および退行卵胞での Cortisol 環境が卵丘細胞の機能性と卵成熟与える影響を検討した当研究室の楯は (2018)、優勢卵胞では Progesterone から Cortisol への合成遺伝子の発現が低く、Cortisol の代謝遺伝子の発現が高い一方、退行卵胞では高い Cortisol 産生遺伝子発現および低い代謝遺伝子発現となることを示した。また優勢卵胞由来の顆粒膜細胞や COC に Cortisol を添加して培養すると Bax, Fas, Caspase8 の遺伝子発現と Caspase3 のタンパク発現の増加を伴うアポトーシスが生じ、さらに卵成熟率は低下することを認めた (データ未発表)。また、Yuan らも (2016)、マウスへの Cortisol の投与は Fas および FasL の発現上昇を伴い顆粒膜細胞と卵丘細胞のアポト

ーシスを誘導し、卵成熟を抑制することを報告している。これらの結果から、優勢卵胞では Progesterone から Cortisol への合成が抑制され、Estrogen や Progesterone の優勢環境下で卵胞発育が進行する一方、退行卵胞では Progesterone から Cortisol への合成が促進される結果、卵胞内の Progesterone と Estrogen のバランスが破綻し、合成された Cortisol が卵胞内の体細胞のアポトーシスを積極的に誘導すると考えられる。

本章の結果から、卵胞発育期間中の恒常的に合成される Progesterone が卵胞発育初期から中期にかけて 20 α -OHP および Estrogen へと代謝されることが明らかとなり、ブタ優勢卵胞の発育過程で卵胞内のステロイドホルモンが Estrogen 優勢から Progesterone 優勢へと移行するメカニズムが明らかになった。さらに、優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境は退行卵胞由来の卵丘細胞の機能性向上を介して卵成熟を促進することを初めて示した。

要約

卵胞発育の過程で卵胞内のステロイドホルモン環境が Estrogen から Progesterone へと移行することは、優勢卵胞の発育に極めて重要である。しかし、Cholesterol を基に産生されるステロイドホルモンの合成と代謝がいつ、どのような機構により制御されるのか、この変化が卵成熟に与える影響は不明である。本章ではステロイドホルモンの合成と代謝に関する遺伝子群の発現とその役割を解明するため、卵胞発育期のブタ卵巣からサイズ別に優勢卵胞と退行卵胞を回収し、以下の実験を行った。

優勢卵胞の顆粒膜細胞における Progesterone 合成遺伝子 (*Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1*), Progesterone から 20 α -OHP への代謝遺伝子 (*Akr1c1*), Progesterone から Estrogen の合成遺伝子 (*Cyp17a1*, *Cyp19a1*) 発現および卵胞液中の Progesterone と Estrogen 濃度を検討した。この結果、Progesterone 合成遺伝子は卵胞サイズに関わらず恒常的に発現した一方、Progesterone の濃度は卵胞サイズの拡大に伴い上昇した。Progesterone を 20 α -OHP へと代謝する *Akr1c1* と Progesterone から Estrogen を合成する *Cyp19a1* は 4-7 mm の卵胞の顆粒膜細胞で高発現していたが、8 mm 以上の卵胞ではこれらの発現は有意に低下した。また Estrogen 濃度は 4-7 mm 以上の卵胞で有意に増加した。以上の結果から、卵胞発育期に恒常的に産生される Progesterone は、卵胞発育初期に 20 α -OHP へ代謝される、あるいは Estrogen 合成の基質として使用されることで低い濃度に保たれ、発育と共に Progesterone 代謝が抑制されると Progesterone 濃度が上昇すると考えられた。

退行卵胞由来の COC を優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境を模した優勢卵胞区で培養すると培養前に認められた TUNEL 陽性細胞数が減少し、アポトーシスが抑制された。また優勢卵胞区での培養により、卵丘細胞における PCNA 陽性細胞率が有意に増加し、卵丘細胞の増殖が促進された。また卵丘細胞の機能性も向上し、卵の MII 率、胚発生率も有意に上昇した一方、退行卵胞では顆粒膜細胞と卵丘細胞のアポトーシスが生じた。当研究室の楯らは (2018)、退行卵胞で Progesterone から Cortisol が合成され、Cortisol がアポトーシス関連因子の発現上昇、顆粒膜細胞と卵丘細胞のアポトーシス誘導を示していることから、優勢卵胞では Progesterone から Cortisol への合成が抑制され、Estrogen や Progesterone により卵胞発育が進行する一方、退行卵胞では Progesterone から合成される Cortisol がアポトーシスを積極的に誘導すると考えられる。

本章の結果から、卵胞発育期間中の恒常的に合成される Progesterone が卵胞発育初期から中期にかけて 20 α -OHP および Estrogen へと代謝されることが明らかとなり、ブタ優勢卵胞の発育過程で卵胞内のステロイドホルモンが Estrogen 優勢から Progesterone 優勢へと移行するメカニズムが明らかになった。また、ブタでは顆粒膜細胞においても Progesterone が合成

され, Estrogen 産生に利用されることを認めた。さらに, 優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境は退行卵胞由来の卵丘細胞の機能性向上を介して卵成熟を促進することを初めて示した。

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

mRNA	Primer sequences	Product size (bp)	Annealing temperature (X°C)	Accession no.
<i>I8s</i>	F:5'-GAG CGA AAG CAT TTG CCA AG-3' R:5'-GGC ATG GTT TAT GGT GGG AA-3'	107	62	AF102857
<i>Star</i>	F:5'-ACA GAC CCA GGT GGA CTT TG-3' R:5'-CCA CTG TCC CCA GAT GAA GT-3'	179	56	NM_213755.2
<i>Cyp11a1</i>	F:5'-AGG GCA CAC AGA AAA TCC AC-3' R:5'-AAT GCT GGT GAT AGG CAA CC-3'	192	64	NM_214427.1
<i>Hsd3b1</i>	F:5'-TCC ACA CCA GCA GCA TAG AG-3' R:5'-CAT GTG GGC AAA GAT GAA TG-3'	245	62	NM_001004049.1
<i>Akr1c1</i>	F:5'-TTT TCC GTC CAG AAT TGG TC-3' R:5'-CCT CGT TCT TGC ACT TCT CC-3'	207	60	NM_001044618
<i>Cyp17a1</i>	F:5'-AAG GGC TCT GGT GCC AAG TA-3' R:5'-CTT GGA ACC CAG ACG AAA GG-3'	153	64	NM_214428.1
<i>Cyp19a1</i>	F:5'-GCT AAT TGC AGC ACC AGA CA-3' R:5'-GGC TGG TAC CTC ATG CTC TC-3'	195	60	NM_214429.1
<i>Ccnd2</i>	F:5'-CGT CCA AGC TCA AAG AGA CC-3' R:5'-CGA AGA ATG TGC TCG ATG AA-3'	169	64	NM_214088.1
<i>Has2</i>	F: 5'-TTT GGA TGT GTC CAG TGC AT-3' R: 5'-GAA CTC AGC ACT CGG TTC GT-3'	152	60	NM_214053
<i>Tnfaip6</i>	F: 5'-GGC GTG TAC CTC AGA GAA GC-3' R: 5'-TGG CTT TAC AAT GGG GTA GC-3'	192	60	NM_001159607
<i>Ptx3</i>	F: 5'-CAG CTC CTG CCT CTC ACT CT-3' R: 5'-CCA ACACTGCAGACCAGAGA-3'	160	60	NM_001244783 XM_003132506
<i>Areg</i>	F:5'-TGG TCC ACA GCG ATT TAT CA-3' R:5'-CCC GAT CTG CTA CCC TGT AA-3'	223	60	NM_214376.1
<i>Ereg</i>	F:5'-CCG TTT TCC TGG TAC ATG CT-3' R:5'-GCA TGT GTC CTT GTG TTT GC-3'	246	60	XM_013978775.1

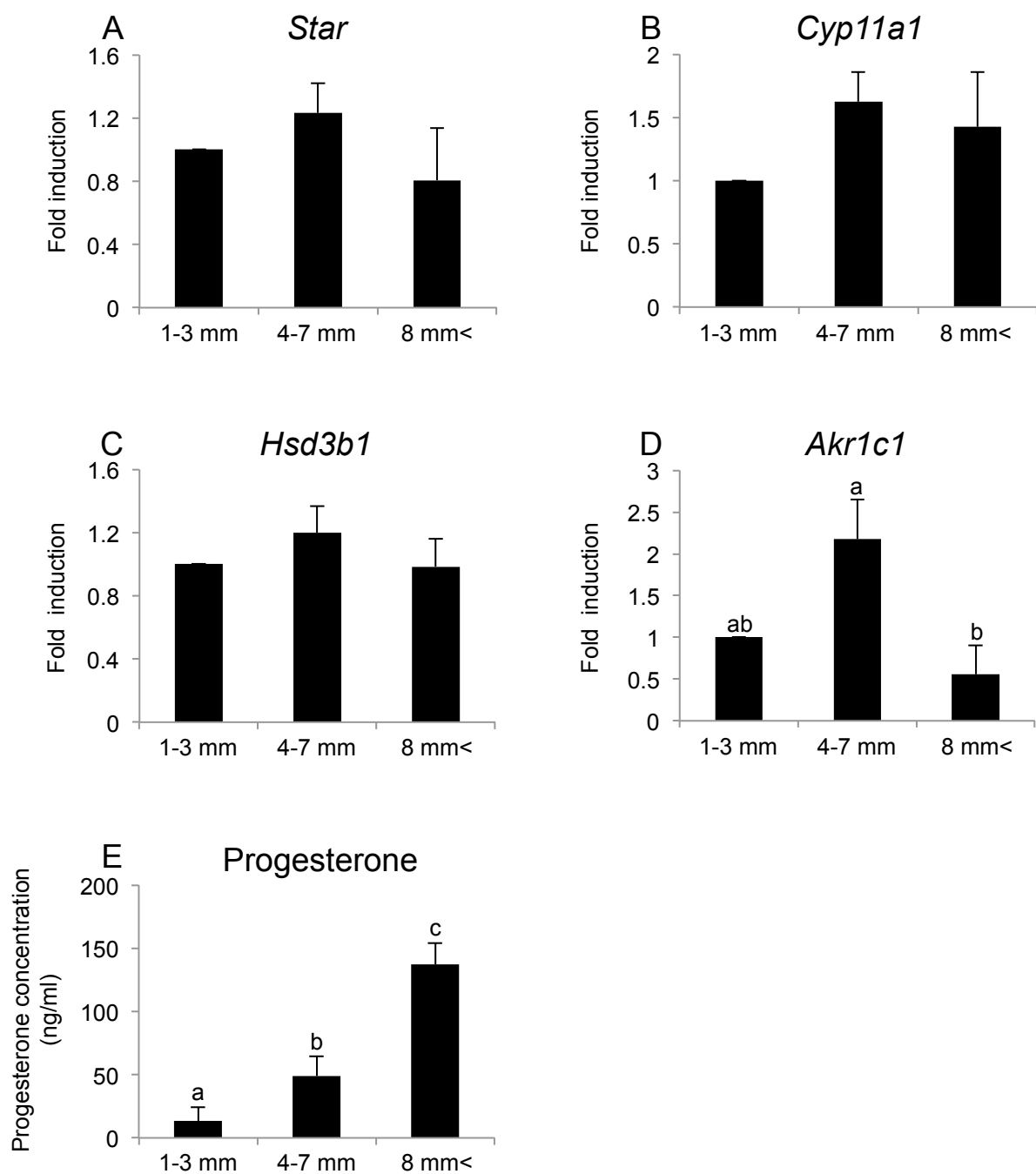


Fig. 1 1-3 mm, 4-7 mm, 8 mm<の卵胞由来の顆粒膜細胞における*Star* (A) , *Cyp11a1* (B) , *Hsd3b1* (C) , *Akr1c1* (D) mRNAの発現と卵胞液中のProgesterone濃度 (E)

A-D : 各遺伝子のmRNA発現は1-3 mmでの発現を1としたFold inductionで表示

a-c : 異符号間に有意差有り ($p < 0.05$)

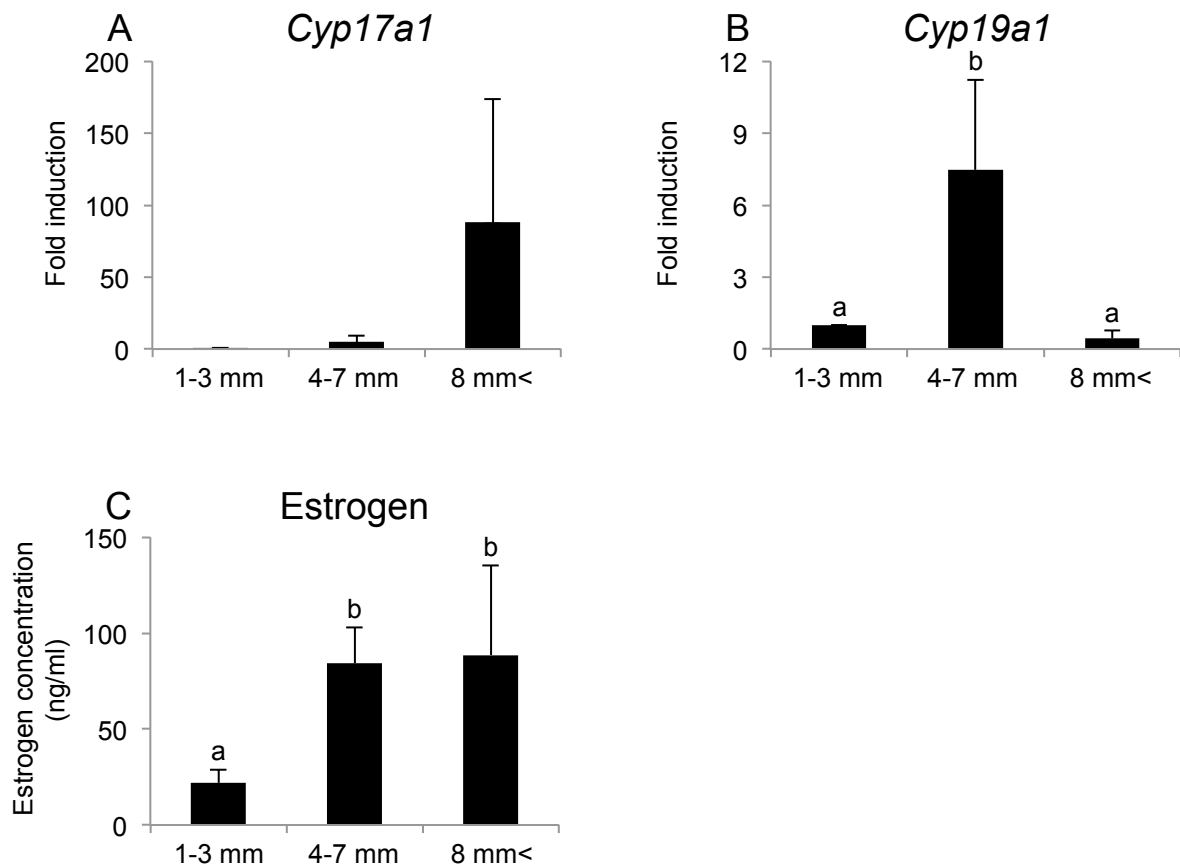
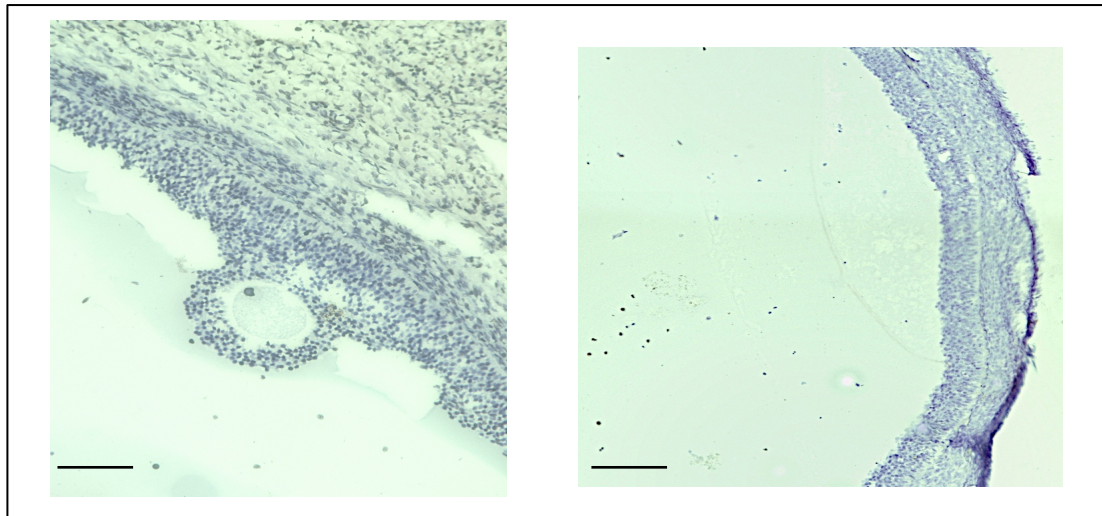


Fig. 2 1-3 mm, 4-7 mm, 8 mm<の卵胞由来の顆粒膜細胞における*Cyp17a1* (A) , *Cyp19a1* (B) mRNAの発現と卵胞液中の Estrogen濃度 (C)

A, B : 各遺伝子のmRNA発現は1-3 mmでの発現を1としたFold inductionで表示

a-b : 異符号間に有意差有り ($p < 0.05$)

A 優勢卵胞



B 退行卵胞

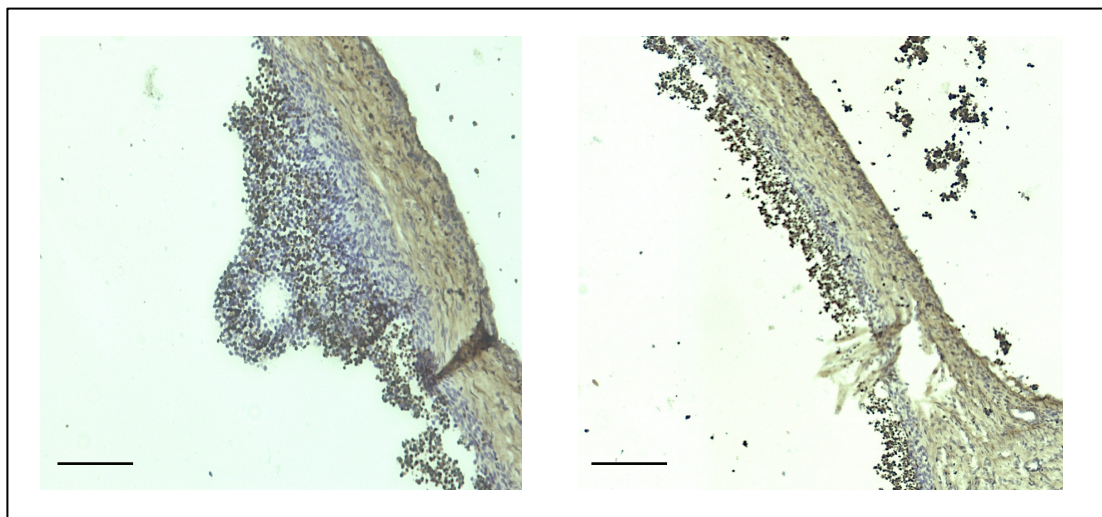


Fig. 3 優勢卵胞 (A) と退行卵胞 (B) 内のTUNEL陽性細胞の局在

Scale bar : 100 μ m

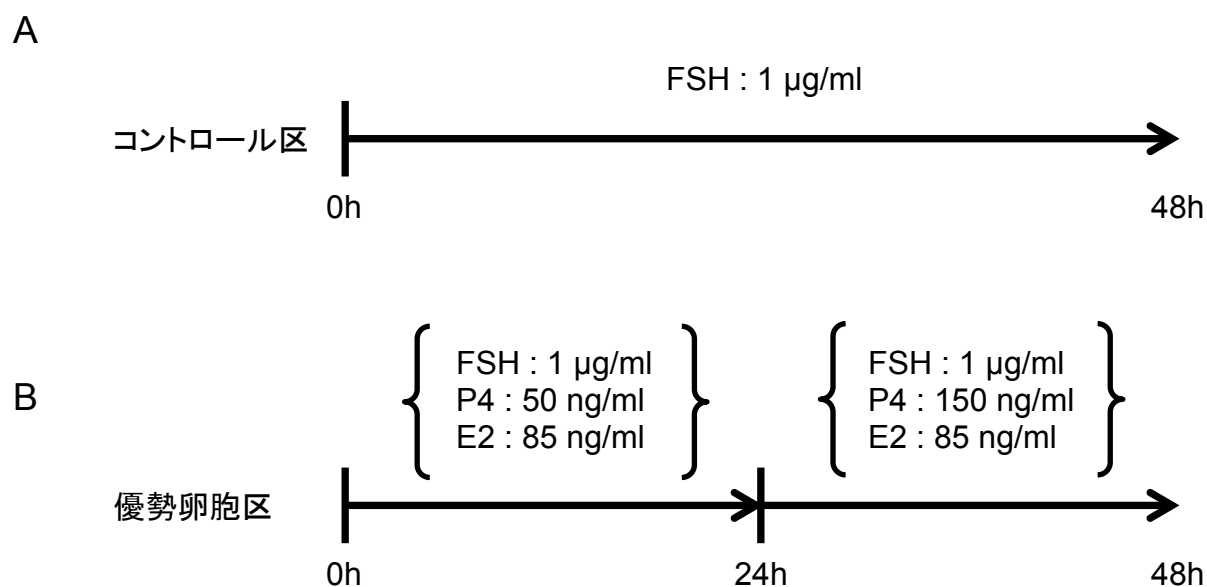


Fig. 4 体外成熟培養法に用いるコントロール区と優勢卵胞区のFSH, Progesterone, Estrogen濃度および培養時間の模式図

P4 : Progesterone濃度

E2 : Estrogen濃度

A : コントロール区

FSH (1 μ g/ml) 添加培地で48時間培養

B : 優勢卵胞区

FSH (1 μ g/ml) , Progesterone (50 ng/ml) , Estrogen (85 ng/ml) 添加培地で24時間培養後,
さらにFSH (1 μ g/ml) , Progesterone (150 ng/ml) , Estrogen (85 ng/ml) 添加培地で24時間培養

