

博士論文

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

江森 千紘

# 目次

目次	1
序論	6
図表	
Fig. 0-1 卵胞発達	
Fig. 0-2 TGF $\beta$ スーパーファミリーのシグナル伝達	
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	14
緒言	15
材料と方法	16
マウス	
培地	
卵丘細胞の単離	
Oocytectomy (OOX) 法による卵丘-卵母細胞複合体からの卵母細胞の除去	
培養	
トータル RNA 抽出、cDNA 合成	
リアルタイム PCR	
マイクロアレイ解析	
統計処理	
結果	22
実験デザイン	
リアルタイム PCR によるマイクロアレイ解析結果の確認	
卵丘細胞遺伝子発現に対する卵母細胞と卵丘細胞の接触の影響	
卵丘細胞遺伝子発現に対する卵分泌因子の影響	
卵丘細胞遺伝子発現に対するエストロゲンの影響	
卵丘細胞遺伝子発現に対する卵分泌因子とエストロゲンが互いのシグナルへ与える影響	
(1) 卵分泌因子に対するエストロゲンの影響	
(1-1) 生物現象に与える影響	
(1-2) シグナル強度に与える影響	
(2) エストロゲンに対する卵分泌因子の影響	

(2-1) 生物現象に与える影響	
(2-2) シグナル強度に与える影響	
考察	31
図表	37
Table 1-1 本章で用いたプライマー	
Fig. 1-1 Oocyectomy (OOX) 法	
Fig. 1-2 VLAD について	
Fig. 1-3 マイクロアレイ解析に用いた実験デザインと比較のグループ	
Fig. 1-4 リアルタイム PCR によるマイクロアレイ解析結果の確認	
Fig. 1-5 卵丘細胞遺伝子発現に対する卵分泌因子の影響	
Fig. 1-6 卵丘細胞遺伝子発現に対するエストロゲンの影響	
Fig. 1-7 卵分泌因子によって制御される卵丘細胞遺伝子発現に対するエストロゲンの生物現象に与える影響	
Fig. 1-8 卵分泌因子によって制御される卵丘細胞遺伝子発現に対するエストロゲンのシグナル強度に与える影響	
Fig. 1-9 エストロゲンによって制御される卵丘細胞遺伝子発現に対する卵分泌因子の生物現象に与える影響	
Fig. 1-10 エストロゲンによって制御される卵丘細胞遺伝子発現に対する卵分泌因子の生物現象に与える影響 2	
Fig. 1-11 エストロゲンによって制御される卵丘細胞遺伝子発現に対する卵分泌因子のシグナル強度に与える影響	

<b>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について</b>	49
<b>第 1 節 エストロゲンによる卵分泌因子のシグナルの制御について</b>	50
緒言	51
材料と方法	54
マウス	
顆粒膜細胞の単離	
(1) 前胞状卵胞顆粒膜細胞	
(2) 卵丘-卵母細胞複合体、卵丘細胞、壁顆粒膜細胞	
培養	
トータル RNA 抽出、cDNA 合成	
リアルタイム PCR	
ウエスタンブロッティング	
妊孕性テスト	

卵巢組織切片の作成、およびヘマトキシリン・エオジン（HE）染色	
組織形態の判定	
統計処理	
結果	62
SMAD のリン酸化に対するエストロゲンシグナルの影響	
エストロゲンの制御を受ける BMP 阻害因子の探索	
Noggin の発現解析	
Noggin の発現制御解析	
(1) 卵丘細胞における Noggin の発現に対するエストロゲンの影響	
(2) 卵丘細胞における Noggin の発現に対する卵分泌因子の影響	
卵母細胞由来の BMP シグナルに対する Noggin の作用	
Noggin 過剰発現トランスジェニックマウスの解析	
(1) Noggin 過剰発現の確認	
(2) Noggin 過剰発現マウスの妊孕性テスト	
(3) Noggin 過剰発現マウスの組織形態観察	
考察	69
図表	74
Table2-1 本節で用いたプライマー	
Table2-2 SMAD 阻害因子および BMP アンタゴニスト	
Table2-3 Noggin 過剰発現マウス妊孕性テスト	
Fig. 2-1 エストロゲンが卵分泌因子を制御するメカニズムの仮説	
Fig. 2-2 pMES-Nog/Amhr2-Cre マウスの遺伝子型の確認	
Fig. 2-3 SMAD のリン酸化に対するエストロゲンの影響	
Fig. 2-4 Noggin の発現解析	
Fig. 2-5 卵丘細胞における Noggin の発現に対するエストロゲンの影響	
Fig. 2-6 卵丘細胞における Noggin の発現に対する卵分泌因子の影響	
Fig. 2-7 卵母細胞由来の BMP シグナルに対する Noggin の作用	
Fig. 2-8 Noggin 過剰発現の確認	
Fig. 2-9 Noggin 過剰発現マウスの組織形態観察	
<b>第 2 節 卵分泌因子によるエストロゲンシグナルの制御について</b>	86
緒言	87
材料と方法	89
マウス	
顆粒膜細胞の単離	
培養	

トータル RNA 抽出、cDNA 作成	
リアルタイム PCR	
統計処理	
結果	91
エストロゲン受容体の発現解析	
エストロゲン受容体の発現制御解析	
卵丘細胞におけるエストロゲン受容体結合因子の発現に対する卵分泌因子の影響	
エストロゲン受容体結合因子の発現解析	
考察	94
図表	98
Table2-4 本節で用いたプライマー	
Table2-5 エストロゲン受容体 (ESR) 結合因子	
Fig. 2-10 エストロゲンのシグナル伝達	
Fig. 2-11 <i>Esr2</i> の発現解析	
Fig. 2-12 卵丘細胞、壁顆粒膜細胞における <i>Esr2</i> の発現に対する卵分泌因子の影響	
Fig. 2-13 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	
Fig. 2-14 ESR 結合因子の発現解析	

<b>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</b>	<b>105</b>
緒言	106
材料と方法	109
マウス	
卵巣、精巣の回収、顆粒膜細胞の単離、培養	
トータル RNA 抽出、cDNA 合成	
リアルタイム PCR	
ウエスタンブロッティング	
統計処理	
結果	111
FOXL2 の発現解析	
壁顆粒膜細胞における FOXL2 発現に対する培養の影響	
壁顆粒膜細胞における FOXL2 発現に対する卵分泌因子とエストロゲンの影響	
壁顆粒膜細胞での遺伝子発現に対する FOXL2 発現変化の影響	
壁顆粒膜細胞における SOX9 発現誘導	
卵分泌因子とエストロゲンが pFF による SOX9 発現誘導に与える影響	
考察	115

