

博士論文

多嚢胞性卵巣症候群の病態における

小胞体ストレス応答と Notch シグナルの役割

小池 洋

博士論文

多嚢胞性卵巣症候群の病態における

小胞体ストレス応答と Notch シグナルの役割

小池 洋

東京大学大学院 医学系研究科

生殖・発達・加齢医学専攻 分子細胞生殖医学

指導教員 大須賀 穰

原田 美由紀

目次

1. 略語表	3
2. 要旨	9
3. 序文	10
4. 実験方法	23
4.1. 倫理承認	
4.2. 患者検体	
4.3. PCOS モデルマウス	
4.4. マウス COC の単離と培養	
4.5. ヒト GLCs の単離と培養	
4.6. 培養ヒト GLCs の薬剤投与方法	
4.7. RNA 抽出、逆転写、リアルタイム定量 PCR (qPCR)	
4.8. ウェスタンブロット法	
4.9. 卵巣組織、免疫組織化学染色	
4.10. 統計学的解析	

5. 実験結果	33
5.1. 患者背景	
5.2. Notch シグナルは PCOS 患者の顆粒膜細胞で活性化している	
5.3. Notch シグナルは PCOS モデルマウスの顆粒膜細胞で活性化している	
5.4. 小胞体ストレスは Notch シグナルを誘導する	
5.5. 小胞体ストレスは ATF4 を介して Notch シグナルを誘導する	
5.6. 小胞体ストレスは Notch シグナルを介して排卵関連分子を誘導する	
5.7. 小胞体ストレスは Notch シグナルを介して COC expansion を促進する	
5.8. PCOS モデルマウスでは、Notch シグナルが COC expansion を促進する	
6. 考察	48
7. 結語	65
8. 引用文献	66
9. 謝辞	84

略語表

ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
AGEs	advanced glycation-end products
AHR	aryl hydrocarbon receptor
AlbZIP	androgen-induced bZIP
AMH	anti-Müllerian hormone
Areg	amphiregulin
ASK1	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF4	activating transcription factor 4
ATF6	activating transcription factor 6
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
BBF2H7	box B-binding factor 2 human homolog on chromosome 7
Bcl-2	B-cell/CLL lymphoma 2
Bip	binding immunoglobulin protein
BMI	body mass index
BMP15	bone morphogenetic protein 15

BSA	bovine serum albumin
BTC	betacellulin
bZIP	basic leucine zipper domain
CHOP	C/EBP homologous protein
COC	cumulus-oocyte complex
COX2	cyclooxygenase 2
CREB	cyclic AMP-response element-binding protein
CTGF	connective tissue growth factor
CYP1B1	cytochrome P450 family 1B1
DAPT	3,5-difluorophenylacetyl)-L-alanyl-L-2-phenylglycine <i>t</i> -butyl ester
DHEA	dehydroepiandrosterone
Dll	delta-like
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DR5	death receptor 5
EGF	epidermal growth factor
eIF2 α	eukaryotic initiation factor 2 α
ER	endoplasmic reticulum

Ereg	epiregulin
FCS	fetal calf serum
FSH	follicle-stimulating hormone
GADD34	growth arrest and DNA damage-inducible protein 34
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GC	granulosa cell
GDF9	growth differentiation factor 9
GLCs	granulosa-lutein cells
GnRH	gonadotropin-releasing hormone
GRP78	glucose-regulated protein 78
Has	hyaluronan synthase 2
hCG	human chorionic gonadotropin
Hes	hairy/enhancer of split
Hey	hairy/enhancer of split related with YRPW
HSPA5	heat shock 70 kDa protein 5
IαI	inter-alpha-trypsin inhibitor
IRE1	inositol requiring enzyme 1
IKK	Ikb kinase

ISR	integrated stress response
Jag	jagged
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LH	luteinizing hormone
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mRNA	messenger RNA
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NICD	Notch intracellular domain
NTM	Notch transmembrane domain
OASIS	old astrocyte specifically induced substance
4-PBA	4-phenylbutyric acid
PBS	phosphate buffered saline
PCOS	polycystic ovary syndrome
PERK	double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase
PI3K	phosphatidylinositol 3 kinase
PMSG	pregnant mare serum gonadotropin
POI	primary ovarian insufficiency
PP1	protein phosphatase 1

PPOS	progesterin-primed ovarian stimulation
Ptx3	pentraxin 3
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RIDD	regulated IRE1-dependent decay
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard error of the mean
SHBG	sex hormone-binding globulin
siRNA	small interfering RNA
TBS	Tris buffered saline
Tg	thapsigargin
TGF- β 1	transforming growth factor- β 1
Tm	tunicamycin
Tnfaip6	tumor necrosis factor alpha-induced protein 6
TRAF2	tumor necrosis factor receptor-associated factor 2
TUDCA	tauroursodeoxycholic acid
UPR	unfolded protein response

UPRE	unfolded protein response element
XBP1	X-box-binding protein 1
XBP1s	spliced XBP1

要旨

多嚢胞性卵巣症候群(polycystic ovary syndrome, PCOS)は排卵障害をきたし、女性の不妊原因として重要な疾患である。しかし、複雑な病態をもつ疾患であるが故に、病態形成の機序は未だ解明されない部分が多い。本研究では、PCOS の顆粒膜細胞で Notch シグナルが活性化していることを示した。小胞体ストレスは Notch シグナルを活性化し、排卵関連遺伝子の発現量増加と、排卵の現象の一部である卵丘-卵子複合体の膨化(cumulus-oocyte complex expansion, COC expansion)を異常亢進させることを明らかにし、PCOS モデルマウスにおいても COC expansion が亢進していることを示した。以上の結果から、卵巣微小環境の小胞体ストレスが Notch シグナルを介した COC expansion の異常を惹起し、PCOS の主要な病態である排卵障害に寄与していることが示唆される。

序文

多嚢胞性卵巣症候群(polycystic ovary syndrome, PCOS)は、生殖年齢女性で最も頻度が高く、その 6-15%に認める内分泌・代謝疾患であり、表現型は多様で広範なスペクトラムをもっている[1-3]。主な症状としては、月経周期異常、排卵障害、不妊症、多毛、にきび、脱毛、肥満、耐糖能異常、心血管障害、悪性腫瘍、抑うつなどがある。日常臨床では月経異常や排卵障害を契機に PCOS と診断されることが多く、不妊症の原因として重要な位置を占める疾患である。さらに、周産期合併症、2 型糖尿病、脂質異常症、精神疾患などの様々な疾病リスクが高くなることが知られており、思春期から閉経後に至るまでライフステージに応じた対応が必要となる。PCOS の診断基準は国際的に広く使用されているロッテルダム基準があり、(1)希発排卵または無排卵、(2)臨床的または生化学的高アンドロゲン状態、(3)多嚢胞性卵巣の 3 項目のうち 2 項目を満たすものとされている[4]。本邦においては、(1)月経異常、(2)多嚢胞性卵巣、(3)血中男性ホルモン高値、または luteinizing hormone (LH)基礎値高値かつ follicle-stimulating hormone (FSH)基礎値正常の 3 項目全てを満たす場合を PCOS と診断している[5]。PCOS の病態は、高アンドロゲン状態を中心として、下垂体からのゴナドトロピン分泌異常、卵巣機能障害、インスリン抵抗性、脂肪細胞機能異常などが互いに関連し

合って形成され、それぞれが寄与する割合によって多彩な表現型を呈することになる[1-3](図1)。卵巣においては、卵胞発育亢進と発育停止、主席卵胞の選択障害、排卵障害により多嚢胞性卵巣の像を認める。卵胞発育はゴナドトロピンの協調した分泌に加えて、卵巣局所環境における多くの因子によって調節されている[6,7]。PCOSの病態に関わる卵巣局所因子としては、小胞体ストレス、酸化ストレス、慢性炎症、アンドロゲン、抗ミュラー管ホルモン(anti-Müllerian hormone, AMH)、終末糖化産物(advanced glycation-end products, AGEs)、環境ホルモンなどが知られている[8-11]。この中でも小胞体ストレスは細胞に対する様々な負荷によって誘発され、多くの生理的、病的状態に関わることから、卵巣局所因子としては重要な位置を占めるといえる。

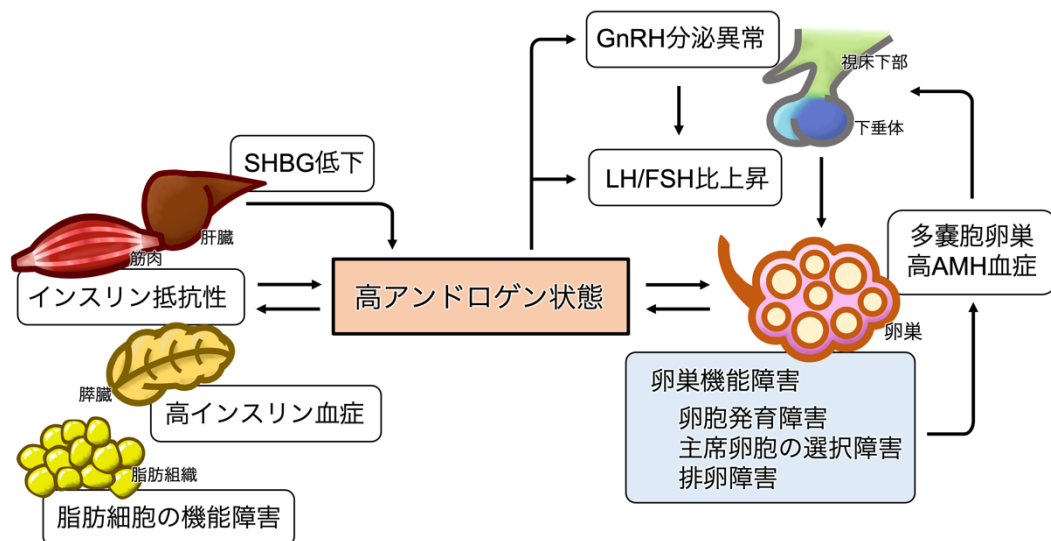


図 1. PCOS の病態

PCOS の病態は、高アンドロゲン状態を中心として、視床下部から分泌される gonadotropin-releasing hormone (GnRH) のパルス頻度の増加、下垂体からの LH 分泌増加、卵巣機能障害、インスリン抵抗性、脂肪細胞機能障害などが互いに関連し合って形成され、それぞれが寄与する割合によって多彩な表現型を呈する。さらに、それぞれの病態が互いに強め合う関係にあるため、病態を増悪させる悪循環が形成される。卵巣での高アンドロゲン状態は排卵障害を引き起こし、卵巣内に多数の卵胞が観察される多嚢胞卵巣の像を呈することになる。高 LH 状態は莢膜細胞でのアンドロゲン産生を促し、アンドロゲンは視床下部-下垂体ホルモン分泌異常を引き起こし、卵巣機能障害の原因となる。多数の小卵胞から分泌される AMH は、卵胞発育の阻害、GnRH 分泌異常を起こす。また、高アンドロゲン状態はインスリン抵抗性を惹起する。インスリン抵抗性は高インスリン血症を招き、莢膜細胞のアンドロゲン産生促進と、肝臓での sex hormone-binding globulin (SHBG) 産生抑制により、高アンドロゲン状態を促進する。インスリン抵抗性は内臓脂肪の蓄積と脂肪細胞機能異常を引き起こし、病態を増悪させる。

小胞体ストレスとは、タンパク質の合成・成熟の場である小胞体に異常なタンパク質が多量に蓄積した状態である。細胞増殖やホルモン合成による小胞体への過負荷、低酸素、飢餓状態、遺伝子変異による異常タンパク質の産生などが小胞体ストレスの誘因になる。細胞は小胞体ストレスに対して恒常性を保つために、小胞体ストレス応答/UPR (unfolded protein response) と呼ばれる複数のシグナル伝達経路からなる反応を誘導する(図 2)。小胞体膜上には主に 3 つのストレスセンサータンパク質が存在し、PERK、IRE1、ATF6 と呼ばれている。小胞体ストレスを検出すると UPR が発動し、それぞれ下流のシグナル経路が活性化する。この反応によって、新たなタンパク質の合成抑制、小胞体シャペロンの誘導による変性タンパク質の修復、異常タンパク質の分解除去が促進し、小胞体の負荷が軽減されることになる。しかし、小胞体ストレスが長期に及ぶ場合や、負荷が小胞体の処理能力を超えて過剰な場合には、細胞はアポトーシスを誘導して死に至る[12-15]。

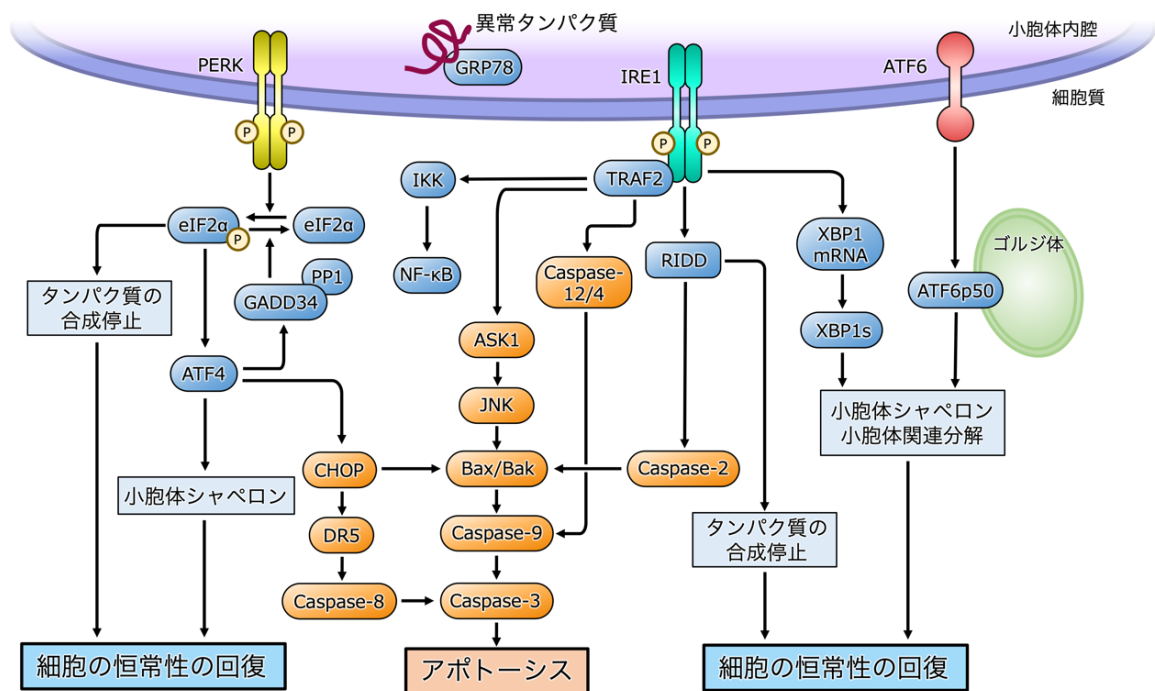


図 2. 小胞体ストレス応答/ UPR の経路

小胞体膜上には主に 3 つのストレスセンサーが存在し、小胞体ストレスを検出すると UPR が発動し、それぞれ下流のシグナル経路が活性化する。

PERK は膜貫通型の小胞体ストレスセンサータンパク質で、異常タンパク質を検知すると GRP78/Bip が解離してオリゴマー化し、自己リン酸化によって活性化する。活性化した PERK はリボソームを構成する eIF2 α をリン酸化することで新たなタンパク質の翻訳を停止し、小胞体の負荷を軽減させる。その一方で、eIF2 α は ATF4 の翻訳を促進し、ストレス応答に関わる酸化還元、アミノ酸代謝、タンパク質合成、オートファジー関連分子、小胞体シャペロンを転写誘導する。ATF4 は GADD34 を誘導し、GADD34 は PP1 と複合体を形成し、リン酸化された eIF2 α の脱リン酸化を促して、タンパク質翻訳を再開させる。小胞体ストレスが持続する場合には、ATF4 により CHOP や GADD34 が転写誘導され、アポトーシス経路が活性化される。CHOP は転写因子として、DR5、Bax、Bak を誘導、Bcl-2 を抑制することでアポトーシスを促進する。GADD34 は、p53 をリン酸化して活性化し、または Akt の活性化を阻害することでアポトーシスを促進する。eIF2 α のリン酸化は I- κ B の翻訳を抑制し、NF- κ B を活性化する。IRE1 は PERK に類似した小胞体内腔領域を持つ膜貫通型の小胞体ストレスセンサータンパク質で、異常タンパク質を検知することで GRP78/Bip が解離するとオリゴマー化し、自己リン酸化によって活性化する。活性化した IRE1 は RNase ドメインで転写因子 XBP1 の mRNA をスプライシングする。スプライシングさ

(図2 続き)

れた XBP1 は翻訳されると機能的な転写因子として働き、小胞体シャペロン、タンパク輸送、タンパク分解に関する多くの UPR 関連分子の転写を促進する。IRE1 の RNase ドメインは RIDD (regulated IRE1-dependent decay) と呼ばれるシステムで特定の mRNA や microRNA を分解し、タンパク質の合成を抑制する。また、IRE1 は活性化するとアダプタータンパク質 TRAF2 と複合体を形成し、IRE1 のキナーゼドメインが ASK1 や IKK をリン酸化することで、JNK 経路を活性化してアポトーシスを引き起こしたり、NF- κ B 経路を活性化して炎症反応を促進させる。

ATF6 は膜貫通型の小胞体ストレスセンサータンパク質で、異常タンパク質を検知することで GRP78/Bip が解離し、小胞体からゴルジ体へ移行する。そこで ATF6 は膜貫通領域が切断され、遊離した bZIP 構造をもつ N 末端領域は核へ移行して転写因子として機能する。ATF6 の標的遺伝子としては、XBP1、CHOP、小胞体シャペロン、タンパク輸送、タンパク分解関連の多くの UPR 関連分子がある。また、ATF6 と構造がよく似た OASIS ファミリー(CREB3 ファミリー)という膜タンパク質があり、ATF6 と同様にプロセッシングを受けて転写因子として働く。OASIS (CREB3L1)、BBF2H7 (CREB3L2)、Luman (CREB3/LZIP)、CREBH (CREB3L3)、AibZIP (CREB3L4/CREB4/TISP40)の 5 種類があり、組織特異的な発現パターンを示す。Luman は顆粒膜細胞で豊富に発現しており、卵胞発育やステロイドホルモン合成に関わる。AibZIP は前立腺で発現が高く、アンドロゲンによって誘導される。

AibZIP, androgen-induced bZIP; ASK1, apoptosis signal-regulating kinase 1; ATF4, activating transcription factor 4; ATF6, activating transcription factor 6; Bak, Bcl-2 homologous antagonist/killer; Bax, Bcl-2-associated X protein; BBF2H7, box B-binding factor 2 human homolog on chromosome 7; Bcl-2, B-cell/CLL lymphoma 2; Bip, binding immunoglobulin protein; CHOP, C/EBP homologous protein; CREB, cyclic AMP-response element-binding protein; DR5, death receptor 5; eIF2 α , eukaryotic initiation factor 2 α ; ER, endoplasmic reticulum; GADD34, growth arrest and DNA damage-inducible protein 34; GRP78, glucose-regulated protein 78; IKK, I κ b kinase; IRE1, inositol requiring enzyme 1; JNK, c-Jun N-terminal kinase; NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; OASIS, old astrocyte specifically induced substance; P, phosphorylation; PERK, double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase; PP1, protein phosphatase 1; RIDD, regulated IRE1-dependent decay; TRAF2, tumor necrosis factor receptor-associated factor 2; UPR, unfolded protein response; XBP1, X-box-binding protein 1; XBP1s, spliced XBP1。

あらゆる細胞において小胞体ストレス応答は細胞機能の恒常性維持に関わるため、生体における極めて多くの生理的、病的状態に関わってくる。その中でも糖尿病、神経変性疾患、虚血性疾患、悪性腫瘍、炎症性疾患の分野において多数の活発な研究がされている[13,16-20]。近年、卵巣機能を調節する卵巣局所因子として小胞体ストレスについて注目が集まってきている。卵胞発育の調節、PCOS、卵巣過剰刺激症候群、肥満による黄体ホルモン分泌異常、子宮内膜症における卵巣機能低下、AGEs 蓄積による卵巣機能低下といった様々な卵巣の生理的、病的状態に関与していることが明らかになってきた[21-25]。PCOS の病態では、卵巣局所の高アンドロゲン環境が顆粒膜細胞の小胞体ストレスを誘発している。小胞体ストレスにより、顆粒膜細胞のアポトーシスと卵胞発育不全、卵巣線維化、AGEs の蓄積、ステロイドホルモン代謝異常、インスリン抵抗性が引き起こされることが報告されている[9, 26-30] (図 3)。

