

## 論文の内容の要旨

論文題目 食事成分が引き起こす雌性不妊における卵巣や卵の機能異常のメカニズム解析

氏 名 小峰 瞳子

### 【背景・目的】

ATP-binding cassette transporter G5 と G8 のヘテロダイマー (ABCG5/G8) は、ステロール類を消化管腔側へと排出するトランスポーターとして知られている。当研究室での *Abcg5/g8* 遺伝子欠損マウスの繁殖過程において、*Abcg5/g8* 遺伝子をホモ欠損したマウス (以下、KO マウス) の雌は不妊であった。私は、修士課程で行った血清メタボローム解析により、KO 雌マウスでは食事中 (通常飼料中) に含まれる植物ステロールの血清中濃度が野生型マウス (以下、WT マウス) と比較して顕著に高値であることを見出した。また、KO 雌マウスの不妊は、植物性成分を除去した飼料 (以下、妊娠餌) で飼育することで回復する一方で、上記の植物ステロールを妊娠餌に添加した植物ステロール餌では回復しなかったことから、これらの植物ステロールが KO 雌マウスの不妊原因物質である可能性を見出した。さらに、体外受精実験の結果、通常飼料 (以下、KO 不妊餌) で飼育した KO 雌マウス (以下、不妊 KO 雌マウス) では、WT 雌マウスや妊娠餌で飼育した KO 雌マウス (以下、妊娠可能 KO 雌マウス) と比べて、受精・卵割といった卵の機能が顕著に低下していることが明らかとなった。しかしながら、このような卵の機能異常が生じるメカニズムは不明であった。そこで本研究では、卵の成熟を担う卵巣にも着目し、植物ステロールが卵巣や卵の機能に及ぼす影響をその分子機構も含めて解析することを目的として、以下の検討を行った。

### 【方法・結果】

#### 1. 不妊 KO 雌マウスの卵巣では妊娠・出産に関わる因子の発現量が低下している

KO 雌マウスの不妊に関わる因子を網羅的に探索するために、WT 雌マウス、不妊 KO 雌マウス、妊娠可能 KO 雌マウスから採取した卵巣の RNA-sequencing (RNA-seq) 解析を行った。その結果、不妊 KO 雌マウスにおいて、WT 雌マウスおよび妊娠可能 KO 雌マウスと比べて発現量が 3 分の 2 以下かつ有意に低下していた因子が 100 個、逆に 1.5 倍以上かつ有意に上昇していた因子が 35 個同定された。このうち、不妊 KO 雌マウスで発現量低下を認めた因子には、妊娠・出産

に関わると報告されているものが複数含まれていた。そこで、不妊 KO 雌マウスで卵の機能異常が生じるメカニズムについて、さらなる手がかりを得るために、(2-a)発現量低下因子群の Gene ontology (GO) 解析に基づく検討と、(2-b)発現量低下因子群に共通する上流制御因子（ゲノム結合因子）を想定した検討とを並行して進めた。

### **2-a. 不妊 KO 雌マウスの卵巣では化合物 A 濃度が低下している**

上述の RNA-seq 解析における不妊 KO 雌マウスの卵巣での発現量低下因子について GO 解析を行った結果、最も上位にステロール生合成が挙げられた。実際に、不妊 KO 雌マウスの卵巣でステロール生合成関連酵素群の発現量低下が認められた。上記の酵素群により産生制御を受けるコレステロール中間代謝物の一つである化合物 A は、卵成熟の促進や胚盤胞到達率の向上に関与し得ることが報告されている。そこで、不妊 KO 雌マウスの卵巣で化合物 A が低下し卵の機能異常に関与している可能性を考え、各マウス群の卵巣の化合物 A 濃度を解析した結果、不妊 KO 雌マウスの卵巣では、WT 雌マウスおよび妊娠可能 KO 雌マウスと比べ化合物 A 濃度の有意な低下が認められた。

### **2-b. 不妊 KO 雌マウスの卵巣ではゲノム結合因子 B の活性が上昇している**

不妊 KO 雌マウスの卵巣での発現量低下因子について、これら因子の発現量を制御する共通のゲノム結合因子が存在する可能性を念頭に、ChIP-seq データベース (ChIP-Atlas ; <https://chip-atlas.org/>) を用いた共通ゲノム結合因子の探索を行った。その結果、ゲノム結合因子 B の構成因子が候補として上位に挙げられた。ゲノム結合因子 B は、ゲノム修飾 C を行い、下流遺伝子の転写を抑制する。そこで、各マウス群の卵巣でのゲノム修飾 C を評価した結果、不妊 KO 雌マウスの卵巣では、WT 雌マウスおよび妊娠可能 KO 雌マウスと比べてゲノム修飾 C が有意に上昇しており、ゲノム結合因子 B の活性亢進が示唆された。

### **3. 不妊 KO 雌マウスの妊娠・出産効率は薬剤 D により改善する**

薬剤 D は、ゲノム結合因子 B の活性を抑制し下流遺伝子の発現を促進することが報告されている。そこで、不妊 KO 雌マウスに薬剤 D を投与して不妊が改善するかを検討した。まず、KO 雌マウスに薬剤 D 含有水を与えた後（以下、薬剤 D 雌マウス）、卵巣を採取しゲノム修飾 C を評価した結果、WT 雌マウスや妊娠可能 KO 雌マウスと同程度にまで低下することが明らかとなった。したがって、不妊 KO 雌マウスの卵巣でのゲノム結合因子 B の活性亢進は、薬剤 D で抑制可能であることが示唆された。次に、薬剤 D 雌マウスを生殖能力がある KO 雄マウスと交配させ、妊娠・出産状況をモニターした。その結果、薬剤 D 投与群では、非投与群と異なり、妊娠に伴う体重増加が認められ、複数の個体で出産も認められた。したがって、卵巣でのゲノム結合因子 B の活性変動と対応して、KO 雌マウスの不妊は薬剤 D で改善し得ることが示された。