図表	119
----	-----

Table3-1 本章で用いたプライマー

Fig. 3-1 FOXL2 の発現解析

Fig. 3-2 壁顆粒膜細胞における FOXL2 発現に対する培養の影響

Fig. 3-3 壁顆粒膜細胞における FOXL2 発現に対する卵分泌因子とエストロゲンの影響

Fig. 3-4 壁顆粒膜細胞における FOXL2 の転写制御を受ける遺伝子の発現に対する卵分泌因子とエストロゲンの影響

Fig. 3-5 壁顆粒膜細胞における SOX9 発現の誘導

Fig. 3-6 卵分泌因子とエストロゲンが pFF による SOX9 発現誘導に与える影響

総括	126
----	-----

Fig. 4-1 本研究が提唱する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機構のモデル

参考文献	131
------	-----

謝辞	142
----	-----

## 序論

卵巣卵胞の発達、原始卵胞の構築から始まる (Fig. 0-1)。原始卵胞は、扁平な体細胞（前顆粒膜細胞）が第一減数分裂前期で停止した状態の卵母細胞を取り囲むことで形成される。原始卵胞は 1 次卵胞へと発達するが、この時、卵母細胞は成長を開始し、顆粒膜細胞（granulosa cells）は立方状の形へ変化する。顆粒膜細胞が増殖し、2 層以上の顆粒膜細胞が卵母細胞を取り囲むと 2 次卵胞（または前胞状卵胞）と呼ばれるようになる。2 次卵胞がさらに発達すると、顆粒膜細胞の間に空洞（卵胞腔）ができ始め、その中を卵胞液と呼ばれる液が満たし、3 次卵胞（または胞状卵胞）と呼ばれるようになる。この時期の卵胞は卵胞腔ができ始めた初期胞状卵胞と、卵胞刺激ホルモン（Follicle stimulating hormone, FSH）の影響を受け、さらに卵胞腔が大きくなった後期胞状卵胞とに区別される。この胞状卵胞では卵胞腔の形成により、顆粒膜細胞は卵母細胞を取り囲む卵丘細胞（cumulus cell）と卵胞壁を裏打ちする壁顆粒膜細胞（mural granulosa cell）とに区別されるようになる。なお、本研究では、卵丘細胞と壁顆粒膜細胞を区別しない場合には顆粒膜細胞と表記する。その後、黄体形成ホルモン（Luteinizing hormone, LH）の刺激を受けることで卵母細胞の減数分裂が再開し、受精可能な卵母細胞が排卵される。

卵丘細胞と壁顆粒膜細胞は、胞状卵胞においてそれぞれ異なる機能を担っている。卵丘細胞は主に卵母細胞の発達支持に特化した細胞であり、一方、壁顆粒膜細胞は主に卵巣のもつ内分泌機能の一端を担う細胞である。例えば、卵丘細胞は、解糖やコレステロール産生、さらにアミノ酸の取り込みなどに高い代謝活性を持ち、これらの代謝産物（ピルビン酸やコレステロール、アミノ酸など）をギャップ結合と呼ばれる卵母細胞との接触面を介して卵母細胞に供給することで、卵母細胞の成長を支持している (Eppig et

al., 2005、Sugiura et al., 2005a、Su et al., 2008)。また、卵丘細胞は環状グアノシン 1 リン酸 (cGMP) を卵母細胞へ供給し、卵母細胞の減数分裂の停止や再開などを制御している (Norris et al., 2009、Zang et al., 2010、2011)。一方、壁顆粒膜細胞は、女性ホルモンの一種であるエストロゲンを合成する酵素、アロマターゼ (CYP19A1) を発現し、莢膜細胞で作られたアンドロゲンを基質として、エストロゲンを合成する働きをもつ (Drummond, 2006)。排卵期には、卵丘細胞は卵母細胞とともに排卵されるが、この際、多くの細胞外基質を分泌し、膨潤化して卵母細胞を保護する。この現象は「卵丘膨化」と呼ばれ、排卵に必須の現象である (Chen et al., 1993)。一方、壁顆粒膜細胞は卵巣に留まり、黄体細胞として妊娠の維持などに関与する。これらの卵丘細胞と壁顆粒膜細胞の機能の違いはそれらの細胞での遺伝子発現の違いにも表れており、卵丘細胞では、代謝や増殖に関連する遺伝子発現が壁顆粒膜細胞と比較して有意に高く、一方、壁顆粒膜細胞ではステロイドホルモン生産に関連する遺伝子の発現が卵丘細胞と比較して有意に高いことが知られる (Wigglesworth et al., 2015)。このように、卵丘細胞と壁顆粒膜細胞は、それぞれ重要な機能を担っており、これらの細胞が適切に発達し機能することは、卵巣が機能する上で非常に重要である。

これら顆粒膜細胞 (卵丘細胞および壁顆粒膜細胞) の発達、機能制御には卵母細胞が分泌する増殖因子 (以下、卵分泌因子) が重要な役割を果たすことが知られている (Eppig, 2001、Emori, 2014)。例えば、前述した卵丘細胞における高い代謝活性は、卵母細胞が卵分泌因子を介して卵丘細胞における代謝関連遺伝子の発現を促進することで制御されている (Eppig et al., 2005、Sugiura et al., 2005a、Su et al., 2008)。さらに、卵分泌因子は卵丘細胞の増殖を促進し (Vanderhyden et al., 1992、Lanuza et al., 1998)、アポトーシスを抑制する (Hussein et al., 2005)。卵分泌因子は壁顆粒膜細胞にも影響を持ち、壁顆粒膜細胞でのステロイドホルモン産生を制御すること (Vanderhyden et al., 1995)、壁顆粒膜細胞の黄体化を抑制することなどが知られている (El-Fouly et al., 1970)。また、



2次卵胞期の卵母細胞と、より未発達な原始卵胞期の体細胞を組み合わせた、卵母細胞と体細胞の発達ステージの異なる再構築卵胞では、卵胞の発達ステージは卵母細胞の発達ステージと一致するようになる (Eppig et al., 2002)。これは、卵母細胞が卵丘細胞や壁顆粒膜細胞の発達や機能を制御することで、卵胞の発達さえも制御していることを意味している。

卵分泌因子としては、成長分化因子 9 (Growth differentiation factor 9, GDF9) や、骨形成因子 (Bone morphogenetic factors, BMPs) に属する BMP15 や BMP6 など、トランスフォーミング成長因子  $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ , TGF $\beta$ ) スーパーファミリーに属するタンパク質がよく知られている (Elvin et al., 2000)。Gdf9 のノックアウトマウスにおいては、1 次卵胞から 2 次卵胞への顆粒膜細胞の分化が異常となり、それ以降の卵胞発達が進まず不妊となる (Dong et al., 1996)。一方、Bmp15 のノックアウトマウスでは不妊とはならないが、卵丘細胞を持たない胞状卵胞期の卵母細胞が見られるなど、卵胞発達に異常をきたし、排卵数の減少による妊孕性の低下が確認されている (Yan et al., 2001)。また、Bmp6 のノックアウトマウスにおいても、黄体形成ホルモンに対する顆粒膜細胞の応答性の低下による排卵数の減少、および妊孕性の低下が報告されている (Sugiura et al., 2010a)。また、Bmp15 のホモノックアウトと、Gdf9 のヘテロノックアウトを合わせたマウス (Bmp15<sup>-/-</sup>Gdf9<sup>+/-</sup>) では、顆粒膜細胞の分化が正常に起こらず、不妊となること (Yan et al., 2001)、合成タンパク質を用いた培養実験では、BMP15 と GDF9 を同時に培養液に添加することで、それぞれ単独で添加した場合に比べて、顆粒膜細胞の増殖やステロイド産生に対する影響がより顕著にみられるようになることから (McNatty et al., 2005a; McNatty et al., 2005b)、BMP15 と GDF9 は相乗的に作用して顆粒膜細胞の制御に関与していると考えられている。BMP15 や GDF9 はホモ 2 量体を形成して機能すると考えられてきたが、最近、BMP15/GDF9 のヘテロ 2 量体の存在が示唆されており (Peng et al., 2013)、これが BMP15 と GDF9 の相乗的な効果のメカニズムとし