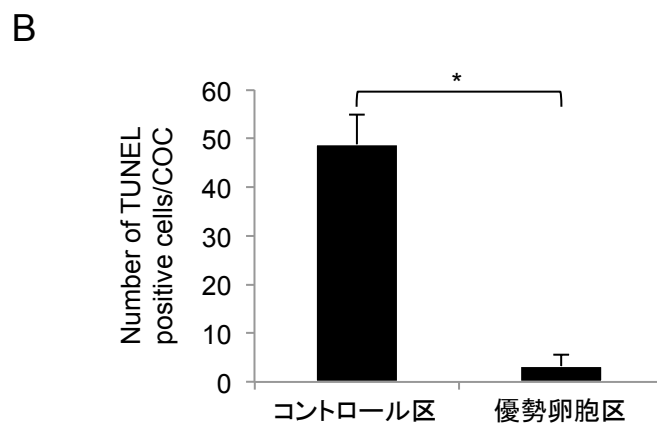
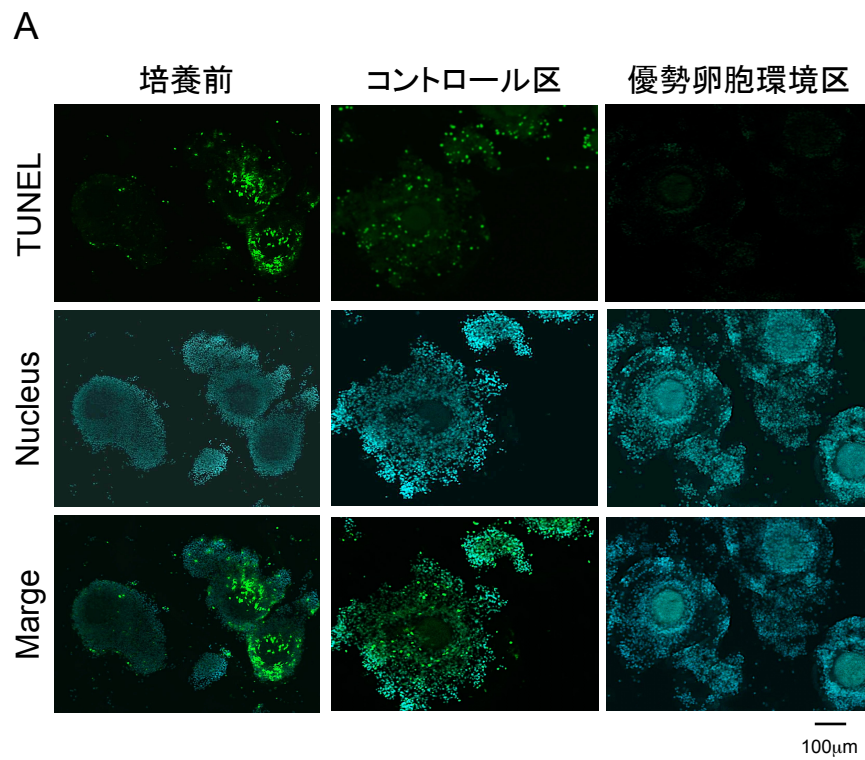


Fig. 5 退行卵胞由来のCOCをコントロール区または優勢卵胞区で48時間体外培養後のTUNEL蛍光染色像 (A) およびTUNEL陽性細胞数 (B)

B : COC1個当たりのTUNEL陽性細胞数

*: 処理区間に対して有意差有り ($p < 0.05$)

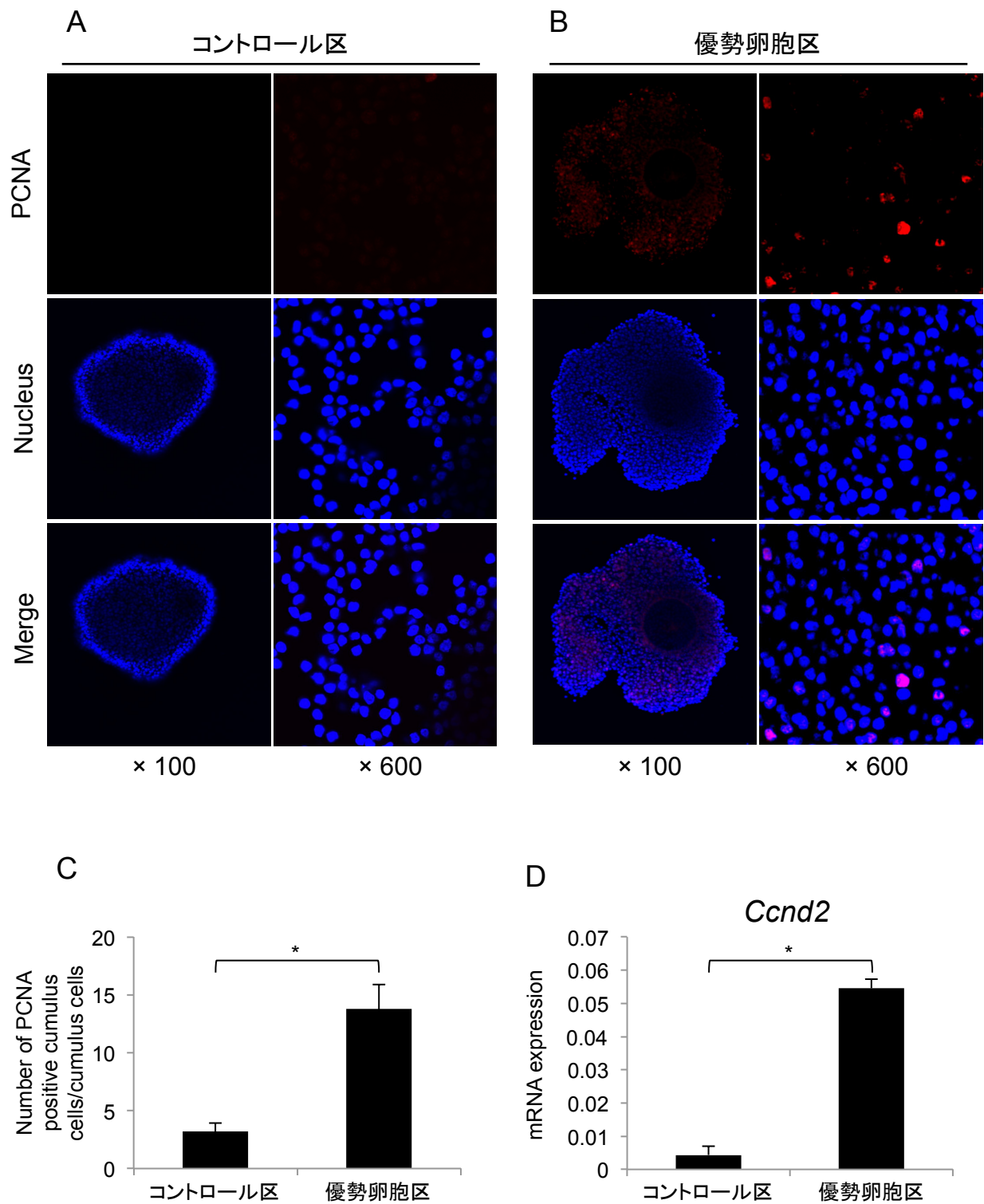


Fig. 6 退行卵胞由来のCOCをコントロール区または優勢卵胞区で24時間体外培養後のPCNA蛍光染色像 (A, B) , PCNA陽性細胞率 (C) および卵丘細胞の*Ccnd2* mRNAの発現 (D)

C : 全卵丘細胞当たりのPCNA陽性細胞率

*: 処理区間に対して有意差有り ($p < 0.05$)

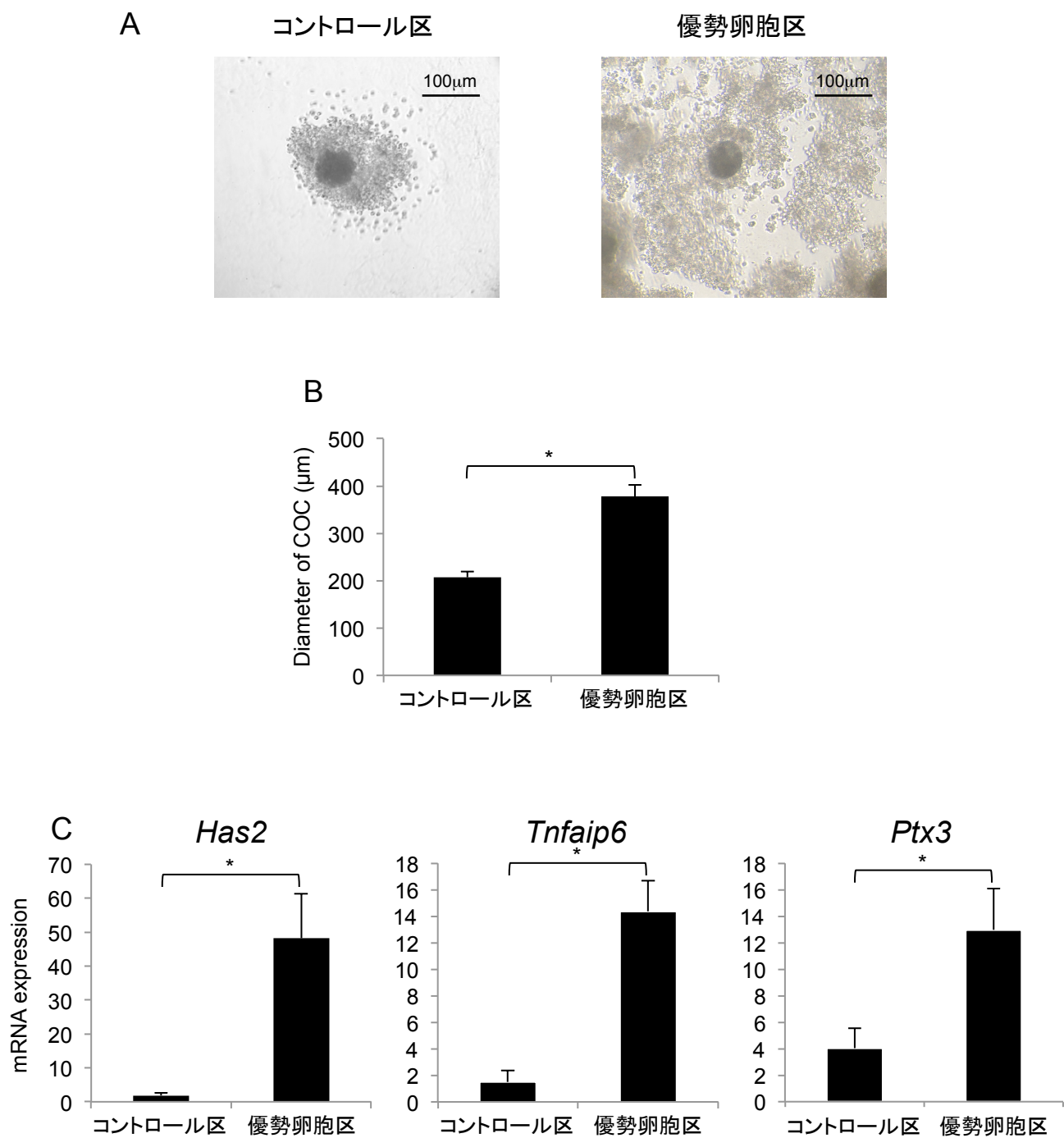


Fig. 7 退行卵胞由来のCOCをコントロール区または優勢卵胞区で体外培養後のCOC形態 (A), 直径 (B) および卵丘細胞の*Has2*, *Tnfaip6*, *Ptx3* mRNAの発現 (C)

A, B : 退行卵胞由来のCOCを48時間培養

C : 退行卵胞由来のCOCを24時間培養

*: 処理区間に対して有意差有り ($p < 0.05$)

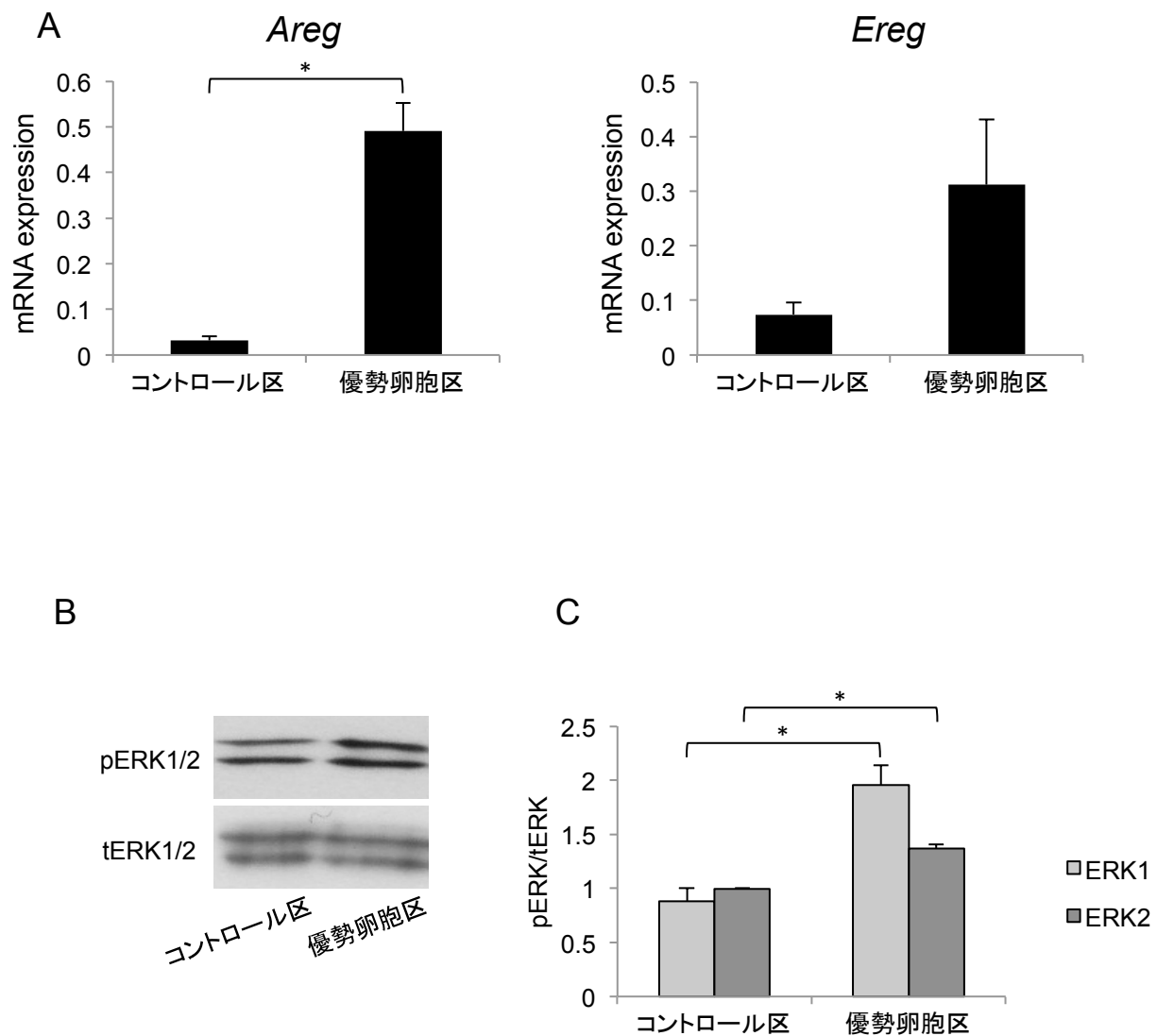


Fig. 8 退行卵胞由来のCOCをコントロール区または優勢卵胞区で体外培養後の卵丘細胞の*Areg*および*Ereg* mRNAの発現 (A) , リン酸化ERK1/2像 (B) およびリン酸化ERK1/2の相対値 (C)

A : 退行卵胞由来のCOCを3時間培養

B : 退行卵胞由来のCOCを24時間培養後, 卵丘細胞のpERK1/2, tERK1/2を検出

C : 退行卵胞由来のCOCを24時間培養後, 卵丘細胞のpERK1/2, tERK1/2強度をGel-Pro Analyzerで解析

*: 処理区間に対して有意差有り ($p < 0.05$)

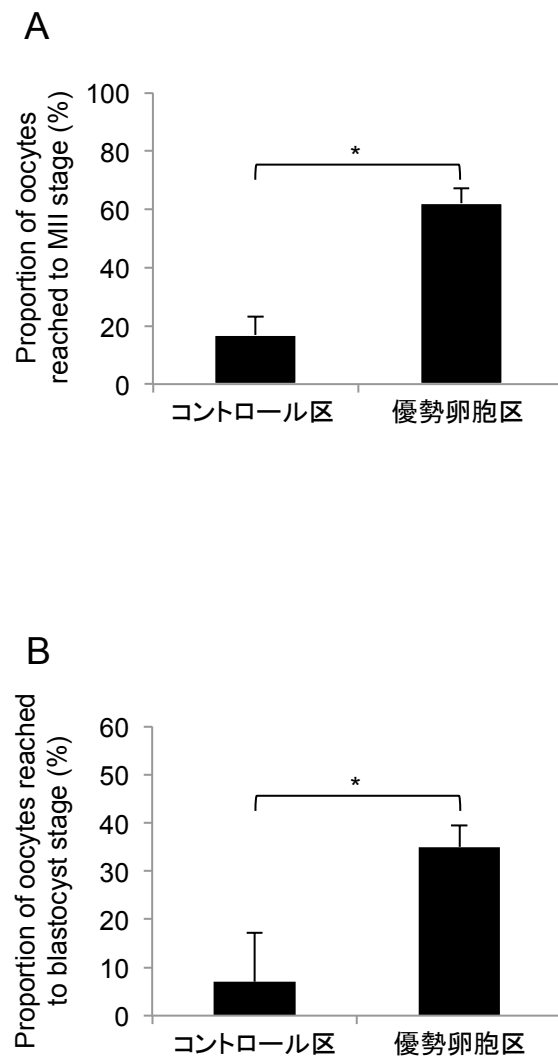


Fig. 9 退行卵胞由来のCOCをコントロール区または優勢卵胞環境区で48時間体外培養後の卵の MII率 (A) と受精試験後の胚盤胞率 (B)

*: 処理区間に対して有意差有り ($p < 0.05$)

第三章

排卵期卵巣における Neurotensin の発現と役割の検討

序論

後期胞状卵胞へと達した卵胞に、脳下垂体より放出されるサーージ状の LH 刺激が加わると、膨化した卵丘細胞と受精能を有する成熟卵の複合体である COC が卵管へと放出され排卵が成立する。しかし、排卵過程において LH に対する受容体である LHCGR は、顆粒膜細胞に高発現する一方で、卵や卵丘細胞には発現が認められない (Amsterdam et al., 1975; Peng et al., 1991)。このことから、LH の刺激を受けた顆粒膜細胞から放出される二次因子が卵丘細胞や卵に作用することで排卵が誘導されると考えられてきた。LH 依存的な二次因子の探索を行った Park らは (2004)、マウスにおいて、LH 刺激により顆粒膜細胞において EGF-like factor である AREG, EREG および BTC が発現すること、これらの因子は卵丘細胞の膨潤と卵の減数分裂再開を誘導することを報告した。また、Noma らは (2011)、LH 刺激後の顆粒膜細胞において EGF-like factor の一種である Neuregulin1 (NRG1) が発現し卵成熟を促進することを報告した。さらに、EGF-like factor の受容体の一種である EGFR (ErbB1) の機能を低下させた *Egfr*^{wa2} マウスや ErbB1 の抑制剤である AG1478 は排卵数の低下を誘導することも報告されている (Ashkenazi et al., 2005; Hsieh et al., 2007)。以上の結果から、AREG, EREG, BTC および NRG1 は LH 刺激を受けた顆粒膜細胞が、受容した LH 刺激を卵丘細胞へと伝える二次因子であり、これらの EGF-like factor は卵丘細胞に発現する ErbB に作用し、卵丘膨化、卵成熟、排卵を制御するキーファクターであることが示された。

顆粒膜細胞および卵丘細胞において EGF-like factor は ErbB1-Ras-ERK1/2 系を活性化することが知られている (Park et al., 2004; Shimada et al., 2006; Hsieh et al., 2007)。AREG 遺伝子を欠損し、低い EGFR 発現を示すダブルミュータントマウス *Areg*^{-/-} *Egfr*^{wa2/wa2} では、排卵刺激後の顆粒膜細胞において ERK1/2 の活性化が低い値を示すこと (Hsieh et al., 2011)、AREG を添加して COC を体外培養したとき、卵丘細胞において ERK1/2 の活性化が誘導されること、さらに LH によって誘導される ERK1/2 のリン酸化が AG1478 の添加により抑制されることが報告されている (Panigone et al., 2008)。また EGF-like factor の受容体である ErbB は ErbB1 の他に ErbB2, ErbB3 および ErbB4 の 4 種類が存在し、AREG は ErbB1/1, EREG と BTC は ErbB1/1, ErbB1/2, ErbB2/4, ErbB4/4, NRG1 は ErbB2/3, ErbB2/4, ErbB4/4 の様に、特異的なリガンド結合刺激により、ホモあるいはヘテロ二量体を形成することで下流にシグナルを伝えることが知られている (Galvez-Contreras et al., 2013) (Fig. 1)。さら

に、卵巣では顆粒膜細胞と卵丘細胞において ErbB1, ErbB2 および ErbB3 が恒常的に存在し、ErbB4 発現は hCG 刺激後に低下することが報告されており (Noma et al., 2011)、このことから排卵期に産生される EGF-like factor は、ErbB1, ErbB2 および ErbB3 を介して ERK1/2 の活性化を誘導すると考えられる。

LH サージ刺激により誘導される ERK1/2 のリン酸化はその下流で様々な遺伝子の発現を制御することが知られている。顆粒膜細胞特異的に ERK1/2 をノックアウトした *Erk1/2^{gc/-}* マウスにおいて、hCG 刺激後の顆粒膜細胞では、*Star* や *Cyp11a1* といった Progesterone 産生酵素が低下し、この結果黄体化が抑制されることに加え、卵丘細胞では、ヒアルロン酸合成遺伝子である *Has2* とその安定化に働く *Tnfaip6* と *Ptx3* の mRNA 発現が低下し、卵丘細胞の膨潤が認められないことが報告された (Fan et al., 2009)。さらに、Salustri ら (2004) は、*Ptx3^{-/-}* マウスにおいて安定的な卵丘膨化や受精が全く生じないこと、Fülöp ら (2003) は、*Tnfaip6^{-/-}* マウスでは、HAS2 により合成されるヒアルロン酸を保持できず、安定的な細胞外マトリクスの形成が生じないこと、この結果、排卵数が著しく減少し、雌は完全不妊となることを報告している。以上の結果から、排卵期に EGF-like factor によって活性化される ErbB-Ras-ERK1/2 系は顆粒膜細胞の黄体化に加え、卵丘細胞の膨潤を誘導し、卵成熟、排卵を亢進する極めて重要な経路であることが示された。