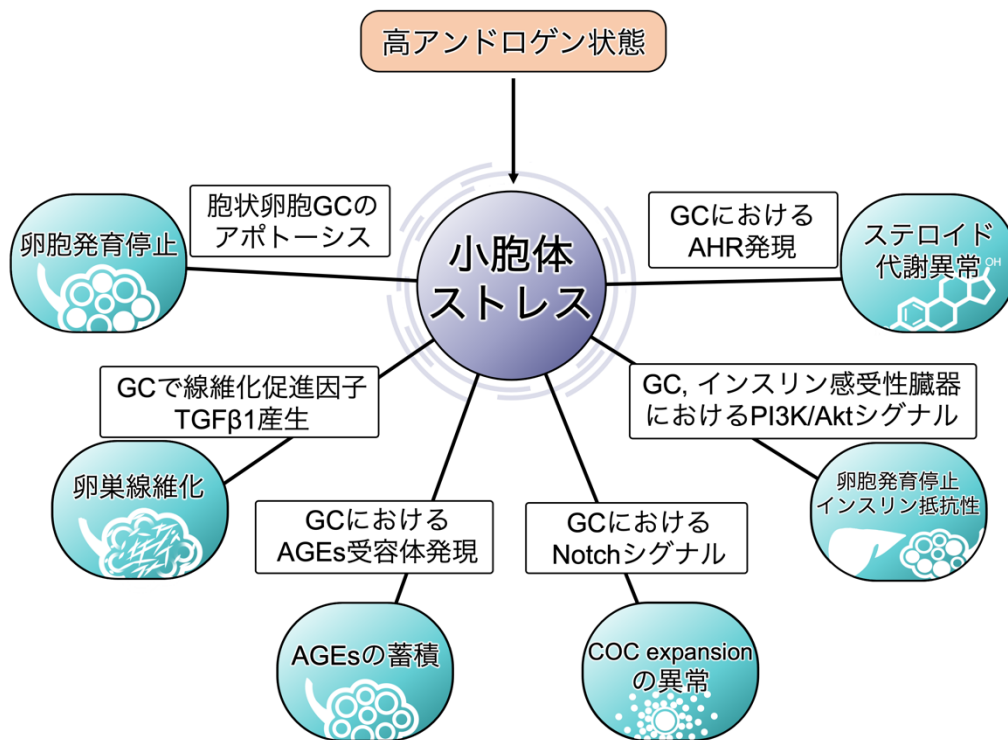


図 3. PCOS の病態と小胞体ストレス応答

卵巣局所の高アンドロゲン状態は、顆粒膜細胞(granulosa cell, GC)の小胞体ストレスを引き起こして、PCOS の病態形成に寄与する。胞状卵胞の GC では小胞体ストレスにより CHOP が活性化、DR5 発現が亢進しアポトーシスが促進している。これにより正常な卵胞発育が障害される。同様に小胞体ストレスによって GC では線維化促進因子の TGF- β 1、CTGF が増加しており、卵巣内のコラーゲン産生増加、線維化が亢進している。小胞体ストレスは卵巣内の AGEs 蓄積促進、AGEs 受容体発現を増加させることで卵胞発育を障害する。小胞体ストレスは GC の AHR とそのシグナル下流にあるステロイド代謝に関わる CYP1B1 の発現を増加させる。また、インスリン感受性臓器における小胞体ストレスはインスリン抵抗性を惹起し、高インスリン血症を引き起こし、卵巣機能不全やアンドロゲン産生を促すことになる。

AHR, aryl hydrocarbon receptor; CTGF, connective tissue growth factor; CYP1B1, cytochrome P450 family 1B1; DR5, death receptor 5; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1。

卵胞の構造は卵子の周囲を顆粒膜細胞が多層に取り囲み、その外周を莢膜細胞が取り囲んでいる。卵胞の成熟から排卵に至る過程は下垂体から分泌されるゴナドトロピンによる調節を受けており、さらに、卵巣内での局所因子による細胞間情報伝達が重要な役割を果たしている[6, 7]。卵子から分泌される growth differentiation factor 9 (GDF9)や bone morphogenetic protein 15 (BMP15)は顆粒膜細胞の増殖、分化に関与し、一方で顆粒膜細胞から分泌される Kit ligand は卵子からのそれらの分泌を調節している[31-37]。排卵の過程では、下垂体から分泌される LH の作用により顆粒膜細胞で epidermal growth factor (EGF)関連因子が誘導され、協調のとれた一連の反応が周囲に伝播し、卵丘-卵子複合体の膨化(cumulus-oocyte complex expansion, COC expansion)と呼ばれる顆粒膜細胞周囲の浮腫状変化を伴う排卵に必須の反応が引き起こされる[38-41]。細胞から分泌される液性因子以外には、卵子と顆粒膜細胞の間ではギャップジャンクションを介した物質交換によって、卵子の成熟を調節している。また、細胞同士の接触による細胞表面のリガンドと受容体を介した情報伝達を担う分子として Notch 受容体がよく知られており、卵巣における Notch シグナルの機能が近年明らかになりつつある[42]。

Notch シグナルは後生動物でよく保存された遺伝子発現の調節経路であり、細胞の分化や増殖を制御し、個体の発生に深く関わっている。また、胎生期だけ

ではなく成体においても多くの細胞の分化や増殖に関わることが分かっている。

Notch シグナルは個体発生段階から成体まで、あらゆる組織において重要な役割をもっているため、そのシグナル異常は先天奇形、悪性腫瘍、代謝異常、他さまざまな病態を呈することになる[43-46]。Notch シグナルは、隣接する細胞膜上のリガンドが Notch 受容体と結合することで活性化する(図 4)。Notch 受容体は膜 1 回貫通型タンパク質で、リガンドと結合すると ADAM ファミリープロテアーゼによる切断を受け、続いて γ -セクレターゼによる切断を受ける。このプロセスにより細胞膜から切り離され、C 末端側の細胞内ドメイン(Notch intracellular domain, NICD)が遊離する。NICD は核内へ移行し標的遺伝子の転写を促進し、Hey1、Hey2、HeyL、Hes1-7 など多数の転写調節因子が誘導され、細胞分化、増殖などの細胞運命が決定される。

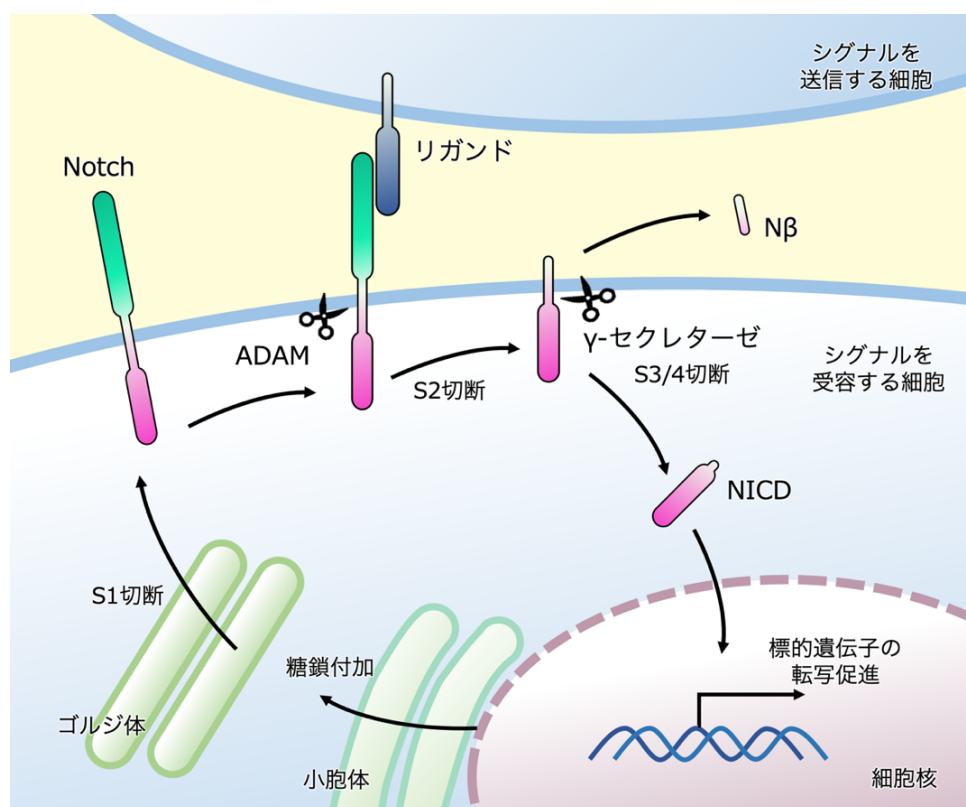


図 4. Notch シグナル経路

Notch シグナルは、隣接する細胞膜上のリガンドが Notch 受容体と結合することで活性化する。Notch 受容体は膜 1 回貫通型タンパク質で、哺乳類では Notch1-4 の 4 種類が存在する。リガンドも膜 1 回貫通型タンパク質で、Delta-like1、3、4、Jagged1、2 の 5 種類が存在する。Notch は翻訳後に小胞体、ゴルジ体で糖鎖付加、S1 切断を受けて成熟型となり、細胞膜へ輸送される。この糖鎖付加が複数あるリガンド選択性に関わってくる。Notch とリガンドが結合すると、リガンドのユビキチン化とエンドサイトーシスにより牽引する力が加わり、折り畳まれていた Notch の S2 切断部位が露出する。Notch は ADAM ファミリープロテアーゼによって S2 切断を受け、細胞内ドメインと膜貫通領域が残る。次に、細胞膜上またはエンドソームで γ -セクレターゼによる S3/S4 切断を受けることで、C 末端側の細胞内ドメイン(Notch intracellular domain, NICD)が遊離する。NICD は核内へ移行し、DNA 結合タンパク質と複合体を形成して標的遺伝子の転写を促進する。Hey1、Hey2、HeyL、Hes1-7 などの転写調節因子が誘導されることで、細胞分化、増殖などの細胞運命が決定される。

ADAM, a disintegrin and metalloproteinase; Hes, hairy/enhancer of split; Hey, hairy/enhancer of split related with YRPW; N β , Notch beta peptide; NICD, Notch intracellular domain.

卵巣の生理機能において、Notch シグナルは胎生期から成体に至るまで重要な役割をもち、卵胞の形成と発育、黄体形成、ステロイドホルモン合成、卵子の成熟、卵巣内血管新生に関わっている[42,47-49]。卵巣の病態と Notch シグナルの関連についても複数の知見が得られている。40 歳未満で無月経になり閉経様の症状を呈する早発卵巣不全患者では Notch2 の遺伝子変異を認めている[50,51]。体外受精における採卵数が 4 個以下の卵巣刺激低反応患者では、卵丘細胞の Notch2 発現量が低いことが報告されている[52]。PCOS と Notch シグナルの関連についても複数の報告がある。しかし、PCOS 患者の体外受精時に採取した顆粒膜細胞、卵胞液、卵子、または PCOS モデル動物を用いて、microRNA、mRNA、タンパク質の発現を解析しているが、Notch シグナルの変化について統一した見解は得られていない[53-61]。さらに、PCOS の病態と関連のある領域としては、アンドロゲンのシグナル経路[62-69]、ステロイドホルモン代謝[70-79]、インスリン抵抗性[80-84]、組織の線維化[85-91]、小胞体ストレス応答[92-102]において、それぞれに Notch シグナルが関与することは知られているものの、実際に PCOS 患者や PCOS モデル動物でどのような関わりがあるかについてはまだ分かっていない。

以上のような知見に基づき、PCOS 卵巣の顆粒膜細胞における小胞体ストレスが Notch シグナルを過剰に活性化させ、適正な細胞間情報伝達が行われなく

なることで、排卵のプロセスである COC expansion に異常をきたすという仮説を立てた。本研究ではこの仮説を検証するために、PCOS 患者および PCOS モデルマウスの顆粒膜細胞で Notch シグナル関連分子の発現量を解析した。次に、培養ヒト黄体化顆粒膜細胞(granulosa-lutein cells, GLCs)を用いて、小胞体ストレスが Notch シグナルに及ぼす影響について検証した。続いて、小胞体ストレスは Notch シグナルを介して排卵に関わる遺伝子群の発現量を変化させることを検証した。さらに、その変化が COC expansion に与える影響を、マウスから採取した COC を用いた実験で検証した。最後に、PCOS モデルマウスにおいて、Notch シグナルと COC expansion の変化について検証した。

実験方法

1. 倫理承認

本研究における全ての実験手順は、東京大学研究倫理審査委員会の承認を得た上で実施した(承認参照番号:3594-11、医-H19-222)。全ての患者に文書による説明を行った後に同意、署名を得た。本研究はヘルシンキ宣言の原則に則って実施し、マウスを使用した実験は東京大学動物の使用および管理に関する委員会によって承認され、関連するガイドラインおよび規制に従って実施した。

2. 患者検体

東京大学医学部附属病院、フェニックス ART クリニック、松本レディースクリニックに通う体外受精患者の採卵時に GLCs を回収した。Notch シグナル関連分子の mRNA 発現量解析のため、PCOS 患者 11 人とコントロール患者 12 人の GLCs を用いた。PCOS 患者はロッテルダム基準に基づいて診断した[4]。コントロール患者の選定基準は、正常な排卵周期をもち、内分泌異常がなく、超音波検査による正常な卵巣形態をもつ者とした。診療録より患者情報を収集した。採卵時の年齢、body mass index (BMI)、月経開始 5 日目までのホルモン基礎値、採卵時の卵巣刺激方法、採卵数を表 1 に示した。

免疫組織化学染色のために、PCOS 患者 4 人とコントロール患者 3 人の卵巣病理組織検体を使用した。卵巣病理組織検体は、子宮頸癌または子宮体癌の診断で手術を受けた、卵巣病変を認めない患者から得た。PCOS 患者は、PCOS に一致する病歴および卵巣組織学的特徴を評価し確認した。コントロール患者はホルモン治療を受けておらず、正常な月経周期、卵巣形態をもつ患者とした。

表 1. GLCs 検体の患者背景

	コントロール	PCOS	<i>p</i> 値
患者数 (人)	12	11	
年齢 (歳)	34.0 (26-40)	31.0 (24-37)	0.1236
BMI (kg/m ²)	21.9 (19.7-25.4)	21.8 (18.1-26.4)	0.8916
LH (mIU/mL)	4.8 (2.1-5.6)	7.9 (5.9-15.4)	0.0002
FSH (mIU/mL)	7.2 (5.3-8.3)	6.5 (4.9-8.4)	0.1057
LH/FSH	0.64 (0.32-0.91)	1.28 (0.87-2.23)	<0.0001
AMH (ng/mL)	2.56 (1.51-6.73)	8.33 (5.44-24.63)	0.0010
採卵数 (個)	11.5 (6-28)	11.0 (5-22)	0.4795
卵巣刺激方法 (人) :			
GnRH agonist long	2	0	
GnRH antagonist	7	4	
PPOS	3	7	

数値は中央値(範囲)を示している。BMI, body mass index; LH, luteinizing hormone; FSH, follicle-stimulating hormone; AMH, anti-Müllerian hormone; GnRH, gonadotropin-releasing hormone; PPOS, progestin-primed ovarian stimulation。

3. PCOS モデルマウス

先行研究に基づき、dehydroepiandrosterone (DHEA)誘発性 PCOS モデルマウスを作成した[29, 103-105]。3 週齢の雌の Balb/c マウス(Japan SLC)を購入し、実験施設に数日間馴化した後、以下のプロトコールで実験を開始した。卵巣での Notch シグナルを解析するために、マウスをコントロール群 7 匹と PCOS 群 7 匹の 2 群に分けた。コントロール群は sesame oil を 20 日間連日皮下注射した。PCOS 群は DHEA (60mg/kg body weight; Sigma-Aldrich)を 20 日間連続皮下注射することでモデルを作成した。PCOS モデルの生殖表現型を確認するために、膣スメアを連日採取し発情周期を観察した。卵巣は 21 日目に採取した。

Notch シグナルが COC expansion に及ぼす影響を解析するため、上記と同様に PCOS モデルマウスを作成した後に、Notch シグナル阻害剤投与および排卵誘発を行った。マウスはコントロール群 4 匹、PCOS 群 4 匹、PCOS+Notch シグナル阻害剤投与群 4 匹の 3 群に分けた。排卵誘発は、10 IU pregnant mare serum gonadotropin (PMSG; Asuka Pharmaceutical)を腹腔内投与し、48 時間後に 10 IU human chorionic gonadotropin (hCG; Mochida Pharmaceutical)を腹腔内投与することで行った。Notch シグナル阻害剤投与群では、25 mg/kg body weight (3,5-difluorophenylacetyl)-L-alanyl-L-2-phenylglycine *t*-butyl ester (DAPT; Peptide Institute, Inc.)を、PMSG 投与時と 24 時間後に腹腔内投与した。コントロール群および

PCOS 群には dimethyl sulfoxide (DMSO)を同様に投与した。ここでの DAPT 投与用量は先行研究を参考に決定した[106,107]。hCG を投与した 14 時間後に卵管を採取した。顕微鏡下に卵管を 27 ゲージ針で切開して COC を採取し、COC の広がる面積を光学顕微鏡下(Olympus IX70 microscope; Olympus)に測定した。

4. マウス COC の単離と培養

3 週齢の雌の C57/BL6j マウス(Japan SLC)に 5 IU PMSG を腹腔内投与し、48 時間後に卵巣を採取し、37°Cに加温した 0.1%ウシ血清アルブミンを含んだ Leibovitz L-15 medium (Thermo Fisher Scientific)に入れた。先行研究と同様の手順で卵巣内の卵胞を単離、培養した[108]。顕微鏡下に卵巣を細切し、27 ゲージ針を用いて卵胞を単離した。排卵直前の大きさの胞状卵胞より COC を単離し、10 IU/mL hCG を含む ORIGIO Sequential Fert medium (Cooper Surgical Fertility Solutions)に入れ、5% CO₂、37°Cの条件で培養した。小胞体ストレスおよび Notch シグナルが COC expansion に及ぼす影響を調べるために、小胞体ストレス誘導剤である 2.5 µg/mL tunicamycin (Wako)と、Notch シグナル阻害剤である 20 µM DAPT を培養液に添加した。15 時間培養した後に、COC の広がる面積を光学顕微鏡下に測定した。

5. ヒト GLCs の単離と培養

先行研究と同様の方法でヒト GLCs の単離と培養を行った[25, 27]。体外受精患者の採卵時に採取した卵胞液を回収し、1,500 rpm、室温で 10 分間遠心した後、沈殿した GLCs を phosphate buffered saline (PBS) に懸濁し再度同条件で遠心した。0.2% ヒアルロニダーゼ (Sigma-Aldrich) を含んだ PBS に懸濁し、37°C、30 分間インキュベートした。これを Ficoll-Paque (GE Healthcare) に重層し、400×g、30 分間遠心して中間層を回収した。PBS で洗浄後に 10% 仔ウシ血清および抗生物質 (100 U/mL ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシン、250 ng/mL アムホテリシン B) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham nutrient mixture F-12 (DMEM/F12) 培地に懸濁し、5% CO₂、37°C の条件で培養した。すべての GLCs は 3-5 日間の前培養でホルモン剤の影響を減弱させた後に実験を行った[109-111]。

6. 培養ヒト GLCs の薬剤投与方法

ヒト GLCs において小胞体ストレスが Notch シグナルに及ぼす影響を調べるために、小胞体ストレス阻害剤として 1 mg/mL tauroursodeoxycholic acid (TUDCA, Tokyo Chemical Industry Co.) を投与した 24 時間後に、小胞体ストレス誘導剤である 2.5 µg/mL tunicamycin、1 µM thapsigargin (Sigma-Aldrich) を投与し、

それぞれ 24 時間、6 時間培養した。投与した薬剤濃度はヒト GLCs を用いた先行研究を参考に決定した[26, 28, 29]。

さらに詳細な小胞体ストレス応答経路を検討するため、ATF4 ノックダウン実験を行った。ON-TARGET plus ATF4 small interfering RNA (siRNA, L-005125; Dharmacon, GE Healthcare)を用いて、メーカーのプロトコールに沿って施行した。Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)を用いて 50 nM siRNA をトランスフェクションし、24 時間培養した。培地を交換した後、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tunicamycin を投与し 24 時間培養した。

小胞体ストレスおよび Notch シグナルが排卵関連分子に及ぼす影響を調べるために、10 IU/mL hCG を含有する培地に、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tunicamycin および Notch シグナル阻害剤である 50 μM DAPT を投与して 6 時間培養した。

7. RNA 抽出、逆転写、リアルタイム定量 PCR (qPCR)

GLCs から RNA 抽出、逆転写、cDNA 合成は SuperPrep II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (TOYOBO)を用いて、メーカーのプロトコールに従って施行した。KOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)を使用して、Light Cycler system (Roche Diagnostics GmBH)により quantitative polymerase chain reaction (qPCR)を行った。qPCR で使用したプライマー配列は表 2 に示す。qPCR 条件は、denaturing、98°C、10 秒、

annealing、60°C、10 秒、extension 68°C、30 秒、40 サイクルとした。全ての qPCR は融解曲線で反応特異性を確認し、増幅曲線から Ct 値を算出、検量線を作成して相対定量を行った。内部標準として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いて標準化した。全ての解析は独立して 4 回以上行った。