て考えられる。しかしながら、卵母細胞が分泌するこれらの因子が実際にヘテロ 2 量体を形成して機能しているかどうかについては不明である。

一般に、TGF $\beta$  スーパーファミリーに属するタンパク質のシグナル伝達は、2 種類のセリン/スレオニンキナーゼ受容体、I 型および II 型受容体が必要であり、細胞内シグナル伝達は、SMAD と呼ばれるタンパク質を介して行われる (Fig. 0-2) (Massaous and Hata. 1997)。SMAD は特異型 (SMAD1, 2, 3, 5, 8)、共有型 (SMAD4)、および抑制型 (SMAD6, 7) の三種類に分類される。リガンドの結合後、これら 2 種類の受容体はヘテロ 4 量体を形成し、II 型受容体が I 型受容体をリン酸化して活性化する。活性化した I 型受容体は特異型 SMAD をリン酸化し、リン酸化された特異型 SMAD は、共有 SMAD と結合して細胞質から核内へ移行し、転写活性因子として作用する。顆粒膜細胞においては、BMP シグナルは SMAD1/5/8 によって伝達され、一方、GDF9 のシグナルは SMAD2/3 によって伝達されることから、顆粒膜細胞での BMP および GDF9 シグナルの影響はそれぞれ SMAD1/5/8 および SMAD2/3 のリン酸化状態により判断することができる。

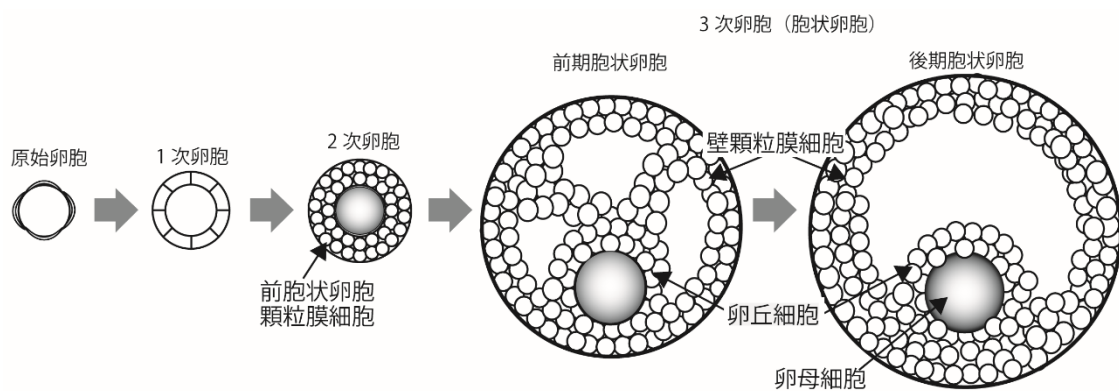
卵分泌因子以外にも、多くの卵胞内のホルモンや増殖因子が顆粒膜細胞の発達に関与するが、中でもエストロゲンのシグナルは重要であると考えられる。エストロゲン受容体には I 型 (estrogen receptor 1; ESR1、または ER $\alpha$ ) と II 型 (ESR2 または ER $\beta$ ) が存在する (Couse et al., 1999b)。Esr1 は卵巣では主に莢膜細胞で発現し、そのノックアウトマウスでは、胞状卵胞期で発達が停止し、黄体形成に異常が見られ、不妊となる (Lubahn et al., 1993、Couse et al., 1999b)。しかしながら、Esr1 ノックアウトマウスに性腺刺激ホルモンを処理することで排卵、黄体形成が起こることから (Rosenfeld et al., 2000)、Esr1 ノックアウトマウスでみられる異常は、卵巣に直接起因せず、卵巣の制御にかかわる内分泌異常に起因すると考えられている。一方、Esr2 は主に顆粒膜細胞で発現し、そのノックアウトマウスは、卵丘膨化に異常がみられ、排卵数、黄体数の減少と

ともに産仔数の減少が報告されている (Krege et al., 1998)。また、*Esr2* ノックアウトマウスの卵胞では、アロマターゼ発現の低下によりエストロゲン産生量が減少すること (Emmen et al., 2005)、卵胞閉鎖や早期に卵胞がなくなることが報告されている (Cheng et al., 2002)。これらの報告により、卵巣においては、エストロゲンの受容体としては ESR2 が主に機能を果たすと考えられている。また、*Esr1*、*2* のダブルノックアウトマウスでは顆粒膜細胞の発達に異常が見られ、不妊となるが (Couse et al., 1999a, Dupont et al., 2000)、このダブルノックアウトマウスでは、加齢に伴って顆粒膜細胞がセルトリ様細胞へと分化転換する。したがって、エストロゲンのシグナルは顆粒膜細胞の「雌性」の維持にも重要であると考えられている。

このように、顆粒膜細胞の発達において、個々の役割については多くの研究が行われてきた卵分泌因子とエストロゲンだが、近年、この2つのシグナルがともに働くことの重要性が示唆された。Sugiura らは、前述の卵丘膨化をモデルとして、卵丘膨化能の獲得と維持には卵分泌因子に加えてエストロゲンが必要であることを報告している (Sugiura et al., 2010b)。また、卵母細胞の減数分裂制御には、グアニル酸環状酵素 NPR2 による卵丘細胞での cGMP 合成が必要であるが (Zhang et al., 2010)、卵丘細胞での *Npr2* の発現には卵分泌因子とエストロゲンの両方が必要である (Zhang et al., 2011)。これらの報告より、卵丘細胞の発達や機能制御に対する卵分泌因子とエストロゲンの協調的な作用の重要性が示唆されるが、これまでのところ、卵丘細胞の発達や機能制御に対する卵分泌因子とエストロゲンの影響に関する報告はこの2報に限られており、卵分泌因子とエストロゲンの協調作用が卵丘細胞の発達制御に与える影響についてより広範な解析が必要とされている。また、卵分泌因子とエストロゲンはそれぞれ壁顆粒膜細胞の発達に重要な役割を果たすことは前述のとおりであるが、両者の協調的な作用の壁顆粒膜細胞の発達や機能制御における役割については解明されていない。