前述の通り、EGF-like factor は卵成熟を誘導する極めて重要な因子であるが、EGF-like factor の一種である AREG のみを体外培養系へ添加し成熟させた卵を受精試験に供した場合、その卵割率は 40% と著しく低い (Noma et al., 2011)。これに対し、マウス生体へ hCG を投与し、排卵を誘起した COC を用いた場合の卵割率は 70% 以上と非常に高値を示す (Shu et al., 2013)。このことから、生体内では EGF-like factor に加え、未知の局所性因子が存在し、機能すると示唆された。そこで本章では、当研究グループにおいて以前行った、排卵刺激前後の野生型マウスの卵丘細胞に発現する遺伝子を DNA マイクロアレイ解析により網羅的に解析したデータベースから、hCG 刺激後に発現量が 2 倍以上に増加する卵成熟促進因子を候補化した。候補化した分泌性因子から Neurensin (NTS) に着目し、卵巣における NTS とその受容体 (NTS receptor 1; NTSR1) の経時的発現と局在について検討した。また NTS の役割を検討する目的で NTSR1 の抑制剤である SR48692 (SR) を用いて、NTS が卵丘細胞の膨潤、卵成熟、胚発生および顆粒膜細胞の黄体化に与える影響を調べた。さらに NTS の作用機序を検討し、排卵期の卵巣における NTS の発現と役割を詳細に検討した。

材料および方法

RNA の回収, 逆転写反応 (Reverse Transcription; RT), Quantitative RT-PCR (qRT-PCR), 卵巣組織切片の作製, タンパク質濃度の測定, 卵巣中のステロイドホルモンの抽出および Progesterone 濃度の測定, 体外培養後の COC 膨潤直径, 卵の核相の観察, Western blotting は第二章と同様の手順で行った。

また, qRT-PCR に用いた各遺伝子に対するプライマーとアニーリング温度 (X°C) は Table. 1 に記した。さらに Western blotting に用いた一次抗体および二次抗体は Table. 2 に示した。

マウスの維持

C57BL/6 マウスを Clea Japan より購入し, 当研究室で繁殖維持した。飼料は飼育繁殖用固形飼料 (CLEA Rodent Diet CE-2, Clea Japan) を用い不断給餌, 水は不断給水とした。環境温度 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 相対湿度 $55 \pm 10\%$, 12 時間照明 (午前 6 時点灯, 午後 6 時消灯) の SPF 環境下の飼育室で飼育した 3 から 4 週齢の未成熟雌マウスまたは 3 から 4 ヶ月齢の成獣雌マウスを実験に供試した。

なお, 本動物実験は県立広島大学動物実験委員会の許可を受け, 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則に従った。

試薬の調整

・PMSG および hCG

PMSG (注射用血清性腺刺激ホルモン 動物用セロトロピン, あすか製薬) 5 IU および hCG (注射用胎盤性性腺刺激ホルモン 動物用ゴナドトロピン 3000, あすか製薬) 6 IU をマウスに腹腔内投与した。

・単離培地

単離培地は Medium 199 (Medium 199 with Hanks' salt and NaHCO_3 without L-glutamine, Sigma Aldrich) に 1% (v/v) 抗生物質と 1% (v/v) FBS を添加して作製した。なお, 単離培地は使用 3 時間以上前に作製し, 予め 37°C に温めたものを利用した。

・成熟培地

成熟培地は DMEM (DMEM, low glucose, pyruvate, Life Technologies) に 1% (v/v) 抗生物質と 1% (v/v) FBS を添加して作製した。なお, 成熟培地は培養開始 3 時間以上前に 96 ウェルプレートに移し, ウェルとウェルの間を超純水で満たし, インキュベーター (37°C , 5% CO_2 , 湿度飽和条件下) に入れ, ガス平衡により培養開始時の pH を 7.4 に調節して使用

した。

• AREG, NTS, SR

AREG (Sigma Aldrich) は DMEM で 10 $\mu\text{g/ml}$ に溶解し, -20°C で保管したものを成熟培地で最終濃度 (100 ng/ml) に希釈して使用した。NTS (Phoenix Pharmaceuticals) は, DMEM で 100 μM に溶解し, -20°C で保管したものを成熟培地で最終濃度 (1 μM) に希釈して使用した。SR48692 (Sigma Aldrich) はジメチルスルホキシド (Dimethyl Sulfoxide; DMSO, Wako) で 5 mM に溶解し, -20°C で保管したものを成熟培地で最終濃度 (75 μM) に希釈して使用した。

卵巣, COC および顆粒膜細胞 (Granulosa Cell; GC) の回収

3 から 4 週齢の雌マウスに PMSG を投与した 48 時間後, hCG を投与し, 各処理時間後に解剖により卵巣を回収した。回収した卵巣を, 単離培地を入れた 50 mm シャーレに移し, 25 G の注射針 (Terumo) を装着した 1 ml の注射筒 (Terumo) を用いて, 実体顕微鏡 (Olympus) 下で卵胞内の COC をはじき出した。実体顕微鏡下でパスツールピペットを用い, 緊密で多重層の卵丘細胞を有する COC を選別し, 回収した。

COC を回収後, シャーレ内の単離培地から卵巣組織を取り除き, 残った単離培地をエッペンドルフチューブに回収し, 1,500 rpm で 10 分間遠心分離した。遠心後, 上清を取り除き, 得られた細胞を GC サンプルとした。

COC の体外培養

回収した COC を単離培地で洗浄後, 100 μl の成熟培地を入れた 96 ウェルプレートに 100 個ずつ入れ, インキュベーター (37°C , 5% CO_2 , 湿度飽和条件下) で各時間培養した。

Semi-quantitative PCR と電気泳動による PCR 産物の可視化

Polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて cDNA を増幅した。cDNA サンプル一つにつき, PCR Buffer (Promega) を 3 μl , MgCl_2 (Promega) を 2.25 μl , 2 mM の dNTP (Promega) を 0.75 μl , prime F・R (Fasmac) を各々 0.75 μl , Taq (Promega) を 0.1 μl , 超純水を 4.4 μl , さらに cDNA サンプルを 3 μl 混合した, 計 15 μl の混合液を作製した。混合液をサーマルサイクラーを用いて, 95°C で 2 分間, その後 95°C で 30 秒間, 60°C で 30 秒間アニーリングし, 72°C で 1 分間伸長反応させた。これを 40 サイクル (*Nts*) または 31 サイクル (*Rpl19*) 行った後, 72°C で 1 分間温めることにより PCR 産物を安定化させた。生成した PCR 産物は 4°C で保存した。なお, 各サンプルにおいて, リボソームタンパク質 *Rpl19* mRNA を内部標準とした。また, *Nts* および *Rpl19* に対するプライマーは Table. 1 に示した。

生成した PCR 産物は電気泳動により可視化した。まず、超純水に 2.4 % (v/v) エチジウムブロマイド (Nacalai tesque) と 1.4 % (w/v) アガロース (Nippon genetics) を混合し、ゲルを作製した。作製したゲルは Tris-Borate EDTA Buffer (TBE, Nacalai tesque) で満たした泳動槽 (Genius, Funakoshi) に入れた。生成した PCR 産物 10 μ l を Loading buffer (Promega) 1 μ l と混合後、ゲルにアプライし、100 V の条件で約 20 分間電気泳動した。電気泳動後、UV トランスイルミネーター (ASTEC) で産物を可視化し、撮影した。

NTS 濃度の測定

卵巣の NTS 濃度測定は Neurotensin (Human, Rat, Mouse) Fluorescent EIA Kit (Phoenix Pharmaceuticals) を用いて行った。回収した卵巣に Whole-cell extract buffer を 200 μ l 添加し、超音波処理をしたものを遠心し、壊死組織片を取り除いて卵巣溶解液を作製した。この卵巣溶解液を 1x assay buffer (20x assay buffer concentrate を超純粋で希釈) で 1/1,000 億倍に希釈した。Primary antibody (rabbit anti-peptide IgG), Positive control, Biotinylated peptide, SA-HRP をそれぞれ 1x assay buffer で再水和した。Standard peptide は 1x assay buffer で段階希釈し、Standard (10,000 pg/ml, 1,000 pg/ml, 100 pg/ml, 10 pg/ml, 1 pg/ml) として用いた。プレートのウェルに Total binding (1x assay buffer), Standard, Positive control, 卵巣溶解サンプルを 50 μ l ずつ添加し、調整した Primary antibody を、ブランクウェルを除いた各ウェルに 25 μ l ずつ添加した。プレートをシールで覆い、4°C, 400 rpm で一晩震盪した。翌日、ブランクウェルを除いた全てのウェルに調整した Biotinylated peptide を 25 μ l ずつ添加した。プレートをシールで覆い、室温で 1.5 時間振盪した。1x assay buffer で洗浄後、SA-HRP 溶液を 100 μ l ずつ添加した。プレートをシールで覆い、室温で 1 時間振盪した。1x assay buffer で洗浄し、Substrate solution と Stable peroxide solution を 9:1 の割合で混合した基質溶液を各ウェルに 100 μ l ずつ添加した。再びプレートをシールで覆い、室温で 20 分間震盪した。各ウェルに Stop solution を 100 μ l ずつ添加し、蛍光マイクロプレートリーダー (Varioskan Flash; Thermo) で蛍光強度 (最大波長: 420 nm, 励起波長: 325 nm) を測定し、Standard を用いて検量線を作成した。作成した検量線をもとに、各サンプルの NTS 濃度を算出した。

免疫蛍光染色

卵巣組織切片を作製後、以下の手順で免疫組織化学染色を行った。

キシレンおよびエタノールで脱パラフィンした後、10% H₂O₂/メタノールで 10 分間インキュベートし、内在性ペルオキシダーゼの賦活化を行った。さらに 0.3% Triton-X/PBS(-) で 30 分間インキュベートし、膜透過処理を行った後、10 mM クエン酸 Buffer (Nacalai tesque) に浸し、マイクロウェーブ法により抗原賦活化を行った。その後 5% BSA/PBS(-) で 90 分間

ブロッキングした後、5%BSA/PBS(-)でそれぞれ 1:300, 1:100 に希釈した抗 NTS 抗体 (Millipore) と抗 NTSR1 抗体 (Santa Cruz) を添加し、4 時間インキュベートした。その後、二次抗体 (1:100, Anti-mouse IgG [whole molecule] F [ab']₂ Fragment- Cy3 antibody produced in sheep) で覆い室温で 2 時間静置した。その後、核染色するための DAPI を滴下し、Cy3 と DAPI の二重染色を行い、蛍光顕微鏡により NTS と NTRA1 の局在を観察した。

排卵卵子数、産仔数、黄体数の測定

3 から 4 週齢未成熟マウスに PMSG 刺激 48 時間後、hCG と同時に DMSO で希釈した SR (0.1 mg/kg) を投与し、16 時間後の卵管膨大部に排卵された COC 数を測定した。

3 から 4 週齢未成熟マウスに PMSG 刺激 48 時間後、hCG と同時に DMSO で希釈した SR (0.1 mg/kg) を投与し、48 時間後の卵巣切片を作製し、切片当たりの黄体数を測定した。

3 から 4 ヶ月齢の成獣雌マウスに DMSO で希釈した SR (0.1 mg/kg) 3 日おきに 10 日間投与した後、雄マウスと交配後、得られた産仔数を測定した。

ヒアルロン酸濃度の測定

ヒアルロン酸濃度の測定は Quantikine ELISA Hyaluronan (R&D System) を用いて行った。回収した COC に PBS を 30 μ l 添加し、超音波処理後、Cell Lysis Buffer 2 (R&D System) を 30 μ l 添加し、30 分間室温で撹拌した。遠心分離後、壊死組織片を取り除いたものを、RD5-18 溶液で希釈し、サンプルの調整を行った。Wash Buffer Concentrate を超純水で 25 倍希釈し Wash Buffer を作製した。Hyaluronan Standard を RD5-18 で段階希釈し、Standard (20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2.5 ng/ml, 1.25 ng/ml, 0.625 ng/ml) を作製した。RD1-14 を 50 μ l ずつ添加したプレートの各ウェルに、さらに Standard, Control (RD5-18), サンプルを 50 μ l ずつ添加した。プレートをシールで覆い、500 rpm, 室温で 2 時間振盪した。各ウェルを Wash Buffer で 5 回洗浄後、Color Reagent A と Color Reagent B を 1:1 で混合して作製した基質溶液をウェルに 100 μ l ずつ添加した。プレートを遮光し、室温で 30 分間静置後、各ウェルに Stop Solution を 100 μ l ずつ添加した。マイクロプレートリーダーで吸光度 (波長: 450 nm, 補正波長: 540 nm) を測定し、Standard を用いて作成した検量線をもとに各サンプルに含まれるヒアルロン酸濃度を算出した。

受精試験

- ・精子前培養、媒精、発生用ドロップの作製

精子前培養、媒精には HTF medium, 発生には KSOM medium (ARK Resource) を用いた。50 mm シャーレに HTF medium を用い 400 μ l の精子前培養用ドロップ、200 μ l の媒精用

ドロップ、KSOM medium を用い 50 μm の発生用ドロップを作製した。各ドロップは乾燥を防ぐために、ミネラルオイルで覆い、インキュベーター内 (37°C, 5% CO_2 , 湿度飽和条件下) で一晩ガス平衡化した。

・精子の前培養, 精子数の調整, 受精

3 ヶ月齢の C57BL/6 雄マウスから解剖により精巣上体尾部を採取した。採取した精巣上体尾部から精子を採取し、精子前培養ドロップで 90 分間インキュベートした。ドロップの中程から精子前培養液 30 μl をエッペンドルフチューブに回収した。そのうち 10 μl を 3 % NaCl (超純水に NaCl を溶解) 90 μl が入ったエッペンドルフチューブに移して 10 倍希釈し、全量血球計算盤を用いて、正立顕微鏡 (Olympus) 下でカウントした。成熟培養後の卵を媒精用ドロップに移し、そこへ 2×10^5 sperm/ml になるように調整した前培養精子を添加して 6 時間共培養し、受精させた。

・発生

受精後、卵に付着している精子を実体顕微鏡下でパスツールピペットを用いて除去し、発生用ドロップに移した。受精卵を 5 日間培養し、発生の様子を倒立位相差顕微鏡で観察した。なお培養期間中、卵割が生じた受精卵を受精、胚盤胞期胚へ達した受精卵を胚盤胞期胚とし、受精率および胚盤胞率を算出した。

統計処理

試験は、それぞれ 3 回以上繰り返し、その結果は、Excel 統計 (Microsoft) を用いて統計分析した。算出した結果は、平均値 \pm 標準誤差で表示した。

3 群以上の比較は、一元配置分散分析の後、Fisher の最小有意差法で算出し、5%水準で有意差があると判定した。ただし、受精率、胚盤胞率に関しては、arc-sin で変換後、一元配置分散分析を行った。

実験計画

【実験 1】排卵期のマウス卵丘細胞において発現する卵成熟促進候補因子の探索

排卵期の卵丘細胞において発現する新たな卵成熟促進因子を探索する目的で、性成熟前の野生型マウスに PMSG 投与した 48 時間後と PMSG に引き続き hCG 投与した 8 時間後の卵巣から回収した卵丘細胞を比較したマイクロアレイデータから hCG 投与後に発現の上昇が認められる卵成熟促進候補因子を探索し、候補化した。

【実験 2】マウスの各臓器における *Nts mRNA* の発現比較

無刺激のマウス大脳、小脳、延髄、肺、心臓、脾臓、肝臓、腎臓、胃、小腸、大腸、

筋肉、精巣、無刺激の卵巢から Total RNA を抽出し、semi-quantitative RT-PCR 法により *Nts* mRNA の発現を調べた。また一部のマウスから PMSG 投与 48 時間後に hCG 投与し 8 時間後の卵巢を採取し、Total RNA を抽出し、semi-quantitative RT-PCR 法により *Nts* mRNA の発現を調べた。

【実験 3】PMSG および hCG 刺激後のマウス卵巢における *Nts* mRNA と NTS 量、および *Ntsr1* mRNA の経時的変化と NTS、NTSR の局在解析

卵胞発育および排卵期の卵巢における *Nts* と *Ntsr1* mRNA 発現および NTS 量の経時的変化を調べる目的で、PMSG 投与 48 時間後、および hCG 投与 2, 4, 8, 12, 16 時間後の未成熟のマウスから卵巢を回収した。卵巢から顆粒膜細胞と COC 由来の卵丘細胞を採取後、Total RNA を抽出し、qRT-PCR 法により、これらの遺伝子発現の変化を解析した。また、同様の処理をした卵巢からタンパク質を抽出し、ELISA 法により NTS 濃度を測定した。さらに、同様の処理をした卵巢を固定後、組織のパラフィン切片を作製し、抗 NTS、抗 NTSR1 抗体を用いた免疫蛍光染色法により卵巢内の NTS と NTSR1 の局在を調べた。

【実験 4】排卵期の NTS が妊孕性および顆粒膜細胞の黄体化に与える影響

NTS が雌の妊孕性に与える影響を検討する目的で、未成熟マウスに hCG あるいは hCG と SR を投与した 18 時間後、卵管膨大部から COC を回収し排卵数を測定した。また同様の処理を施した 16 時間後のマウス卵巢から回収した COC を受精試験に供試し、5 日間の発生培養後、胚盤胞率を調べた。さらに、3 ヶ月齢から 4 ヶ月齢の雌マウスに Vehicle または SR を 3 日おきに 10 日間投与し、雄と交配後の産子数を測定した。くわえて、NTS が排卵後の顆粒膜細胞の機能的黄体化に与える影響を検討するために、未成熟マウスに hCG あるいは hCG と SR を投与した 16 時間後の顆粒膜細胞と 48 時間後の卵巢を回収した。回収した顆粒膜細胞から Total RNA を抽出し、qRT-PCR 法により、Progesterone 産生遺伝子 *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1* mRNA の発現を解析した。また卵巢からタンパク質を抽出後、ステロイド分画を抽出し、ELISA 法を用いて Progesterone 濃度を測定した。さらに一部の卵巢は固定後、組織のパラフィン切片を作製し、HE 染色法により卵巢切片当たりの黄体数を調べた。

【実験 5】COC の体外培養系において NTS が卵丘細胞の膨潤および卵成熟に与える影響

COC の体外培養時においても NTS が卵丘細胞の機能性や卵成熟に影響を与えるのかを検討する目的で、PMSG 刺激 48 時間後の卵巢から回収した COC を AREG、NTS をそれぞれ単独添加した区、AREG と NTS の同時添加区、そこにさらに SR を添加した処理区で 12 時間培養後、卵丘細胞における膨潤関連遺伝子 *Has2*, *Tnfaip6*, *Ptx3* mRNA 発現を qRT-PCR

法により、16 時間培養後の 20 個の COC が蓄積するヒアルロン酸量を ELISA 法により測定した。また 16 時間培養後の COC の膨潤直径および卵の MII 率も測定した。さらに、16 時間培養後の一部の COC を受精試験に供試し、受精率と 5 日間の発生培養後の胚盤胞率を調べた。

【実験 6】NTS が ERK1/2 のリン酸化に与える影響

NTS が排卵にとって極めて重要な因子である卵丘細胞の ERK1/2 の活性化に果たす役割を検討する目的で、未成熟のマウスに PMSG を投与し 48 時間後、hCG 投与あるいは hCG と同時に SR を投与し、2, 4, 8, 12, 16 時間後の卵巣から卵丘細胞を回収した。また、PMSG 投与 48 時間後に回収した COC を AREG, NTS をそれぞれ単独添加した区、あるいは AREG と NTS を同時添加した区で 2, 4, 6, 8, 12, 16 時間培養後、卵丘細胞を回収した。回収した卵丘細胞からタンパク質を抽出後し、Western Blot 法を用いて ERK1/2 の経時的活性変化を調べた。

【実験 7】NTS による排卵期の ERK1/2 活性化維持機構の解明

実験 6 の結果から NTS による卵丘細胞の ERK1/2 の活性化持続作用を認めたことから、ERK1/2 の上流経路である顆粒膜細胞の ADAM17 と EGF-like factor の発現と卵丘細胞の ErbBs の発現に NTS が与える影響を検討する目的で、未成熟のマウスに PMSG を投与し 48 時間後、hCG 投与あるいは hCG と同時に SR を投与し 2, 4, 8, 12, 16 時間後の卵巣から顆粒膜細胞と卵丘細胞を採取し、Total RNA とタンパク質を抽出後、qRT-PCR 法により顆粒膜細胞での *Adam17*, *Areg*, *Ereg*, *Btc*, *Nrg1* mRNA と卵丘細胞での *Erbbl*, *Erb2*, *Erb3*, *Erb4* mRNA の発現と Western Blot 法により顆粒膜細胞での ADAM17 と EREG 発現と卵丘細胞での ErbB1 発現を検出した。

結果

【実験 1】 排卵期のマウス卵丘細胞において発現する卵成熟促進候補因子の探索

PMSG 投与 48 時間後、あるいは PMSG に続き、hCG を投与した 8 時間後の卵丘細胞を比較したマイクロアレイデータから、hCG 投与後に発現上昇する卵成熟促進候補因子を探索した。この結果、既に報告されている EGF-like factor の一種である *Areg* や *Btc*, 卵丘細胞の膨潤関連遺伝子である *Has2* や *Ptx3* などの既知遺伝子に加え、卵巣においてこれまで報告されていない、神経ペプチドの *Neurotensin* (*Nts*) や *Protein kinase, cGMP-dependent, typeII* (*Prkg2*) などの因子を見出し、これを候補化した (Table. 3)。この内、*Nts* 発現がそれ以外の候補因子に比べ、hCG 刺激後の卵丘細胞において、約 211 倍と著しく高値を示していたことから、以降の実験では *Neurotensin* に着目し、その発現と発現機序について解析した。

【実験 2】 マウスの各臓器における *Nts* mRNA の発現比較

NTS はこれまでに中枢神経系や消化器系における発現が報告されている (Vincent et al., 1999)。そこで、野生型マウスから中枢神経器官である大脳、小脳、延髄、消化器官である胃、小腸、大腸、さらに肺、心臓、脾臓、肝臓、腎臓、筋肉、精巣と無刺激あるいは PMSG および hCG を投与した卵巣における、*Nts* mRNA 発現を比較した。この結果、既に *Nts* の発現が報告されている中枢神経器官では延髄、消化器官では小腸と大腸にバンドが検出され、それ以外の臓器ではシグナルは検出されなかった。卵巣では、排卵刺激していない無刺激ではシグナルが認められなかった一方、hCG 刺激 8 時間後では、延髄や小腸、大腸よりも、著しく強いバンドが検出された (Fig. 2)。

【実験 3】PMSG および hCG 刺激後のマウス卵巣における *Nts* mRNA と NTS 量, および *Ntsr1* mRNA の経時的変化と NTS, NTSR の局在解析