表 2. プライマー配列の一覧

遺伝子名	Forward 5' - 3'	Reverse 5' - 3'
Notch2	CAACCGCAATGGAGGCTATG	GCGAAGGCACAATCATCAATGTT
Hey2	GCCCGCCCTTGTCAGTATC	CCAGGGTCGGTAAGGTTTATTG
Hes1	CCCAACGCAGTGTCACCTTC	TACAAAGGCGGCAATCCAATATG
ATF4	GGCTGGCTGTGGATGGGTTG	CTCCTGGACTAGGGGGGCAA
Areg	GTGGTGCTGTCGCTCTTGATA	CCCCAGAAAATGGTTCACGCT
Ereg	GTGATTCCATCATGTATCCCAGG	GCCATTCATGTCAGAGCTACACT
Tnfaip6	TTTCTCTTGCTATGGGAAGACAC	GAGCTTGATTTGCCAGACCG
Has2	CTCTTTTGGAAGTGTATGGTGCC	AGGGTAGGTTAGCCTTTTCACA
COX2	CTGGCGCTCAGCCATACAG	CGCACTTATACTGGTCAAATCCC
GAPDH	TGGACCTGACCTGCCGTCTA	CTGCTTCACCACCTTCTTGA

8. ウェスタンブロット法

GLCs を PhosphoSafe Extraction Reagent (Merck)で溶解し、16,000×g、4°Cで 5 分間遠心した。上清を回収し、タンパク質定量を Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories)を用いて行った。サンプルに 6×Nacalai Sample Buffer Solution for

SDS-PAGE (Nacalai)を加え、97°C、5 分間インキュベートし氷上へ移した。同タンパク質量のサンプルを SDS を含むポリアクリルアミドゲルに供して電気泳動した後に、Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories)を使用して polyvinylidene difluoride membrane に転写した。ブロッッキングを 5%スキムミルク含有 Tris buffered saline with Tween 20 (TBS-T)で 1 時間行った後に、一次抗体を入れて、4°Cで一晩反応させた。一次抗体は、抗 ATF4 (1:1000, RRID: AB_2616025; Cell Signaling Technology)、抗 Notch2 (1:5000, RRID: AB_10693319; Cell Signaling Technology)、抗 β -actin (1:10,000, RRID: AB_476697; Sigma-Aldrich)抗体を用いた。二次抗体は抗 rabbit (RRID: AB_2099233; Cell Signaling Technology)、抗 mouse (RRID: AB_330924; Cell Signaling Technology)抗体を用いて、室温で 1 時間反応させた。発光反応は ECL Plus western blotting detection reagents (GE Healthcare)で行い、ImageQuant LAS 4000 Mini luminescent image analyzer (GE Healthcare)で検出した。 β -actin を内部標準として使用し、バンドの定量分析を ImageJ software (RRID: SCR_003073; National Institutes of Health)を用いて行った[112]。レーンプロファイル法でバンドの濃度をプロットし、曲線下面積を測定することで定量した。全ての解析は独立して 3 回以上行った。

9. 卵巣組織、免疫組織化学染色

ヒトとマウス卵巣は 10%中性緩衝ホルマリンで固定後にパラフィン包埋し、5 μm の切片を作成した。各卵巣中央部位について、Hematoxylin-Eosin 染色を行って形態を観察した。

免疫組織化学染色は、EnVision+ Dual Link System/HRP (DAB) Kit (Dako)を使用した。卵巣切片を脱パラフィン後、Target retrieval solution high pH を用いて、95°C、40 分間インキュベートして抗原賦活化した。ブロッキングした後に一次抗体を 4°C、一晩反応させた。一次抗体は、抗 Notch2 (1:200, RRID: AB_10693319; Cell Signaling Technology)、抗 Hey2 (1:500, AB_2118415; Proteintech Group)、抗 Hes1 (1:400, RRID: AB_1209570; Abcam)抗体を使用した。陰性コントロールとして Isotype-specific IgG を使用した。二次抗体反応後に diaminobenzidine (DAB)、Hematoxylin 染色を行った。標本は Olympus BX50 fluorescence microscope (Olympus)で観察し、定量分析には ImageJ software (RRID: SCR_003073; National Institutes of Health)を用いた[112]。画像をバイナリ化し、測定する範囲として顆粒膜細胞層を指定し、その中で一定の閾値以上を示す領域の割合を、免疫組織化学染色陽性として定量した。

10. 統計学的解析

全ての統計学的解析には JMP Pro 15 software (RRID: SCR_022199; SAS Institute Inc.)を使用した。全てのデータは $\text{mean} \pm \text{SEM}$ として図に示した。二つのサンプル間の比較に Student's t test を用い、複数サンプル間の比較に Tukey-Kramer honest significant difference test を用いた。 p 値 <0.05 を有意差ありと判定した。

実験結果

1. 患者背景

Notch シグナルの変化を調べるために使用した GLCs の患者背景を表 1 に示した。コントロール患者と PCOS 患者を比較すると、年齢、BMI、FSH 値、採卵数に有意な差は認めず、LH 値、LH/FSH 比、AMH 値は PCOS 患者で有意に高値を示した。卵巣刺激方法は、コントロール群では long 法、antagonist 法が多く、PCOS 群では PPOS 法が多かった。

2. Notch シグナルは PCOS 患者の顆粒膜細胞で活性化している

PCOS 患者およびコントロール患者の顆粒膜細胞における、Notch シグナルの活性化状態を解析した。Notch2 とそのシグナルの下流で転写誘導される Hey2、Hes1 の GLCs での mRNA 発現量を qPCR で定量すると、PCOS 患者ではコントロール患者に比べて有意に増加していた(図 5A)。さらに、ヒト卵巣組織の胞状卵胞の顆粒膜細胞層を免疫組織化学染色で解析すると、PCOS 患者ではコントロール患者と比較して、Notch2、Hey2、Hes1 の発現量が有意に増加していた(図 5B-J)。PCOS 患者の顆粒膜細胞では Notch シグナルが異常亢進している可能性があることから、次に PCOS モデルマウスを用いて解析を行った。

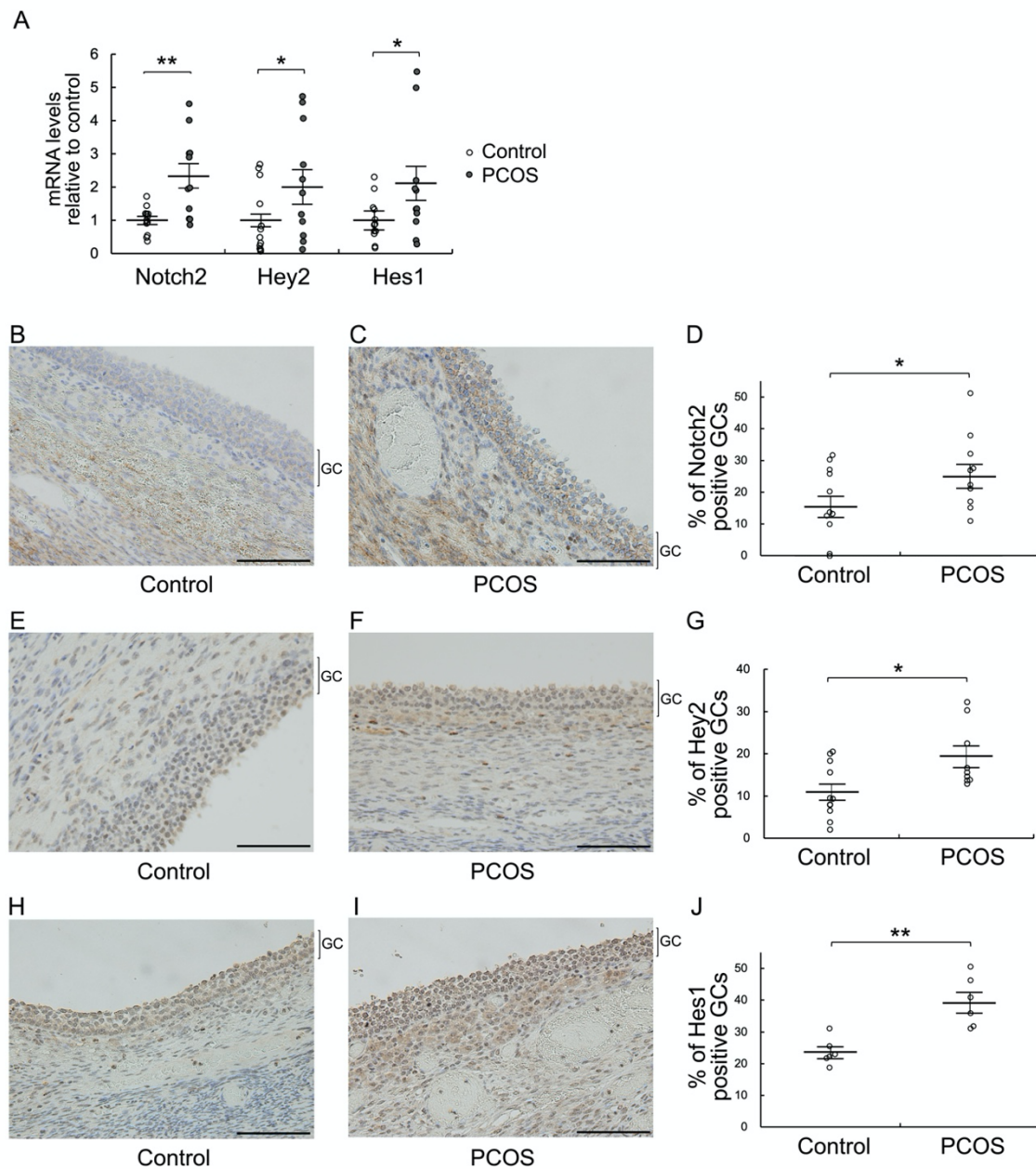


図 5. Notch2、Hey2、Hes1 は PCOS 患者の顆粒膜細胞で増加している

(A) 体外受精の採卵時に回収したコントロール患者(n=12)と PCOS 患者(n=11)の GLCs における、Notch2、Hey2、Hes1 の mRNA 発現量を qPCR で定量した。内部標準として GAPDH を用いて標準化した。(B-J) コントロール患者(n=3)と PCOS 患者(n=4)の卵巣手術検体を免疫組織化学染色で解析した。(B, C) 抗 Notch2 抗体、(E, F) 抗 Hey2 抗体、(H, I) 抗 Hes1 抗体で染色した代表的切片を示す。(D, G, J) 免疫組織化学染色において各卵胞毎の陽性となった顆粒膜細胞の定量的分析を示す。スケールバーは 100 μ m を示す。値は平均値 \pm SEM を示す。有意差は、* p <0.05、** p <0.01 を示す。GC, granulosa cell 顆粒膜細胞。

3. Notch シグナルは PCOS モデルマウスの顆粒膜細胞で活性化している

PCOS モデルマウスの胞状卵胞の顆粒膜細胞における Notch シグナルの活性化状態を調べるため、卵巣組織切片を免疫組織化学染色で解析した。PCOS 群ではコントロール群に比較して、顆粒膜細胞層における Notch2、Hey2、Hes1 の発現量が有意に増加していた(図 6)。PCOS モデルマウスは多くの先行研究で行われている方法で作成し、発情周期が停止することや多嚢胞状の卵巣形態よりモデルが適切に作成されていることを確認した。

PCOS モデルマウスにおいても、PCOS 患者と一致して Notch2、Hey2、Hes1 の発現量が有意に増加する結果となった。次に、小胞体ストレスが Notch シグナルに及ぼす影響を調べるため、ヒト培養 GLCs を用いた実験を進めた。

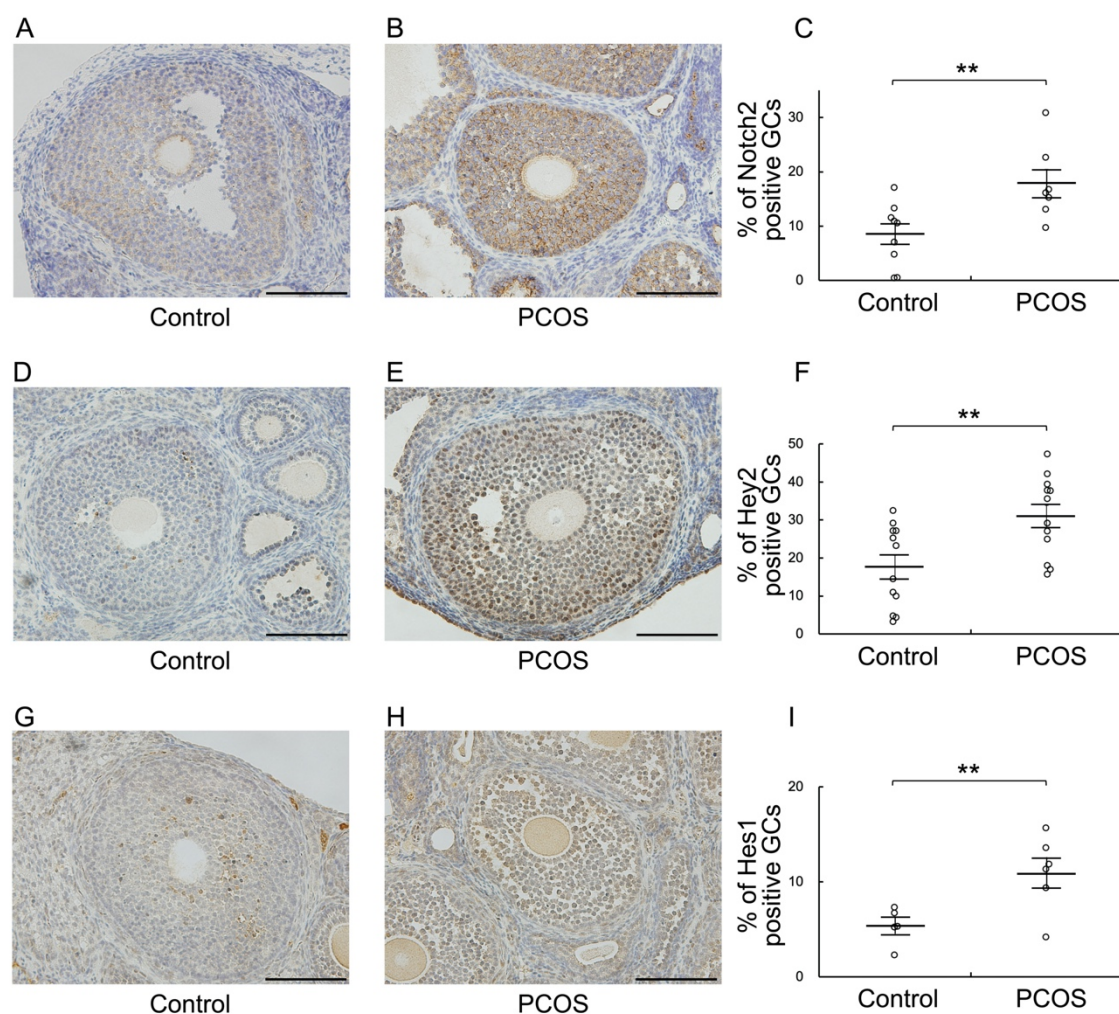


図 6. Notch2、Hey2、Hes1 は PCOS モデルマウスの顆粒膜細胞で増加している
DHEA 皮下注射により PCOS モデルマウスを作成し、卵巣組織に免疫組織化学染色を行い、コントロール群(n=7)と PCOS 群(n=7)を比較した。(A, B) 抗 Notch2 抗体、(D, E) 抗 Hey2 抗体、(G, H) 抗 Hes1 抗体で染色した代表的断面を示す。(C, F, I) 免疫組織化学染色において各卵胞毎の陽性となった顆粒膜細胞の定量的分析を示す。スケールバーは 100 μm を示す。値は平均値±SEM を示す。有意差は、** $p<0.01$ を示す。

4. 小胞体ストレスは Notch シグナルを誘導する

PCOS の顆粒膜細胞では小胞体ストレスが亢進した状態であることは既に知られている[8, 9, 29]。小胞体ストレスと Notch シグナルの関係を調べるため、培養ヒト GLCs を用いて、Notch2、Hey2 の mRNA 発現量を qPCR で定量した。最初に、小胞体ストレス誘導剤である tunicamycin と thapsigargin はともに小胞体ストレス応答を誘導し、その反応は小胞体ストレス阻害剤である TUDCA によって阻害されることを確認した(図 7E, F)。ここでは小胞体ストレス応答で活性化する分子として ATF4 を提示しているが、他に CHOP や XBP1s も同様の変化を示した。培養ヒト GLCs に tunicamycin または thapsigargin を投与すると、Notch2、Hey2 の mRNA の発現量が有意に増加し、これらの変化は TUDCA の投与で有意に抑制された(図 7A-D)。培養ヒト GLCs において、小胞体ストレスは Notch シグナルを活性化させることが示唆されたため、UPR のどの経路が関与するかについて次に詳細な検討を行った。

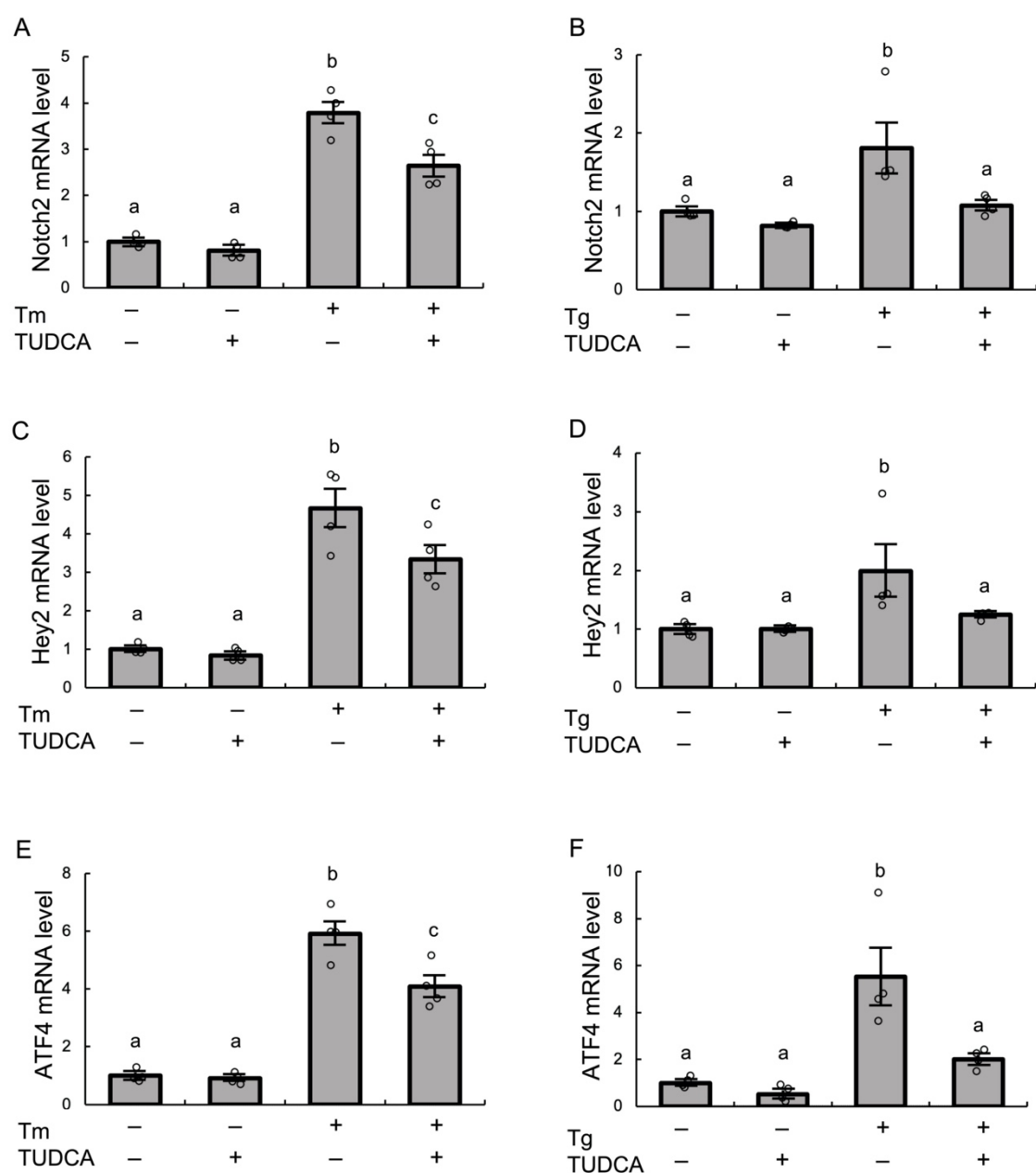


図7. 培養ヒト GLCs において、小胞体ストレスは Notch2、Hey2 を増加させる
 培養ヒト GLCs を用いて、1 mg/mL TUDCA を投与した 24 時間後に、(A, C, E)
 2.5 μ g/mL tunicamycin または(B, D, F) 1 μ M thapsigargin を投与して 24 時間培養
 し、mRNA 発現量を qPCR で定量した。(A, B) Notch2、(C, D) Hey2、(E, F) ATF4
 の mRNA 発現量を、GAPDH を内部標準として標準化して示す。値は平均値 \pm
 SEM を示す。異なるアルファベットがそれぞれ有意差を示し、有意水準は $p < 0.05$
 である。Tm, tunicamycin; Tg, thapsigargin、TUDCA, tauroursodeoxycholic acid。