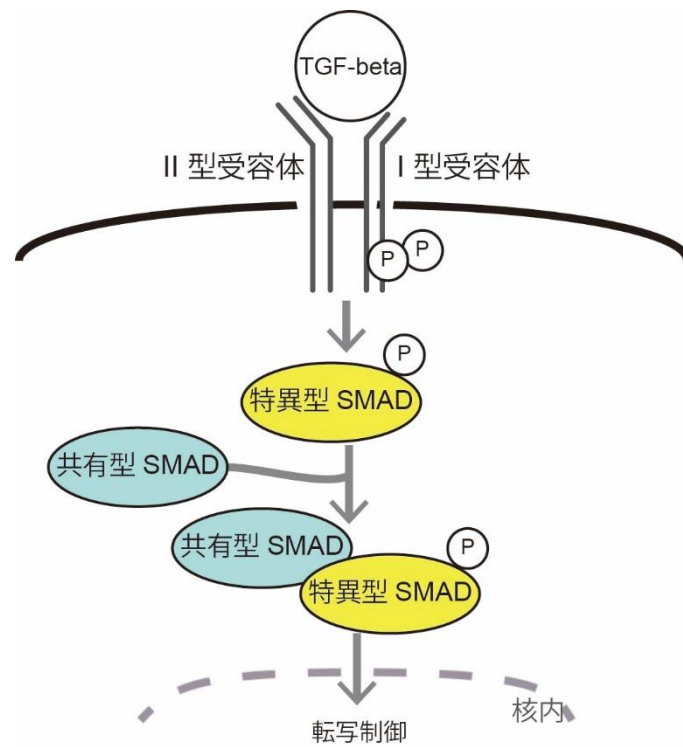
そこで本研究では、卵分泌因子とエストロゲンのシグナルが顆粒膜細胞 (卵丘細胞

と壁顆粒膜細胞)の発達制御に与える影響を明らかにすることを目的とした。第1章では、卵分泌因子とエストロゲンのシグナルの協調作用が卵丘細胞における遺伝子発現にどのような影響を及ぼすのか、マイクロアレイを用いて網羅的な解析を行った。続く第2章で、これら2者がどのように関わり合っているのか、メカニズムについての解析を行った。さらに第3章では、壁顆粒膜細胞に着目し、卵分泌因子とエストロゲンのシグナルの協調作用が壁顆粒膜細胞の発達に与える影響について解析を行った。



**Fig. 0-1 卵胞発達**

卵巣内の原始卵胞は、成長を開始した卵母細胞を立方状の体細胞が取り囲む1次卵胞へと発達し、2次卵胞では2層以上の体細胞（前胞状卵胞顆粒膜細胞）が卵母細胞を取り囲み、その外側を莢膜細胞が覆う。さらに発達すると、顆粒膜細胞の間に卵胞液で満たされた空洞ができ、3次卵胞（胞状卵胞）となる。胞状卵胞は初期胞状卵胞と、後期胞状卵胞とに区別される。また、顆粒膜細胞は卵丘細胞と壁顆粒膜細胞とに区別される。



**Fig. 0-2 TGFβ スーパーファミリーのシグナル伝達**

TGFβ スーパーファミリーのシグナルはセリン/スレオニンキナーゼ受容体 I 型、II 型から、SMAD を介して伝わる。II 型受容体が I 型受容体をリン酸化すると、特異型 SMAD がリン酸化される。リン酸化された特異型 SMAD は共有型 SMAD と結合して核内で転写活性因子として作用する。

## 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

## 緒言

本章では、卵分泌因子とエストロゲンが卵丘細胞の発達制御に与える影響を明らかにすることを目的とし、マイクロアレイ解析を用いて、卵丘細胞において両者によって制御される遺伝子発現を、遺伝子オントロジー解析を用いて網羅的に解析した。さらに、卵丘細胞の発達には、卵母細胞とのギャップ結合などの細胞接触を介したコミュニケーションの重要性も知られることから、その点についても解析することとした。

また、一般に、シグナルの相互作用は制御される遺伝子の種類に影響を及ぼすだけでなく、それぞれの発現量、すなわち、シグナルの強度にも影響を及ぼすと考えられる。そこで、遺伝子オントロジー解析に加えて、卵分泌因子とエストロゲンが互いのシグナルの強度に及ぼす影響を解析することにした。

遺伝子オントロジー解析、およびシグナル強度の解析で用いた手法は材料と方法で、また、具体的な実験デザインは結果の冒頭で述べる。



## 材料と方法

本マイクロアレイ解析は、John J. Eppig 博士（ジャクソン研究所、アメリカ合衆国）との共同研究として実施し、解析に用いたサンプルの準備およびマイクロアレイの実施はジャクソン研究所で行われた。リアルタイム PCR によるマイクロアレイ結果の確認実験、および遺伝子オンロジー解析、シグナル強度の解析は私自身で行った。

### マウス

マウスは 3 週齢の B6SJLF1 (C57BL/6×SJL1) マウスを本研究室で自家繁殖したもの、またはジャクソン研究所で飼育されているものを用いた。室温 22-25°C、湿度 40-60%、明期 12 時間、暗期 12 時間の条件、および、固形飼料と水を自由に与えて飼育し、実験に供した。なお、実験は全て東京大学またはジャクソン研究所の動物実験実施マニュアルに則り行った。

### 培地

培地には MEM $\alpha$  (Life Technology, Inc.) に、炭酸水素ナトリウム（和光純薬工業）を 2.2 mg/ml、ペニシリン G カリウム（明治製菓）を 75  $\mu$ g/ml、硫酸ストレプトマイシン（明治製菓）を 50  $\mu$ g/ml、牛血清アルブミン (BSA) (Sigma-Aldrich Co.) を 3 mg/ml 加えたものを基本培地として用いた。さらに、卵母細胞添加実験を行う際には、卵母細胞を卵核胞期で停止させておくために、基本培地にホスフォジエステラーゼ阻害剤である milrinone (Sigma-Aldrich Co.) を 10  $\mu$ M の濃度で添加した。

## 卵丘細胞の単離

3 週齢のマウスに、妊馬血清性腺刺激ホルモン (pregnant mare serum gonadotropin : PMSG) (あすか製薬) を 5 IU 腹腔内注射して卵胞発達を促進した。その 44-48 時間後に頸椎脱臼により安楽死させた後、開腹して卵巣を取り出した。取り出した卵巣を 2.5 ml の基本培地の入った 35 mm dish の中に入れ、26 ゲージの注射針を用いて、卵巣を小片に切り裂いて、胞状卵胞より卵丘-卵母細胞複合体をマイクロピペットを用いて回収した。回収した細胞は、数回洗浄してから実験に用いた。共培養に用いた卵母細胞は回収した卵丘-卵母細胞複合体よりピペッティングで卵丘細胞を取り除いて得た。

