

## 論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成 25 年度博士課程進学

氏名 江森千紘

指導教員 杉浦幸二

論文題目 卵分泌因子とエストロゲンによる卵巣顆粒膜細胞の発達制御に関する研究

哺乳類の卵巣は、女性ホルモン(エストロゲン)などを生産する内分泌器官としての機能と、卵母細胞を生産する生殖器官としての機能を持つ重要な器官である。卵巣は、卵母細胞と顆粒膜細胞などからなる「卵胞」組織で構成され、排卵前の発達した胞状卵胞において、顆粒膜細胞は、卵母細胞を取り囲む卵丘細胞と、卵胞壁を裏打ちする壁顆粒膜細胞とに区別される。卵丘細胞は、卵母細胞の発達支持に特化した細胞であり、一方、壁顆粒膜細胞は、卵巣のもつ内分泌機能の一端を担う細胞である。そのため、これら顆粒膜細胞の発達制御の理解は、上記卵巣機能の制御を理解する上で重要である。

顆粒膜細胞の発達制御には、多くの因子が関与する。それらの因子が個々に果たす役割については多くの知見が得られているが、それらが複雑に関わる発達制御や、その相互作用メカニズムについては十分な研究はされていない。そこで本研究では、中でも、顆粒膜細胞の発達制御への重要性が知られる卵分泌因子(卵母細胞が分泌する増殖因子)とエストロゲンに着目し、マウスの顆粒膜細胞(卵丘細胞および壁顆粒膜細胞)の発達制御にこれらの相互作用が果たす役割と、そのメカニズムを明らかとすることを目的とした。

## 第1章 卵分泌因子とエストロゲンによって制御される卵丘細胞遺伝子発現の網羅的解析

卵分泌因子とエストロゲンのシグナル相互作用によって卵丘細胞内で制御される現象を理解するために、卵丘細胞における遺伝子発現を、マイクロアレイ法を用いて網羅的に解析した。本研究では、エストロゲンとして、 $17\beta$ -estradiol (E2)を用いた。

まず、卵分泌因子やエストロゲンが、それぞれ単独で卵丘細胞での遺伝子発現に与える影響について、遺伝子オントロジー解析を行った。その結果、卵分泌因子は、卵丘細胞での細胞増殖に関連する遺伝子発現を促進し、アポトーシス関連遺伝子発現を抑制した。一方、エストロゲンは、卵丘細胞での細胞増殖関連遺伝子発現を促進し、細胞接着に関連する遺伝子発現を抑制した。これらの結果は、卵分泌因子やエストロゲンが卵丘細胞においてこれらの現象を制御するという既報と一致していた。これは、このアレイ解析の信頼性を裏付ける結果である。

次に、卵分泌因子とエストロゲンが互いのシグナルに与える影響を、「生物現象(遺伝子オントロジー)」と「シグナル強度」に着目して解析した。まず、「生物現象」について解析した結果、卵分泌因子によって卵丘細胞で制御される生物現象は、エストロゲンの有無によって大きな影響を受けなかった。一方、エストロゲンによって卵丘細胞で制御される生物現象は、卵分泌因子の有無により大きく変化し、卵分泌因子の存在下でエストロゲンは血小板由来増殖因子、血管内皮細胞増殖因子、上皮成長因子など、卵胞発達に重要な増殖因子のシグナル伝達制御に関連した遺伝子を促進することが示唆された。すなわち、エストロゲンは、卵分泌因子が卵丘細胞で制御する生物現象に大きな影響は与えず、一方、卵分泌因子はエストロゲンが制御する生物現象に大きな変化を及ぼすことが示唆された。また、「シグナル強度」について解析した結果、エストロゲンは、卵母細胞が分泌する bone morphogenetic protein (BMP) シグナルを強めることが示唆された。

## 第2章 卵分泌因子とエストロゲンが互いのシグナルを制御するメカニズムの解明

卵分泌因子とエストロゲンが互いのシグナルをどのように制御しているのかについて、エストロゲンによる卵分泌因子、特に BMP シグナルの制御と、卵分泌因子によるエストロゲンシグナルの制御を、それぞれ第1節と第2節に分けて解析を行った。

第1節では、エストロゲンが卵母細胞の分泌する BMP シグナルの増強にかかわるメカニズムの解明を試みた。BMP シグナルは細胞内で SMAD1/5/8 タンパク質のリン酸化として伝達される。そこでまず、実際にエストロゲンが卵丘細胞での卵母細胞由来 BMP シグナルを増強するのかについて SMAD1/5/8 のリン酸化を指標として解析した。その結果、卵丘-卵母細胞複合体における SMAD1/5/8 のリン酸化は、エストロゲン添加によって強まることが確認された。

BMP/SMAD のシグナルは多くの阻害因子によって制御されているため、エストロゲンが

BMP/SMAD シグナルの阻害因子の発現を抑制することで卵分泌因子シグナルを制御している可能性が考えられる。そこで、第 1 章のマクロアレイ解析結果から、エストロゲンにより発現制御を受ける阻害因子を探索したところ、BMP アンタゴニストとして知られる Noggin (NOG) の発現が、卵丘細胞でエストロゲンによる抑制を受けることが示唆された。そこで、NOG の発現制御を解析したところ、卵丘細胞における NOG の発現は、卵分泌因子により促進され、一方、エストロゲンにより抑制された。さらに、NOG 存在下では、卵分泌因子刺激による SMAD1/5/8 のリン酸化が抑制された。これらのことから、エストロゲンは NOG の発現抑制を介して、卵分泌因子のシグナル強度を制御していることが示唆された。