5. 小胞体ストレスの一部は ATF4 を介して Notch シグナルを誘導する

小胞体ストレスによって誘導される UPR は、ストレスセンサータンパク質である PERK、IRE1、ATF6 の活性化と、その下流に続く ATF4、CHOP、XBP1 など多くの分子の反応によって構成される(図 2)。UPR と Notch シグナルの関係性はこれまでに卵巣以外の研究では多数報告されている[92-102]。培養ヒト GLCs において、どの UPR の経路が Notch シグナルの活性化に関与しているか調べるために、ATF4 の siRNA を用いたノックダウン実験を行った。前項の実験同様に tunicamycin を投与すると Notch2、Hey2 の mRNA 発現量は有意に上昇し、これらの変化は ATF4 をノックダウンすることで有意に抑制された(図 8A, B)。ATF4 の siRNA によるノックダウンが適切に行われているかどうかは、mRNA およびタンパク質レベルで確認した(図 8C-E)。小胞体ストレスによる Notch シグナルの活性化の一部には、UPR の中でも ATF4 を介した経路に関与していることが示唆され、このことが卵巣機能障害にどのように関与するかについて、排卵に注目して次に検討した。

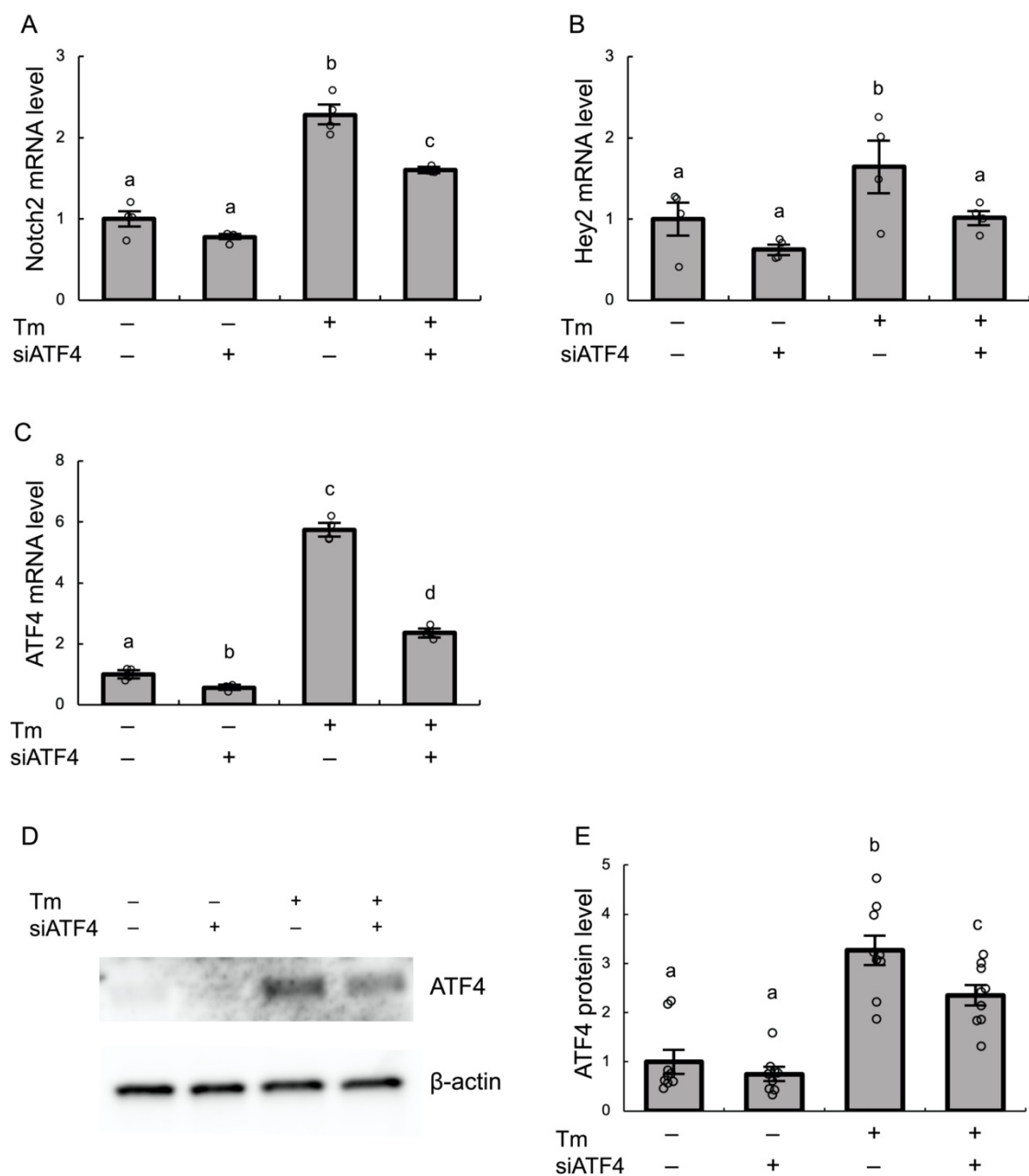


図 8. 培養ヒト GLCs において、小胞体ストレスは ATF4 を介して Notch シグナルを誘導する

培養ヒト GLCs を用いて、ATF4 の siRNA をトランスフェクションして 24 時間培養した後、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tunicamycin を投与して 24 時間培養後、mRNA 発現量を qPCR で定量した。(A) Notch2、(B) Hey2、(C) ATF4 の mRNA 発現量を、GAPDH を内部標準として標準化して示した。(D) ATF4 のタンパク質発現量をウェスタンブロット法で検出した。(E) ATF4 のウェスタンブロット結果を β -actin を内部標準として標準化した定量結果を示す。値は平均値 \pm SEM を示す。異なるアルファベットがそれぞれ有意差を示し、有意水準は $p < 0.05$ である。

6. 小胞体ストレスは Notch シグナルを介して排卵関連分子を誘導する

小胞体ストレスが Notch シグナルを活性化して排卵に影響を及ぼすかどうか検討するために、培養ヒト GLCs における排卵に関連した遺伝子群の mRNA 変化を解析した。排卵の過程は下垂体から分泌される LH サージをトリガーとして引き起こされる一連のカスケードで、多くの関連分子の協調的变化により構成される[41]。ここでは排卵に関わる代表的な分子である Areg、Ereg、Tnfaip6、Has2、COX2 の mRNA 発現量を qPCR によって定量した。hCG を含む培養液でヒト GLCs を培養し、tunicamycin を投与することで排卵関連遺伝子群の発現量はコントロールに比較して有意に増加した。同時に Notch シグナル阻害剤である DAPT を投与することでそれらの変化は有意に抑制された(図 9A-E)。Notch の活性型である NICD と、Notch シグナルで転写誘導される Hey2 も同様の変化を示したことで(図 9F-H)、小胞体ストレスによって Notch シグナルが活性化し、その反応は Notch シグナル阻害剤で抑制されることを確認した。小胞体ストレスによって Notch シグナルが活性化し、一連の排卵関連分子が誘導された。続いて、排卵の現象として COC expansion との関わりについて検討する実験を行った。

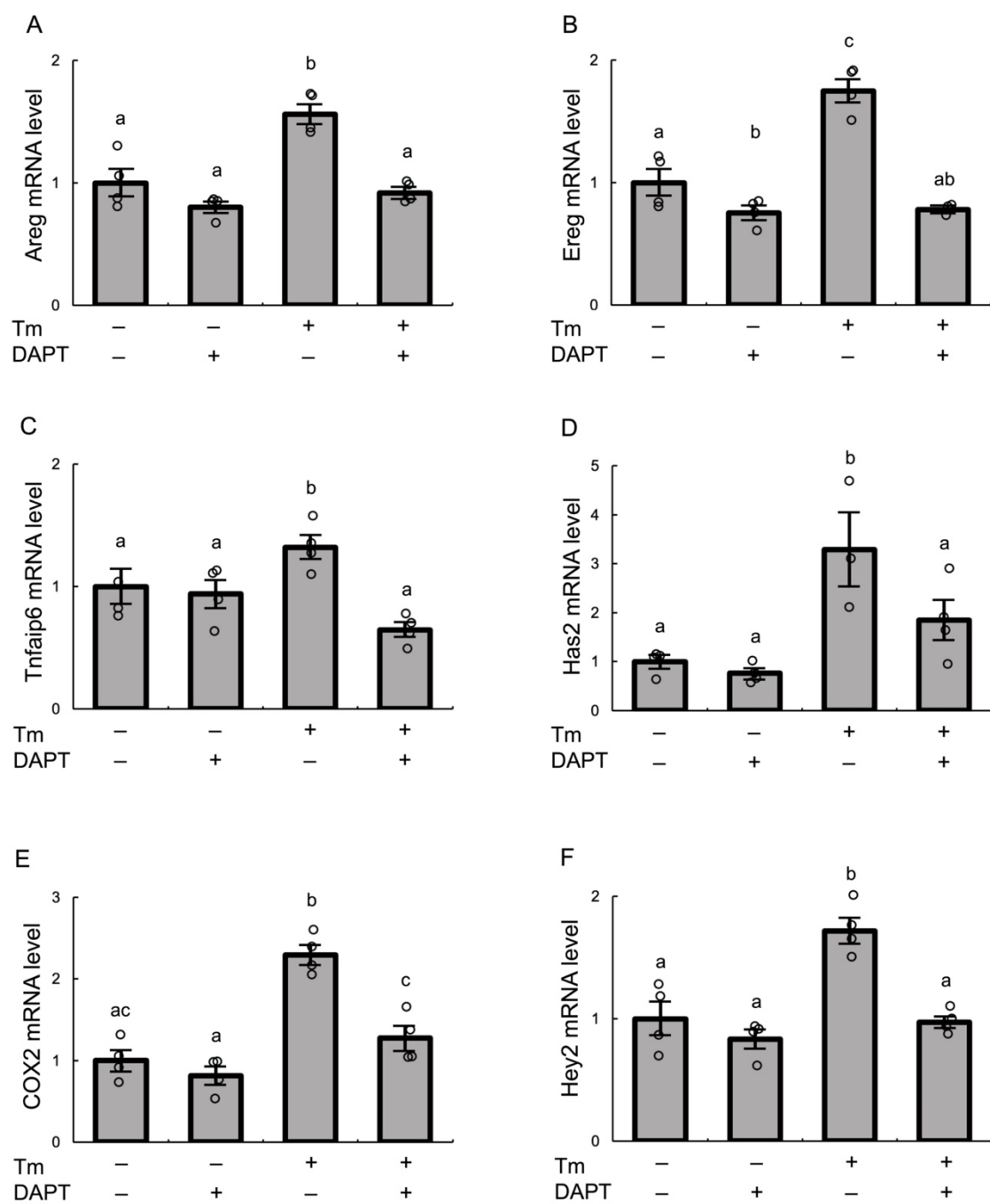


図 9. 培養ヒト GLCs において、小胞体ストレスは Notch シグナルを活性化し、
排卵関連分子群の mRNA を誘導する
(次ページに続く)

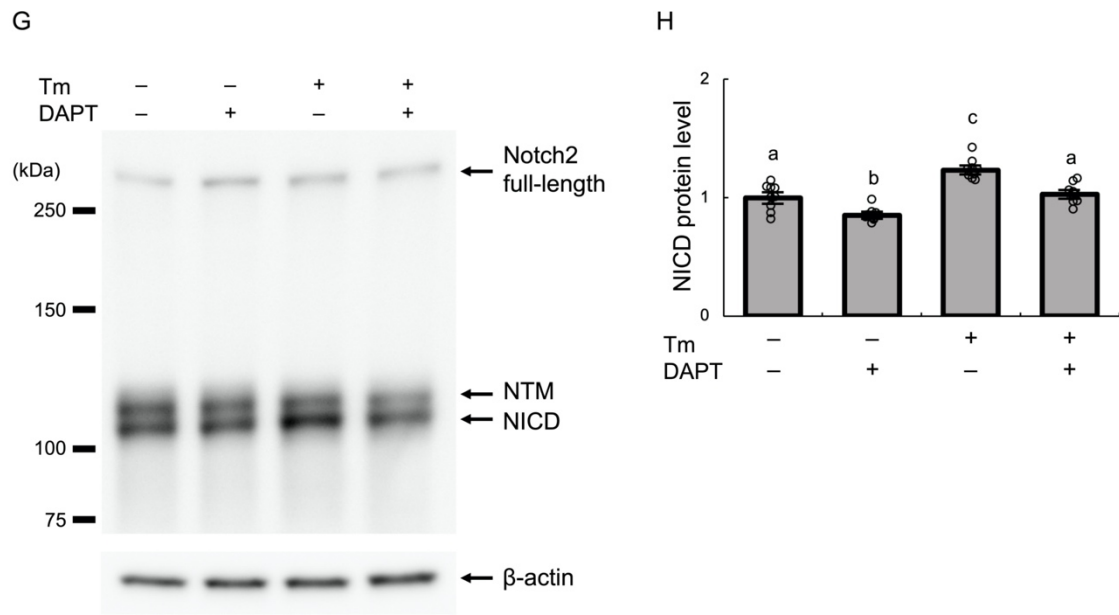


図 9. 培養ヒト GLCs において、小胞体ストレスは Notch シグナルを活性化し、排卵関連分子群の mRNA を誘導する

培養ヒト GLC を 10 IU/mL hCG 存在下で、2.5 µg/mL tunicamycin および 50 µM DAPT を投与して培養後に、mRNA 発現量を qPCR で定量した。(A) Areg、(B) Ereg、(C) Tnfaip6、(D) Has2、(E) COX2、(F) Hey2 の mRNA 発現量を、GAPDH を内部標準として標準化して示した。(G) Notch2 の活性型である切断型 Notch2 (Notch intracellular domain, NICD) のタンパク質発現量をウェスタンブロット法で検出した。(H) NICD のウェスタンブロット結果を β-actin を内部標準として標準化した定量結果を示す。値は平均値±SEM を示す。異なるアルファベットがそれぞれ有意差を示し、有意水準は $p < 0.05$ である。Tm, tunicamycin; NTM, Notch transmembrane domain; NICD, Notch intracellular domain。

7. 小胞体ストレスは Notch シグナルを介して COC expansion を促進する

排卵では卵子を取り囲む卵丘細胞が分散して広がる現象が起こり、これを COC expansion と呼んでいる。小胞体ストレスが Notch シグナルを活性化させて COC expansion に影響を及ぼすかどうか検討するために、マウス胞状卵胞から単離培養した COC を用いて解析を行った。COC expansion の定量的評価は、卵子周囲の卵丘細胞が広がる面積を顕微鏡下に測定することで行った。hCG を含む培養液でマウス COC を培養し、tunicamycin を投与すると COC の広がる面積はコントロールに比較して有意に増加した。同時に DAPT を投与するとその変化は有意に抑制された(図 10)。前項の排卵に関連する遺伝子群の mRNA 変化と矛盾しない結果となり、小胞体ストレスが Notch シグナルを活性化させ、COC expansion を促進した可能性がある。次に PCOS 卵巢でも同様のことが起こっているか検証するために、PCOS モデルマウスを作成して実験を行った。

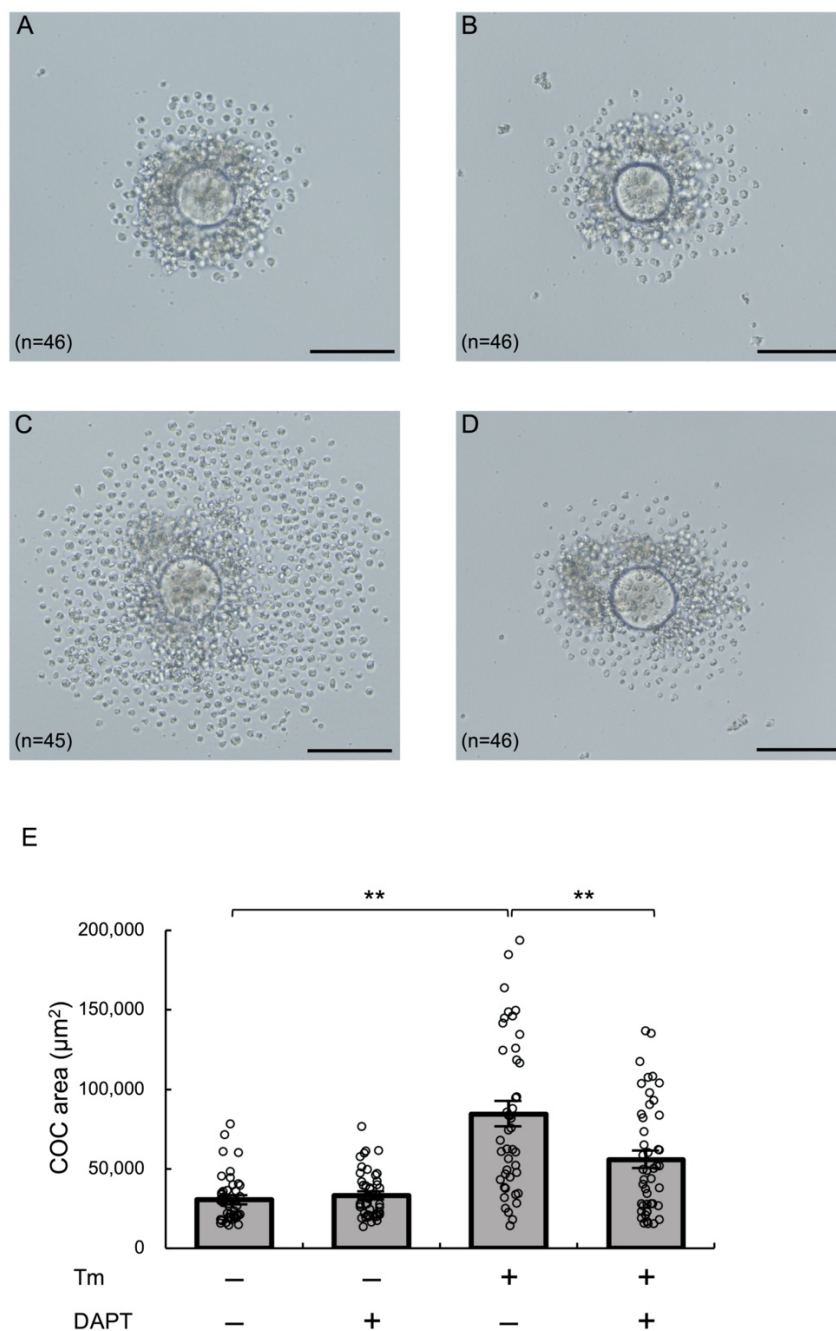


図 10. 培養マウス COC において、小胞体ストレスは Notch シグナルを活性化させ、COC expansion を促進する

マウス卵巣内の胞状卵胞より COC を採取し、10 IU/mL hCG を含有する培養液に入れ、2.5 μg/mL tunicamycin および 20 μM DAPT を投与し、15 時間培養後に COC の広がる面積を測定した。(A) コントロール、(B) DAPT、(C) tunicamycin、(D) tunicamycin + DAPT 投与群の代表的な COC を示す。(E) 各 COC の面積を定量した結果を示す。スケールバーは 100 μm を示す。値は平均値 ± SEM を示す。有意差は、** $p < 0.01$ を示す。Tm, tunicamycin。

8. PCOS モデルマウスでは、Notch シグナルが COC expansion を促進する

PCOS の顆粒膜細胞は小胞体ストレスが亢進した状態にあることから[8, 9, 29]、PCOS モデルマウスにおいても、小胞体ストレスによって活性化した Notch シグナルが COC expansion に影響を及ぼすかどうか検討した。マウスを、コントロール群、PCOS 群、PCOS+DAPT 投与群の 3 群に分けた。それぞれのマウスに PMSG、hCG を投与することで排卵誘発を行い、卵管内より COC を採取して各 COC の広がる面積を測定した。PCOS モデルマウス群の COC 面積はコントロール群より有意に増加していた(図 11)。PCOS モデルマウスに DAPT を投与すると、COC 面積の増加は有意に抑制された。PCOS モデルマウス卵巣では COC expansion が促進し、それは Notch シグナルを阻害することによって抑制されることが示された。