## Oocytectomy (OOX) 法による卵丘-卵母細胞複合体からの卵母細胞の除去

卵丘細胞は、その立体的な高次構造が破壊されるとその細胞特性を失ってしまうことが経験的に知られている。そこで、卵丘細胞の特性を維持したままで卵母細胞を除去するために、マイクロマニピュレーターを用いて OOX 法 (Buccione et al., 1990) により、卵丘-卵母細胞複合体 から卵母細胞を除去した (Fig. 1-1)。まず、卵丘-卵母細胞複合体 をホールディングピペットで吸引固定し (Fig. 1-1A)、インジェクションピペットで透明帯に小さな穴をあけた (Fig. 1-1B)。透明帯に穴をあけた卵丘-卵母細胞複合体 をホールディングピペットで強く吸引することにより、卵丘細胞の高次構造を保ったまま卵母細胞の細胞質をホールディングピペット内へ吸引除去した (Fig. 1-1CD)。

## 培養

培養には前述の基本培地を用いた。本研究で用いるエストロゲンとしては、最も強い生理活性を持つとされる  $17\beta$ -Estradiol (E2) を  $10^{-7}$  M の濃度で用いた。この濃度は、ラットの卵胞液に含まれる E2 濃度の報告から、生体の卵胞内に含まれると予測される E2 濃度に近い値である (Goff et al., 1979)。また、マウス卵丘-卵母細胞複合体の培養にお

いて、十分に E2 の影響が観察できる濃度である (Sugiura et al., 2010b)。17 $\beta$ -Estradiol (E2) (Sigma-Aldrich Co.) は、基本培地に 10<sup>-7</sup> M の濃度で添加して用いた。また、卵丘細胞と卵母細胞との共培養を行う実験では、1  $\mu$ l の培地につき 2 個の卵母細胞を加えて培養した。培養は、96 ウェルプレート (IWAKI) を用い、37°C、CO<sub>2</sub> 5%、O<sub>2</sub> 5%、湿度 100% に保たれたインキュベーター内で行った。

### トータル RNA 抽出、cDNA 合成

トータル RNA の抽出には RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用い、卵丘細胞 よりトータル RNA を抽出した。RNeasy Micro Kit では、1%  $\beta$ -メルカプトエタノール含有 RLT Buffer 75  $\mu$ l に細胞を入れ、さらに、70%エタノールを加えた。その後、細胞抽出液全量を RNeasy MinElute Spin カラムに移し、以降はプロトコルに従って、DNase 処理および洗浄を行った。RNA の溶出には 14  $\mu$ l の RNease free water を用いた。

得られたトータル RNA より、QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用いて cDNA 合成を行った。QuantiTect Reverse Transcription Kit では RNeasy Micro Kit により精製した RNA に DNA wipeout buffer を加え、42°C で 2 分置いた後、Quantiscript Reverse Transcriptase と Quantiscript RT Buffer、RT Primer Mix を加え 42°C で 30 分間、95°C で 3 分間反応させ cDNA を得た。

### リアルタイム PCR

リアルタイム PCR には、QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) と、リアルタイム PCR 機器 StepOnePlus Real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いた。内部標準としてハウスキーピング遺伝子である ribosomal protein L19 (*Rpl19*) を用い、遺伝子発現は *Rpl19* の発現量を基準とした  $\Delta\Delta C_t$  法 (Livak and Schmittgen, 2001) により、標準とするサンプルの発現量に対する比で表した。非特異的なシグナルを検出することを

避けるために、リアルタイム PCR 解析終了後に dissociation-curve analyses を行い、さらに PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にかけ、予想されたサイズのバンドが 1 本だけ検出されることを確認した。なお、本章で用いたプライマーは Table 1-1 に示した。

## マイクロアレイ解析

マイクロアレイ実験は、John J. Eppig 博士との共同研究として、ジャクソン研究所のマイクロアレイサービスで行われた。以下に、方法について簡潔に示す。

トータルRNAの精製にはRNeasy Micro Kit (Qiagen) を上記と同様の方法で用いた。トータルRNAの質と収率はQuan-iT RiboGreen Reagent (Invitrogen) と共にBioanalyzer 2100 とRNA 6000 Pico LabChip assay (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) をプロトコルに従って用いた。実験に必要な量のcRNAを得るため、回収したトータルRNA (10 ng) より two-Cycle Eukaryotic Target Labeling Assay パッケージ (Affymetrix) を用いてcDNAの合成およびin vitro転写を行い、cRNAを増幅させた。15 µgのビオチン標識したcRNAを Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Arrays に45°Cで16時間ハイブリダイゼーションした。その後、Fluidics Station 450 instrument (Affymetrix) にを用いプロトコルに従って染色・洗浄を行った。GeneChip 3000 laser confocal slide scanner (Affymetrix) を用いてアレイ画像を得、Gene Chip Operating Software version 1.2 (GCOS, Affymetrix) を用いて数値化した。各プローブセットの数値化データは、Expression Console (Version 1.1) ソフトウェア (Affymetrix) を用いて解析した。マイクロアレイには、すべての実験群について独立した3つのサンプルを用いた。

得られたマイクロアレイ解析結果は、東京大学でデータ解析を行った。各比較において、統計処理により Q 値が 0.05 以下 ( $Q \text{ value} < 0.05$ )、遺伝子発現が 1.5 倍以上の変化 ( $\text{Fold Change} > 1.5$ ) を示した遺伝子について、比較した 2 つの実験区で発現差があると定義した。

各比較において発現差があると定義された遺伝子セットについて、VLAD (<http://proto.infomatics.jax.org/prototypes/vlad/>)を用いて、遺伝子オントロジー解析を行った。VLADを用いることで通常の遺伝子オントロジー解析に加えて、複数の遺伝子セットに関連した遺伝子オントロジーの関連性を視覚化することができる。以下では、2種類の遺伝子セット（遺伝子セット a と b）の解析結果を模式的に示した Fig. 1-2 を用いて、VLAD による遺伝子オントロジー解析結果の解釈の仕方を解説する。

まず、それぞれの四角が一つ一つの遺伝子オントロジー（GO）を表しており、各遺伝子オントロジーの関係性はそれぞれ異なる色の矢印で表されている。それぞれの矢印の意味は Fig. 1-2B に示した。また、Fig. 1-2A では遺伝子セット a の解析結果を緑、もう一方の遺伝子セット b の解析結果を赤で示している。この時、それぞれの四角（遺伝子オントロジー、GO）中の緑と赤色の割合は、それぞれの遺伝子オントロジーに対して各遺伝子セットから関連付けられた遺伝子の統計的な比率を示している。例えば、遺伝子オントロジーA（GO: A）について見てみると、緑と赤の割合がほぼ同じであることから、遺伝子セット a と b は同じ比率でこの遺伝子オントロジーに関連付けられた遺伝子が存在することを示している。遺伝子オントロジーB（GO: B）は緑色の割合が多いことから、遺伝子セット a の遺伝子は、遺伝子セット b のものと比べてより顕著（有意）にこの GO: B に関連付けられた遺伝子が存在する。一方、GO: C では、遺伝子セット b に関連付けられた遺伝子が顕著に存在することを示している。このように、VLAD を用いた遺伝子オントロジー解析では、2種類以上の遺伝子セットを用いた遺伝子オントロジー解析結果を視覚的に比較することができる。