さらに、エストロゲンによる NOG 発現抑制の生体内での重要性を理解するために、顆粒膜細胞特異的に NOG を発現するトランスジェニックマウスを作製し、解析を行った。野生型雄マウスとの交配による妊孕性テストを約 5 カ月間行った結果、NOG 過剰発現メスマウスでは産仔が得られず、不妊であることが明らかとなった。また、NOG 過剰発現マウスの卵巣切片を観察したところ、胞状卵胞における顆粒膜細胞層の希薄化や、卵母細胞の萎縮など異常な卵胞が多く観察され、NOG の過剰発現は卵胞発達に異常をきたすことが示唆された。これらの結果は、NOG 発現制御を介した卵分泌因子とエストロゲンのシグナル相互作用が生体内においても卵胞の正常な発達制御に重要であることを示唆している。

第 2 節では、卵分泌因子がエストロゲンシグナルに影響を及ぼすメカニズムに着目した。顆粒膜細胞におけるエストロゲンのシグナルは、主にエストロゲン受容体 2 (ESR2) によって仲介され、細胞質中の ESR2 はエストロゲンと結合すると核内へ移行して標的遺伝子の転写を制御する。その際、ESR2 の転写活性は多くの ESR 結合因子の影響を受ける。そこで、卵分泌因子によるエストロゲンシグナルの制御メカニズムを解明するために、ESR2 および ESR 結合因子に着目した。まず、卵丘細胞における ESR2 の mRNA の発現制御を解析したところ、ESR2 発現は卵分泌因子により促進された。次に、卵丘細胞における ESR 結合因子の発現に対する卵分泌因子の影響を解析したところ、ESR 結合因子をコードする *Nrip1*、*Ddx17*、*Ncoa3* の mRNA 発現は卵分泌因子により抑制され、一方 *Psmc3ip* は促進された。これらの結果は、卵分泌因子は、ESR 結合因子の発現を変化させることで、エストロゲンシグナルが制御する遺伝子発現に影響を与えている可能性を示唆している。

### 第 3 章 壁顆粒膜細胞における FOXL2 転写因子の発現に対する卵分泌因子とエストロゲンの影響

壁顆粒膜細胞の正常な発達と機能制御には Forkhead box L2 (FOXL2) 転写因子が重要であ

ることが知られている。しかし、FOXL2 の発現制御には不明な点が多く、卵分泌因子やエストロゲンの関与は不明である。そこでまず、壁顆粒膜細胞における、FOXL2 の発現に対する卵分泌因子とエストロゲンの影響を解析した。その結果、興味深いことに、FOXL2 タンパク質量は、壁顆粒膜細胞の単独培養、または、卵母細胞やエストロゲンの単独添加培養では顕著な影響は見られなかったが、卵母細胞とエストロゲンの両方を培地に添加することで高く維持された。このとき、FOXL2 mRNA 量には変化は見られなかった。すなわち、卵分泌因子とエストロゲンは、FOXL2 タンパク質量を制御することで壁顆粒膜細胞の発達に影響を及ぼしている可能性がある。また、この結果は、卵分泌因子とエストロゲンの相互作用が第 1、2 章で解析してきた mRNA 発現制御に加えて、タンパク質量の制御に関わる可能性を示唆している。

FOXL2 を欠損させたマウス成獣の顆粒膜細胞では、精巣特異的遺伝子 SOX9 の発現が上昇し、一部がセルトリ細胞化、すなわち卵巣顆粒膜細胞の雌性が失われ雄性化することが報告されている。本研究において壁顆粒膜細胞を培養すると FOXL2 タンパク質量が低下したことから、卵分泌因子とエストロゲンは、FOXL2 の発現を高く維持することで SOX9 発現を抑制し、顆粒膜細胞の雄性化を抑制している可能性が考えられる。そこで、培養した壁顆粒膜細胞での SOX9 発現を解析したところ、顆粒膜細胞単体で培養した際には、SOX9 の発現変化は見られなかった。しかし興味深いことに、培養条件をより生体内に近づける目的で卵胞液を培地に添加したところ、SOX9 発現の顕著な上昇が見られ、この SOX9 発現は卵分泌因子とエストロゲンの添加によって抑制された。これらの結果から、卵分泌因子とエストロゲンの相互作用は FOXL2 のタンパク質発現を促進し、この制御は本来顆粒膜細胞では発現しない SOX9 の発現抑制に必要であることが示唆された。

以上、本研究により卵分泌因子とエストロゲンは互いのシグナルに影響を及ぼし合い、卵丘細胞の発達を制御すること。また、壁顆粒膜細胞の発達に重要な FOXL2 発現に必要であることが明らかとなった。特に、Noggin の過剰発現マウスが不妊であるという事実は、卵分泌因子とエストロゲンの相互作用の異常が個体の妊孕性にまでも影響を及ぼす可能性を示唆している。以上の知見は、顆粒膜細胞の発達制御に新たな知見を提供し、卵巣機能制御の理解に貢献すると考えられる。