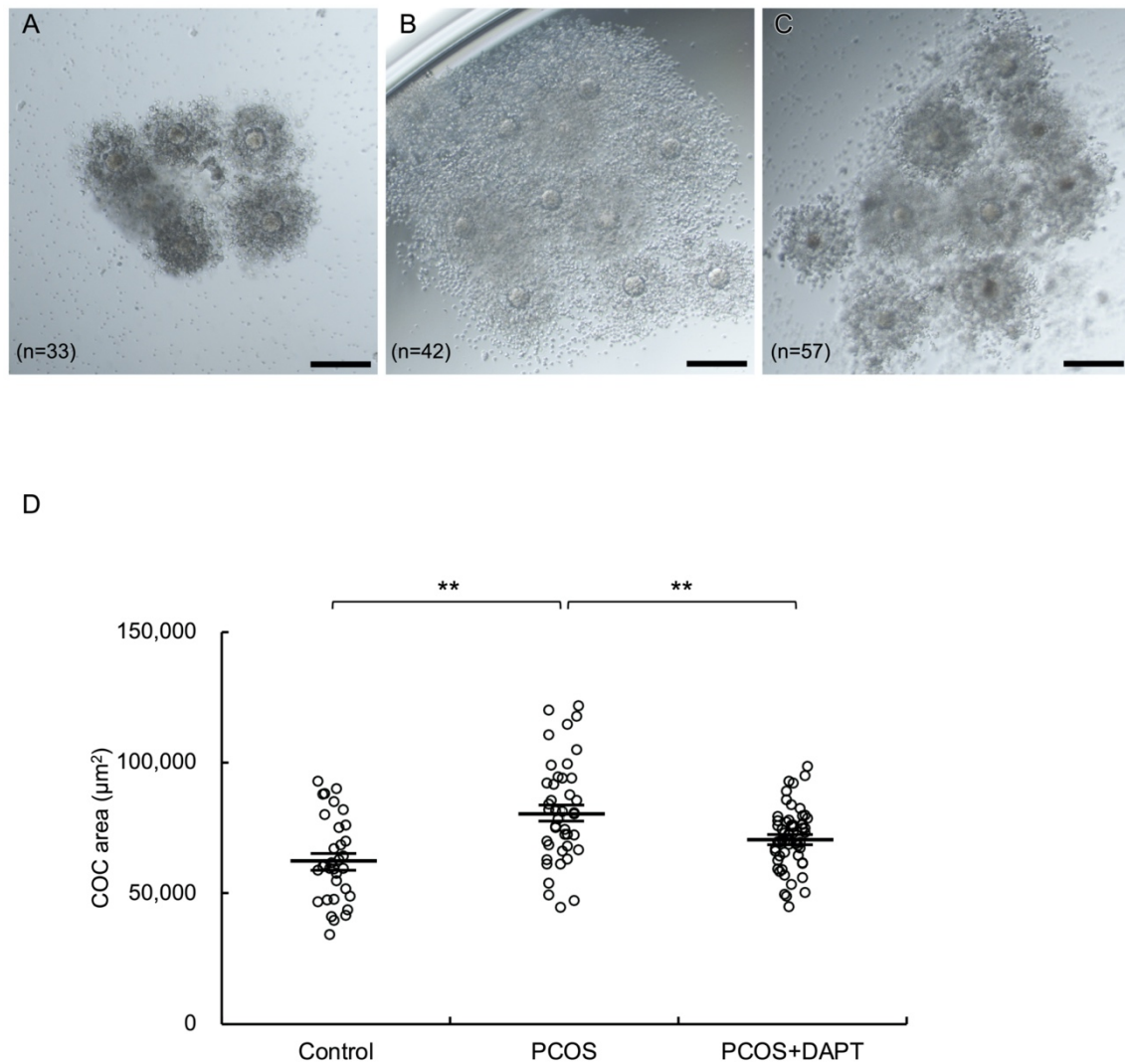


図 11. PCOS モデルマウスでは、Notch シグナルが COC expansion を促進する
DHEA 皮下注射により PCOS モデルマウスを作成後、10 IU PMSG を腹腔内投与し、48 時間後に 10 IU hCG を腹腔内投与して排卵誘発を行った。25 mg/kg DAPT を PMSG 投与後に 2 回腹腔内投与した。hCG 投与 14 時間後に卵管を回収、切開して COC を採取し、その広がる面積を測定した。(A)コントロール群(4 匹、COC 33 個)、(B)PCOS 群(4 匹、COC 42 個)、(C)PCOS+DAPT 投与群(4 匹、COC 57 個)の代表的な COC を示す。(D) 各 COC の面積を定量した結果を示す。スケールバーは 200 μm を示す。値は平均値±SEM を示す。有意差は、** $p<0.01$ を示す。

考察

本研究の結果では、PCOS 患者および PCOS モデルマウス胞状卵胞の顆粒膜細胞で、Notch シグナルを構成する分子である Notch2、Hey2、Hes1 の発現量が増加していた。培養ヒト GLCs を用いた実験で、小胞体ストレスは Notch2 と Hey2 の発現量を上昇させ、その機序の一部には小胞体ストレス応答の中でも ATF4 を介した経路が関与していた。続いて培養ヒト GLCs を用いた実験で、小胞体ストレスは排卵に関わる遺伝子群の発現量を上昇させ、Notch シグナル阻害剤によりその変化は抑制された。培養マウス COC を用いた実験では、小胞体ストレスは排卵に必須の反応である COC expansion を亢進させ、Notch シグナル阻害剤によりその変化は抑制された。PCOS モデルマウスに排卵誘発を行い、COC を回収して観察すると、COC expansion が亢進しており、PCOS モデルマウスに Notch シグナル阻害剤を投与するとその変化は抑制された。

Notch シグナルの変化を解析した GLCs の患者背景(表 1)では、コントロール患者と PCOS 患者を比較すると、年齢、BMI、FSH 値、採卵数に有意な差は認めなかった。LH 値、LH/FSH 比、AMH 値は PCOS 患者で有意に高値を示したが、これは PCOS の病態から予想された通りの結果であった。卵巢刺激方法の差異は、PCOS 患者で卵巢過剰刺激症候群を予防し最適な採卵を行うために想定

された通りであり、コントロール群では long 法、antagonist 法が多く、PCOS 群では PPOS 法が多く行われていた。

Notch 受容体は哺乳類では Notch1-4 の 4 種類が同定されており、Notch シグナルの下流にある標的遺伝子は Hey1-2、HeyL、Hes1-7 など多数の存在が知られている。その中でも Notch2、Hey2、Hes1 がヒト卵巣の胞状卵胞の顆粒膜細胞における発現量が特に多いと報告されている[31, 113]。本研究では同分子に着目して解析したところ、コントロールに比べて PCOS の顆粒膜細胞で発現量が増加していた(図 5、6)。この結果より、PCOS 卵巣の顆粒膜細胞において、Notch シグナルが亢進していることが示唆される。しかし、PCOS と Notch シグナルの関連については複数の報告があり、PCOS 患者の体外受精時に採取した顆粒膜細胞、卵胞液、卵子、または PCOS モデル動物を用いて解析されているが、Notch シグナルの変化について一致した見解は得られていない[53-61]。PCOS 患者の顆粒膜細胞では、Notch1、Notch2、 γ -セクレターゼの mRNA 発現量が増加しているという報告がある[57, 59, 60]。その一方で、Notch2、Notch3、Hes1 の mRNA 発現量が減少しているという報告もある[53, 56, 61]。それらの先行研究の解析方法が、Notch シグナル関連遺伝子のトランスクリプトーム解析しか行われず、タンパク質発現量を確認していない研究が混在していることが、結論が一致しない原因の一つと考えられる。また、すべての先行研

究で用いられている体外受精患者の検体は、治療に伴う多量のホルモン剤による修飾を受けており、使用薬剤の種類や投与期間が一定ではないことも結果のばらつきを生じさせている一因であると考えられる。本研究では、体外受精時に採取した PCOS 患者の GLCs で、Notch2 とその標的遺伝子である Hey2、Hes1 の mRNA 発現量は増加していた(図 5A)。さらに、ホルモン剤を投与していない PCOS 患者および PCOS モデルマウスの卵巣を免疫組織化学染色することで、顆粒膜細胞における Notch2、Hey2、Hes1 のタンパク質発現量が増加していることを確認した(図 5B-J、図 6)。本研究の結果からは、PCOS の卵巣の顆粒膜細胞では Notch シグナルが活性化していることが示唆される。

小胞体ストレス誘導剤である tunicamycin または thapsigargin を培養ヒト GLCs に投与すると、Notch2、Hey2 の mRNA 発現量が上昇した。さらに、この変化は小胞体ストレス阻害剤である TUDCA の処理によって抑制された(図 7)。他の Notch シグナル関連分子についても検討(データ未提示)したが、Notch1、Notch4、Dll4、Hey1、HeyL は、顆粒膜細胞での発現量が少ないためか qPCR では殆ど検出できなかった。Notch3、Jag1 は、Notch2 に類似した発現量の変化を示したが、結果にばらつきが多かった。その原因は、元来の発現量の少なさによるものか、または小胞体ストレス以外の経路に影響を受けている可能性が考えられた。そのため、Notch シグナルとして安定して検出が可能な Notch2、

Hey2 について、以降の実験で解析を進めることにした。小胞体ストレス誘導剤の tunicamycin は小胞体でのタンパク質の糖鎖修飾を阻害し、thapsigargin は小胞体へのカルシウムイオン輸送を阻害することで小胞体ストレスを引き起こす[114]。TUDCA は異常タンパク質を安定化するケミカルシャペロンとして作用することで小胞体ストレスを改善する[115]。本研究では、作用機序の異なる 2 種類の小胞体ストレス誘導剤を用いた実験で同様の結果が得られた。PCOS の顆粒膜細胞が小胞体ストレスの亢進した状態にあることは既に知られており [8, 9, 29]、PCOS 患者の GLCs や卵巣組織では小胞体ストレスの各種マーカーが上昇している。培養ヒト GLCs にテストステロンを投与すると多くの小胞体ストレスマーカーが上昇し、アンドロゲン受容体阻害剤であるフルタミドを投与するとその変化は抑制される[27, 116, 117]。このことより、テストステロンによって誘導される小胞体ストレスは、アンドロゲン受容体を介して作用していることが示唆されるが、更に詳細な機序は検討されていない。培養マウス顆粒膜細胞にテストステロンを投与して上昇した小胞体ストレスが、p38 阻害剤および p38 ノックダウンにより抑制されたことから、p38 MAPK の関与を示唆する研究もある[118]。また、他領域の研究になるが、前立腺癌では小胞体ストレスは亢進した状態にある。そこではアンドロゲンと結合したアンドロゲン受容体は IRE1 と XBP1 のエンハンサー領域に結合して転写を促進している[119]。

他に、ATF6 とよく似た構造をもち、同様のプロセッシングを受けて転写因子として働く OASIS ファミリーという膜タンパク質の中に、アンドロゲンで誘導される AibZIP というものがある。AibZIP の N 末端領域は、小胞体ストレス応答に関与する unfolded protein response element (UPRE) という配列に結合し転写を制御している可能性が報告されている[120-122]。卵巣局所の高アンドロゲン状態が顆粒膜細胞の小胞体ストレスを亢進させているという PCOS の病態モデルとして、本研究では培養ヒト GLCs に小胞体ストレス誘導剤を投与した実験で、小胞体ストレスは Notch シグナルを活性化させることが分かった。これまでに、膵 β 細胞、腎細胞、膠芽腫細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞など多岐にわたる細胞で、小胞体ストレスが Notch シグナルを活性化させることが知られており[92-102]、多くの組織で小胞体ストレスと Notch シグナルの関係は重要な役割を担っていると考えられる。卵巣の顆粒膜細胞においては本研究が初めてその関係を見出すことができ、PCOS の病態のひとつとしての可能性を考え実験を進めた。

小胞体ストレスによって誘導される UPR は、ストレスセンサータンパク質である PERK、IRE1、ATF6 の活性化と、その下流に続く ATF4、CHOP、XBP1 などの多くの分子の反応によって構成される(図 2)。本研究では、培養ヒト GLCs において siRNA を用いて ATF4 をノックダウンすると、小胞体ストレ

スによって誘導された Notch シグナルが抑制された。この結果より、UPR の中でも ATF4 を介した経路が、Notch シグナル活性化の一部に寄与していることが示唆される。小胞体ストレスが Notch シグナルを活性化させる機序については様々な研究がされており[92-102]、本研究結果も踏まえると、 γ -セクレターゼ活性化と、Notch 関連分子の転写誘導促進や分解抑制が考えられる。ATF4 によって γ -セクレターゼ活性増加や、 γ -セクレターゼを構成する presenilin-1 の発現が上昇し、Notch の切断による活性化が促進されることを示している研究がある[93, 98]。小胞体ストレスにより Notch2 と Hey2 の mRNA 発現量が増加しており(図 7、8)、Notch2、Jag1、Hes1 のプロモーター領域には XBP1 や CHOP が結合する可能性のある領域を認めることから、Notch 関連分子の転写誘導促進によっても Notch シグナルは活性化していると考えられる。

ATF4 は様々な細胞ストレスや炎症反応を集約する役割も知られている。小胞体ストレスを含めて細胞にかかる多くのストレスは、各々刺激に対応したリン酸化酵素を活性化し、eIF2 α のリン酸化とそれに続いて ATF4 が誘導される統合的ストレス応答(integrated stress response, ISR)を引き起こす[123, 124]。この応答により細胞はストレスの軽減を図るが、ストレスが過剰な場合には細胞死が誘導される。また、GLCs、心筋細胞、網膜細胞、気管支細胞、血管内皮細胞において、ATF4 を介した炎症反応との関連が報告されている[125-129]。他に

も、小胞体ストレスは、IRE1 や PERK の活性化に続いて NF- κ B や炎症関連のシグナルを活性化させることが知られている[130, 131]。一方で、Notch シグナルは、非アルコール性脂肪肝炎、変形性関節炎、敗血症など炎症背景を病態にもつ疾患との関係が報告されている[132-136]。また、PCOS の卵巣微小環境は慢性炎症様の環境になっており、アンドロゲン刺激によって顆粒膜細胞の炎症反応が惹起される[116, 117, 137, 138]。これらの知見を合わせて考えると、小胞体ストレス、炎症反応、Notch シグナルの 3 者は、PCOS の卵巣内で病態を増悪させる悪循環を作っている可能性がある。

小胞体ストレス誘導剤である tunicamycin を培養ヒト GLCs に投与すると、排卵関連分子である Areg、Ereg、Tnfaip6、Has2、COX2 の mRNA 発現量が上昇し、これらの変化は Notch シグナル阻害剤である DAPT 処理によって抑制された。マウス胞状卵胞から単離培養した COC を用いた実験では、tunicamycin 投与により COC expansion が亢進し、DAPT 投与によりその変化は抑制された。卵巣から卵子が放出される排卵の一連のプロセスは、下垂体から分泌される LH が顆粒膜細胞の LH 受容体に結合することで開始する。顆粒膜細胞において EGF ドメインをもつ Areg、Ereg、BTC が誘導され、周囲の顆粒膜細胞や卵丘細胞の EGF 受容体に作用し、ヒアルロン酸など細胞外マトリックス産生に関わる分子である Has2、Tnfaip6、Ptx3、IaI の誘導を促進する。同時に COX2

も誘導され、プロスタグランジン E2 を産生することで、排卵に関わる一連の反応を増幅させる。続いて水分の貯留と細胞同士の接着が疎になって、COC expansion と呼ばれる COC 周囲の浮腫状変化が起こり、卵胞壁から COC の剥離、卵子の減数分裂再開と、さらに排卵過程が進行していくことになる[38-41]。本研究では小胞体ストレスによって排卵関連分子群の発現上昇と、COC expansion の亢進が認められ、Notch 阻害剤によってその変化は抑制された。小胞体ストレスが Notch シグナルを介して COC expansion を亢進させたと考えることができる。排卵に必須の現象である COC expansion と小胞体ストレスの関係について分かっていることは少なく、現在 4 報の研究が報告されているのみである。小胞体ストレス誘導剤の thapsigargin を培養マウス COC に投与すると排卵関連の遺伝子群が誘導され、COC expansion は亢進する[118]。ラット卵巢で ATF4 をノックダウンすると COC expansion は障害される[129]。この 2 報は、本研究で小胞体ストレスによって COC expansion が亢進していたという結果と合致した内容である。しかし、thapsigargin を培養マウス COC に投与すると Ptx3 発現量が減少し、COC expansion が抑制されるという報告[139]や、tunicamycin を培養ブタ COC に投与すると COC expansion が抑制されるという報告[140]もある。小胞体ストレスと COC expansion の関係について相反する結論が混在している状況であり、実験に用いた COC のプレコンディショニング

や培養条件の差異が結果に大きく影響すると考えられるため、引き続き実験を繰り返し検証することが求められる。さらに詳細な機序に踏み込んだ研究や、本研究のように Notch シグナルとの関連を調べた研究は現在までに存在しない。Notch シグナルは細胞同士が直接接触することで情報が伝わり、細胞分化や増殖という細胞運命を決定する役割を担っていることを考慮すると、卵胞構造が大きく変化する排卵とそれに続く黄体化の過程において、顆粒膜細胞の機能が Notch シグナルで調節されている可能性は充分にあると推測される。

以上までの *in vitro* の実験において、小胞体ストレスが Notch シグナルを活性化させ、排卵関連遺伝子群を誘導し、COC expansion を亢進させることが示唆された。次に、PCOS の病態では生体内で COC expansion がどのように変化しているか、PCOS モデルマウスを作成して検討した。マウスに排卵誘発を行い、卵管内より採取した COC を比較すると、PCOS モデルマウスではコントロールマウスに比べて COC expansion が亢進していた。PCOS モデルマウスに Notch シグナル阻害剤である DAPT を投与すると、この変化は抑制された。PCOS モデルマウスでも *in vitro* の実験と矛盾しない結果となった。PCOS の顆粒膜細胞で亢進している小胞体ストレスが、Notch シグナルを活性化し、COC expansion を亢進させたと考えることができる。

本研究では幾つかの限界、制限があるため考察を加える。最初に、PCOS 患者において COC expansion が亢進しているかどうかを、本研究では実際に観察することができていない。体外受精患者の採卵時には COC を確認しているが、その取り扱いをどれだけ素早く行うかが治療予後に影響するため、臨床現場では患者の COC 面積を研究目的に測定することは非常に困難である。体外受精の採卵時に PCOS 患者の COC 面積を測定した唯一の報告によると、PCOS 患者ではコントロール患者に比べて COC 面積は小さく、GLCs における排卵関連分子の mRNA 発現量は低下していると述べている[141]。本研究の結果とは相反する内容であるが、ここにも臨床上の制約があるため簡単には結論を出すことができない。PCOS では採卵に向けた排卵誘発で卵巣過剰刺激症候群を発症するリスクが高いため、使用する薬剤の投与量を減量したり種類を変更する場合があり、このような治療条件の違いが COC expansion に影響すると考えられる。GLCs の遺伝子発現については、排卵刺激のために hCG を投与した約 34 時間後に採卵を行うため、その時点での発現量を解析することになる。排卵関連分子は排卵刺激後の動態が各々異なっており、一過性に強く誘導された後に速やかに減少するものや、遅れて上昇してくるものなど様々なものがある。本研究の培養ヒト GLCs での予備実験では、Areg の mRNA 発現量は hCG 刺激後 6 時間でピークに達した後に急峻に減少し、30 時間後では小胞体ストレスに対

する反応が逆転する。他の関連分子もそれぞれ特有の経時的パターンを示すことから、排卵関連の遺伝子発現について解析するときは、検体の背景条件をよく確認する必要がある。PCOS 患者の GLCs、卵胞液、血清中の排卵関連分子の発現量を検討した研究は多数[56, 57, 59, 60, 129, 142-152]あるが、統一した見解が得られておらず、その原因には以上のような理由もあると考えられる。今後は実際に PCOS 患者において、本研究のように排卵関連遺伝子の発現量が増加し、COC expansion が亢進しているかどうかを検証していく必要がある。

本研究からは、COC expansion の亢進が PCOS の病態にどのように関わるのか明らかにされていないが、この現象が PCOS の特徴である排卵障害に直接関わる可能性は充分にあると考えることができる。動物実験では COC 周囲マトリックスの構造異常が排卵障害を呈することが示されている[41]。また、体外受精において排卵誘発をしている際に、採卵予定日より早くプロゲステロン値が上昇する早期黄体化と呼ばれる現象が知られている。卵胞数が多いなどの原因で顆粒膜細胞の黄体化を伴わないプロゲステロン値上昇のみであれば卵子の質には影響しないが[153]、早発 LH サージなどによって顆粒膜細胞の変化を伴う場合には卵子の質は低下する[154, 155]。早期黄体化では COC が過剰に熟化した状態になっており、卵丘細胞の顆粒状の分散、断片化、凝縮、黒色化が形態的な特徴とされている[156-158]。PCOS ではアンドロゲン、インスリン、