上記、遺伝子オントロジー解析に加えて、シグナル強度に着目した解析も行った。解析方法としては、卵分泌因子、または E2 によって有意な発現制御を受ける遺伝子について、横軸に卵分泌因子、またはエストロゲン単独によって発現制御を受ける遺伝子発現量の比（Fold change）を、縦軸に卵分泌因子と E2 によって発現制御を受ける遺伝

子発現量比をとり、プロットし、近似直線の傾きを評価した。さらに、*Bmp15* 欠損マウス卵丘細胞でのマイクロアレイ解析より (Su et al., 2008)、卵母細胞が分泌する BMP15 については、その下流で制御されると考えられる遺伝子が既に報告されていることから、BMP15 の下流遺伝子発現に着目した解析も行った。

## 統計処理

リアルタイム PCR による遺伝子発現の確認にはすべて 3 回以上、独立した実験をおこなった。統計処理にはマイクロソフト Excel を使い、t 検定を用いた。危険率  $p < 0.05$  以下をもって有意差があるとした。

## 結果

### 実験デザイン

まず、マイクロアレイ解析の概要を説明する。今回、解析に用いたサンプルは以下の6種類の条件で培養した卵丘細胞サンプルである (Fig. 1-3A)。

実験区①： 卵丘-卵母細胞複合体の状態 で培養

実験区②： 卵丘-卵母細胞複合体を E2 添加培地で培養

実験区③： 卵丘細胞のみを培養

実験区④： 卵丘細胞を卵母細胞と共培養

実験区⑤： 卵丘細胞を E2 添加培地で培養

実験区⑥： 卵丘細胞を卵母細胞とともに E2 添加培地で培養

これらの卵丘細胞サンプルを用いたマイクロアレイ解析結果について、次の7種類の比較解析を行った (Fig. 1-3B)。

比較 1： 卵丘細胞 (実験区③) vs 卵丘細胞 + 卵母細胞 (実験区④)

比較 2： 卵丘細胞 (実験区③) vs 卵丘細胞 + E2 (実験区⑤)

比較 3： 卵丘細胞 + E2 (実験区⑤) vs 卵丘細胞 + 卵母細胞 + E2 (実験区⑥)

比較 4： 卵丘細胞 + 卵母細胞 (実験区④) vs 卵丘細胞 + 卵母細胞 + E2 (実験区⑥)

比較 5： 卵丘細胞 (実験区③) vs 卵丘細胞 + 卵母細胞 + E2 (実験区⑥)

比較 6： 卵丘-卵母細胞複合体 (実験区①) vs 卵丘細胞 + 卵母細胞 (実験区④)

比較 7： 卵丘-卵母細胞複合体 + E2 (実験区②) vs 卵丘細胞 + 卵母細胞 + E2 (実験区⑥)

比較 1、2 ではそれぞれ卵分泌因子、または E2 単独が卵丘細胞での遺伝子発現に与える影響を解析することができる。比較 3-5 は、卵分泌因子とエストロゲンのシグナル相互作用に着目しており、比較 3 では E2 存在下での卵丘細胞遺伝子発現に対する卵分

泌因子の影響、比較 4 では卵分泌因子存在下での卵丘細胞遺伝子発現に対する E2 の影響、比較 5 では卵丘細胞遺伝子発現に対する卵分泌因子と E2 混合の影響を解析することができる。また、比較 6、7 では卵丘細胞と卵母細胞のギャップ結合などの接触の有無が卵丘細胞遺伝子発現に与える影響を解析できる。

### リアルタイム PCR によるマイクロアレイ解析結果の確認

今回のマイクロアレイの解析結果が正しいことをリアルタイム PCR を用いて確認した。Fig. 1-3 に示した各比較において、本研究で定めた基準（Q value<0.05、Fold change>1.5）で発現差があると定義された遺伝子を、それぞれの比較結果から選び、リアルタイム PCR で発現を確認した。また、比較 6、および比較 7 では発現差のある遺伝子がなかった (Fig. 1-3)。今回リアルタイム PCR で発現を確認したのは *Ccnd2*、*Inhbb*、*Rgs13*、*Sgpp2*、*Pdgfb*、*Ptk2* の 6 遺伝子である。これらの遺伝子について卵丘細胞における mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析し、マイクロアレイの結果と比較した (Fig.1-4)。その結果、リアルタイム PCR の結果とマイクロアレイ結果はほぼ一致しており、今回のマイクロアレイ結果は十分に信頼できるものだと考えられる。

### 卵丘細胞遺伝子発現に対する卵母細胞と卵丘細胞の接触の影響

卵母細胞と卵丘細胞間のギャップ結合などの接触を介したシグナル伝達が卵丘細胞遺伝子発現に与える影響を明らかにするために、次の 2 種類の比較を行った (Fig. 1-3B 参照)。一つ目は、卵丘-卵母細胞複合体の状態で培養した卵丘細胞（実験区①、接触あり）と、OOX による卵母細胞の除去後、卵母細胞と共培養した卵丘細胞（実験区④、接触なし）の比較（比較 6）であり、2 つ目は、エストロゲン存在下で同様の比較を行ったもので、卵丘-卵母細胞複合体を E2 添加培地で培養した区（実験区②、接触あり）と、卵丘細胞を E2 添加培地で卵母細胞と共培養した区（実験区⑥、接触なし）の比較



である（比較 7）。

興味深いことに、卵丘細胞と卵母細胞間の接触で有意に発現が変化する遺伝子は一つも確認されなかった（Fig. 1-3B）。すなわち、少なくとも本培養条件下では、卵母細胞と卵丘細胞の接触の有無は、卵丘細胞での遺伝子発現に顕著な影響を持たないことが明らかとなった。

### 卵丘細胞遺伝子発現に対する卵分泌因子の影響

卵丘細胞における遺伝子発現に対する卵分泌因子の影響を解析するために、卵丘細胞を単独培養した区（実験区③）と、卵丘細胞と卵母細胞を共培養した区（実験区④）における卵丘細胞遺伝子発現を比較した（比較 1）。その結果、卵丘細胞と卵母細胞の共培養により 2523 の遺伝子が有意な発現促進を受け、一方、1769 の遺伝子が有意な発現抑制を受けていた（Fig. 1-3B）。

次に、これらの卵丘細胞において卵分泌因子によって有意に促進、または抑制を受ける遺伝子について、VLAD を用いて遺伝子オントロジー解析を行った（Fig. 1-5）。Fig. 1-5A では、卵丘細胞において卵分泌因子によって発現が促進される遺伝子セットを緑、卵分泌因子によって発現が抑制される遺伝子セットを赤で示してある（Fig. 1-5 A）。卵分泌因子によって発現が促進される遺伝子セットが有意に関連付けられた遺伝子オントロジー（以下「促進される遺伝子オントロジー」と表現する）のうち、Q 値が最も小さかったものは「cellular metabolic process（GO: 0044237）」で、卵分泌因子によって発現が抑制される遺伝子セットが有意に関連付けられた遺伝子オントロジー（以下「抑制される遺伝子オントロジー」と表現する）のうち、Q 値が最も小さかったものは「positive regulation of biological process（GO: 0048518）」であった（データ未掲載）。これらの上位にみられる遺伝子オントロジーに関連付けられる遺伝子は 3000 を超えており、それぞれの遺伝子オントロジーの示す意味合いが大きく、特異的に卵丘細胞内のどのような現