実験 2 の結果より、hCG 刺激 8 時間後の卵巣において、中枢神経系や消化器系以上の *Nts* mRNA 発現が認められたことから、*Nts* mRNA は排卵刺激依存的に発現が誘導されることが示唆された。そこで、マウスに PMSG および hCG を投与し、卵胞発育と排卵を誘起させた顆粒膜細胞と卵丘細胞における *Nts* mRNA と卵巣における NTS 量の経時的変化を調べた。その結果、*Nts* mRNA 発現は hCG 刺激 2 時間後までは顆粒膜細胞、卵丘細胞共に低い値であったのに対し、hCG 刺激 6 時間後に両細胞において有意な発現上昇が認められた。また、卵丘細胞では hCG 刺激 8 時間後まで *Nts* mRNA の有意な発現上昇が認められた。これらの発現上昇は hCG 刺激 12 時間後以降、顕著に低下した (Fig. 3 A)。卵巣の NTS 量は hCG 刺激 12 時間後までは低い値を示したが、hCG 刺激 16 時間後の卵巣では、その量は 3

倍以上に有意に増加した (Fig. 3 B)。NTS タンパク質の局在を解析した結果、hCG 刺激前の卵巣では顆粒膜細胞において陽性細胞が検出されたものの、そのシグナルは極弱いものであった。しかし、hCG 刺激 16 時間後の卵巣では顆粒膜細胞と卵丘細胞において強い染色像の陽性細胞が検出された (Fig. 3 C)。

NTSR をコードする *Ntsr1* の遺伝子発現変化を PMSG および hCG 刺激した顆粒膜細胞と卵丘細胞において解析した結果、*Ntsr1* mRNA は顆粒膜細胞と卵丘細胞のどちらの細胞においても、全ての時間で一様に発現していた (Fig. 4 A)。一方、NTSR1 の局在シグナルは、hCG 刺激前の卵巣では顆粒膜細胞において微弱な NTSR1 陽性細胞が検出され、このシグナルは hCG 刺激 16 時間後の卵巣の顆粒膜細胞と卵丘細胞において顕著に増加した (Fig. 4 B)。

【実験 4】 排卵期の NTS が妊孕性および顆粒膜細胞の黄体化に与える影響

実験 3 の結果から、排卵刺激後の卵巣において NTS とその受容体が存在することが明らかとなった。そこで排卵期の卵巣における NTS の役割を調べるために、マウスに NTSR1 の拮抗阻害剤である SR を投与し、NTS が排卵数、胚発生率、産仔数に与える影響について検討した。その結果、hCG 投与では 20.1 ± 2.1 個であった排卵数は SR 投与により 5.7 ± 4.7 個に顕著に減少した (Fig. 5 A)。また、hCG または hCG+SR を投与し 16 時間後の卵巣より回収した COC を受精試験に供試した結果、hCG 投与では $57.5 \pm 4.8\%$ であった胚盤胞率は SR 投与により $15.5 \pm 10.8\%$ へと有意に減少した (Fig. 5 B)。さらに、雌マウスに SR を投与後、雄マウスとの交配により得られた産仔数は、非投与に比べて 7 割程度に減少した (Vehicle; 9 ± 2 匹, +SR; 6.5 ± 0.5 匹) (Fig. 5 C)。

排卵後の卵巣では顆粒膜細胞が黄体細胞へと分化し、妊娠の成立と維持に重要な Progesterone を産生する。そこで NTS が排卵後の顆粒膜細胞における Progesterone 産生遺伝子の発現、卵巣中の Progesterone 濃度および黄体形成に与える影響を検討した。その結果、*Star*, *Cyp11a1* の発現は SR 投与により有意に減少した (Fig. 5 D, E)。Hsd3b1 発現も有意差は認められなかったものの SR 投与により減少した (Fig. 5 F)。また卵巣中の Progesterone 濃度も有意差は認められないものの SR により低下した (Fig. 5 G)。さらに、hCG 投与した卵巣では多数認められた黄体は、SR 投与した卵巣では殆ど認められなかった (Fig. 5 H)。また黄体数を計測した結果、hCG では 12.2 ± 1.0 個であった黄体数は SR 投与により 3.9 ± 0.3 個に有意に減少した (Fig. 5 I)。

【実験 5】 COC の体外培養系において NTS が卵丘細胞の膨潤および卵成熟に与える影響

実験 4 において、NTS は胚発生と顆粒膜細胞の黄体化を亢進することが明らかとなった。そこで NTS の機能をより詳細に検討するために PMSG 刺激後の卵巣から COC を回収

し、NTS 区あるいは EGF-like factor の一種である AREG 区、NTS と AREG と同時添加した AREG+NTS 区、さらに AREG と NTS に SR を添加した AREG+NTS+SR 区で体外培養し、NTS が卵丘細胞の機能性と卵成熟に与える影響を検討した。卵丘細胞における膨潤関連遺伝子である *Has2*, *Tnfaip6*, *Ptx3* mRNA の発現を測定した結果、全ての遺伝子発現は、AREG 区と NTS 区で低い値を示した一方、AREG+NTS 区ではこれらの遺伝子発現が有意に上昇した。またこの上昇は SR の添加により有意に抑制された (Fig. 6 A)。卵丘細胞に蓄積するヒアルロン酸量を調べた結果、AREG 区では 85.0 ± 2.2 ng のヒアルロン酸が蓄積されていたものの、NTS 区では 1.8 ± 2.2 ng の蓄積しか認められなかった。一方、AREG+NTS 区においてヒアルロン酸量は 107.8 ± 7.2 ng へと有意に増加しており、この量は卵管膨大部から回収した排卵された COC (*in vivo*; 108.5 ± 35.7 ng) の量に匹敵する程であった。また、この増加は AREG+NTS+SR 区において 25.8 ± 6.0 ng へと有意に減少していた (Fig. 6 B)。

AREG や NTS の単独添加と比較し、AREG と NTS の同時添加により膨潤関連遺伝子と卵丘細胞間隙に蓄積されるヒアルロン酸量が増加することから、培養 16 時間後の COC の膨潤直径と形態の観察を行った。その結果、AREG+NTS 区 (289.6 ± 10.4 μ m) では AREG 区 (222.9 ± 13.7 μ m) の約 1.3 倍、NTS 区 (155.0 ± 4.3 μ m) の約 1.9 倍の有意な直径の増大が認められ、この直径は、排卵された COC 直径 (*in vivo* ; 296.9 ± 15.4 μ m) と同等であった。一方、この直径拡大は AREG+NT+SR 区 (190.7 ± 6.7 μ m) で有意に抑制された (Fig. 6 C)。また、16 時間培養した後の COC 形態は、AREG+NTS 区では卵丘細胞間隙の拡大に伴う COC 直径の増大が認められ、hCG 刺激 16 時間後の排卵 COC と同様の形態をしていた。一方、NTS 区、AREG+NTS+SR 区では卵丘細胞間隙の拡大は認められず、最外層の卵丘細胞が繊維芽状に変形していた (Fig. 6 D)。

これまでの実験結果より、AREG と NTS を同時添加して培養することで卵丘細胞の機能性を向上させることが明らかになったため、卵の MII 率と受精試験後の受精率および胚盤胞率に対する影響についても調べた。その結果、MII 率は AREG 区では $48.2 \pm 14.9\%$ 、NTS 区では $25.2 \pm 5.2\%$ であったのに対し、AREG+NTS 区では $62.8 \pm 3.2\%$ と増加が認められ、この増加はさらなる SR の添加で $27.6 \pm 4.5\%$ と有意に減少した (Fig. 6 E)。受精率は AREG 区では $55.0 \pm 5.0\%$ 、NTS 区では $25.0 \pm 25\%$ であったのに対し、AREG+NTS 区では $79.4 \pm 9.4\%$ と有意な増加が認められ、この増加は SR の添加で約 10% と有意に減少した (Fig. 6 F)。また、胚盤胞率は AREG 区では $29.2 \pm 3.4\%$ 、NTS 区で $10.7 \pm 3.7\%$ であったが、AREG+NTS 区では $48.7 \pm 4.1\%$ にまで増加した。しかし SR の添加は $11.1 \pm 7.4\%$ にまで胚盤胞率を有意に抑制した (Fig. 6 G)。

【実験 6】NTS が ERK1/2 のリン酸化に与える影響

実験 4 と実験 5 に結果から、NTS は卵丘細胞の機能性を亢進し、卵成熟を促進することで排卵と胚発生および排卵後の顆粒膜細胞の黄体化を誘導することが明らかとなった。そこで NTS による制御メカニズムを推測するために、卵成熟、黄体化、排卵に重要であることが知られる ERK1/2 のリン酸化に NTS が及ぼす影響を調べた。PMSG 投与後に hCG あるいは hCG と同時に NTSR1 の抑制剤の SR を投与し、各時間に回収した卵丘細胞における ERK1/2 の経時的リン酸化パターンを調べた結果、hCG 投与 4 時間後の卵丘細胞において認められた顕著な ERK1/2 のリン酸化シグナルは排卵直前期に相当する投与 16 時間後まで強く維持されていた。一方 hCG と同時に SR を投与した卵丘細胞では、投与 4 時間後に認められた ERK1/2 のリン酸化シグナルは hCG 投与に比べて弱く、このシグナルは投与 8 時間までは維持されていたものの 12 時間後以降、基底レベルにまで減弱した (Fig. 7 A)。

体内において、NTS は ERK1/2 の持続的リン酸化に関与していると考えられたことから、NTS の役割がより明確に検討な体外培養系を用いて検討を行なった。COC を AREG あるいは NTS の単独添加区および AREG と NTS の同時添加区で体外培養し、リン酸化 ERK1/2 の変化を調べた結果、AREG 区では培養 2 時間後に強いリン酸化シグナルが認められたが、徐々にそのシグナルは減少し、培養 6 時間以降ではほとんど検出されなかった (Fig. 7 B)。また、NTS 区でも培養 2 時間後に強いシグナルが認められたが、その後シグナルは減弱した (Fig. 6. C)。AREG+NTS 区では、リン酸化シグナルは培養 2 時間後から認められ、16 時間後まで強く維持されており (Fig. 7 D)、これは生体内で排卵誘導した卵丘細胞と同様の ERK1/2 活性パターンを示していた (Fig. 7 A)。

【実験 7】NTS による排卵期の ERK1/2 活性化維持機構の解明

実験 5 の結果から、NTS は ERK1/2 の上流を制御する因子であると考えられた。このことから、NTS は EGF-like factor の切断酵素 (ADAM17)、EGF-like factor あるいは ErbB の発現を誘導していると考えられた。始めに、顆粒膜細胞において ADAM17 の遺伝子発現とタンパク質発現を測定した。その結果、hCG 区と hCG+SR 区において *Adam17* mRNA の発現に有意な差は認められなかった (Fig. 8 A)。ADAM17 のタンパク質発現は、hCG 刺激 6 時間後に認められたものの、その発現は時間経過と共に減弱し、16 時間後には認められなかった。一方、SR 区では投与 8 時間後から顕著な ADAM17 シグナルを検出し、この強いシグナルは 16 時間後まで維持された (Fig. 8 B)。

次に、顆粒膜細胞における EGF-like factor の発現に NTS が与える影響を調べたところ、hCG 投与前は低値を示した *Areg* と *Btc* の遺伝子発現は SR 投与の有無にかかわらず、投与後 2 時間から 4 時間にかけて急激に上昇した後、6 時間以降では基底レベル以下にまで顕著

に低下した。*Areg* と *Btc* mRNA 発現が SR 投与による影響を受けなかった一方、hCG 投与前に比べ、hCG 投与 4 時間後と 8 時間後で高い値を示した *Ereg* と、hCG 投与 4 時間後で高値を示した *Nrg1* 発現は、SR の投与により有意に低下した (Fig. 9 A)。また、SR 投与によって遺伝子発現が抑制された EREG タンパク質の発現を調べた結果、hCG 投与後 6 時間から 8 時間にかけて検出された強いシグナルが SR の同時投与により、消失した (Fig. 9 B)。

さらに、NTS が卵丘細胞における ErbB family member の発現に与える影響を検討した結果、hCG 投与 8 時間後に顕著に増加した *ErbB2* と *ErbB3* の発現が SR 投与により基底レベルにまで有意かつ顕著に抑制された。一方、*ErbB1* では SR 投与により恒常的に、*ErbB4* では投与 12 時間から 16 時間後にかけて hCG 投与に比べ有意に遺伝子発現が上昇した (Fig. 10 A)。またこの ErbB1 の SR 投与による発現増加はタンパク質レベルでも検出された (Fig. 10 B)。

考察

NTS はウシ視床下部において初めて単離された神経性ペプチドであり、Lys-Arg2-Asx-Glx2-Pro2-Ile-Leu2-Tyr2 の 13 個のアミノ酸から構成される (Carraway and Leeman, 1973)。また NTS の受容体には、共に 7 回膜貫通型の GPCR で NTS と高親和性の NTSR1 と低親和性の NTSR2、および 1 回膜貫通領域を有し、NTS 以外のリガンドも結合可能である非特異性の NTSR3/sortilin の 3 種類が存在し、これらの受容体は NTS の C 末端配列を認識することで下流にシグナルを伝えている (Vita et al., 1993; Hermans and Moloteaux, 1998; Mazella, 2001)。NTS はこれまで脳におけるドーパミン系の調節因子 (Binder et al., 2001; Thibault et al., 2011)、および胃や小腸における運動性や分泌機能の制御因子 (Carraway and Leeman, 1976; Zhao and Pothoulakis, 2006) として機能することが報告されているが、排卵期の卵巣における NTS の発現制御機構および機能は不明であった。

本実験において、NTS の発現は、hCG 刺激 8 時間以降に顆粒膜細胞発現が増加し、この発現は、EGFR 阻害剤 (AG1478) および ERK1/2 阻害剤 (U0126) により著しく低下していた (Sup Fig. 1)。Park らは (2004)、排卵期のマウス卵巣において AREG は hCG 刺激後 1 時間から 3 時間にかけて、BTC は hCG 刺激後 3 時間から 6 時間にかけて一過的に誘導されるのに対し、EREK は刺激後 1 時間から排卵直前期に相当する 12 時間まで発現が維持されることを報告している。このことから、NTS の発現は、AREG、BTC および EREG による刺激により活性化される ERK1/2 系により誘導されるものと考えられる。ヒトカルチノイド細胞である BON 細胞において NTS のプロモーター配列を検討した Evers らは (1995)、NTS 配列の上流に AP-1 サイト、CRE 様サイト、糖質コルチコイド応答配列 (Glucocorticoid response element ; GRE) が存在し、これらの中でも *Nts* のプロモーター活性に AP-1 が極めて重要であることを報告している。また当研究グループでは排卵期の卵巣においても AP-1 サイトに結合するに結合する転写因子の JunD と Fra2 がリン酸化されその活性が増加し、さらにこのリン酸化が ERK1/2 依存的であること (Sharma and Richards, 2000)、卵巣特異的に ERK1/2 をノックアウトした *Erk1/2*^{gc-/-} マウスでは野生型マウスに比べ、排卵刺激後の顆粒膜細胞における *Nts* 発現が低下することを報告している (Fan et al., 2009)。以上の結果から、排卵時に発現する NTS の発現は、hCG 刺激後初期に発現する EGF-like factor-ErbB-ERK1/2-JunD/Fra2 により増加しているものと考えられる。

本研究の *in vivo* および *in vitro* 解析により排卵期の卵巣における NTS の役割を検討した結果、NTS は卵丘細胞の膨潤、卵成熟、排卵および黄体化の亢進に機能する極めて重要な因子であることが明らかになった。また NTS の受容体 NTSR1 は GPCR 型の受容体であり、その下流で PKC 経路、Akt 経路、NF- κ B 経路および ERK1/2 経路の活性化を誘導する

ことが知られている (Ehlers et al., 1998; Guha et al., 2002; Zhao et al., 2003; Hassan et al., 2004)。本実験において、排卵期に発現する NTS は卵丘細胞の ERK1/2 の活性を維持する因子であること、NTS の阻害により、卵丘細胞の膨潤、卵成熟、胚発生および黄体化が抑制されることが示された。また NTSR1 の阻害剤である SR の投与により、EGF-like factor の内、*Ereg*, *Nrg1* mRNA と *ErbB2*, *ErbB3* mRNA 発現が排卵期の中期から後期に抑制されていたことから、NTS は排卵期中期から後期にかけて EGF-like factor-ErbB-ERK1/2 シグナルを上方制御し、卵丘細胞の膨潤、卵成熟、胚発生、黄体化を誘導しているものと考えられる。

本研究において、NTS は ERK1/2 活性の維持を促進したことから、この制御には、NTS により EGF-like factor および ErbB の発現制御が関与すると考えられた。そこで、NTS は、①EGF-like factor の切断を促進する ADAM17 の発現、②EGF-like factor の発現、および③ErbB の発現を制御し、ERK1/2 活性を制御すると仮説を立てこれらの可能性を調べた。この結果、排卵期中期から後期にかけて顆粒膜細胞の EREG と NRG1 の発現および卵丘細胞における ErbB2 と ErbB3 の発現を亢進する因子であることが初めて明らかになった。EREG は hCG 刺激後 1 時間から排卵期後期にかけて発現すること (Park et al., 2004)、NRG1 は卵成熟の前半から後半まで ERK1/2 のリン酸化を誘導することが明らかになっていることから (Noma et al., 2011)、NTS は排卵中期から後期にかけての EREG-ErbB2 経路あるいは NRG1-ErbB2/ErbB3 経路を上方制御し、ERK1/2 のリン酸化を維持すると考えられた。

本研究において、卵丘細胞では排卵期間中の継続的な ERK1/2 のリン酸化が誘導されていたのに対し、顆粒膜細胞では hCG 刺激 2 時間以降で ERK1/2 のリン酸化は認められていない (Fan et al., 2009)。このことから、顆粒膜細胞における NTS の役割は ERK1/2 の維持ではなく、Progesterone の産生と黄体化に限定されると考えられた。NTS による ERK1/2 のリン酸化維持が卵丘細胞にのみ認められる要因として卵由来因子が卵丘細胞の ERK1/2 に影響を与えることが考えられる。GDF-9 や Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP-15) は卵から卵丘細胞に作用する代表的な卵由来因子として知られており、Lin らは (2014)、ブタ IVF 系への GDF-9 や BMP-15 の添加が卵丘細胞の膨潤や卵成熟が促進することを報告した。このことから、EREG, NRG1, ErbB2, ErbB3 の発現促進により卵丘細胞で限定的に認められた ERK1/2 活性の維持を誘導する NTS の働きは、GDF-9 や BMP-15 などの卵由来の成長因子と協働している可能性が示唆された。

本章により、排卵期の卵巣において NTS は LH サージ後に顆粒膜細胞と卵丘細胞に発現すること、発現した NTS は NTSR1 を介して、排卵中期から後期において卵丘細胞に作用する EREG, NRG1 とそれらの受容体である ErbB2 と ErbB3 の発現を亢進し、ERK1/2 の活性を維持することが初めて示された。さらにその結果、卵丘細胞の機能性と卵成熟と黄体化が十分に促進されることが明らかになった。以上の結果から、NTS は、これまで報告さ

れてきた EGF-like factor-ErbB-ERK1/2 経路の活性化を促進することで、LH サージ刺激の伝達と増幅に機能するマスターキーであることが明らかとなった (Fig. 11)。

要約

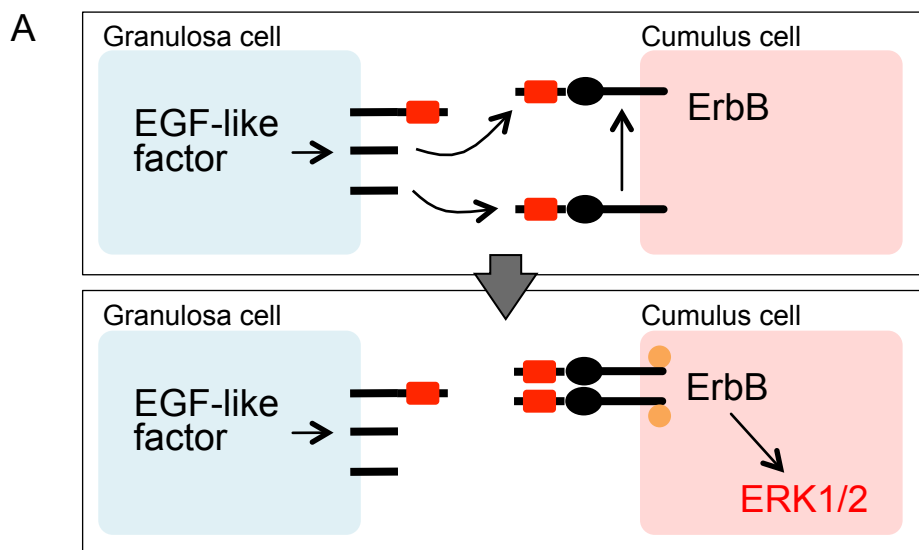
後期胞状卵胞に LH サージ刺激が加わると、COC が卵管へと放出され、排卵が成立する。しかし、排卵過程において LH 受容体 LHCGR は、顆粒膜細胞に高発現する一方で、卵や卵丘細胞には発現しないことから、LH の刺激を受けた顆粒膜細胞から放出される二次因子が卵丘細胞や卵に作用し、排卵が誘導され则认为られてきた。これまでの研究から排卵刺激後の顆粒膜細胞において EGF-like factor と切断酵素 ADAM17 が発現すること、切断されたリガンド部位が卵丘細胞の ErbB-ERK1/2 系に作用し、卵成熟、卵丘膨化および排卵を誘導することが明らかになっている。しかし COC の体外培養系に AREG を添加して培養したときの卵成熟率は体内成熟卵と比べて低く、生体内では卵巢局所で作用する制御因子の存在が示唆されてきた。本章では、排卵期のトランスクリプトーム解析結果から NTS に着目し、排卵期における NTS の発現と役割を検討した。

PMSG と hCG を投与した未成熟マウスから、卵巢、顆粒膜細胞、卵丘細胞を回収し、NTS と NTSR1 の遺伝子発現、タンパク質発現、および局在を調べた結果、*Nts* は顆粒膜細胞と卵丘細胞で hCG 刺激後に有意に増加し、卵巢中のタンパク質も hCG 刺激後に有意に増加した。NTSR1 は hCG 刺激後に顆粒膜細胞と卵丘細胞に局在していた。

未成熟マウス PMSG と hCG 投与および hCG+SR(NTSR1 抑制剤)を投与し NTS が妊孕性と顆粒膜細胞に黄体化に与える影響を検討した結果、排卵数、産仔数、*Star* と *Cyp11a1* 発現、Progesterone 濃度、および黄体数は SR により減少した。体外培養系により NTS の詳細な役割を検討した結果、NTS のみでは効果が認められないものの、NTS は AREG と協働することで卵丘細胞の機能性を亢進し、卵成熟を促進することが明らかになった。