AMH の上昇によって顆粒膜細胞の LH 感受性が高まり、高 LH 血症も相重なり早期黄体化が惹起されることで、卵胞発育障害や排卵障害が引き起こされるという報告がある[159-162]。本研究で観察された COC expansion 亢進は、形態的には早期黄体化で見られる COC 過熟化によく似た様相を呈していることから、排卵障害に関わる現象の一部を捉えている可能性がある。また、ウシに高 FSH 刺激をした場合であるが、早期 COC expansion が誘発され、排卵障害を起こしているという報告もある[163-165]。さらに、自然周期の体外受精において、採卵予定時に既に卵胞が破裂していた患者の既破裂卵胞を穿刺すると、半数近くの患者で卵子が回収できる。これは卵胞が破裂したにも関わらず卵子が放出されずに卵巣内に残っていることを示している。予定通り卵胞破裂前に採卵できた患者と COC の成熟度を比較すると、既破裂卵胞患者の卵胞内に残っていた COC は未熟および過熟の COC が多いという結果が得られている。この卵子放出不全の原因の一部として LH シグナル経路の不調和による COC 成熟の異常があると考察されている[166]。これらの報告から、排卵障害と COC expansion の亢進についての関係性が支持される。PCOS 患者では顆粒膜細胞の早期黄体化が起こり排卵障害に繋がっている可能性があり、形態的に早期黄体化と COC expansion 亢進はよく似た像を呈している。また、高 FSH 刺激という条件下であるが、早期 COC expansion が排卵障害を引き起こしている。さら

に、体外受精患者で COC の過熟が排卵障害に関係している。このように卵胞内のホルモン応答や細胞間の協調がとれない病態が、COC が適切な時期に適度に成熟することを阻害し、排卵障害を引き起こしている可能性がある。排卵障害を実験で直接的に証明することは難しいが、発情周期や卵巣形態などの生殖表現型に対しては小胞体ストレスの影響を検討することはできる。PCOS モデルマウスに小胞体ストレス阻害剤である TUDCA や 4-PBA を投与すると、発情周期が正常化し、多嚢胞や閉鎖卵胞といった卵巣形態異常が改善する([26, 29] および未発表データ)。PCOS モデルラットに漢方薬を投与し、小胞体ストレス低減と生殖表現型の改善を示した研究[167, 168]や、PCOS 患者にレスベラトロールを投与し、小胞体ストレス低下および妊娠率の改善傾向を示した研究[169]がある。これらの研究結果では、小胞体ストレスを阻害することで生殖表現型が改善しており、排卵障害を含む多くの病態が改善した結果であると考えることができる。

PCOS の治療では症状に応じて様々な薬剤が使用されている。月経周期異常にはエストロゲンやプロゲステロンなどのホルモン剤、卵胞発育障害や排卵障害には排卵誘発剤、インスリン抵抗性や代謝異常にはメトホルミンを用いることが多い。PCOS の病態のことを考えると抗アンドロゲン製剤の効果が高そうであるが、多毛に対して一部効果を認めるものの、催奇形性があるため妊娠の

可能性がある患者には使用できない[170]。本研究の結果からは、Notch シグナルに作用する薬剤が PCOS 治療薬の候補として挙げられる。COC expansion の亢進を阻害し、排卵障害、顆粒膜細胞の早期黄体化を改善できる可能性がある。さらに、Notch シグナルを阻害すると小胞体ストレス応答が低下する(データ未提示)こともあり、PCOS の病態を形成する悪循環を断ち切ることができる可能性がある。Notch シグナルを阻害する薬剤で臨床試験が進んでいるものは主に 2 種類に大別でき、 γ -セクレターゼ阻害剤、受容体やリガンドに対する抗体医薬品がある。臨床試験はほとんどが悪性腫瘍に対するものであるが、70 以上の登録があり、第Ⅲ相臨床試験も進みつつあり、Notch シグナル阻害剤の臨床応用が期待されている[171-173]。しかし、Notch シグナルは全身の多くの細胞に発現して重要な役割をもつことから、意図しない反応を回避するために組織特異的に作用するような薬剤にする必要がある。さらに、Notch シグナルは個体発生に重要なシグナルであることから、妊娠可能性がある患者の場合には催奇形性が懸念されるため使用が困難である。本研究結果からは、もう一つの PCOS 治療戦略として、Notch シグナルとクロストークがある小胞体ストレス阻害剤を候補に挙げることができる。PCOS の病態の多くは小胞体ストレスと関連をもっており(図 3)、顆粒膜細胞のアポトーシス促進、線維化促進因子増加、AGEs 受容体増加、環境ホルモン受容体増加によって、卵胞発育障

害、卵巣線維化、卵巣内の AGEs 蓄積、ステロイドホルモン代謝異常が生じる。PCOS モデルマウスに小胞体ストレス阻害剤を投与すると、顆粒膜細胞の小胞体ストレスマーカー低下、卵巣線維化の減少、多嚢胞や閉鎖卵胞の改善、AGEs 蓄積の減少、発情周期の正常化を認める([26, 29])。小胞体ストレスを標的にして治療すると、一度に多くの病態に対応でき、病態相互の悪循環を解消することができるため、より一層高い治療効果が期待できる。小胞体ストレスを調節する薬剤としては、タンパク質の凝集を抑制する小分子化合物であるケミカルシャペロンと、各ストレスセンサーやシグナル分子を直接調節する薬剤がある。ケミカルシャペロンの TUDCA は原発性胆汁性肝硬変に、4-PBA は尿素サイクル障害の治療に臨床で使用されている。他にも小胞体ストレスを調節する薬剤を用いた臨床試験が様々な疾患に対して行われている[8, 174-176]。

2022 年には、TUDCA と 4-PBA の配合剤である AMX0035 が、アメリカとカナダで筋萎縮性側索硬化症の治療薬として承認された[177]。既に臨床で使用されているこの 2 剤は、PCOS 治療薬として比較的導入しやすいのではないと思われる。多彩な作用機序をもつメトホルミンやイメグリミンは、小胞体ストレスを調節する作用ももっており[178, 179]、インスリン抵抗性改善という作用以外にも PCOS の治療に有効である可能性がある。小胞体ストレスを調節して PCOS に治療効果があると考えられている物質は他にもあり、漢方[167, 168]、

イノシトール[170, 180-182]、クルクミン[183, 184]、レスベラトロール[169]、アスタキサンチン[185]などが報告されている。他にも多数の天然化合物が小胞体ストレスを調節するといわれており[186, 187]、PCOS に有効なサプリメントの開発も期待できる。既に臨床に使用されている薬剤の中に小胞体ストレス阻害剤が多数あるということは、それを PCOS 治療薬として臨床応用する際に非常に有利な状況だといえる。

本研究では、PCOS の卵巣の顆粒膜細胞において、Notch シグナルが活性化していることを示した。小胞体ストレスは Notch シグナルを活性化し、そこには ATF4 を介した経路が関与していることを示した。続いて、小胞体ストレスによる Notch シグナル活性化は、排卵関連遺伝子の発現量増加と、COC expansion を異常亢進させることを明らかにした。PCOS モデルマウスにおいても、Notch シグナルを介して COC expansion が異常亢進していることを示した(図 12)。本研究の結果から、卵胞微小環境の小胞体ストレスが Notch シグナルを介した COC 成熟異常を惹起し、PCOS の主要な病態である排卵障害に寄与していることが示唆される。しかし、本研究には制約もあることから、詳細な機序の解明には更なる研究の進展が望まれる。

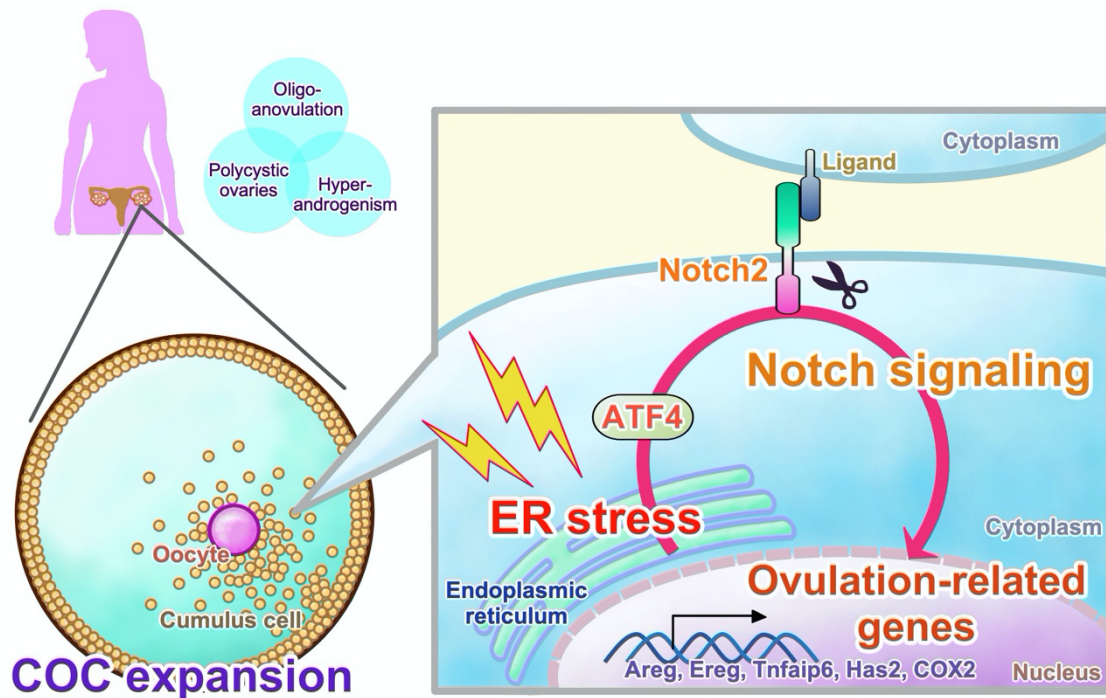


図 12. PCOS の病態における小胞体ストレス応答と Notch シグナルの役割
 PCOS の卵巣の顆粒膜細胞は小胞体ストレスが亢進した状態にある。小胞体ストレスは ATF4 を介して Notch シグナルを活性化し、排卵関連遺伝子の発現量増加と、COC expansion の異常亢進をきたす。

結語

本研究では、PCOS の卵巣の顆粒膜細胞において、Notch シグナルが活性化していることを示した。小胞体ストレスは Notch シグナルを活性化し、そこには ATF4 を介した経路が関与していることを示した。続いて、小胞体ストレスによる Notch シグナル活性化は、排卵関連遺伝子の発現量増加と、COC expansion を異常亢進させることを明らかにした。PCOS モデルマウスにおいても、Notch シグナルを介して COC expansion が異常亢進していることを示した。本研究の結果から、卵胞微小環境の小胞体ストレスが Notch シグナルを介した COC 成熟異常を惹起し、PCOS の主要な病態である排卵障害に寄与していることが示唆される。本研究の成果から、小胞体ストレス応答や Notch シグナルの調節を行うことが、PCOS の新たな治療戦略として期待できる。

引用文献

1. Harada, M. Pathophysiology of polycystic ovary syndrome revisited: Current understanding and perspectives regarding future research. *Reprod Med Biol* **21**, e12487 (2022).
2. Escobar-Morreale, H.F. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. *Nature Reviews Endocrinology* **14**, 270-284 (2018).
3. Azziz, R. Polycystic Ovary Syndrome. *Obstetrics & Gynecology* **132**, 321-336 (2018).
4. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* **81**, 19-25 (2004).
5. 生殖・内分泌委員会 本邦における多嚢胞性卵巣症候群の新しい診断基準の設定に関する小委員会（平成 17 年度～平成 18 年度）検討結果報告. *産婦誌* **59**, 868-886 (2007).
6. Gougeon, A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* **17**, 121-155 (1996).
7. Dumesic, D.A., Meldrum, D.R., Katz-Jaffe, M.G., Krishner, R.L. & Schoolcraft, W.B. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril* **103**, 303-316 (2015).
8. Harada, M., Takahashi, N., Azhary, J.M., Kunitomi, C., Fujii, T. & Osuga, Y. Endoplasmic reticulum stress: a key regulator of the follicular microenvironment in the ovary. *Mol Hum Reprod* **27** (2021).
9. Koike, H., Harada, M., Kusamoto, A., Xu, Z., Tanaka, T., Sakaguchi, N., Kunitomi, C., Azhary, J.M.K., Takahashi, N., Urata, Y. & Osuga, Y. Roles of endoplasmic reticulum stress in the pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)* **14**, 1124405 (2023).
10. Wang, C. & Zhang, Y. Endoplasmic Reticulum Stress: A New Research Direction for Polycystic Ovary Syndrome? *DNA and Cell Biology* **41**, 356-367 (2022).
11. Zeber-Lubecka, N., Ciebia, M. & Hennig, E.E. Polycystic Ovary Syndrome and Oxidative Stress-From Bench to Bedside. *Int J Mol Sci* **24** (2023).
12. Kaufman, R.J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* **13**, 1211-1233 (1999).

13. Hetz, C., Zhang, K. & Kaufman, R.J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **21**, 421-438 (2020).
14. Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 519-529 (2007).
15. Walter, P. & Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081-1086 (2011).
16. Harding, H.P. & Ron, D. Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes - A review. *Diabetes* **51**, S455-S461 (2002).
17. Kaneko, M., Koike, H., Saito, R., Kitamura, Y., Okuma, Y. & Nomura, Y. Loss of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and amyloid-beta generation. *J Neurosci* **30**, 3924-3932 (2010).
18. Urrea, H., Dufey, E., Avril, T., Chevet, E. & Hetz, C. Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. *Trends Cancer* **2**, 252-262 (2016).
19. Ren, J., Bi, Y., Sowers, J.R., Hetz, C. & Zhang, Y. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol* **18**, 499-521 (2021).
20. Grootjans, J., Kaser, A., Kaufman, R.J. & Blumberg, R.S. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* **16**, 469-484 (2016).
21. Harada, M., Nose, E., Takahashi, N., Hirota, Y., Hirata, T., Yoshino, O., Koga, K., Fujii, T. & Osuga, Y. Evidence of the activation of unfolded protein response in granulosa and cumulus cells during follicular growth and maturation. *Gynecol Endocrinol* **31**, 783-787 (2015).
22. Kunitomi, C., Harada, M., Takahashi, N., Azhary, J.M.K., Kusamoto, A., Nose, E., Oi, N., Takeuchi, A., Wada-Hiraike, O., Hirata, T., Hirota, Y., Koga, K., Fujii, T. & Osuga, Y. Activation of endoplasmic reticulum stress mediates oxidative stress-induced apoptosis of granulosa cells in ovaries affected by endometrioma. *Mol Hum Reprod* **26**, 40-52 (2020).
23. Takahashi, N., Harada, M., Hirota, Y., Zhao, L., Yoshino, O., Urata, Y., Izumi, G., Takamura, M., Hirata, T., Koga, K., Wada-Hiraike, O., Fujii, T. & Osuga, Y. A potential role of endoplasmic reticulum stress in development of ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol Cell Endocrinol* **428**, 161-169 (2016).
24. Takahashi, N., Harada, M., Hirota, Y., Zhao, L., Azhary, J.M., Yoshino, O., Izumi, G., Hirata, T., Koga, K., Wada-Hiraike, O., Fujii, T. & Osuga, Y. A Potential Role for Endoplasmic Reticulum Stress in Progesterone Deficiency in Obese Women. *Endocrinology* **158**, 84-97 (2017).

25. Takahashi, N., Harada, M., Azhary, J.M.K., Kunitomi, C., Nose, E., Terao, H., Koike, H., Wada-Hiraike, O., Hirata, T., Hirota, Y., Koga, K., Fujii, T. & Osuga, Y. Accumulation of advanced glycation end products in follicles is associated with poor oocyte developmental competence. *Mol Hum Reprod* **25**, 684-694 (2019).
26. Azhary, J.M.K., Harada, M., Kunitomi, C., Kusamoto, A., Takahashi, N., Nose, E., Oi, N., Wada-Hiraike, O., Urata, Y., Hirata, T., Hirota, Y., Koga, K., Fujii, T. & Osuga, Y. Androgens Increase Accumulation of Advanced Glycation End Products in Granulosa Cells by Activating ER Stress in PCOS. *Endocrinology* **161** (2020).
27. Azhary, J.M.K., Harada, M., Takahashi, N., Nose, E., Kunitomi, C., Koike, H., Hirata, T., Hirota, Y., Koga, K., Wada-Hiraike, O., Fujii, T. & Osuga, Y. Endoplasmic Reticulum Stress Activated by Androgen Enhances Apoptosis of Granulosa Cells via Induction of Death Receptor 5 in PCOS. *Endocrinology* **160**, 119-132 (2019).
28. Kunitomi, C., Harada, M., Kusamoto, A., Azhary, J.M., Nose, E., Koike, H., Xu, Z., Urata, Y., Takahashi, N., Wada-Hiraike, O., Hirota, Y., Koga, K., Fujii, T. & Osuga, Y. Induction of aryl hydrocarbon receptor in granulosa cells by endoplasmic reticulum stress contributes to pathology of polycystic ovary syndrome. *Molecular Human Reproduction* **27** (2021).
29. Takahashi, N., Harada, M., Hirota, Y., Nose, E., Azhary, J.M., Koike, H., Kunitomi, C., Yoshino, O., Izumi, G., Hirata, T., Koga, K., Wada-Hiraike, O., Chang, R.J., Shimasaki, S., Fujii, T. & Osuga, Y. Activation of Endoplasmic Reticulum Stress in Granulosa Cells from Patients with Polycystic Ovary Syndrome Contributes to Ovarian Fibrosis. *Sci Rep* **7**, 10824 (2017).
30. Koike, H., Harada, M., Kusamoto, A., Kunitomi, C., Xu, Z., Tanaka, T., Urata, Y., Nose, E., Takahashi, N., Wada-Hiraike, O., Hirota, Y., Koga, K. & Osuga, Y. Notch Signaling Induced by Endoplasmic Reticulum Stress Regulates Cumulus-Oocyte Complex Expansion in Polycystic Ovary Syndrome. *Biomolecules* **12** (2022).
31. Zhang, Y., Yan, Z., Qin, Q., Nisenblat, V., Chang, H.M., Yu, Y., Wang, T., Lu, C., Yang, M., Yang, S., Yao, Y., Zhu, X., Xia, X., Dang, Y., Ren, Y., Yuan, P., Li, R., Liu, P., Guo, H., Han, J., He, H., Zhang, K., Wang, Y., Wu, Y., Li, M., Qiao, J., Yan, J. & Yan, L. Transcriptome Landscape of Human Folliculogenesis Reveals Oocyte and Granulosa Cell Interactions. *Mol Cell* **72**, 1021-1034 e1024 (2018).
32. Eppig, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* **122**, 829-838 (2001).

33. Matzuk, M.M., Burns, K.H., Viveiros, M.M. & Eppig, J.J. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* **296**, 2178-2180 (2002).
34. Chang, H.M., Qiao, J. & Leung, P.C. Oocyte-somatic cell interactions in the human ovary-novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. *Hum Reprod Update* **23**, 1-18 (2016).
35. Jones, A.S.K. & Shikanov, A. Follicle development as an orchestrated signaling network in a 3D organoid. *J Biol Eng* **13**, 2 (2019).
36. Alam, M.H. & Miyano, T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. *Reprod Med Biol* **19**, 13-23 (2020).
37. Zhang, H. & Liu, K. Cellular and molecular regulation of the activation of mammalian primordial follicles: somatic cells initiate follicle activation in adulthood. *Hum Reprod Update* **21**, 779-786 (2015).
38. Richani, D. & Gilchrist, R.B. The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Human Reproduction Update* **24**, 1-14 (2018).
39. Turathum, B., Gao, E.-M. & Chian, R.-C. The Function of Cumulus Cells in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and Fertilization. *Cells* **10** (2021).
40. Vanderhyden, B.C., Caron, P.J., Buccione, R. & Eppig, J.J. Developmental Pattern of the Secretion of Cumulus Expansion-Enabling Factor by Mouse Oocytes and the Role of Oocytes in Promoting Granulosa-Cell Differentiation. *Dev Biol* **140**, 307-317 (1990).
41. Robker, R.L., Hennebold, J.D. & Russell, D.L. Coordination of Ovulation and Oocyte Maturation: A Good Egg at the Right Time. *Endocrinology* **159**, 3209-3218 (2018).
42. Vanorny, D.A. & Mayo, K.E. The role of Notch signaling in the mammalian ovary. *Reproduction* **153**, R187-R204 (2017).
43. Kopan, R. & Ilagan, M.X.G. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell* **137**, 216-233 (2009).
44. Lloyd-Lewis, B., Mourikis, P. & Fre, S. Notch signalling: sensor and instructor of the microenvironment to coordinate cell fate and organ morphogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* **61**, 16-23 (2019).
45. Bray, S.J. Notch signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 722-735 (2016).
46. Mašek, J. & Andersson, E.R. The developmental biology of genetic Notch disorders. *Development* **144**, 1743-1763 (2017).