象を制御しているのか理解することが難しい。そこで、より特異的な現象に絞るために、各オントロジーに関連付けられている遺伝子が 500 以下のオントロジーに着目した。Fig. 1-5B に、Q 値の小さい上位 10 の遺伝子オントロジーのリストを示した。卵分泌因子が、卵丘細胞において、有意に促進する遺伝子オントロジーには「Cell phase (GO: 0022403)」、「Cell cycle process (GO: 0022403)」、「M phase (GO: 0000279)」など、細胞増殖に関連するものが多く見られ、実際、卵丘細胞の細胞増殖に必須だとされる Cyclin D2 (*Ccnd2*) 遺伝子発現は、リアルタイム PCR を用いた発現確認においても卵分泌因子によって約 30 倍と有意に促進されていた (Fig. 1-4)。一方、卵分泌因子によって卵丘細胞において抑制される遺伝子オントロジーは (Fig. 1-5C)、「positive regulation of program cell death (GO: 0043068)」、「positive regulation of apoptotic process (GO: 0043065)」、「positive regulation of cell death (GO: 0010942)」など、アポトーシスに関連したものも多く見られた。これらは卵母細胞が卵丘細胞の細胞増殖を促進し、アポトーシスを抑制するという過去の報告 (Hussein et al., 2005) と一致しており、本研究で用いたマイクロアレイの信頼性を裏付ける結果である。

### 卵丘細胞遺伝子発現に対するエストロゲンの影響

卵丘細胞における遺伝子発現に対するエストロゲンの影響を解析するために、卵丘細胞の単独培養区 (実験区③) と、卵丘細胞を E2 添加培地で培養した区 (実験区⑤) における卵丘細胞遺伝子発現を比較した (比較 2)。その結果、955 の遺伝子が E2 添加培地で卵丘細胞を培養することにより有意に発現促進を受けていた。一方、590 の遺伝子が有意に発現抑制を受けていた (Fig. 1-3B)。

次に、これらの卵丘細胞において E2 によって有意に促進、または抑制を受ける遺伝子について、VLAD を用いた遺伝子オントロジー解析を行った (Fig. 1-6)。この図では E2 によって促進を受ける遺伝子セットを緑、抑制を受ける遺伝子セットを赤で示し

である (Fig. 1-6A)。E2 によって Q 値が最も小さかった促進される遺伝子オントロジーは「metabolic process (GO: 0008152)」, 一方、Q 値が最も小さかった抑制される遺伝子オントロジーは「localization (GO: 0051179)」であった (データ未掲載)。上記の卵分泌因子の影響の解析と同様に、より特異的な現象を理解するために、関連付けられる遺伝子が 500 以下の遺伝子オントロジーに着目した (Fig. 1-6BC)。卵丘細胞において E2 によって促進される遺伝子オントロジーは「mitotic cell cycle (GO: 0000278)」, 「M phase of mitotic cell cycle (GO: 00000087)」, 「cell cycle process (GO: 0022402)」であり、いずれも細胞増殖に関連する遺伝子オントロジーであった。一方、抑制される遺伝子オントロジーは「cell adhesion (GO: 0007155)」, 「biological adhesion (GO: 0022610)」, 「cell migration (GO: 0016477)」であった。これらから、エストロゲンのシグナルは卵丘細胞の細胞接着や移動を抑制していると考えられる。

## **卵丘細胞遺伝子発現に対する卵分泌因子とエストロゲンが互いのシグナルへ与える影響**

次に、卵分泌因子とエストロゲンのシグナルが関わり合って制御する卵丘細胞遺伝子発現について解析を行った。卵分泌因子とエストロゲンのシグナルの一方の存在が、もう一方のシグナルの卵丘細胞での遺伝子発現制御に与える影響を解析した。すなわち、卵分泌因子によって制御される遺伝子発現が、エストロゲンの有無によってどのように変化するか、または、エストロゲンによって制御される遺伝子発現が、卵分泌因子の有無によってどのように変化するかを解析した。

### **(1) 卵分泌因子に対するエストロゲンの影響**

#### **(1-1) 生物現象に与える影響**

卵分泌因子によって制御される遺伝子発現に対するエストロゲンの影響を解析す

るために、卵丘細胞での遺伝子発現に対する卵分泌因子の影響を E2 が存在しない場合（比較 1）と、E2 が存在する場合（比較 3）で比較した（Fig. 1-7）。

E2 非存在下では、卵分泌因子が卵丘細胞で 2523 の遺伝子の発現を有意に促進し、一方、1769 の遺伝子の発現を有意に抑制したと先に述べたが（Fig. 1-3B）、E2 存在下では、卵母細胞は 1619 の遺伝子発現を促進し、1239 の遺伝子発現を抑制した（Fig. 1-3B）。この時、E2 存在下で卵分泌因子によって促進、または抑制を受ける遺伝子のそれぞれ 75%（1232/1619）と 65%（818/1239）が卵分泌因子単独で制御を受ける遺伝子と一致していた（Fig.1-7AB）。

次に、卵分泌因子によって制御される卵丘細胞遺伝子について、E2 が存在する場合としない場合で、遺伝子オントロジー解析結果を VLAD を用いて視覚的に比較した（Fig. 1-7CD）。その結果、卵分泌因子によって促進される遺伝子オントロジーについて見てみると（Fig.1-7C）、E2 が存在しない場合（比較 1、オレンジ）と、E2 が存在する場合（比較 3、緑）で、各遺伝子オントロジーにおいて、それぞれの色の占める比率はほぼ同等であった。同様に、卵分泌因子によって抑制される遺伝子オントロジー（Fig.1-7D）についても、E2 が存在しない場合（比較 1、ピンク）と、E2 が存在する場合（比較 3、赤）でそれぞれの色の占める比率はほぼ同等であった。このことは、卵分泌因子によって制御される卵丘細胞の生物現象（遺伝子オントロジー）は E2 の存在の有無によって影響を受けない、すなわち、E2 の存在は、卵丘細胞での卵分泌因子シグナルに大きな影響を与えないと考えられた。実際、E2 存在下で卵分泌因子によって促進される遺伝子オントロジーは、卵分泌因子単独の影響と同様に「metabolic process (GO: 0008152)」、「cell cycle phase (GO: 0022403)」など、細胞の代謝や増殖に関するものであった。一方、抑制されるものについても「Negative regulation of cellular process (GO: 0048523) など、卵分泌因子単独でも有意に制御を受けていた遺伝子オントロジーであった。