NTS の標的因子を予測するために、卵成熟を誘導するために重要な経路である ERK1/2 のリン酸化を体外成熟培養で検討した結果、AREG あるいは NTS 単独では一過的であった ERK1/2 のリン酸化が、AREG と NTS と協働することで体内と同様に排卵期中期から後期まで維持することが明らかになった。そこで NTS の標的因子が ERK1/2 の上流に存在することが明らかになったことから、その可能性のある EGF-like factor 切断酵素 (ADAM17)、EGF-like factor (*Areg*, *Btc*, *Ereg*, *Nrg1*) と卵丘細胞の ErbB (*ErbB1*, *ErbB2*, *ErbB3*, *ErbB4*) に NTS が与える影響を検討した。その結果、顆粒膜細胞での *Adam17*, *Areg* と *Btc*, 卵丘細胞での *ErbB1*, *ErbB4* の発現は NTS の影響を受けなかったが、顆粒膜細胞の *Ereg* と *Nrg1* と卵丘細胞の *ErbB2* と *ErbB3* 発現は NTS により発現が制御されることが明らかになった。

本章の結果から、NTS は顆粒膜細胞の EREG, NRG1 と卵丘細胞の ErbB2, ErbB3 の発現を亢進し、排卵直前期までリン酸化 ERK1/2 を持続させることで、成熟卵や黄体形成を誘導するマスターキーであることが明らかになった。



B

EGF-like factor	Dimerization of ErbB
AREG	ErbB1-ErbB1
BTC EREG	ErbB1-ErbB1
	ErbB1-ErbB2
	ErbB2-ErbB4
	ErbB4-ErbB4
NRG1	ErbB2-ErbB3
	ErbB2-ErbB4
	ErbB4-ErbB4

Fig. 1 EGF-like factorによるErbBシグナル伝達のメカニズムの模式図 (A) と各EGF-like factorが誘導する二量体化ErbBの一覧 (B)

A : EGF-like factorは特異的なErbBに結合すると, ErbBはホモまたはヘテロ二量体を形成し, 互いをリン酸化することで, 下流にシグナルを伝達し, ERK1/2をリン酸化を誘導する

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

mRNA	Primer sequences	Product size (bp)	Annealing 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>Nts</i>	F:5'-GTG TGG ACC TGC TTG TCA GA-3' R:5'-TGC TTT GCT GAT CTT GGA TG-3'	177	60	NM_024435
<i>Ntsr1</i>	F:5'-GCC CCT CCT CCT AAG AAA TG-3' R:5'-ACT CCA GGC TGA GTC CTT CA-3'	225	54	018766 XM
<i>Star</i>	F:5'-GCA GCA GGC AAC CTG GTG-3' R:5'-TGA TTG TCT TCG GCA GCC-3'	249	60	NM_011485
<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	NM_001304800 XM_006501035
<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	NM_008216
<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	NM_009398.2
<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	NM_008987.3
<i>Adam17</i>	F:5'-TTC AGG CAA TCA AAG CAG TG-3' R:5'-CAA ACG GTA AAC GCC TCA AT-3'	161	64	AH006905
<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>Btc</i>	F:5'-GGA ACC TGA GGA CTC ATC CA-3' R:5'-TCT AGG GGT GGT ACC TGT GC-3'	227	60	NM_007568
<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>Nrg1</i>	F:5'-TGCATTGCTGGCCTAAAGTG R:5'-GTT CTT CCG GG TGG GTA CTG-3'	258	64	Noma et al., 2011
<i>Erbbl1</i>	F:5'-TGC CAA GGC ACA AGT AAC AG-3' R:5'-GTT GAG GGC AAT GAG GAC AT-3'	192	64	AF124513
<i>Erbbl2</i>	F:5'-CCC TAG GTA CTG GGA GCA CA-3' R:5'-GTC CTT TGG TTA CCC CCA CT-3'	186	60	L47239
<i>Erbbl3</i>	F:5'-AGT TCT CCC GTC CCA TCT CT-3' R:5'-GGG AGT AAG CAG GCT GTG TC-3'	197	60	L47240
<i>Erbbl4</i>	F:5'-CCC AGG CTT TCA ACA TAC CT-3' R:5'-CCT CTG GTA TGG TGC TGG TT-3'	150	60	L47241

Table.2 Western Blotに用いた一次抗体および二次抗体リスト

一次抗体	製品名	分子量 (kDa)	希釈倍率 (X倍)	二次抗体
p-ERK1/2	Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (E10) Mouse mAb Cell Signaling Technology	42/44	1000	Anti-mouse IgG
t-ERK1/2	p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb Cell Signaling Technology	42/44	1000	Anti-rabbit IgG
ADAM17	TACE Antibody Cell Signaling Technology	135	1000	Anti-mouse IgG
EREG	Mouse Ephiregulin Antibody R&D Systems	28	1000	Anti-goat IgG
ErbB1	EGF receptor Antibody Cell Signaling Technology	175	1000	Anti-rabbit IgG
β -Actine	β -Actin Antibody Cell Signaling Technology	45	1000	Anti-rabbit IgG

二次抗体	製品名	希釈倍率 (X倍)
Anti-mouse IgG	Anti-mouse IgG, Horseradish peroxidase (HRP) - linked Antibody Cell Signaling Technology	5000
Anti-rabbit IgG	Anti-Rabbit IgG, Horseradish peroxidase (HRP) - linked Antibody Cell Signaling Technology	3000
Anti-goat IgG	Anti-goat IgG, Horseradish peroxidase (HRP) - linked Antibody Novus Biologicals	5000

Table.3 hCG刺激後のマウス卵丘細胞において発現上昇する遺伝子

Gene name	Gene ID	Fold induction by hCG (0-8 h)
Neurotensin	<i>Nts</i>	211.8
Pentraxin related gene	<i>Ptx3</i>	63.0
Runt related transcription factor 2	<i>Runx2</i>	59.7
Steroidogenic acute regulatory protein	<i>Star</i>	49.7
Protein kinase, cGMP-dependent, type II	<i>Prkg2</i>	39.0
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	<i>Enpp3</i>	37.1
Early growth response 3	<i>Egr3</i>	36.8
Sphingosine kinase 1	<i>Sphk1</i>	35.7
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	<i>Ptgs2</i>	30.8
Frizzled homolog 1 (Drosophila)	<i>Fzd1</i>	26.1
Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 4	<i>Cited4</i>	25.7
Tumor necrosis factor alpha induced protein 6	<i>Tnfaip6</i>	24.0
Dual specificity phosphatase 4	<i>Dusp4</i>	19.5
Betacellulin	<i>Btc</i>	18.5
Secreted frizzled-related protein 4	<i>Sfrp4</i>	11.6
Amphiregulin	<i>Areg</i>	10.5
Dual specificity phosphatase 6	<i>Dusp6</i>	9.6
Hyaluronan synthase 2	<i>Has2</i>	8.6

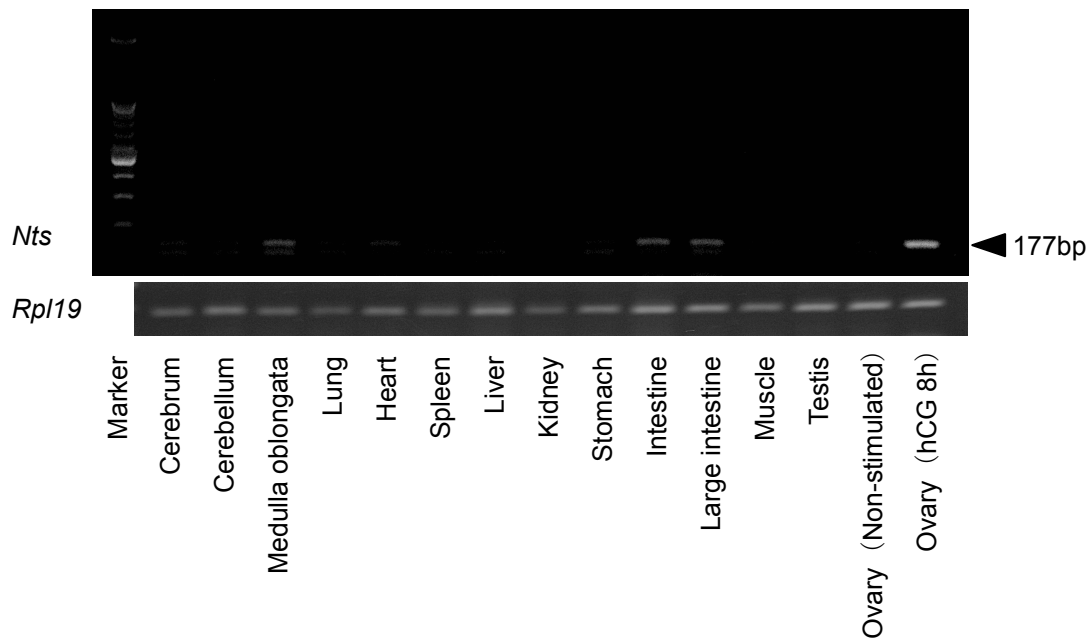


Fig. 2 マウスの各臓器における*Nts* mRNAの発現比較

Cerebrum : 大脳

Cerebellum : 小脳

Medulla oblongata : 延髄

Lung : 肺

Heart : 心臓

Spleen : 脾臓

Liver : 肝臓

Kidney : 腎臓

Stomach : 胃

Intestine : 小腸

Large intestine : 大腸

Muscle : 筋肉

Testis : 精巣

Ovary (Non-stimulated) : 卵巣 (無刺激)

Ovary (hCG 8h) : 卵巣 (hCG 8h)

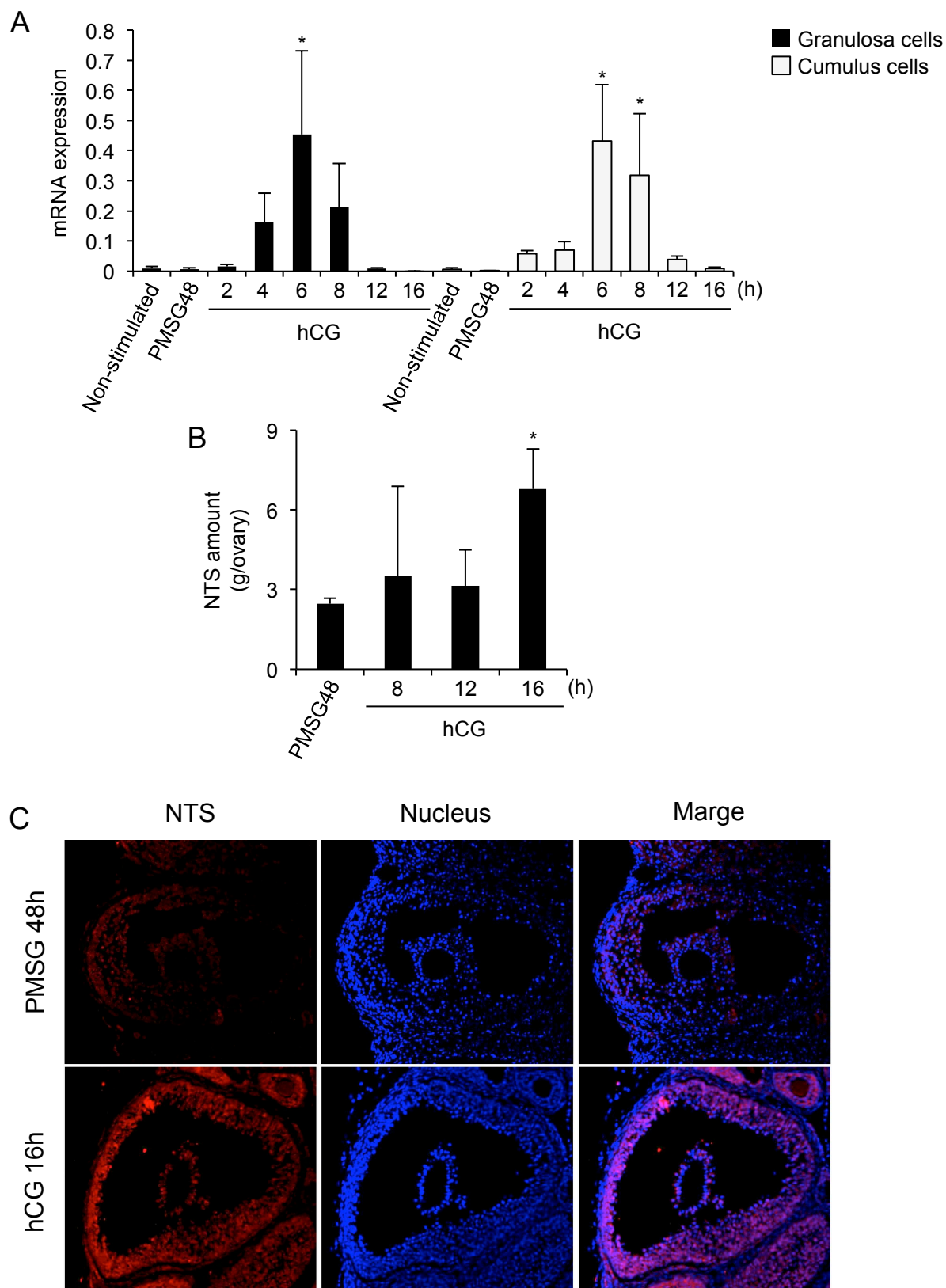


Fig. 3 無刺激，PMSGおよびhCG刺激後の卵巣における*Nts* mRNA (A)，NTS量 (B) の経時的変化およびNTS局在 (C)

A：無刺激 (Non-stimulated)，PMSGおよびhCG刺激後の顆粒膜細胞 (Granulosa cells) と卵丘細胞 (Cumulus cells) における*Nts* mRNA

B：PMSGおよびhCG刺激後の卵巣におけるNTS量

C：PMSGおよびhCG刺激後の卵巣のNTS局在

*：PMSG 48hに対して有意差有り ($p<0.05$)

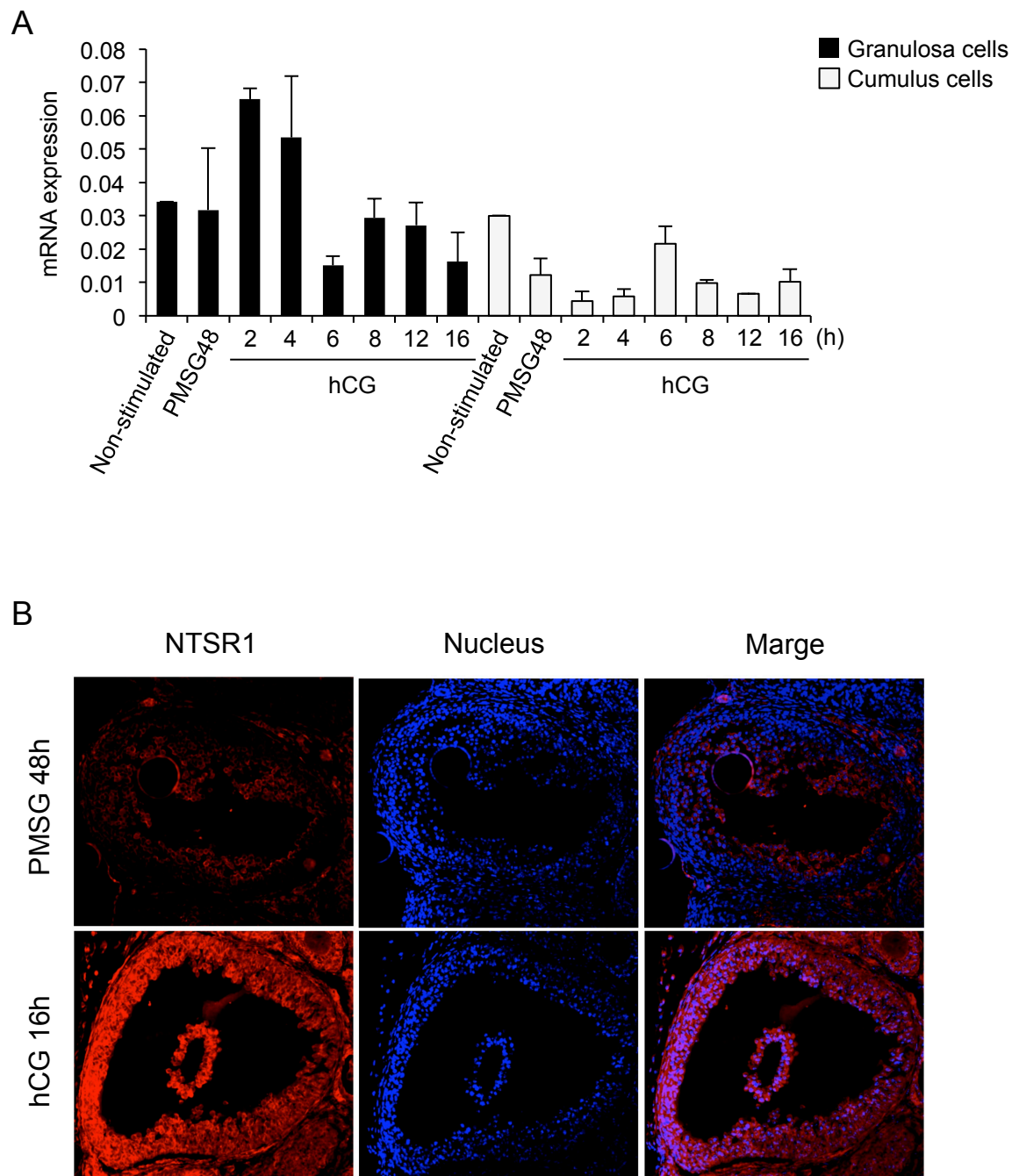


Fig. 4 無刺激，PMSGおよびhCG刺激後の卵巣における*Ntsr1* mRNA (A) とNTSR1の局在 (B)

A : 無刺激 (Non-stimulated) , PMSGおよびhCG刺激後の顆粒膜細胞 (Granulosa cells) と卵丘細胞 (Cumulus cells) における*Ntsr1* mRNA

B : PMSGおよびhCG刺激後の卵巣のNTSR1局在

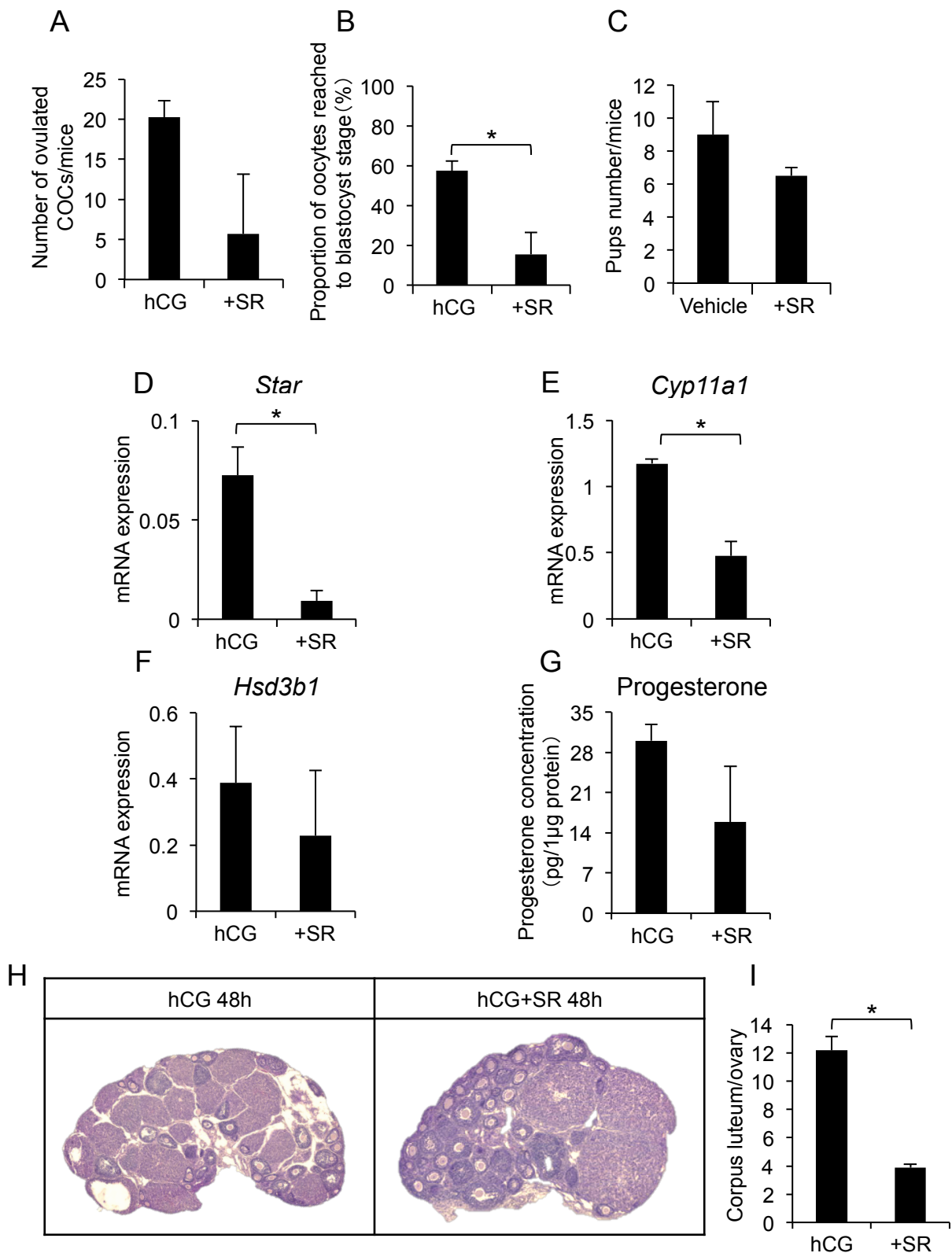


Fig. 5 hCGあるいはhCG+SR投与後の排卵数 (A), 受精試験後の胚盤胞率 (B), VehicleあるいはSR投与後の産仔数 (C), 顆粒膜細胞における*Star* (D), *Cyp11a1* (E), *Hsd3b1* (F) mRNAの発現, 卵巣中のProgesterone濃度 (G), 卵巣所見 (H) および黄体数 (I)

A : hCGおよびhCG+SR投与18時間後の排卵数

B : hCGおよびhCG+SR投与16時間後のCOCを受精試験に供試した後の胚盤胞率

C : VehicleおよびSR投与した雌マウスを雄マウスと交配後に得られた産仔数

D-F : hCGおよびhCG+SR投与16時間後の顆粒膜細胞での遺伝子発現

G-I : hCGおよびhCG+SR投与48時間後の卵巣のProgesterone量 (G), 黄体所見 (H) および黄体数 (I)