47. Guo, S., Quan, S. & Zou, S. Roles of the Notch Signaling Pathway in Ovarian Functioning. *Reprod Sci* **28**, 2770-2778 (2021).
48. Xie, Q., Cheng, Z., Chen, X., Lobe, C.G. & Liu, J. The role of Notch signalling in ovarian angiogenesis. *J Ovarian Res* **10**, 13 (2017).
49. Murta, D., Batista, M., Silva, E., Trindade, A., Mateus, L., Duarte, A. & Lopes-da-Costa, L. Differential expression of Notch component and effector genes during ovarian follicle and corpus luteum development during the oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev* **27**, 1038-1048 (2015).
50. Patino, L.C., Beau, I., Morel, A., Delemer, B., Young, J., Binart, N. & Laissue, P. Functional evidence implicating NOTCH2 missense mutations in primary ovarian insufficiency etiology. *Hum Mutat* **40**, 25-30 (2019).
51. Li, L., Feng, F., Zhao, M., Li, T., Yue, W., Ma, X., Wang, B. & Yin, C. NOTCH2 variant D1853H is mutated in two non-syndromic premature ovarian insufficiency patients from a Chinese pedigree. *J Ovarian Res* **13**, 41 (2020).
52. Tanriverdi, G., Denir, S., Ayla, S., Bilir, A., Oktar, H., Cepni, I. & Irez, T. Notch signaling pathway in cumulus cells can be a novel marker to identify poor and normal responder IVF patients. *J Assist Reprod Genet* **30**, 1319-1326 (2013).
53. Xu, B., Zhang, Y.W., Tong, X.H. & Liu, Y.S. Characterization of microRNA profile in human cumulus granulosa cells: Identification of microRNAs that regulate Notch signaling and are associated with PCOS. *Mol Cell Endocrinol* **404**, 26-36 (2015).
54. Butler, A.E., Ramachandran, V., Hayat, S., Dargham, S.R., Cunningham, T.K., Benurwar, M., Sathyapalan, T., Najafi-Shoushtari, S.H. & Atkin, S.L. Expression of microRNA in follicular fluid in women with and without PCOS. *Sci Rep* **9**, 16306 (2019).
55. Skrtic, A., Sokolic, L., Borovecki, A., Rosa, J. & Fenzl, V. Immunohistochemical localization of CD31, NOTCH1 and JAGGED1 proteins in experimentally induced polycystic ovaries of immature rats. *Acta Histochem* **113**, 262-269 (2011).
56. Haouzi, D., Assou, S., Monzo, C., Vincens, C., Dechaud, H. & Hamamah, S. Altered gene expression profile in cumulus cells of mature MII oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* **27**, 3523-3530 (2012).
57. Kaur, S., Archer, K.J., Devi, M.G., Kriplani, A., Strauss, J.F., 3rd & Singh, R. Differential gene expression in granulosa cells from polycystic ovary syndrome patients with and without insulin resistance: identification of susceptibility gene sets through network analysis. *J Clin Endocrinol Metab* **97**, E2016-2021 (2012).

58. Wood, J.R., Dumesic, D.A., Abbott, D.H. & Strauss, J.F., 3rd Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 705-713 (2007).
59. Liu, Q., Li, Y., Feng, Y., Liu, C., Ma, J., Li, Y., Xiang, H., Ji, Y., Cao, Y., Tong, X. & Xue, Z. Single-cell analysis of differences in transcriptomic profiles of oocytes and cumulus cells at GV, MI, MII stages from PCOS patients. *Sci Rep* **6**, 39638 (2016).
60. Yang, D., Li, N., Ma, A., Dai, F., Zheng, Y., Hu, X., Wang, Y., Xian, S., Zhang, L., Yuan, M., Liu, S., Deng, Z., Yang, Y. & Cheng, Y. Identification of Potential Biomarkers of Polycystic Ovary Syndrome via Integrated Bioinformatics Analysis. *Reprod Sci* **28**, 1353-1361 (2021).
61. Masoudi, M., Yamini, N., Salehi, F., Aflatoonian, R., Kutenae, M.A., Esfandiari, S., Hosseini, E., Asadi, E., Najarkolaei, A.H., Mortezaee, K., Moini, A., Abolhassani, F. & Salehi, E. Notch signaling pathway in cumulus cells reflecting zygote and embryo quality in polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet* **304**, 1097-1105 (2021).
62. Kaminska, A., Marek, S., Pardyak, L., Brzoskwinia, M., Pawlicki, P., Bilinska, B. & Hejmej, A. Disruption of androgen signaling during puberty affects Notch pathway in rat seminiferous epithelium. *Reprod Biol Endocrinol* **18**, 30 (2020).
63. Qiu, M., Bao, W., Wang, J., Yang, T., He, X., Liao, Y. & Wan, X. FOXA1 promotes tumor cell proliferation through AR involving the Notch pathway in endometrial cancer. *BMC Cancer* **14**, 78 (2014).
64. Kim, J.H., Han, G.C., Seo, J.Y., Park, I., Park, W., Jeong, H.W., Lee, S.H., Bae, S.H., Seong, J., Yum, M.K., Hann, S.H., Kwon, Y.G., Seo, D., Choi, M.H. & Kong, Y.Y. Sex hormones establish a reserve pool of adult muscle stem cells. *Nat Cell Biol* **18**, 930-940 (2016).
65. Mirochnik, Y., Veliceasa, D., Williams, L., Maxwell, K., Yemelyanov, A., Budunova, I. & Volpert, O.V. Androgen receptor drives cellular senescence. *PLoS One* **7**, e31052 (2012).
66. Tarulli, G.A., Butler, L.M., Tilley, W.D. & Hickey, T.E. Bringing androgens up a NOTCH in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **21**, T183-202 (2014).
67. Belandia, B., Powell, S.M., Garcia-Pedrero, J.M., Walker, M.M., Bevan, C.L. & Parker, M.G. Hey1, a mediator of notch signaling, is an androgen receptor corepressor. *Mol Cell Biol* **25**, 1425-1436 (2005).
68. Carvalho, F.L., Simons, B.W., Eberhart, C.G. & Berman, D.M. Notch signaling in prostate cancer: a moving target. *Prostate* **74**, 933-945 (2014).

69. Lavery, D.N., Villaronga, M.A., Walker, M.M., Patel, A., Belandia, B. & Bevan, C.L. Repression of androgen receptor activity by HEYL, a third member of the Hairy/Enhancer-of-split-related family of Notch effectors. *J Biol Chem* **286**, 17796-17808 (2011).
70. Li, Y., Jing, J., Dang, W., Han, Q., Guo, X., Jia, K., Cheng, Y., Wang, K., Kebreab, E. & Lyu, L. Effects of Notch2 on proliferation, apoptosis and steroidogenesis in bovine luteinized granulosa cells. *Theriogenology* **171**, 55-63 (2021).
71. Guo, R., Chen, F. & Shi, Z. Suppression of Notch Signaling Stimulates Progesterone Synthesis by Enhancing the Expression of NR5A2 and NR2F2 in Porcine Granulosa Cells. *Genes (Basel)* **11** (2020).
72. Prasasya, R.D. & Mayo, K.E. Notch Signaling Regulates Differentiation and Steroidogenesis in Female Mouse Ovarian Granulosa Cells. *Endocrinology* **159**, 184-198 (2018).
73. Wang, J., Liu, S., Peng, L., Dong, Q., Bao, R., Lv, Q., Tang, M., Hu, C., Li, G., Liang, S. & Zhang, C. Notch Signaling Pathway Regulates Progesterone Secretion in Murine Luteal Cells. *Reprod Sci* **22**, 1243-1251 (2015).
74. Accialini, P., Hernandez, S.F., Bas, D., Pazos, M.C., Irusta, G., Abramovich, D. & Tesone, M. A link between Notch and progesterone maintains the functionality of the rat corpus luteum. *Reproduction* **149**, 1-10 (2015).
75. Wang, Y., Lu, E., Bao, R., Xu, P., Feng, F., Wen, W., Dong, Q., Hu, C., Xiao, L., Tang, M., Li, G., Wang, J. & Zhang, C. Notch signalling regulates steroidogenesis in mouse ovarian granulosa cells. *Reprod Fertil Dev* **31**, 1091-1103 (2019).
76. George, R.M., Hahn, K.L., Rawls, A., Viger, R.S. & Wilson-Rawls, J. Notch signaling represses GATA4-induced expression of genes involved in steroid biosynthesis. *Reproduction* **150**, 383-394 (2015).
77. Hernandez, F., Peluffo, M.C., Stouffer, R.L., Irusta, G. & Tesone, M. Role of the DLL4-NOTCH system in PGF2alpha-induced luteolysis in the pregnant rat. *Biol Reprod* **84**, 859-865 (2011).
78. Kathiriya, I.S., King, I.N., Murakami, M., Nakagawa, M., Astle, J.M., Gardner, K.A., Gerard, R.D., Olson, E.N., Srivastava, D. & Nakagawa, O. Hairy-related transcription factors inhibit GATA-dependent cardiac gene expression through a signal-responsive mechanism. *J Biol Chem* **279**, 54937-54943 (2004).
79. Weber, D., Wiese, C. & Gessler, M. Hey bHLH transcription factors. *Curr Top Dev Biol* **110**, 285-315 (2014).

80. Huang, K.C., Chuang, P.Y., Yang, T.Y., Huang, T.W. & Chang, S.F. Hyperglycemia inhibits osteoblastogenesis of rat bone marrow stromal cells via activation of the Notch2 signaling pathway. *Int J Med Sci* **16**, 696-703 (2019).
81. Hachisuga, M., Oki, S., Kitajima, K., Ikuta, S., Sumi, T., Kato, K., Wake, N. & Meno, C. Hyperglycemia impairs left-right axis formation and thereby disturbs heart morphogenesis in mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E5300-5307 (2015).
82. Valenti, L., Mendoza, R.M., Rametta, R., Maggioni, M., Kitajewski, C., Shawber, C.J. & Pajvani, U.B. Hepatic notch signaling correlates with insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes* **62**, 4052-4062 (2013).
83. Hasan, S.S., Jabs, M., Taylor, J., Wiedmann, L., Leibing, T., Nordstrom, V., Federico, G., Roma, L.P., Carlein, C., Wolff, G., Ekim-Ustunel, B., Brune, M., Moll, I., Tetzlaff, F., Grone, H.J., Fleming, T., Geraud, C., Herzig, S., Nawroth, P.P. & Fischer, A. Endothelial Notch signaling controls insulin transport in muscle. *EMBO Mol Med* **12**, e09271 (2020).
84. Bi, P. & Kuang, S. Notch signaling as a novel regulator of metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **26**, 248-255 (2015).
85. Zhu, C., Kim, K., Wang, X., Bartolome, A., Salomao, M., Dongiovanni, P., Meroni, M., Graham, M.J., Yates, K.P., Diehl, A.M., Schwabe, R.F., Tabas, I., Valenti, L., Lavine, J.E. & Pajvani, U.B. Hepatocyte Notch activation induces liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Transl Med* **10** (2018).
86. Huang, S., Park, J., Qiu, C., Chung, K.W., Li, S.Y., Sirin, Y., Han, S.H., Taylor, V., Zimmer-Strobl, U. & Susztak, K. Jagged1/Notch2 controls kidney fibrosis via Tfam-mediated metabolic reprogramming. *PLoS Biol* **16**, e2005233 (2018).
87. Romeo, S. Notch and Nonalcoholic Fatty Liver and Fibrosis. *N Engl J Med* **380**, 681-683 (2019).
88. Hu, B. & Phan, S.H. Notch in fibrosis and as a target of anti-fibrotic therapy. *Pharmacol Res* **108**, 57-64 (2016).
89. Blokzijl, A., Dahlqvist, C., Reissmann, E., Falk, A., Moliner, A., Lendahl, U. & Ibanez, C.F. Cross-talk between the Notch and TGF-beta signaling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3. *J Cell Biol* **163**, 723-728 (2003).
90. Niimi, H., Pardali, K., Vanlandewijck, M., Heldin, C.H. & Moustakas, A. Notch signaling is necessary for epithelial growth arrest by TGF-beta. *J Cell Biol* **176**, 695-707 (2007).

91. Sun, X.F., Sun, X.H., Cheng, S.F., Wang, J.J., Feng, Y.N., Zhao, Y., Yin, S., Hou, Z.M., Shen, W. & Zhang, X.F. Interaction of the transforming growth factor-beta and Notch signaling pathways in the regulation of granulosa cell proliferation. *Reprod Fertil Dev* **28**, 1873-1881 (2016).
92. Zhao, L., Cai, H., Tang, Z., Cui, Q., Liu, Z. & Lu, S. Matrine suppresses advanced glycation end products-induced human coronary smooth muscle cells phenotype conversion by regulating endoplasmic reticulum stress-dependent Notch signaling. *Eur J Pharmacol* **882**, 173257 (2020).
93. Ohta, K., Mizuno, A., Li, S., Itoh, M., Ueda, M., Ohta, E., Hida, Y., Wang, M.X., Furoi, M., Tsuzuki, Y., Sobajima, M., Bohmoto, Y., Fukushima, T., Kobori, M., Inuzuka, T. & Nakagawa, T. Endoplasmic reticulum stress enhances gamma-secretase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **416**, 362-366 (2011).
94. Liu, X., Yu, J., Xu, L., Umphred-Wilson, K., Peng, F., Ding, Y., Barton, B.M., Lv, X., Zhao, M.Y., Sun, S., Hong, Y., Qi, L., Adoro, S. & Chen, X. Notch-induced endoplasmic reticulum-associated degradation governs mouse thymocyte beta-selection. *Elife* **10** (2021).
95. Lee, J.E., Morrison, W. & Hollien, J. Hairy and enhancer of split 1 (HES1) protects cells from endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through repression of GADD34. *J Biol Chem* **293**, 5947-5955 (2018).
96. Li, Y., Zhang, Y., Fu, H., Huang, H., Lu, Q., Qin, H., Wu, Y., Huang, H., Mao, G., Wei, Z. & Liao, P. Hes1 Knockdown Exacerbates Ischemic Stroke Following tMCAO by Increasing ER Stress-Dependent Apoptosis via the PERK/eIF2alpha/ATF4/CHOP Signaling Pathway. *Neurosci Bull* **36**, 134-142 (2020).
97. Reinhardt, S., Schuck, F., Grosgen, S., Riemenschneider, M., Hartmann, T., Postina, R., Grimm, M. & Endres, K. Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease. *FASEB J* **28**, 978-997 (2014).
98. Mitsuda, T., Hayakawa, Y., Itoh, M., Ohta, K. & Nakagawa, T. ATF4 regulates gamma-secretase activity during amino acid imbalance. *Biochem Biophys Res Commun* **352**, 722-727 (2007).
99. Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N.H., Arias, C., Lennon, C.J., Kluger, Y. & Dynlacht, B.D. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell* **27**, 53-66 (2007).
100. Szabat, M., Kalynyak, T.B., Lim, G.E., Chu, K.Y., Yang, Y.H., Asadi, A., Gage, B.K., Ao, Z., Warnock, G.L., Piret, J.M., Kieffer, T.J. & Johnson, J.D. Musashi

- expression in beta-cells coordinates insulin expression, apoptosis and proliferation in response to endoplasmic reticulum stress in diabetes. *Cell Death Dis* **2**, e232 (2011).
101. Dadey, D.Y., Kapoor, V., Khudanyan, A., Urano, F., Kim, A.H., Thotala, D. & Hallahan, D.E. The ATF6 pathway of the ER stress response contributes to enhanced viability in glioblastoma. *Oncotarget* **7**, 2080-2092 (2016).
 102. Jaud, M., Philippe, C., Van Den Berghe, L., Segura, C., Mazzolini, L., Pyronnet, S., Laurell, H. & Touriol, C. The PERK Branch of the Unfolded Protein Response Promotes DLL4 Expression by Activating an Alternative Translation Mechanism. *Cancers (Basel)* **11** (2019).
 103. Elia, E., Sander, V., Luchetti, C.G., Solano, M.E., Di Girolamo, G., Gonzalez, C. & Motta, A.B. The mechanisms involved in the action of metformin in regulating ovarian function in hyperandrogenized mice. *Mol Hum Reprod* **12**, 475-481 (2006).
 104. Caldwell, A.S., Middleton, L.J., Jimenez, M., Desai, R., McMahon, A.C., Allan, C.M., Handelsman, D.J. & Walters, K.A. Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models. *Endocrinology* **155**, 3146-3159 (2014).
 105. Walters, K.A., Allan, C.M. & Handelsman, D.J. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod* **86**, 149, 141-112 (2012).
 106. Korbel, C., Gerstner, M.D., Menger, M.D. & Laschke, M.W. Notch signaling controls sprouting angiogenesis of endometriotic lesions. *Angiogenesis* **21**, 37-46 (2018).
 107. Wang, J.J., Zhu, J.D., Zhang, X.H., Long, T.T., Ge, G. & Yu, Y. Neuroprotective effect of Notch pathway inhibitor DAPT against focal cerebral ischemia/reperfusion 3 hours before model establishment. *Neural Regen Res* **14**, 452-461 (2019).
 108. Bertoldo, M.J., Caldwell, A.S.L., Riepsamen, A.H., Lin, D., Gonzalez, M.B., Robker, R.L., Ledger, W.L., Gilchrist, R.B., Handelsman, D.J. & Walters, K.A. A Hyperandrogenic Environment Causes Intrinsic Defects That Are Detrimental to Follicular Dynamics in a PCOS Mouse Model. *Endocrinology* **160**, 699-715 (2019).
 109. Ophir, L., Yung, Y., Maman, E., Rubinstein, N., Yerushalmi, G.M., Haas, J., Barzilay, E. & Hourvitz, A. Establishment and validation of a model for non-luteinized human mural granulosa cell culture. *Mol Cell Endocrinol* **384**, 165-174 (2014).

110. Casarini, L., Lispi, M., Longobardi, S., Milosa, F., La Marca, A., Tagliasacchi, D., Pignatti, E. & Simoni, M. LH and hCG action on the same receptor results in quantitatively and qualitatively different intracellular signalling. *PLoS One* **7**, e46682 (2012).
111. Ophir, L., Yung, Y., Yerushalmi, G.M., Baum, M., Machtinger, R., Maman, E. & Hourvitz, A. An optimized model for hCG stimulation of human mural granulosa cell culture. *Reprod Biol* **19**, 67-74 (2019).
112. Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**, 671-675 (2012).
113. Kristensen, S.G., Ebbesen, P. & Andersen, C.Y. Transcriptional profiling of five isolated size-matched stages of human preantral follicles. *Mol Cell Endocrinol* **401**, 189-201 (2015).
114. Shinjo, S., Mizotani, Y., Tashiro, E. & Imoto, M. Comparative analysis of the expression patterns of UPR-target genes caused by UPR-inducing compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* **77**, 729-735 (2013).
115. Kusaczuk, M. Tauroursodeoxycholate-Bile Acid with Chaperoning Activity: Molecular and Cellular Effects and Therapeutic Perspectives. *Cells* **8** (2019).
116. Xiang, Y., Wang, H., Ding, H., Xu, T., Liu, X., Huang, Z., Wu, H. & Ge, H. Hyperandrogenism drives ovarian inflammation and pyroptosis: A possible pathogenesis of PCOS follicular dysplasia. *Int Immunopharmacol* **125**, 111141 (2023).
117. Zhang, Y., Xie, X., Ma, Y., Du, C., Jiao, Y., Xia, G., Xu, J. & Yang, Y. Cyproterone Acetate Mediates IRE1alpha Signaling Pathway to Alleviate Pyroptosis of Ovarian Granulosa Cells Induced by Hyperandrogen. *Biology (Basel)* **11** (2022).
118. Jin, J., Ma, Y., Tong, X., Yang, W., Dai, Y., Pan, Y., Ren, P., Liu, L., Fan, H.Y., Zhang, Y. & Zhang, S. Metformin inhibits testosterone-induced endoplasmic reticulum stress in ovarian granulosa cells via inactivation of p38 MAPK. *Hum Reprod* **35**, 1145-1158 (2020).
119. de la Calle, C.M., Shee, K., Yang, H., Lonergan, P.E. & Nguyen, H.G. The endoplasmic reticulum stress response in prostate cancer. *Nat Rev Urol* **19**, 708-726 (2022).
120. Nagamori, I., Yabuta, N., Fujii, T., Tanaka, H., Yomogida, K., Nishimune, Y. & Nojima, H. Tisp40, a spermatid specific bZip transcription factor, functions by binding to the unfolded protein response element via the Rip pathway. *Genes Cells* **10**, 575-594 (2005).