#### **4. 不妊 KO 雌マウスの卵巣では薬剤 D で回復可能な上流転写因子 E の発現量低下が認められる**

乳ガン由来の培養細胞において、ゲノム結合因子 B は上述のステロール生合成関連酵素群の発現量を、上流転写因子 E の発現量の抑制を介して負に制御する。そこで、上流転写因子 E の mRNA 発現量を各マウス群の卵巣で定量・比較した結果、不妊 KO 雌マウスでは、WT 雌マウスおよび妊娠可能 KO 雌マウスに比べ、上流転写因子 E の mRNA 発現量が有意に低下しており、この低下は薬剤 D で回復傾向を示した。この結果と対応して、不妊 KO 雌マウスの卵巣で低下していたステロール生合成関連酵素群の mRNA 発現量は、薬剤 D 雌マウスでは WT 雌マウスや妊娠可能 KO 雌マウスと同程度にまで回復していた。以上より、不妊 KO 雌マウスの卵巣でのステロール生合成関連酵素群の mRNA 発現量低下は、ゲノム結合因子 B の活性亢進による上流転写因子 E の発現量低下により生じている可能性が示唆された。

#### **5. 不妊 KO 雌マウスの卵巣中の化合物 A 濃度は薬剤 D により回復する**

薬剤 D 雌マウスの卵巣でステロール生合成関連酵素群の発現量が回復したことから、卵巣中の化合物 A 濃度も解析した結果、不妊 KO 雌マウスと比べ薬剤 D 雌マウスで化合物 A 濃度は有意に上昇していた。

#### **6. 不妊 KO 雌マウスの卵の機能異常は薬剤 D により改善する**

さらに、薬剤 D 投与で不妊 KO 雌マウスの卵の機能異常が改善するかを検討した。薬剤 D 雌マウスから採取した卵について、WT 雄マウスの精子と体外受精を行い、受精率ならびに胚盤胞までの正常卵割率を評価した結果、不妊 KO 雌マウスの卵の受精率や胚盤胞到達率は、薬剤 D 投与により WT 雌マウスと同程度にまで回復し、不妊 KO 雌マウスの卵の機能異常は薬剤 D で改善することが示された。

#### **7. 不妊 KO 雌マウスの卵巣では成熟卵胞数が低下している**

一般に、卵の機能異常は卵の成熟不全が原因であることが多い。そこで、卵巣内で卵の成熟を担う細胞集合体である卵胞に着目し、さらなる解析を進めた。まず、各マウス群の排卵前の卵巣について、H&E 染色による組織学的評価を行った。その結果、不妊 KO 雌マウスの卵巣では、WT 雌マウスおよび妊娠可能 KO 雌マウスと比べて、小型で未成熟な原始卵胞の割合が高い一方で、大型の成熟卵胞の割合が低かった。また、薬剤 D 投与により、原始卵胞数の低下および成熟卵胞数の増加が確認され、不妊 KO 雌マウスの卵巣では、薬剤 D で回復可能な卵胞発育不全が生じていることが示唆された。

#### **8. 不妊 KO 雌マウスの卵巣には植物ステロールが蓄積している**

次に、不妊原因物質と示唆された上述の植物ステロールと卵胞発育との関連性を解析するために、WT 雌マウス、不妊 KO 雌マウス、妊娠可能 KO 雌マウスの卵巣中の植物ステロール濃度を

定量した。その結果、不妊 KO 雌マウスの卵巣では、他の 2 群と比べて植物ステロール濃度が顕著に高く、植物ステロールの異常蓄積が認められた。また、薬剤 D 雌マウスの卵巣中の植物ステロール濃度は、不妊 KO 雌マウスと同程度であったことから、薬剤 D は、植物ステロールの卵巣中濃度には影響を与えずに卵・卵胞の成熟異常や不妊を改善していることが示唆された。

## 9. 植物ステロールにより WT 卵胞の発育は阻害され、これは化合物 A および薬剤 D により改善する

植物ステロールが卵胞発育に及ぼす影響を明らかにするために、WT 雌マウスの卵巣から単離した卵胞を、不妊 KO 雌マウスの卵巣中濃度と同程度の植物ステロールを添加した培地で *in vitro* 培養し、発育を評価した。その結果、ステロール未添加条件やコレステロール添加条件と比べ、植物ステロール添加条件では卵胞発育が有意に阻害された。また、植物ステロールによる卵胞発育阻害は、化合物 A や薬剤 D の添加で回復した。以上より、不妊 KO 雌マウスの卵巣では、植物ステロールにより、化合物 A および薬剤 D 感受性の卵胞発育不全が生じている可能性が示唆された。

### 【結論・考察】

本研究により、KO 雌マウスの不妊のメカニズムとして、卵巣でのステロール生合成関連因子の低下、並びに、ゲノム結合因子 B の活性化の関与が示唆され、ゲノム結合因子 B の阻害剤である薬剤 D により KO 雌マウスの不妊が改善することが示された。また、*in vitro* 卵胞培養により、植物ステロールは卵胞発育阻害活性を有すること、この阻害が化合物 A や薬剤 D で回復することが明らかとなった。以上より、不妊 KO 雌マウスの卵巣では、植物ステロールの蓄積によるゲノム結合因子 B の活性化、並びに、それに伴う下流でのステロール生合成系（特に化合物 A）の低下を介し、卵胞発育不全や卵の機能異常が生じている可能性が示唆された。本研究で得られた知見により、ゲノム結合因子 B の活性と卵巣・卵の機能異常や不妊のメカニズムの関係のより詳細な解明につながることを期待される。