* : 処理区間に対して有意差有り (p<0.05)

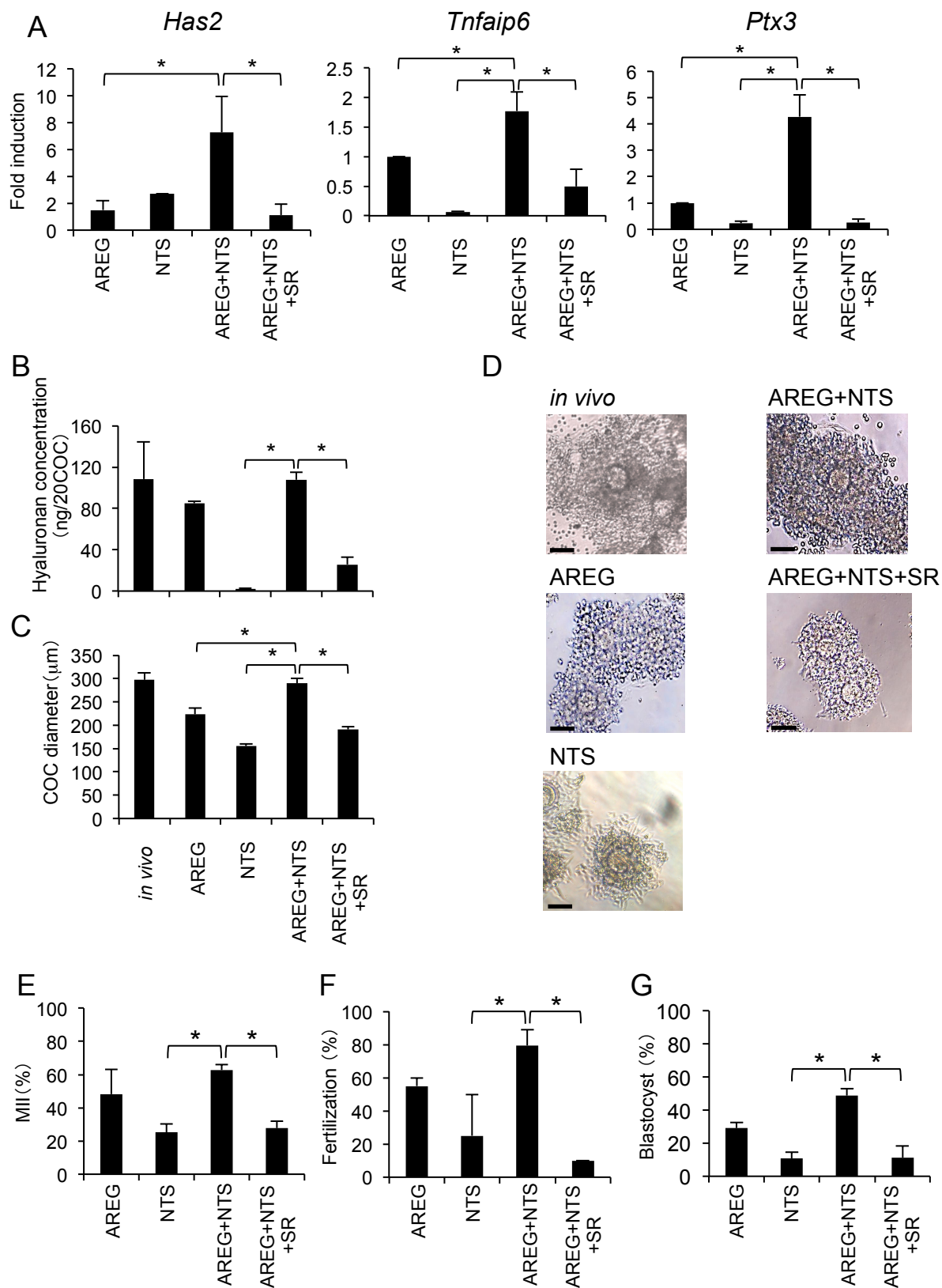


Fig. 6 PMSG投与48時間後に回収したCOCをAREG区、NTS区、AREG+NTS区、AREG+NTS+SR区で12時間培養後の卵丘細胞の*Has2*, *Tnfaip6*, *Ptx3* mRNAの発現(A), 16時間培養後のCOCのヒアルロン酸量(B), 膨潤直径(D)と形態(E), 卵のMII率(E), および受精試験後の受精率(F)と胚盤胞率(G)

in vivo: hCG刺激18時間後の卵管膨大部から回収

NTS: NTS (1 μM) 添加培地で培養

AREG+NTS+SR: AREG, NTSとSR (75 μM) 添加培地で培養

*: 処理区間に有意差あり (p<0.05)

AREG: AREG (100 ng/ml) 添加培地で培養

AREG+NTS: AREGとNTS添加培地で培養

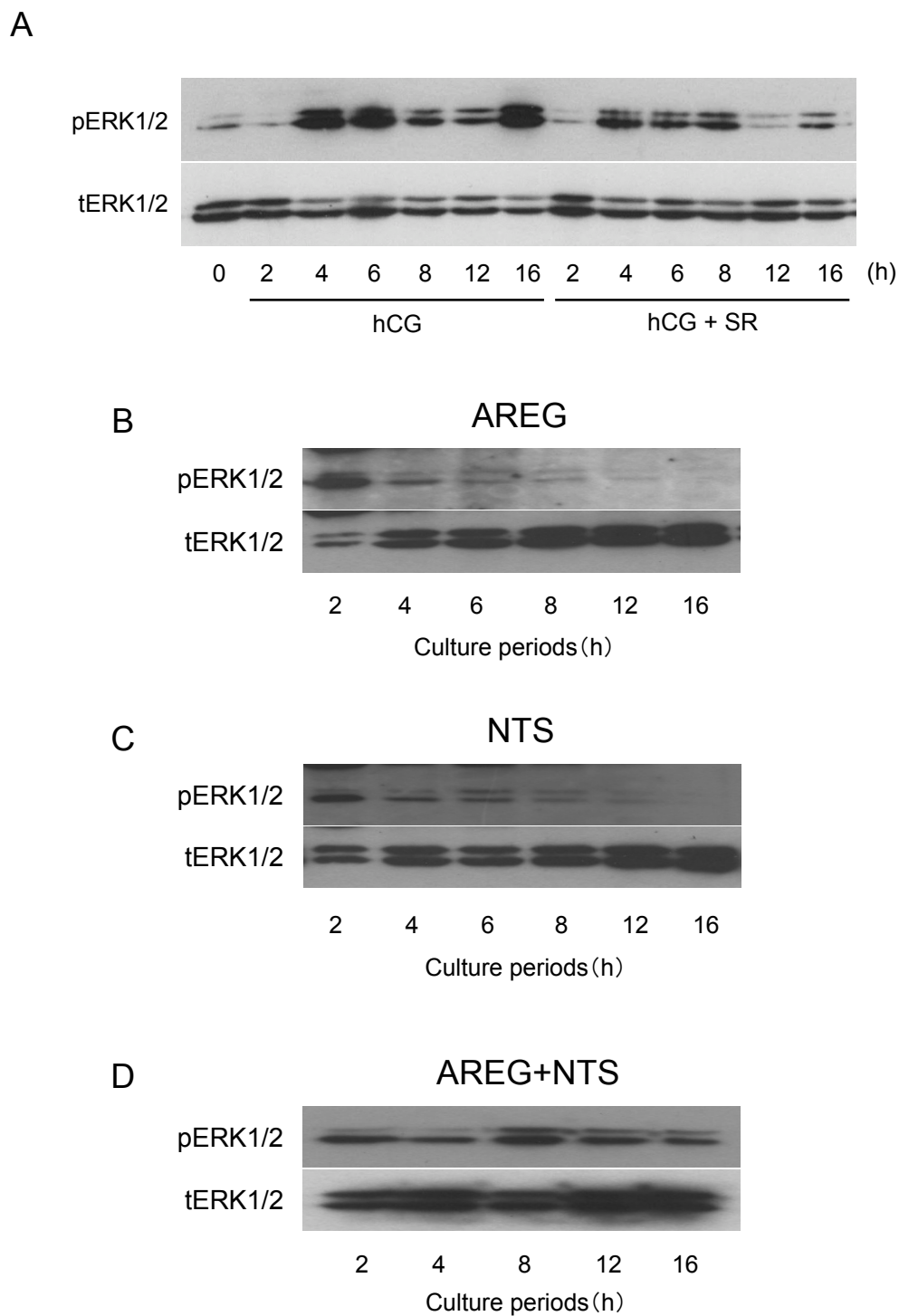


Fig. 7 hCGあるいはhCG+SR投与後の卵丘細胞 (A) およびPMSG投与48時間後に回収したCOCをAREG区(B), NTS区(C), AREG+NTS区(D)で培養後の卵丘細胞におけるリン酸化ERK1/2の経時的変化

A : hCGあるいはhCG+SR投与後の上記の時間で卵丘細胞を回収

B : PMSG投与48時間後の卵丘細胞を回収し, AREG(100 ng/ml)添加培地で上記の時間培養

C : PMSG投与48時間後の卵丘細胞を回収し, NTS(1 μ M)添加培地で上記の時間培養

D : PMSG投与48時間後の卵丘細胞を回収し, AREGとNTS添加培地で上記の時間培養

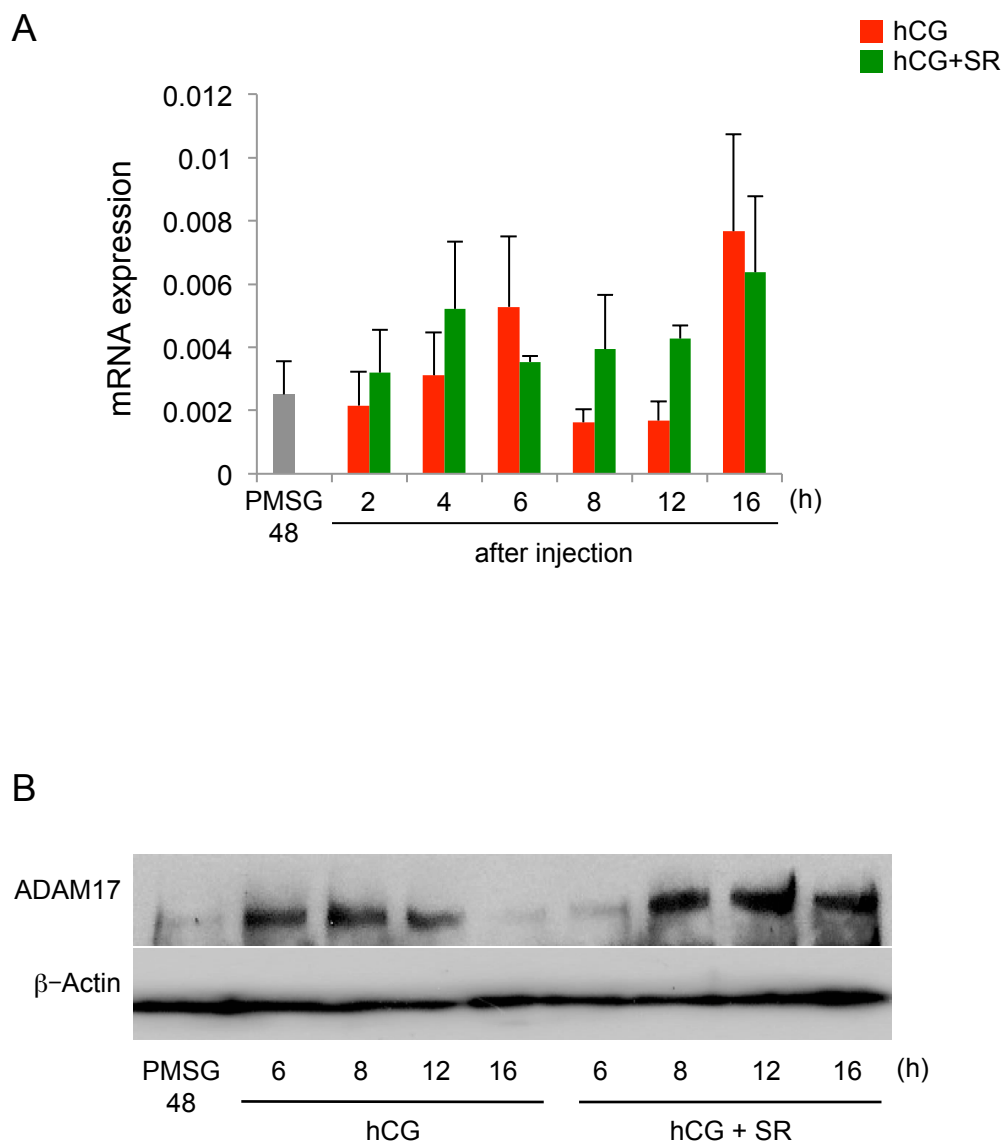


Fig. 8 hCGあるいはhCG+SR投与後の顆粒膜細胞の*Adam17* mRNAの発現 (A) とADAM17タンパク質発現 (B)

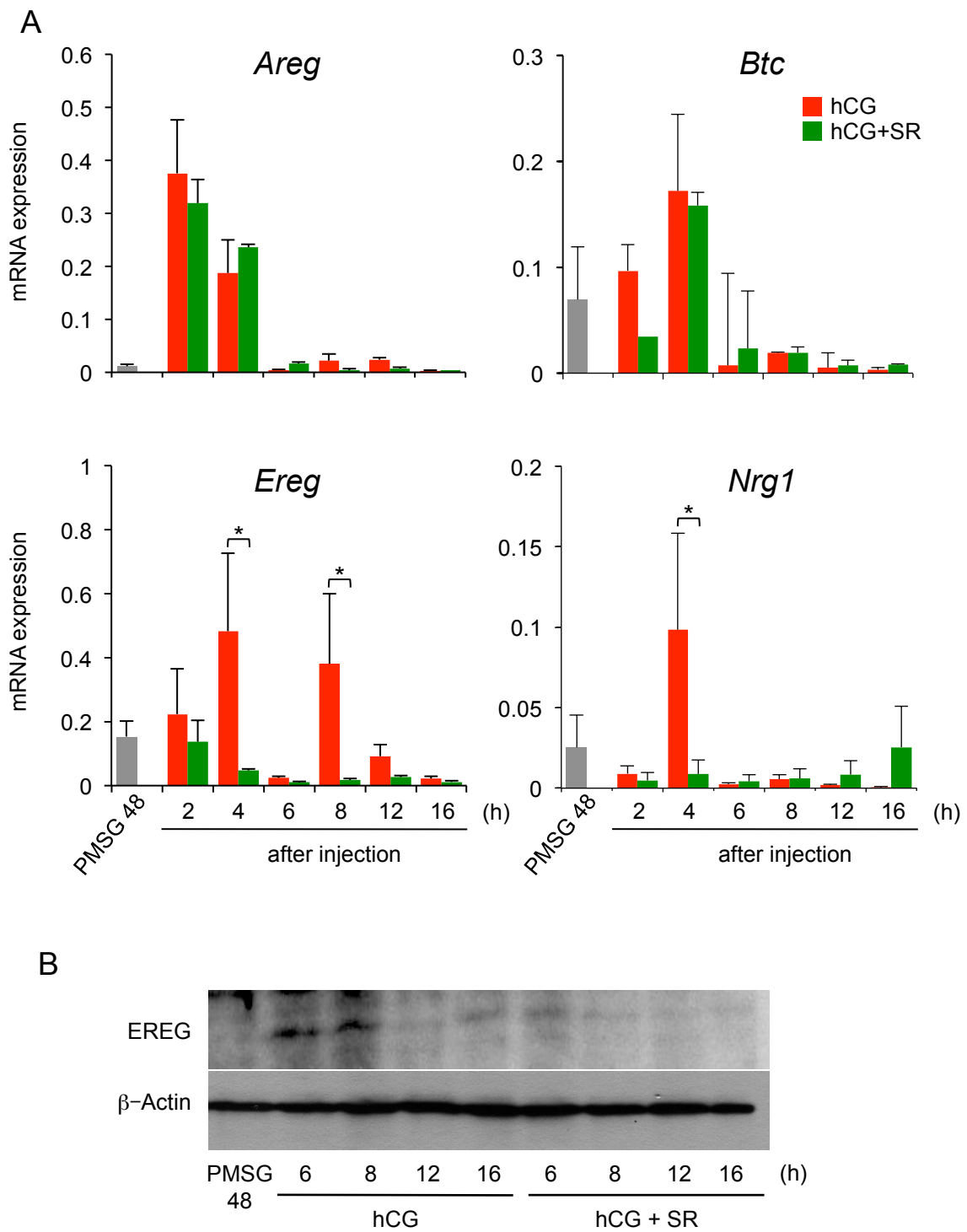
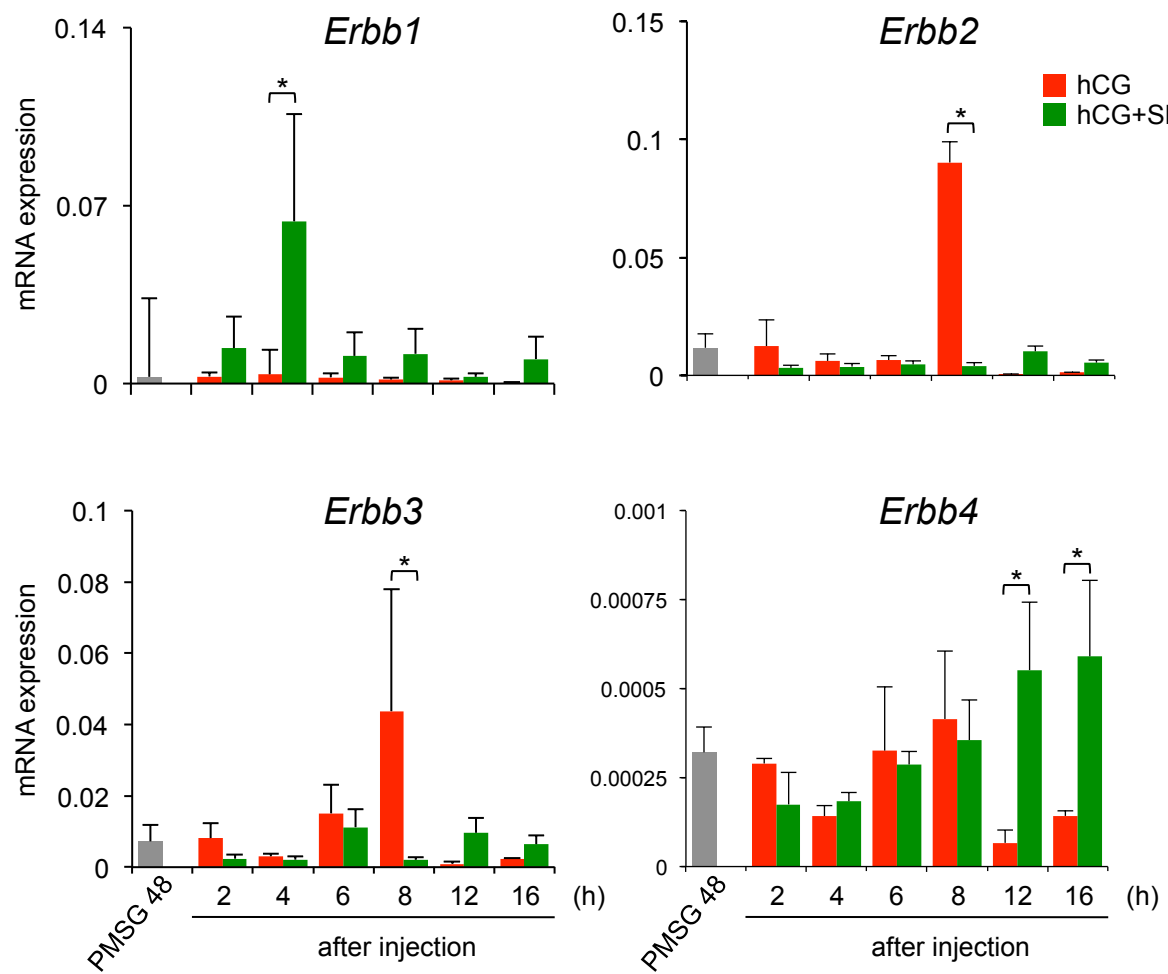


Fig. 9 hCGあるいはhCG+SR投与後の顆粒膜細胞の*Areg*, *Btc*, *Ereg*, *Nrg1* mRNAの発現 (A) とEREGタンパク質発現 (B)

*: 処理区間に有意差あり($p < 0.05$)

A



B

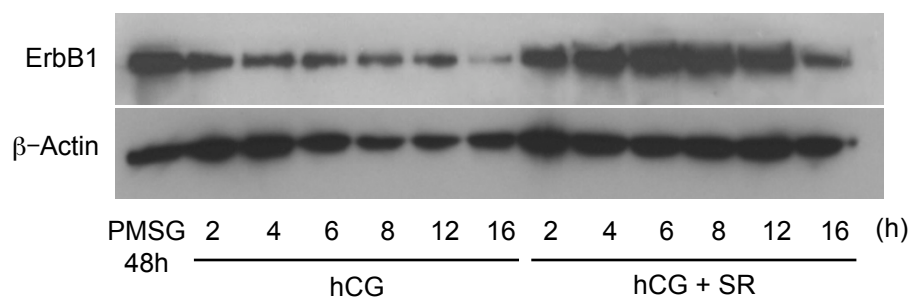
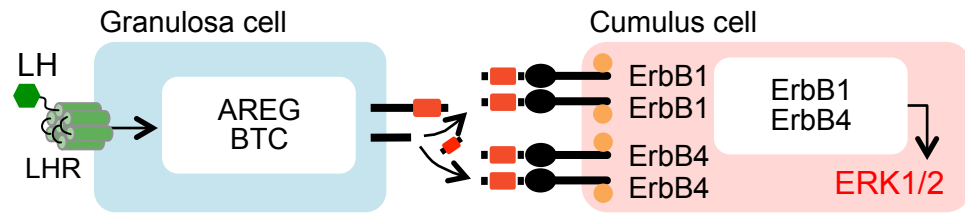


Fig. 10 hCGあるいはhCG+SR投与後の卵丘細胞の*ErbB1*, *ErbB2*, *ErbB3*, *ErbB4* mRNAの発現 (A) とErbB1タンパク質発現 (B)

*: 処理区間に有意差あり(p<0.05)