121. Kim, T.H., Park, J.M., Kim, M.Y. & Ahn, Y.H. The role of CREB3L4 in the proliferation of prostate cancer cells. *Sci Rep* **7**, 45300 (2017).
122. Asada, R., Kanemoto, S., Kondo, S., Saito, A. & Imaizumi, K. The signalling from endoplasmic reticulum-resident bZIP transcription factors involved in diverse cellular physiology. *J Biochem* **149**, 507-518 (2011).
123. Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljujic, M., Samali, A. & Gorman, A.M. The integrated stress response. *EMBO Rep* **17**, 1374-1395 (2016).
124. Costa-Mattioli, M. & Walter, P. The integrated stress response: From mechanism to disease. *Science* **368** (2020).
125. Guo, Q., Li, H., Liu, J., Xu, L., Yang, L., Sun, Z. & Zhou, B. Tunicamycin aggravates endoplasmic reticulum stress and airway inflammation via PERK-ATF4-CHOP signaling in a murine model of neutrophilic asthma. *J Asthma* **54**, 125-133 (2017).
126. Ge, D., Jing, Q., Zhao, W., Yue, H., Su, L., Zhang, S. & Zhao, J. Finding ATF4/p75NTR/IL-8 signal pathway in endothelial-mesenchymal transition by safore oxide. *PLoS One* **9**, e99378 (2014).
127. Stevens, S.A., Gonzalez Aguiar, M.K., Toro, A.L., Yerlikaya, E.I., Sunilkumar, S., VanCleave, A.M., Pflieger, J., Bradley, E.A., Kimball, S.R. & Dennis, M.D. PERK/ATF4-dependent expression of the stress response protein REDD1 promotes proinflammatory cytokine expression in the heart of obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **324**, E62-E72 (2023).
128. Sunilkumar, S., Toro, A.L., McCurry, C.M., VanCleave, A.M., Stevens, S.A., Miller, W.P., Kimball, S.R. & Dennis, M.D. Stress response protein REDD1 promotes diabetes-induced retinal inflammation by sustaining canonical NF-kappaB signaling. *J Biol Chem* **298**, 102638 (2022).
129. Di, F., Liu, J., Li, S., Yao, G., Hong, Y., Chen, Z.J., Li, W. & Du, Y. ATF4 Contributes to Ovulation via Regulating COX2/PGE2 Expression: A Potential Role of ATF4 in PCOS. *Front Endocrinol (Lausanne)* **9**, 669 (2018).
130. Zhang, K. & Kaufman, R.J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* **454**, 455-462 (2008).
131. Li, W., Cao, T., Luo, C., Cai, J., Zhou, X., Xiao, X. & Liu, S. Crosstalk between ER stress, NLRP3 inflammasome, and inflammation. *Appl Microbiol Biotechnol* **104**, 6129-6140 (2020).
132. Sucur, A., Filipovic, M., Flegar, D., Kelava, T., Sisl, D., Lukac, N., Kovacic, N. & Grcevic, D. Notch receptors and ligands in inflammatory arthritis - a systematic review. *Immunol Lett* **223**, 106-114 (2020).

133. Zhou, B., Lin, W., Long, Y., Yang, Y., Zhang, H., Wu, K. & Chu, Q. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther* **7**, 95 (2022).
134. Yu, J., Zhu, C., Wang, X., Kim, K., Bartolome, A., Dongiovanni, P., Yates, K.P., Valenti, L., Carrer, M., Sadowski, T., Qiang, L., Tabas, I., Lavine, J.E. & Pajvani, U.B. Hepatocyte TLR4 triggers inter-hepatocyte Jagged1/Notch signaling to determine NASH-induced fibrosis. *Sci Transl Med* **13** (2021).
135. Monteagudo, S. & Lories, R.J. A Notch in the joint that exacerbates osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **14**, 563-564 (2018).
136. Gallenstein, N., Tichy, L., Weigand, M.A. & Schenz, J. Notch Signaling in Acute Inflammation and Sepsis. *Int J Mol Sci* **24** (2023).
137. Dumesic, D.A., Oberfield, S.E., Stener-Victorin, E., Marshall, J.C., Laven, J.S. & Legro, R.S. Scientific Statement on the Diagnostic Criteria, Epidemiology, Pathophysiology, and Molecular Genetics of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocr Rev* **36**, 487-525 (2015).
138. Adams, J., Liu, Z., Ren, Y.A., Wun, W.S., Zhou, W., Kenigsberg, S., Librach, C., Valdes, C., Gibbons, W. & Richards, J. Enhanced Inflammatory Transcriptome in the Granulosa Cells of Women With Polycystic Ovarian Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **101**, 3459-3468 (2016).
139. Wu, L.L., Russell, D.L., Norman, R.J. & Robker, R.L. Endoplasmic reticulum (ER) stress in cumulus-oocyte complexes impairs pentraxin-3 secretion, mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$ m), and embryo development. *Mol Endocrinol* **26**, 562-573 (2012).
140. Park, H.J., Park, J.Y., Kim, J.W., Yang, S.G., Jung, J.M., Kim, M.J., Kang, M.J., Cho, Y.H., Wee, G., Yang, H.Y., Song, B.S., Kim, S.U. & Koo, D.B. Melatonin improves the meiotic maturation of porcine oocytes by reducing endoplasmic reticulum stress during in vitro maturation. *J Pineal Res* **64** (2018).
141. Patil, K., Shinde, G., Hinduja, I. & Mukherjee, S. Compromised Cumulus-Oocyte Complex Matrix Organization and Expansion in Women with PCOS. *Reprod Sci* **29**, 836-848 (2022).
142. Ambekar, A.S., Kelkar, D.S., Pinto, S.M., Sharma, R., Hinduja, I., Zaveri, K., Pandey, A., Prasad, T.S., Gowda, H. & Mukherjee, S. Proteomics of follicular fluid from women with polycystic ovary syndrome suggests molecular defects in follicular development. *J Clin Endocrinol Metab* **100**, 744-753 (2015).
143. Schmidt, J., Weijdegard, B., Mikkelsen, A.L., Lindenberg, S., Nilsson, L. & Brannstrom, M. Differential expression of inflammation-related genes in the

- ovarian stroma and granulosa cells of PCOS women. *Mol Hum Reprod* **20**, 49-58 (2014).
144. Aydos, A., Gurel, A., Oztemur Islakoglu, Y., Noyan, S., Gokce, B., Ecemis, T., Kaya, C., Aksu, A.T. & Gur Dedeoglu, B. Identification of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Specific Genes in Cumulus and Mural Granulosa Cells. *PLoS One* **11**, e0168875 (2016).
 145. Zheng, Q., Zhou, F., Cui, X., Liu, M., Li, Y., Liu, S., Tan, J. & Yan, Q. Novel Serum Biomarkers Detected by Protein Array in Polycystic Ovary Syndrome with Low Progesterone Level. *Cell Physiol Biochem* **46**, 2297-2310 (2018).
 146. Pan, J.X., Tan, Y.J., Wang, F.F., Hou, N.N., Xiang, Y.Q., Zhang, J.Y., Liu, Y., Qu, F., Meng, Q., Xu, J., Sheng, J.Z. & Huang, H.F. Aberrant expression and DNA methylation of lipid metabolism genes in PCOS: a new insight into its pathogenesis. *Clin Epigenetics* **10**, 6 (2018).
 147. Pan, J., Zhou, C., Zhou, Z., Yang, Z., Dai, T., Huang, H. & Jin, L. Elevated ovarian pentraxin 3 in polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet* **38**, 1231-1237 (2021).
 148. Tosi, F., Di Sarra, D., Bonin, C., Zambotti, F., Dall'Alda, M., Fiers, T., Kaufman, J.M., Donati, M., Franchi, M., Zanolin, M.E., Bonora, E. & Moghetti, P. Plasma levels of pentraxin-3, an inflammatory protein involved in fertility, are reduced in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* **170**, 401-409 (2014).
 149. Sahin, F.K., Sahin, S.B. & Cure, E. Does low pentraxin-3 levels associate with polycystic ovary syndrome and obesity? *Int J Clin Exp Med* **15**, 3512-3519 (2014).
 150. Aydogdu, A., Tasci, I., Tapan, S., Basaran, Y., Aydogan, U., Meric, C., Sonmez, A., Aydogdu, S., Akbulut, H., Taslipinar, A., Uckaya, G. & Azal, O. High plasma level of long Pentraxin 3 is associated with insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* **28**, 722-725 (2012).
 151. Wyskida, K., Franik, G., Choreza, P., Pohl, N., Markuszewski, L., Owczarek, A., Madej, P., Chudek, J. & Olszanecka-Glinianowicz, M. Pentraxin 3 Levels in Young Women with and without Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) in relation to the Nutritional Status and Systemic Inflammation. *Int J Endocrinol* **2020**, 1380176 (2020).
 152. Imbar, T., Klipper, E., Greenfield, C., Hurwitz, A., Haimov-Kochman, R. & Meidan, R. Altered endothelin expression in granulosa-lutein cells of women with polycystic ovary syndrome. *Life Sci* **91**, 703-709 (2012).
 153. Racca, A., De Munck, N., Santos-Ribeiro, S., Drakopoulos, P., Errazuriz, J., Galvao, A., Popovic-Todorovic, B., Mackens, S., De Vos, M., Verheyen, G.,

- Tournaye, H. & Blockeel, C. Do we need to measure progesterone in oocyte donation cycles? A retrospective analysis evaluating cumulative live birth rates and embryo quality. *Hum Reprod* **35**, 167-174 (2020).
154. Wang, M., Xi, Q., Yang, Q., Li, Z., Yang, L., Zhu, L. & Jin, L. The relationship between a novel evaluation parameter of premature luteinization and IVF outcomes. *Reprod Biomed Online* **42**, 323-331 (2021).
 155. Hussein, R.S., Elnashar, I., Amin, A.F., Abou-Taleb, H.A., Abbas, A.M., Abdelmageed, A.M., Farghaly, T. & Zhao, Y. Revisiting debates of premature luteinization and its effect on assisted reproductive technology outcome. *J Assist Reprod Genet* **36**, 2195-2206 (2019).
 156. Khan, I., Staessen, C., Van den Abbeel, E., Camus, M., Wisanto, A., Smitz, J., Devroey, P. & Van Steirteghem, A.C. Time of insemination and its effect on in-vitro fertilization, cleavage and pregnancy rates in GnRH agonist/HMG-stimulated cycles. *Hum Reprod* **4**, 921-926 (1989).
 157. Hill, G.A., Freeman, M., Bastias, M.C., Rogers, B.J., Herbert, C.M., 3rd, Osteen, K.G. & Wentz, A.C. The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* **52**, 801-806 (1989).
 158. 神野正雄, 羽生一郎, 吉村泰典 & 中村幸雄 ヒト体外受精における卵成熟度の受精・胚発育に及ぼす影響. *日産婦誌* **47**, 523-530 (1995).
 159. Rosenfield, R.L. & Ehrmann, D.A. The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited. *Endocr Rev* **37**, 467-520 (2016).
 160. Willis, D.S., Watson, H., Mason, H.D., Galea, R., Brincat, M. & Franks, S. Premature response to luteinizing hormone of granulosa cells from anovulatory women with polycystic ovary syndrome: relevance to mechanism of anovulation. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 3984-3991 (1998).
 161. Franks, S., Stark, J. & Hardy, K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* **14**, 367-378 (2008).
 162. Man, L., Lustgarten Guahmich, N., Kallinos, E., Caiazza, B., Khan, M., Liu, Z.Y., Patel, R., Torres, C., Pepin, D., Yang, H.S., Bodine, R., Zaninovic, N., Schattman, G., Rosenwaks, Z. & James, D. Chronic superphysiologic AMH promotes premature luteinization of antral follicles in human ovarian xenografts. *Sci Adv* **8**, eabi7315 (2022).
 163. Karl, K.R., Schall, P.Z., Clark, Z.L., Ruebel, M.L., Cibelli, J., Tempelman, R.J., Latham, K.E. & Ireland, J.J. Ovarian stimulation with excessive FSH doses causes

- cumulus cell and oocyte dysfunction in small ovarian reserve heifers. *Mol Hum Reprod* **29** (2023).
164. Karl, K.R., Jimenez-Krassel, F., Gibbings, E., Ireland, J.L.H., Clark, Z.L., Tempelman, R.J., Latham, K.E. & Ireland, J.J. Negative impact of high doses of follicle-stimulating hormone during superovulation on the ovulatory follicle function in small ovarian reserve dairy heifersdagger. *Biol Reprod* **104**, 695-705 (2021).
 165. Clark, Z.L., Ruebel, M.L., Schall, P.Z., Karl, K.R., Ireland, J.J. & Latham, K.E. Follicular Hyperstimulation Dysgenesis: New Explanation for Adverse Effects of Excessive FSH in Ovarian Stimulation. *Endocrinology* **163** (2022).
 166. Teramoto, S., Osada, H. & Shozu, M. Prematurely ruptured dominant follicles often retain competent oocytes in infertile women. *Sci Rep* **9**, 15041 (2019).
 167. Xu, Y., Pan, C.S., Li, Q., Zhang, H.L., Yan, L., Anwaier, G., Wang, X.Y., Yan, L.L., Fan, J.Y., Li, D. & Han, J.Y. The Ameliorating Effects of Bushen Huatan Granules and Kunling Wan on Polycystic Ovary Syndrome Induced by Dehydroepiandrosterone in Rats. *Front Physiol* **12**, 525145 (2021).
 168. Pan, X., Liu, Y., Liu, L., Pang, B., Sun, Z., Guan, S., Yan, Q., Mo, T., Chen, R., Xu, M., Chang, Z. & Zhou, X. Bushen Jieyu Tiaochong Formula reduces apoptosis of granulosa cells via the PERK-ATF4-CHOP signaling pathway in a rat model of polycystic ovary syndrome with chronic stress. *J Ethnopharmacol* **292**, 114923 (2022).
 169. Brenjian, S., Moini, A., Yamini, N., Kashani, L., Faridmojtahedi, M., Bahramrezaie, M., Khodarahmian, M. & Amidi, F. Resveratrol treatment in patients with polycystic ovary syndrome decreased pro-inflammatory and endoplasmic reticulum stress markers. *Am J Reprod Immunol* **83**, e13186 (2020).
 170. Teede, H.J., Tay, C.T., Laven, J., Dokras, A., Moran, L.J., Piltonen, T.T., Costello, M.F., Boivin, J., Redman, L.M., Boyle, J.A., Norman, R.J., Mousa, A., Joham, A.E. & International, P.N. Recommendations from the 2023 International Evidence-based Guideline for the Assessment and Management of Polycystic Ovary Syndromedagger. *Hum Reprod* **38**, 1655-1679 (2023).
 171. Andersson, E.R. & Lendahl, U. Therapeutic modulation of Notch signalling--are we there yet? *Nat Rev Drug Discov* **13**, 357-378 (2014).
 172. Katoh, M. & Katoh, M. Precision medicine for human cancers with Notch signaling dysregulation (Review). *Int J Mol Med* **45**, 279-297 (2020).

173. Moore, G., Annett, S., McClements, L. & Robson, T. Top Notch Targeting Strategies in Cancer: A Detailed Overview of Recent Insights and Current Perspectives. *Cells* **9** (2020).
174. Almanza, A., Carlesso, A., Chinth, C., Creedican, S., Doultinos, D., Leuzzi, B., Luis, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Puschel, F., Sassano, M.L., Skoko, J., Agostinis, P., de Belleruche, J., Eriksson, L.A., Fulda, S., Gorman, A.M., Healy, S., Kozlov, A., Munoz-Pinedo, C., Rehm, M., Chevet, E. & Samali, A. Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J* **286**, 241-278 (2019).
175. Doultinos, D., Avril, T., Lhomond, S., Dejeans, N., Guedat, P. & Chevet, E. Control of the Unfolded Protein Response in Health and Disease. *SLAS Discov* **22**, 787-800 (2017).
176. Gonzalez-Teuber, V., Albert-Gasco, H., Auyeung, V.C., Papa, F.R., Mallucci, G.R. & Hetz, C. Small Molecules to Improve ER Proteostasis in Disease. *Trends Pharmacol Sci* **40**, 684-695 (2019).
177. Paganoni, S., Macklin, E.A., Hendrix, S., Berry, J.D., Elliott, M.A., Maiser, S., Karam, C., Caress, J.B., Owegi, M.A., Quick, A., Wymer, J., Goutman, S.A., Heitzman, D., Heiman-Patterson, T., Jackson, C.E., Quinn, C., Rothstein, J.D., Kasarskis, E.J., Katz, J., Jenkins, L., Ladha, S., Miller, T.M., Scelsa, S.N., Vu, T.H., Fournier, C.N., Glass, J.D., Johnson, K.M., Swenson, A., Goyal, N.A., Pattee, G.L., Andres, P.L., Babu, S., Chase, M., Dagostino, D., Dickson, S.P., Ellison, N., Hall, M., Hendrix, K., Kittle, G., McGovern, M., Ostrow, J., Pothier, L., Randall, R., Shefner, J.M., Sherman, A.V., Tustison, E., Vigneswaran, P., Walker, J., Yu, H., Chan, J., Wittes, J., Cohen, J., Klee, J., Leslie, K., Tanzi, R.E., Gilbert, W., Yeramian, P.D., Schoenfeld, D. & Cudkowicz, M.E. Trial of Sodium Phenylbutyrate-Taurursodiol for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med* **383**, 919-930 (2020).
178. Ruan, G., Wu, F., Shi, D., Sun, H., Wang, F. & Xu, C. Metformin: update on mechanisms of action on liver diseases. *Front Nutr* **10**, 1327814 (2023).
179. Li, J., Inoue, R., Togashi, Y., Okuyama, T., Satoh, A., Kyohara, M., Nishiyama, K., Tsuno, T., Miyashita, D., Kin, T., Shapiro, A.M.J., Chew, R.S.E., Teo, A.K.K., Oyadomari, S., Terauchi, Y. & Shirakawa, J. Imeglimin Ameliorates beta-Cell Apoptosis by Modulating the Endoplasmic Reticulum Homeostasis Pathway. *Diabetes* **71**, 424-439 (2022).
180. Michell, R.H. Do inositol supplements enhance phosphatidylinositol supply and thus support endoplasmic reticulum function? *Br J Nutr* **120**, 301-316 (2018).

181. Suliman, M., Case, K.C., Schmidtke, M.W., Lazcano, P., Onu, C.J. & Greenberg, M.L. Inositol depletion regulates phospholipid metabolism and activates stress signaling in HEK293T cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1867**, 159137 (2022).
182. Etrusco, A., Lagana, A.S., Chiantera, V., Buzzaccarini, G. & Unfer, V. Myo-inositol in assisted reproductive technology from bench to bedside. *Trends Endocrinol Metab* **35**, 74-83 (2024).
183. Zhang, Y., Wang, L., Weng, Y., Wang, D., Wang, R., Wang, H., Wang, L., Shen, S., Wang, H., Li, Y. & Wang, Y. Curcumin Inhibits Hyperandrogen-Induced IRE1alpha-XBP1 Pathway Activation by Activating the PI3K/AKT Signaling in Ovarian Granulosa Cells of PCOS Model Rats. *Oxid Med Cell Longev* **2022**, 2113293 (2022).
184. Zhang, Y., Weng, Y., Wang, D., Wang, R., Wang, L., Zhou, J., Shen, S., Wang, H. & Wang, Y. Curcumin in Combination with Aerobic Exercise Improves Follicular Dysfunction via Inhibition of the Hyperandrogen-Induced IRE1alpha/XBP1 Endoplasmic Reticulum Stress Pathway in PCOS-Like Rats. *Oxid Med Cell Longev* **2021**, 7382900 (2021).
185. Jabarpour, M., Aleyasin, A., Nashtaei, M.S., Lotfi, S. & Amidi, F. Astaxanthin treatment ameliorates ER stress in polycystic ovary syndrome patients: a randomized clinical trial. *Sci Rep* **13**, 3376 (2023).
186. Ma, R.-H., Ni, Z.-J., Thakur, K., Zhang, F., Zhang, Y.-Y., Zhang, J.-G. & Wei, Z.-J. Natural Compounds Play Therapeutic Roles in Various Human Pathologies via Regulating Endoplasmic Reticulum Pathway. *Medicine in Drug Discovery* **8** (2020).
187. Liu, H., Yang, J., Li, L., Shi, W., Yuan, X. & Wu, L. The Natural Occurring Compounds Targeting Endoplasmic Reticulum Stress. *Evid Based Complement Alternat Med* **2016**, 7831282 (2016).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科 生殖・発達・加齢医学専攻 産婦人科学 大須賀穰教授に謹んで感謝の意を表します。また、研究の進捗、方向性、論文作成に多大なるご指導ご鞭撻を頂きました同講座 原田美由紀准教授に深く感謝いたします。さらに、折に触れ御助言頂きました同講座 平池修准教授、甲賀かをり准教授（現千葉大学教授）、廣田泰准教授（現同講座教授）に深く感謝いたします。

本研究にあたり、実験、討論など数々の御助力を頂いた皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、大学院での研究生活を見守り、支え、応援して下さいました家族、妻に心より感謝いたします。本当にありがとうございました。