Early phase



Middle-Late phase

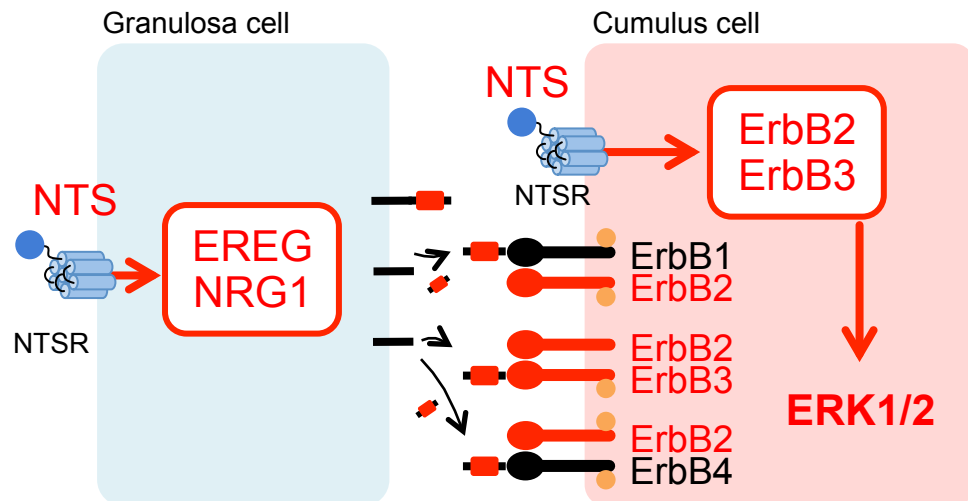
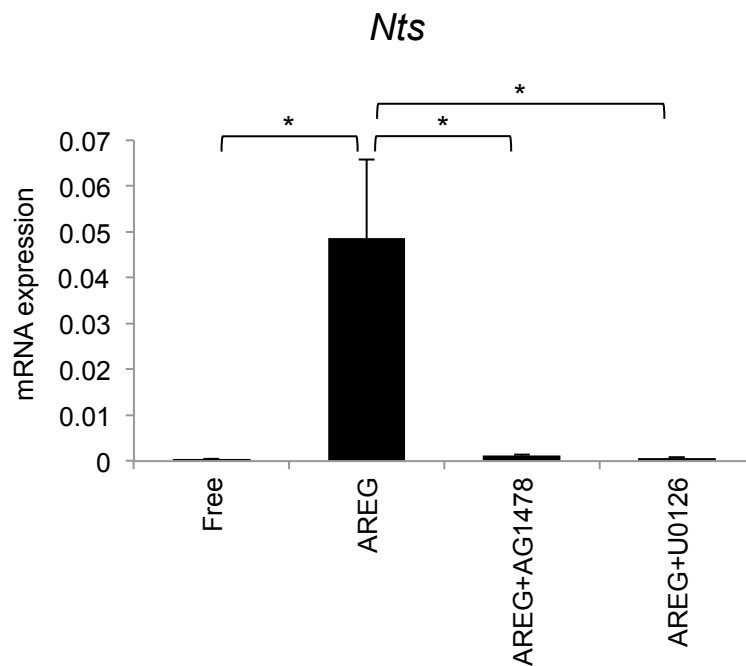


Fig. 11 排卵期においてNTSが誘導するERK1/2のリン酸化維持メカニズム

排卵期初期（Early Phase）にはLH依存的に発現するAREGおよびBTCはERK1/2のリン酸化を一過的に誘導するが、排卵中期から後期（Middle-Late Phase）では、NTSがEREGとNRG1およびErbB2とErbB3の発現を促進し、ERK1/2のリン酸化を維持する。



Sup Fig1. AREG添加培地にAG1478またはU0126を添加した卵丘細胞における*Nts* mRNAの発現変化
PMSG刺激48時間後のマウスから卵丘細胞を回収し、各処理区で4時間培養

Free : AREG無添加培地で培養

AREG : AREG添加培地(100 ng/ml)で培養

AREG+AG1478 : AREG, AG1478(10 μ M)添加培地で培養

AREG+U0126 : AREG, U0126 (10 μ M)添加培地で培養

*: 処理区間に有意差有り (p<0.05)

第四章

総合考察

IVF 法により作製した胚を母体に移植し、産仔を得る研究は、1959 年、Chang がウサギにおいて初めて報告して以降、実験動物や畜産動物のみならず、ヒトの高度生殖補助医療分野においても急激に発展し、約 20 年後の 1978 年には、Edwards によるヒトの産子誕生が報告された (Steptoe and Edwards, 1978)。IVF 法の発展に伴い、生体より採取した未成熟卵から受精能力や発生能力を有する成熟卵を得る IVM 法の開発が進んできた。しかし、既存の IVM 法で得られる成熟卵の発生率は依然として低いままであり、この改良が広く求められている。

既存の IVM 法における低い卵成熟の原因の一つは、体内での卵成熟メカニズムの低再現性であると考えられる。既存の IVM 法では卵成熟のみを目的に、生体での発育段階に関わらず全ての卵 (COC) を LH 刺激に相当する、高濃度 FSH を添加して培養する。しかし、生体内で卵は卵胞内において、その周りを取り囲むように存在する卵丘細胞や顆粒膜細胞と同調的に発育を進行する。この同調的発育の進行に重要な役割を果たすのが、脳下垂体から放出される FSH や LH といった性腺刺激ホルモンである。近年、FSH や LH 刺激依存的に卵巣に発現する遺伝子の DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析手法の導入により、卵胞発育から排卵までの期間、卵胞内において様々な遺伝子の発現が増減することが明らかとなっている (Espey and Richards, 2002; Jo et al., 2004; McRae et al., 2005)。この結果は、卵胞発育および排卵過程が、FSH や LH といった脳下垂体由来の外因性因子だけではなく、卵胞内において局所的に合成される内因性因子により制御されることを示している。このことから、高い成熟能を有した卵を体外で作出するためには、生体内で発現制御され、卵胞発育と卵成熟を誘導する卵胞内局所性因子を最適時期に最適濃度添加する新規 IVM 系の研究が必要であると考えられた。そこで本研究では、卵胞内において Estrogen 優勢から Progesterone 優勢への劇的なステロイドホルモンの移行が生じる卵胞発育期および、受精能と発生能を有した成熟卵の排卵に向けて劇的な卵胞内環境の変化が誘導される排卵期に着目し、それぞれの過程において卵胞内で生じる変化をブタとマウスを用いて内分泌学的に解析した。

本研究第二章において、ブタでは卵胞発育期間中、恒常的に合成される Progesterone が卵胞発育初期では Estrogen や 20α -OHP へと代謝されることで、卵胞内が Estrogen から Progesterone 環境へ移行することを示した。また優勢卵胞環境はアポトーシスを抑制した一方、退行卵胞ではアポトーシスが誘導されたことから、退行卵胞では優勢卵胞で認められ

る抗アポトーシス作用が破綻することが考えられた。そこでブタ卵巢から退行卵胞をサイズ別に回収し、卵胞液中の Progesterone 濃度を測定した結果、優勢卵胞で認められた卵胞サイズの拡大に伴う Progesterone 濃度の上昇が、退行卵胞では認められなかった (Sup Fig. 1)。そこで、Progesterone より合成可能で、他細胞腫においてアポトーシスの誘導が報告されている Cortisol の卵胞液中濃度と Progesterone から Cortisol の合成に関与する *Cyp21a1*, *Cyp11b2* の顆粒膜細胞での発現を優勢卵胞と退行卵胞で比較した結果、優勢卵胞に比べ、退行卵胞において高い Cortisol 合成遺伝子の発現に伴う、Cortisol の蓄積を認めた (Sup Fig. 2)。また Cortisol の役割を検討するため、優勢卵胞由来の COC に Cortisol を添加、および退行卵胞由来の COC に Cortisol 合成酵素 CYP11B1 の合成阻害剤 Metyrapone を添加して培養した結果、優勢卵胞由来 COC への Cortisol 添加は卵丘細胞のアポトーシスが誘導した一方、退行卵胞由来 COC への Metyrapone 添加は卵丘細胞のアポトーシスを抑制した (データ未掲載)。このことから、退行卵胞において Progesterone を基に合成される Cortisol は、卵胞内体細胞のアポトーシスを誘導し、卵成熟を抑制することが明らかとなった。また本研究において退行卵胞由来の COC でも、優勢卵胞環境を模倣した IVM 系で培養し、後天的に優勢卵胞のステロイドホルモン環境に変えることで、卵丘細胞の機能性および卵成熟率を向上させることを示した。さらに成熟卵の誘導に重要な *Areg* の発現と ERK1/2 のリン酸化もまた、優勢卵胞区での培養により向上したことから、優勢卵胞のステロイドホルモンは、優勢卵胞、退行卵胞に関わらず、排卵刺激に十分に応答可能な成熟卵の誘導に機能すると考えられる。

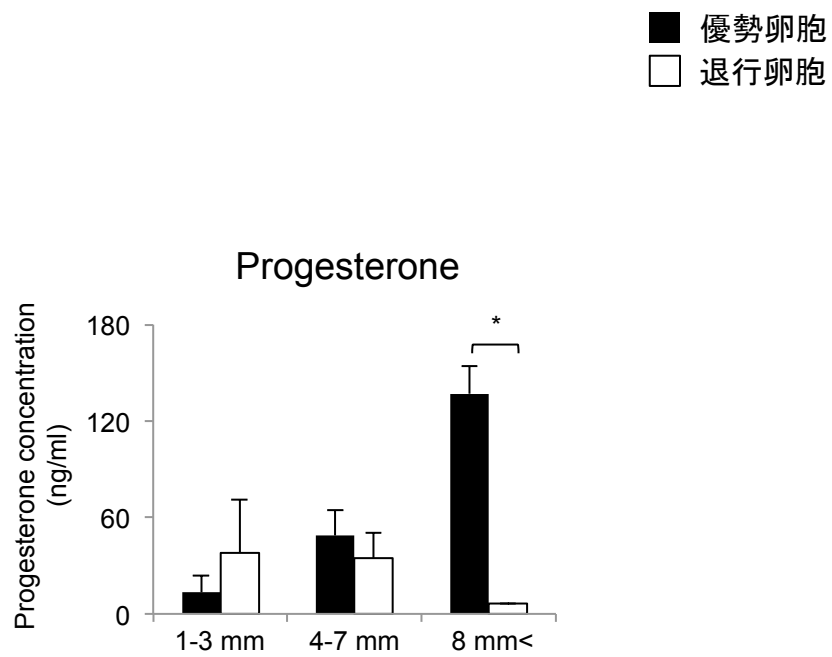
本研究では、排卵期に EGF-like factor に加えて機能する因子として、神経ペプチド NTS を見出し、その役割が顆粒膜細胞の EREG, NRG1 と卵丘細胞の ErbB2, ErbB3 の発現の亢進を介した、排卵期間中の ERK1/2 の活性化維持であり、その結果、卵丘膨化、卵成熟および黄体化が誘導されることを初めて明らかにした。近年、Younes らは (2014)、肺ガン細胞由来の培養細胞を用い、NTS が NTSR1 を介して、ErbB1, ErbB2 および ErbB3 の過剰発現を誘導することを報告した。さらに、Dupouy ら (2014) は、乳ガン細胞あるいは乳ガン由来の培養細胞において、NTS と ErbB1 の発現と活性化が誘導されること、また ErbB1 の活性化は EGF family に属する Heparin Binding-EGF (HB-EGF) や Neureglin2 の放出と、タンパク質切断酵素である Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) の発現上昇を伴うことを示した。以上の結果は、ガン細胞や正常細胞において、NTS は ErbB とそのリガンドの発現を誘導し、下流シグナル系を増強させる役割を持つことを示している。これらの報告は、排卵期の卵巢においても NTS が EGF-like factor と ErbB の発現制御を介して、ERK1/2 の持続的リン酸化を亢進することを強く支持した。

卵丘細胞は排卵刺激の後、細胞間隙へのヒアルロン酸蓄積に伴い膨潤し、COC として卵と共に卵管膨大部へ放出され、その後卵は精子と受精し、胚発生が起こる。受精過程に

において COC の卵丘細胞に精子が接近すると、先体由来のヒアルロニダーゼによりヒアルロン酸の切断される結果、卵丘細胞層は卵から分離する。このことから卵丘細胞は精子との受精時まで卵の生存を担保し、受精および胚発生を亢進する役割を持つと考えられる。排卵刺激後の卵丘細胞の機能性を亢進する因子の一つに Interleukin6 (IL6) が挙げられる。Liu らは (2009)、hCG による排卵刺激後の卵丘細胞において ERK1/2 依存的に IL6 が発現し、卵の機能性と受胎数を亢進することを報告した。このことから少なくとも卵丘細胞において持続的な ERK1/2 のリン酸化は卵丘細胞における IL6 の発現促進を介して、胚発生を誘導する重要なシグナルであると考えられた。

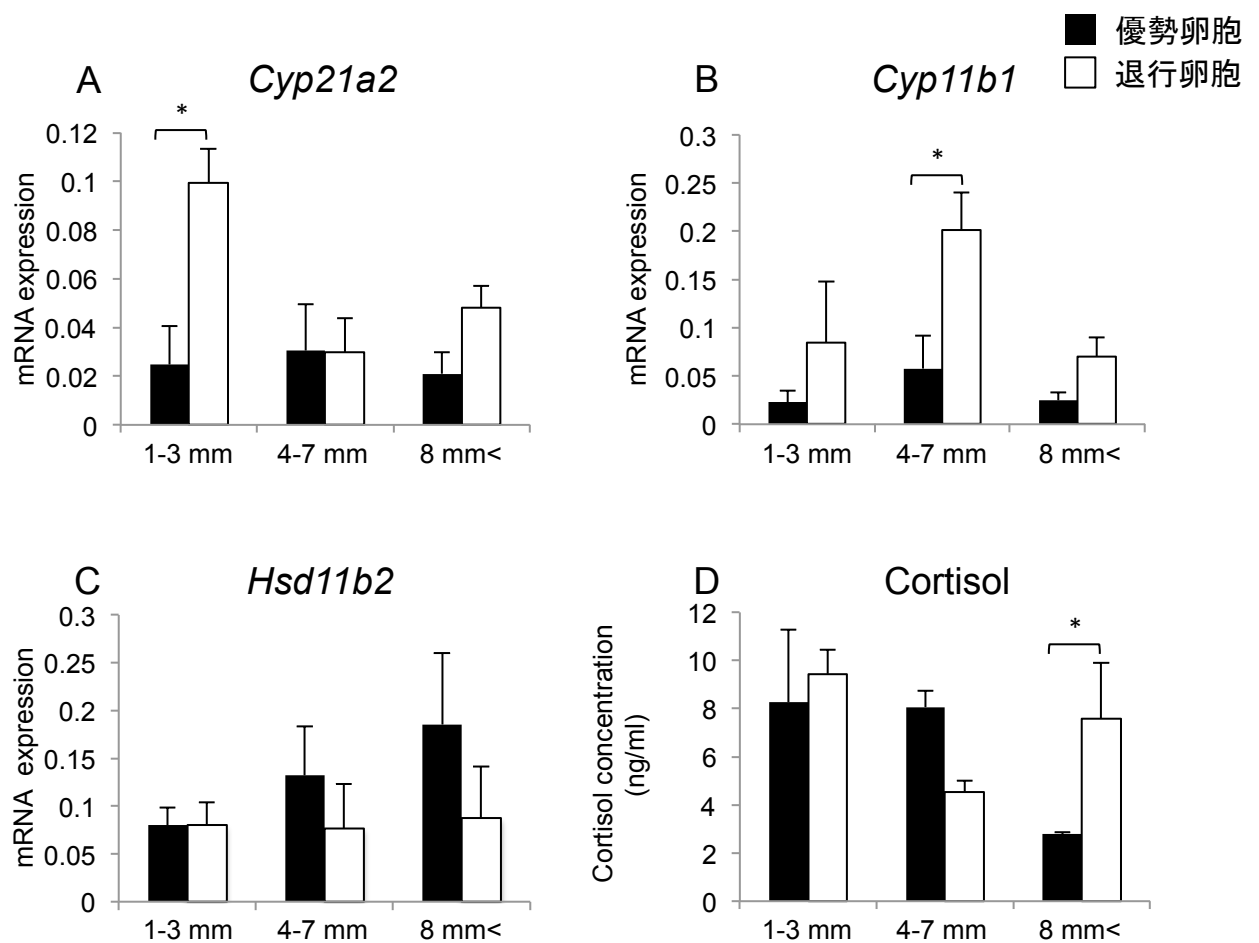
さらに最近、精子に NTSR1 が発現すること、前培養培地への NTS の添加が精子のチロシンリン酸化と先体反応を促進することが報告された (Hiradate et al., 2014)。また、この報告によると、NTS は、受精の場である卵管においても発現することが示されている。我々もまた、卵管上皮細胞において排卵刺激依存的に NTS が発現、局在すること、その受容体である NTSR1 は恒常的に発現することを認めている (データ未掲載)。これらの結果は、NTS が卵成熟に加え、精子成熟や卵管においても役割を果たすこと、卵、精子、卵管上皮細胞の間には NTS を介した細胞間コミュニケーションが存在することを強く示唆している。しかしながら現在のところ、卵や胚発生の場合である子宮における NTS や NTSR の発現やその役割は不明であり、今後さらなる解析が必要である。

本研究の結果から、既存の IVM 系では考慮されてこなかった、卵胞発育段階に応じた Estrogen や Progesterone 移行と Cortisol の合成の制御、排卵期間中の ERK1/2 持続的活性化といった、新たな成熟卵形成のための指標を見出した。これらの知見から、卵胞発育期前期、卵胞発育後期および排卵期を三段階に模倣した新規 IVM 法の開発が可能である。すなわち、pre-IVM 系において卵胞発育の前期を模倣した低い Progesterone、高い Estrogen 環境で 24 時間培養後、卵胞発育の後期を模倣した高濃度の Progesterone を添加し、さらに 24 時間培養する。その後 AREG と NTS を同時添加して ERK1/2 の持続的活性化が誘導可能な IVM 系で COC を培養することで、これまでよりも高確率に受精能・胚発生能を有する成熟卵の作出が期待できる (Sup Fig. 3)。また、未だその発現や機能の知られていない未知因子の発現動態とその役割を詳細に解析後、これら知見を IVM 系に応用することで、卵胞発育期および排卵期の卵胞で生じる生理学的変化を正確に捉えた、より生態環境に近い IVM 系の開発が可能になると考えられる。このことから、本研究によりもたらされる結果は、獣医畜産分野では雌雄個体の遺伝資源の有効利用や、ヒトの高度生殖補助医療等の分野において大きく貢献できると考えられる。



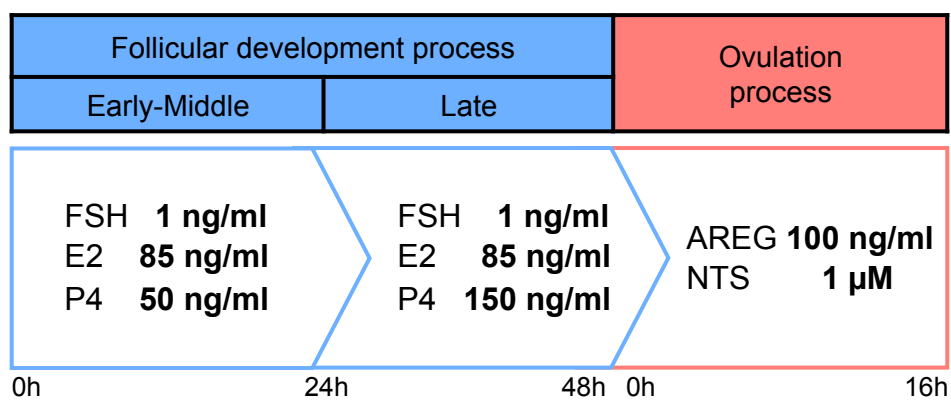
Sup Fig. 1 1-3 mm, 4-7 mm, 8 mm<の卵胞由来の優勢卵胞および退行卵胞の卵胞液中の Progesterone濃度

*:処理区間に対して有意差有り (p<0.05)



Sup Fig. 2 1-3 mm, 4-7 mm, 8 mm<の卵胞由来の優勢卵胞および退行卵胞の顆粒膜細胞における *Cyp21a1* (A) , *Cyp11b1* (B) , *Hsd11b2* (C) mRNAの発現と卵胞液中のCortisol濃度 (D)

*:処理区間に対して有意差有り (p<0.05)



Sup Fig.3 卵胞発育期前期、卵胞発育後期および排卵期を三段階に模倣した新規IVM法の模式図

第五章

総括

第一章：緒論

哺乳動物では卵胞発育と排卵の各過程で段階的に卵成熟が誘導される。卵胞発育を誘導する FSH 刺激は卵巣で Estrogen や Progesterone 合成を促進し、一部の優勢卵胞の発育が誘導される。その後 LH 刺激により顆粒膜細胞で発現し、ADAM17 (切断酵素) により切り出される EGF-like factor が卵丘細胞の EGF 受容体 (ErbB) -ERK1/2 系を活性化し、優勢卵胞から成熟卵が排卵される。しかし、卵胞発育期での Estrogen や Progesterone の合成制御機構や排卵期での EGF-like factor および ErbB 発現機構は未だ不明な点が多い。本研究では Estrogen・Progesterone の合成・代謝能に着目した優勢卵胞発育機構と排卵期卵巣で新たに見出した Neurotensin (NTS) に着目した排卵誘導機構をブタとマウスを用いてそれぞれ解析した。

第二章：ステロイドホルモン合成および代謝能力に着目した優勢卵胞発育機構の検討

優勢卵胞の発育過程で卵胞内のステロイドホルモン環境が Estrogen から Progesterone へと移行することは、極めて重要である。しかし、これらのステロイドホルモンの合成・代謝がいつ、どのように制御されるのか、およびステロイドホルモンの変移が卵成熟に与える影響は不明である。そこで、卵胞発育期のブタ卵巣からサイズ別に優勢卵胞を回収し、顆粒膜細胞における Progesterone 合成遺伝子 (*Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1*), Progesterone から 20α -OHP への代謝遺伝子 (*Akr1c1*), Progesterone から Estrogen の合成遺伝子 (*Cyp17a1*, *Cyp19a1*) 発現および卵胞液中の Progesterone と Estrogen 濃度を測定した。その結果、Progesterone 合成遺伝子は卵胞サイズに関わらず恒常的に発現した一方、Progesterone の濃度は卵胞サイズの拡大に伴い上昇した。*Akr1c1* と *Cyp19a1* の発現は 4-7 mm で高発現していたが、8 mm 以上では有意に低下した。また Estrogen 濃度は 4-7 mm 以上の卵胞で有意に増加した。さらに退行卵胞由来の COC を優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境を模した優勢卵胞区で培養することで卵丘細胞の生存、機能性および卵成熟率が向上した。以上の結果から、卵胞発育期に恒常的に産生される Progesterone は、卵胞発育初期に 20α -OHP へ代謝、あるいは Estrogen 合成の基質として使用されることで低い濃度に保たれ、発育と共に Progesterone 代謝が抑制されると Progesterone 濃度が上昇するという、ブタ優勢卵胞の発育過程で卵胞内が Estrogen 優勢から Progesterone 優勢へと移行するメカニズムが明らかになっ

た。さらに、優勢卵胞の Progesterone と Estrogen 環境は退行卵胞由来の卵丘細胞の機能性向上を介して卵成熟を促進することを初めて示した。

第三章：排卵期卵巣における Neurotensin の発現と役割の検討

後期胞状卵胞に LH サージ刺激が加わると、顆粒膜細胞において EGF-like factor と切断酵素 ADAM17 が発現し、切断されたリガンド部位が卵丘細胞の ErbB-ERK1/2 系に作用することで、卵成熟、卵丘膨化および排卵が誘導される。しかし COC の体外培養系に AREG を添加して培養したときの卵成熟率は体内成熟卵と比べて低く、生体内では卵巣局所で作用する制御因子の存在が示唆されてきた。本章では、排卵期のトランスクリプトーム解析結果から NTS に着目し、排卵期における NTS の発現と役割を検討した。その結果、NTS と NTSR1 は hCG 刺激後の顆粒膜細胞と卵丘細胞に発現、局在することが示された。また *In vivo* および *In vitro* 解析により NTS は卵丘細胞における ERK1/2 のリン酸化維持に作用し、排卵、産仔形成、卵丘細胞の膨潤、卵成熟、顆粒膜細胞の黄体化を促進すること、これらの作用は SR により抑制されることが明らかになった。NTS による卵丘細胞の ERK1/2 にリン酸化維持機構を解明するために、ERK1/2 の上流に存在する、顆粒膜細胞の EGF-like factor 切断酵素 (ADAM17)、EGF-like factor (*Areg*, *Btc*, *Ereg*, *Nrg1*) および卵丘細胞の ErbB (*ErbB1*, *ErbB2*, *ErbB3*, *ErbB4*) の発現に NTS が与える影響を検討した結果、顆粒膜細胞での *Adam17*, *Areg* と *Btc*, 卵丘細胞での *ErbB1*, *ErbB4* の発現は NTS の影響を受けなかったが、顆粒膜細胞の *Ereg* と *Nrg1* と卵丘細胞の *ErbB2* と *ErbB3* 発現は NTS により発現が抑制されることが明らかになった。以上の結果から、NTS は顆粒膜細胞の EREG, NRG1 と卵丘細胞の ErbB2, ErbB3 の発現を亢進し、排卵直前期までリン酸化 ERK1/2 を持続させることで、成熟卵や黄体形成を誘導するマスターキーであることが明らかになった。

第四章：総合考察

本研究の結果から、卵胞発育期における Estrogen 優勢から Progesterone 優勢環境への移行、および排卵期における NTS が卵丘細胞の ERK1/2 リン酸化を維持するメカニズムが明らかとなり、これらの機構により卵成熟が促進されることが示された。これらの知見は、卵胞発育期前期、卵胞発育後期および排卵期を三段階に模倣した新規 IVM 法の開発につながり、これまでよりも高確率に受精能・胚発生能を有する成熟卵の作出が期待できる。したがって本研究の成果は、獣医畜産分野では雌雄個体の遺伝資源の有効利用や、ヒトの高度生殖補助医療等の分野において大きく貢献できると考えられる。

略語一覽

20 α -OHP	: 20 α -Hydroxyprogesterone
20 α -HSD	: 20 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase
3 β -HSD	: 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase
ADAMTS-1	: A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs-1
AREG	: Amphiregulin
BTC	: Betacellulin
BMP-15	: Bone Morphogenetic Protein-15
COC	: Cumulus-Oocyte Complex
CCND2	: Cyclin D2
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
EGF-like factor	: Epidermal Growth Factor-like factor
EREG	: Epiregulin
ER	: Estrogen Receptor
ERK1/2	: Extracellular signal Regulated Kinases 1 and 2
FSHR	: FSH Receptor
FIG- α	: Factor In the Germline- α
FasL	: Fas Ligand
FBS	: Fetal Bovine Serum
FSH	: Follicle Stimulating Hormone;
FOXJ2	: Forkhead box L2
GVBD	: Germinal Vesicle Break Down
GRE	: Glucocorticoid response element
GnRH	: Gonadotropin Releasing Hormone
GC	: Granulosa Cell
GDF-9	: Growth Differentiation Factor-9
HB-EGF	: Heparin Binding
HDL	: High-Density Lipoprotein
HAS2	: Hyaluronan Synthase2
IVF	: <i>In Vitro</i> Fertilization
IVM	: <i>In Vitro</i> Maturation
IGF-1	: Insulin like Growth Factor-1

IL6	: Interleukin6
LDL	: Low-Density Lipoprotein;
LHCGR	: Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Receptor
LH	: Luteinizing Hormone
MMP-9	: Matrix Metalloproteinase-9
NTSR1	: NTS receptor 1
NRG1	: Neuregulin 1
NTS	: Neurotensin
NOBOX	: Newborn Ovary Homeobox
OHSS	: Ovarian Hyperstimulation Syndrome
OPU	: Ovum Pick Up
P450scc	: P450 cholesterol side chain cleavage
EP2	: PGE2 receptor
PTX3	: Pentraxin 3
PI3K	: Phosphoinositide 3-Kinase
PVP	: Polyvinylpyrrolidone
PMSG	: Pregnant Mare Serum Gonadotropin
PGR	: Progesterone Receptor
PGE2	: Prostaglandin E2
PTGS-2	: Prostaglandin-endoperoxide Synthase-2
qRT-PCR	: Quantitative RT-PCR
RT	: Reverse Transcription
StAR	: Steroidogenic Acute Regulatory protein
SOV	: Super Ovulation
TBE	: Tris-Borate EDTA Buffer
TNFAIP6	: Tumor Necrosis Factor, α -Induced Protein 6
TACE/ADAM17	: Tumor necrosis factor- α -Converting Enzyme/ A Disintegrin and Metallopeptidase domain 17
cAMP	: cyclic Adenosine Monophosphate
hCG	: human Chorionic Gonadotropin

謝辞

本研究を遂行し取りまとめるに際して、実験手技の習得や研究計画の組み立て方から、英語論文の執筆、申請書の作成に至るまで、多大なるご指導ご鞭撻を賜りました、県立広島大学生命環境学部生命科学科 准教授 山下泰尚 博士に深謝の意を表します。

本研究を進めるのに際し、終始ご助言を頂きました広島大学大学院生物圏科学研究科 教授 島田昌之 博士，ならびに県立広島大学生命環境学部生命科学科 教授 堀内俊孝 博士，教授 小西博昭 博士，准教授 阿部靖之 博士，故 矢間太 先生に厚く御礼申し上げます。

同研究室の同期である池田真規 女史，岩下夢美 女史，堺優俊 氏，土居知佳 女史，山口菜央 女史には，同研究室の一期生として研究技術の習得に切磋琢磨し，卒業論文研究，修士論文研究を共にしました。また同研究室の後輩である長谷川麻理 女史，永村優 氏，末永麻優子 女史，上村亜絵理 女史，隅田美優 女史，三輪智弘 氏，楯幸子 女史には本研究を行うにあたり，サンプルの回収から解析，実験計画の立案といった多岐に渡る御協力を頂きました。本学位論文を完遂するにあたり，多くのご支援を賜った皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に博士課程修了まで資金面を支え，見守り続けてくれた両親にこの場を借りて感謝の意を表します。

引用文献

Amsterdam A, Koch Y, Lieberman ME, Lindner HR.

Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat.

J Cell Biol. 1975 Dec;67(3):894-900.

Ashkenazi H, Cao X, Motola S, Popliker M, Conti M, Tsafiriri A.

Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response.

Endocrinology. 2005 Jan;146(1):77-84.

Binder EB, Kinkead B, Owens MJ, Nemeroff CB.

The role of neurotensin in the pathophysiology of schizophrenia and the mechanism of action of antipsychotic drugs.

Biol Psychiatry. 2001 Dec 1;50(11):856-72.

Boerboom D, Sirois J.

Equine P450 cholesterol side-chain cleavage and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta(5)-delta(4) isomerase: molecular cloning and regulation of their messenger ribonucleic acids in equine follicles during the ovulatory process.

Biol Reprod. 2001 Jan;64(1):206-15.

Britt K, Kerr J, O'Donnell L, Jones M, Drummond A, Findlay J, Simpson E.

Defining the roles of sex steroid hormones in the control of differentiation in somatic cells of mammalian gonads.

Proc USA Endocr Soc. 2001. Abstract OR39-2.

Carraway R, Leeman SE.

Characterization of radioimmunoassayable neurotensin in the rat. Its differential distribution in the central nervous system, small intestine, and stomach.

J Biol Chem. 1976 Nov 25;251(22):7045-52.

Carraway R, Leeman SE.

The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami.

J Biol Chem. 1973 Oct 10;248(19):6854-61.

Chang MC.

Fertilization of rabbit ova in vitro.

Nature. 1959 Aug 8;184(Suppl 7):466-7.

Chen SH, Dharmarajan AM, Wallach EE, Mastroyannis C.

RU486 inhibits ovulation, fertilization and early embryonic development in rabbits: in vivo and in vitro studies.

Fertil Steril. 1995 Sep;64(3):627-33.

Cunningham MA, Zhu Q, Unterman TG, Hammond JM.

Follicle-stimulating hormone promotes nuclear exclusion of the forkhead transcription factor FoxO1a via phosphatidylinositol 3-kinase in porcine granulosa cells.

Endocrinology. 2003 Dec;144(12):5585-94.

Delvigne A, Rozenberg S.

Review of clinical course and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS).

Hum Reprod Update. 2003 Jan-Feb;9(1):77-96.

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.

Dupouy S, Doan VK, Wu Z, Mourra N, Liu J, De Wever O, Llorca FP, Cayre A, Kouchkar A, Gompel A, Forgez P.

Activation of EGFR, HER2 and HER3 by neurotensin/neurotensin receptor 1 renders breast tumors aggressive yet highly responsive to lapatinib and metformin in mice.

Oncotarget. 2014 Sep 30;5(18):8235-51.

Ehlers RA 2nd , Bonnor RM, Wang X, Hellmich MR, Evers BM.

Signal transduction mechanisms in neurotensin-mediated cellular regulation.

Surgery. 1998 Aug;124(2):239-46; discussion 246-7.

Elmore S.

Apoptosis: a review of programmed cell death.

Toxicol Pathol. 2007 Jun;35(4):495-516.

Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C.

The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships.

Endocr Rev. 1985 Summer;6(3):371-99.

Espey LL, Richards JS.

Temporal and spatial patterns of ovarian gene transcription following an ovulatory dose of gonadotropin in the rat.

Biol Reprod. 2002 Dec;67(6):1662-70.

Evers BM, Wang X, Zhou Z, Townsend CM Jr, McNeil GP, Dobner PR.

Characterization of promoter elements required for cell-specific expression of the neurotensin/neuromedin N gene in a human endocrine cell line.

Mol Cell Biol. 1995 Jul;15(7):3870-81.

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.

Fitzpatrick SL, Carlone DL, Robker RL, Richards JS.

Expression of aromatase in the ovary: down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge.

Steroids. 1997 Jan;62(1):197-206.

Fukuda M, Katayama K, Tojo S.

Inhibitory effect of progesterone on follicular growth and induced superovulation in the rat.

Arch Gynecol. 1980;230(1):77-87.

Fülöp C, Szántó S, Mukhopadhyay D, Bárdos T, Kamath RV, Rugg MS, Day AJ, Salustri A, Hascall VC, Glant TT, Mikecz K.

Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice.

Development. 2003 May;130(10):2253-61.

Galvez-Contreras AY, Quiñones-Hinojosa A, Gonzalez-Perez O.

The role of EGFR and ErbB family related proteins in the oligodendrocyte specification in germinal niches of the adult mammalian brain.

Front Cell Neurosci. 2013 Dec 17;7:258.

Gonzalez-Robayna IJ, Falender AE, Ochsner S, Firestone GL, Richards JS.

Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells.

Mol Endocrinol. 2000 Aug;14(8):1283-300.

Guha S, Rey O, Rozengurt E.

Neurotensin induces protein kinase C-dependent protein kinase D activation and DNA synthesis in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1.

Cancer Res. 2002 Mar 15;62(6):1632-40.

Hassan S, Dobner PR, Carraway RE.

Involvement of MAP-kinase, PI3-kinase and EGF-receptor in the stimulatory effect of Neurotensin on DNA synthesis in PC3 cells.

Regul Pept. 2004;120:155–166.

Hermans E, Maloteaux JM.

Mechanisms of regulation of neurotensin receptors.

Pharmacol Ther. 1998 Aug;79(2):89-104.

Hernandez-Gonzalez II, Gonzalez-Robayna I, Shimada M, Wayne CM, Ochsner SA, White L, Richards JS.

Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process?

Mol Endocrinol. 2006 Jun;20(6):1300-21.

Hiradate Y, Inoue H, Kobayashi N, Shirakata Y, Suzuki Y, Gotoh A, Roh SG, Uchida T, Katoh K, Yoshida M, Sato E, Tanemura K.

Neurotensin enhances sperm capacitation and acrosome reaction in mice.

Biol Reprod. 2014 Aug;91(2):53.

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.

Hsieh M, Lee D, Panigone S, Horner K, Chen R, Theologis A, Lee DC, Threadgill DW, Conti M.

Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation.

Mol Cell Biol. 2007 Mar;27(5):1914-24.

Hsieh M, Thao K, Conti M.

Genetic dissection of epidermal growth factor receptor signaling during luteinizing hormone-induced oocyte maturation.

PLoS One. 2011;6(6):e21574.

Ishida M, Choi JH, Hirabayashi K, Matsuwaki T, Suzuki M, Yamanouchi K, Horai R, Sudo K, Iwakura Y, Nishihara M.

Reproductive phenotypes in mice with targeted disruption of the 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene.

J Reprod Dev. 2007 Jun;53(3):499-508.

Jayasekara WS, Yonezawa T, Ishida M, Yamanouchi K, Nishihara M.

Expression and possible role of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase in the placenta of the goat.

J Reprod Dev. 2005 Apr;51(2):265-72.

Jo M, Gieske MC, Payne CE, Wheeler-Price SE, Gieske JB, Ignatius IV, Curry TE Jr, Ko C.

Development and application of a rat ovarian gene expression database.

Endocrinology. 2004 Nov;145(11):5384-96.

Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK.

Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice.

Cell. 1997 Oct 17;91(2):197-208.

Lin ZL, Li YH, Xu YN, Wang QL, Namgoong S, Cui XS, Kim NH.

Effects of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 on the in vitro maturation of porcine oocytes.

Reprod Domest Anim. 2014 Apr;49(2):219-27.

Lipner H, Greep RO.

Inhibition of steroidogenesis at various sites in the biosynthetic pathway in relation to induced ovulation.

Endocrinology. 1971 Mar;88(3):602-7.

Liu Z, de Matos DG, Fan HY, Shimada M, Palmer S, Richards JS.

Interleukin-6: an autocrine regulator of the mouse cumulus cell-oocyte complex expansion process.

Endocrinology. 2009 Jul;150(7):3360-8.

Loutradis D, Bletsa 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.

Marchal R, Vigneron C, Perreau C, Bali-Papp A, Mermillod P.

Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes.

Theriogenology. 2002 Mar 15;57(5):1523-32.

Mazella J.

Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking?

Cell Signal. 2001 Jan;13(1):1-6.

McRae RS, Johnston HM, Mihm M, O'Shaughnessy PJ.

Changes in mouse granulosa cell gene expression during early luteinization.

Endocrinology. 2005 Jan;146(1):309-17.

Moriishi T, Komori T.

Glucocorticoid and Bone. The inhibition of osteoblast differentiation and induction of osteocyte apoptosis through the regulation of Bcl-2 by glucocorticoids.

Clin Calcium. 2014 Sep;24(9):1329-36.

Navot D, Bergh PA, Laufer N.

Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: prevention and treatment.

Fertil Steril. 1992 Aug;58(2):249-61.

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.

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.

Ochsner SA, Russell DL, Day AJ, Breyer RM, Richards JS.

Decreased expression of tumor necrosis factor-alpha-stimulated gene 6 in cumulus cells of the cyclooxygenase-2 and EP2 null mice.

Endocrinology. 2003 Mar;144(3):1008-19.

Oi A, Tasaki H, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H.

Effects of reaggregated granulosa cells and oocytes derived from early antral follicles on the properties of oocytes grown in vitro.

J Reprod Dev. 2015;61(3):191-7.

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.

Panigone S, Hsieh M, Fu M, Persani L, Conti M.

Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway.

Mol Endocrinol. 2008 Apr;22(4):924-36.

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.

Peng XR, Hsueh AJ, LaPolta PS, Bjersing L, Ny T.

Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation.

Endocrinology. 1991 Dec;129(6):3200-7.

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.

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.

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.

Rose UM, Hanssen RG, Kloosterboer HJ.

Development and characterization of an in vitro ovulation model using mouse ovarian follicles.

Biol Reprod. 1999 Aug;61(2):503-11.

Russell DL, Doyle KM, Ochsner SA, Sandy JD, Richards JS.

Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation.

J Biol Chem. 2003 Oct 24;278(43):42330-9.

Salustri A, Garlanda C, Hirsch E, De Acetis M, Maccagno A, Bottazzi B, Doni A, Bastone A, Mantovani G, Beck Peccoz P, Salvatori G, Mahoney DJ, Day AJ, Siracusa G, Romani L, Mantovani A.

PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization.

Development. 2004 Apr;131(7):1577-86.

Sharma SC, Richards JS.

Regulation of AP1 (Jun/Fos) factor expression and activation in ovarian granulosa cells. Relation of JunD and Fra2 to terminal differentiation.

J Biol Chem. 2000 Oct 27;275(43):33718-28.

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.

Shimada M, Nishibori M, Yamashita Y, Ito J, Mori T, Richards JS.

Down-regulated expression of A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like repeats-1 by progesterone receptor antagonist is associated with impaired expansion of porcine cumulus-oocyte complexes.

Endocrinology. 2004 Oct;145(10):4603-14.

Shu J, Xing L, Ding G, Luo Q, Liu X, Yan Q, Sheng J, Huang H.

The effect of peritoneal fluid from patients with endometriosis on mitochondrial function and development of early mouse embryos.

PLoS One. 2013 Dec 26;8(12):e82334.

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.

Stephoe PC, Edwards RG.

Birth after the reimplantation of a human embryo.

Lancet. 1978 Aug 12;2(8085):366.

Syed V, Ho SM.

Progesterone-induced apoptosis in immortalized normal and malignant human ovarian surface epithelial cells involves enhanced expression of FasL.

Oncogene. 2003 Oct 9;22(44):6883-90.

Takanosawa M, Nishino H, Ohta Y, Ichimura K.

Glucocorticoids enhance regeneration of murine olfactory epithelium.

Acta Otolaryngol. 2009 Sep;129(9):1002-9.

Tanaka N, Espey LL, Stacy S, Okamura H.

Epostane and indomethacin actions on ovarian kallikrein and plasminogen activator activities during ovulation in the gonadotropin-primed immature rat.

Biol Reprod. 1992 Apr;46(4):665-70.

Thibault D, Albert PR, Pineyro G, Trudeau LÉ.

Neurotensin triggers dopamine D2 receptor desensitization through a protein kinase C and beta-arrestin1-dependent mechanism.

J Biol Chem. 2011 Mar 18;286(11):9174-84.

Toda K, Takeda K, Okada T, Akira S, Saibara T, Kaname T, Yamamura K, Onishi S, Shizuta Y.

Targeted disruption of the aromatase P450 gene (Cyp19) in mice and their ovarian and uterine responses to 17beta-oestradiol.

J Endocrinol. 2001 Jul;170(1):99-111.

Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G.

Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development.

Hum Mol Genet. 2004 Jun 1;13(11):1171-81.

Uilenbroek JT, Sánchez-Criado JE, Karels B.

Decreased luteinizing hormone-stimulated progesterone secretion by preovulatory follicles isolated from cyclic rats treated with the progesterone antagonist RU486.

Biol Reprod. 1992 Sep;47(3):368-73.

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.

Vincent JP, Mazella J, Kitabgi P.

Neurotensin and neurotensin receptors.

Trends Pharmacol Sci. 1999 Jul;20(7):302-9.

Vita N, Laurent P, Lefort S, Chalon P, Dumont X, Kaghad M, Gully D, Le Fur G, Ferrara P, Caput D.

Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor.

FEBS Lett. 1993 Feb 8;317(1-2):139-42.

Vollmar B, Laschke MW, Rohan R, Koenig J, Menger MD.

In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles.

Am J Pathol. 2001 Nov;159(5):1661-70.

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.

Yamashita Y, Okamoto M, Ikeda M, Okamoto A, Sakai M, Gunji Y, Nishimura R, Hishinuma M, Shimada M.

Protein kinase C (PKC) increases TACE/ADAM17 enzyme activity in porcine ovarian somatic cells, which is essential for granulosa cell luteinization and oocyte maturation.

Endocrinology. 2014 Mar;155(3):1080-90.

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.

Younes M, Wu Z, Dupouy S, Lupo AM, Mourra N, Takahashi T, Fléjou JF, Trédaniel J, Régnard JF, Damotte D, Alifano M, Forgez P.

Neurotensin (NTS) and its receptor (NTSR1) causes EGFR, HER2 and HER3 over-expression and their autocrine/paracrine activation in lung tumors, confirming responsiveness to erlotinib.

Oncotarget. 2014 Sep 30;5(18):8252-69.

Young JM, McNeilly AS.

Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle.

Reproduction. 2010 Oct;140(4):489-504.

Yuan HJ, Han X, He N, Wang GL, Gong S, Lin J, Gao M, Tan JH.

Glucocorticoids impair oocyte developmental potential by triggering apoptosis of ovarian cells via activating the Fas system.

Sci Rep. 2016 Apr 4;6:24036.

Zhao D, Pothoulakis C.

Effects of NT on gastrointestinal motility and secretion, and role in intestinal inflammation.

Peptides. 2006 Oct;27(10):2434-44.

Zhao D, Kuhnt-Moore S, Zeng H, Wu JS, Moyer MP, Pothoulakis C.

Neurotensin stimulates IL-8 expression in human colonic epithelial cells through Rho GTPase-mediated NF-kappa B pathways.

Am J Physiol Cell Physiol. 2003 Jun;284(6):C1397-404.

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.

西澤行人

繁殖生物学 第1版, 第5章 生殖各期の生理 1. 性周期
インターズー (2013)