## (1-2) シグナル強度に与える影響

次に、E2 の存在が卵分泌因子シグナルの強度に与える影響を解析した。Fig. 1-8 に示したように、横軸に、卵分泌因子によって発現制御を受ける卵丘細胞遺伝子の発現量比 (Fold change) (比較 1) を、縦軸に卵分泌因子と E2 によって発現制御を受ける遺伝子の発現量比 (比較 5) をとり、卵分泌因子によって有意な発現制御を受ける遺伝子についてプロットした (Fig. 1-8、赤)。この際、E2 が直接発現制御する遺伝子を除くため、E2 単独で有意な発現制御を受ける遺伝子 (比較 2) は除外した。この赤いプロットについて近似直線を引いたところ、有意な相関が見られ ( $p < 0.01$ 、相関係数 = 0.888)、また、近似直線の傾きは、1.0889 であった。近似直線の傾きが 1 より大きいということは、卵分泌因子が単独で作用するよりも、卵分泌因子と E2 の両方が同時に作用したときの方が、卵丘細胞での各遺伝子の発現は大きく変化することを意味しており、E2 の存在は、卵分泌因子シグナルを増強すると考えられる。次に、卵母細胞が分泌する BMP15 によって発現制御を受ける遺伝子 (Su et al., 2008) (Fig. 1-8、緑) に着目して、同様に近似直線を引いたところ、有意な相関が見られ ( $p < 0.01$ 、相関係数 = 0.937)、近似直線の傾きは 1.1869 であった。このことから、卵母細胞が分泌する BMP15 のシグナルは、エストロゲンによる影響を強く受けると考えられた。

## (2) エストロゲンに対する卵分泌因子の影響

### (2-1) 生物現象に与える影響

次に、E2 によって制御される卵丘細胞における遺伝子発現に対する卵分泌因子の影響を解析するために、卵丘細胞での遺伝子発現に対する E2 の影響を卵分泌因子が存在しない場合 (比較 2) と、存在する場合 (比較 4) で比較した (Fig. 1-9、1-10)。

卵分泌因子非存在下で、E2 が卵丘細胞で 955 の遺伝子発現を有意に促進し、590

の遺伝子の発現を有意に抑制したことは先に述べたが (Fig. 1-3B)、卵分泌因子存在下では、E2 は 256 の遺伝子発現を促進し、266 の遺伝子を抑制した (Fig. 1-3B)。この時、E2 による制御を受ける遺伝子のうち、約 63% (162/256) と 72% (192/266) の遺伝子が卵分泌因子存在下でのみ E2 によってそれぞれ促進、抑制を受けていた (Fig. 1-9D、Fig. 1-10D)。

次に、E2 によって促進される卵丘細胞遺伝子発現について、卵分泌因子が存在する場合としない場合で、遺伝子オントロジー解析結果を VLAD を用いて視覚的に比較した (Fig. 1-9)。その結果、E2 によって促進される遺伝子オントロジーは卵分泌因子が存在しない場合 (比較 2、オレンジ) と卵分泌因子が存在する場合 (比較 4、緑) で、それぞれの色の占める比率に差異が見られた (Fig. 1-9A)。卵分泌因子や E2 単独の影響の解析と同様に、より特異的な現象を理解するために、関連付けられる遺伝子が 500 以下の遺伝子オントロジーに着目したところ、卵分泌因子存在下で E2 によって有意に促進される遺伝子オントロジーは「vasculature development (GO: 00944)」や「blood vessel development (GO: 0001568)」など、血管新生に関するものに加え、「enzyme-linked receptor signaling pathway (GO: 0007167)」、「positive regulation of protein tyrosine kinase activity (GO: 0061098)」、「regulation of protein tyrosine kinase activity (GO: 0061097)」といったタンパク質のリン酸化シグナル経路 (細胞内シグナル伝達経路) に関連するものが含まれていた (Fig. 1-9B)。さらに、「enzyme-linked receptor protein signaling pathway (GO: 0007167)」の下流についてさらに詳細に調べると、「epidermal growth factor (EGF) receptor signaling pathway (GO: 0007173)」、「tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains (TIE) receptor signaling pathway (GO: 0048014)」、「vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor signaling pathway (GO: 0048010)」、「platelet-derived growth factor (PDGF) receptor signaling pathway (GO: 0048008)」など具体的な細胞シグナル伝達経路に関連する遺伝子オントロジーが含まれていた (Fig. 1-9E)。

E2 によって抑制される遺伝子オントロジー (Fig. 1-10) についても同様に、卵分泌因子が存在しない場合 (比較 2、ピンク) と、卵分泌因子が存在する場合 (比較 4、赤) で、それぞれの色の占める比率に顕著な差異が見られた。卵分泌因子存在下で E2 によって抑制を受ける遺伝子オントロジーは、「muscle tissue development (GO: 0060537)」 「muscle organ development (GO: 0007517)」 など、筋肉の発達に関連する遺伝子オントロジーを有意に抑制していた (Fig. 1-10B)。

## (2-2) シグナル強度に与える影響

卵分泌因子に対する E2 の影響で行った解析と同様に、卵分泌因子の存在がエストロゲンシグナルに与える影響を解析した。Fig. 1-11 に示したように、横軸に E2 によって発現制御を受ける卵丘細胞遺伝子 (比較 2) の発現量比を、縦軸に卵分泌因子と E2 によって発現制御を受ける遺伝子 (比較 5) の発現量比をとり、E2 単独によって有意な発現制御を受ける遺伝子についてプロットした (Fig. 1-11)。この際、卵分泌因子が直接発現制御する遺伝子を除くために、卵分泌因子単独で有意に発現制御を受ける遺伝子 (比較 1) は除外した。近似直線をひいたところ、有意な相関が見られ ( $p < 0.01$ 、相関係数 = 0.706)、近似直線の傾きは 0.5631 であった。このことから、卵分泌因子はエストロゲンシグナルを減弱させる可能性が考えられるが、この点については考察する。

## 考察

本章では、卵母細胞の発達支持に重要である卵丘細胞に着目し、卵分泌因子とエストロゲンが卵丘細胞遺伝子発現に与える影響を明らかにするために、マイクロアレイ解析を行った。その結果、E2 は卵分泌因子によって制御される遺伝子発現に大きな影響を及ぼさない（すなわち、生物現象を変化させない）が、卵分泌因子のシグナル、中でも BMP15 のシグナルを増強することが示唆された。一方、卵分泌因子は E2 によって制御される生物現象を変化させ、卵胞内のシグナル伝達に関係する遺伝子の発現を促進することが示唆された。また、卵母細胞と卵丘細胞間の接触の有無は、卵丘細胞遺伝子発現に影響しないことが示唆された。

以下では、まず卵丘細胞での遺伝子発現に対する卵母細胞との接触の影響、卵分泌因子の影響、エストロゲンの影響についてそれぞれ考察したのち、卵分泌因子とエストロゲンの相互作用について考察する。

まず、卵丘細胞における遺伝子発現に対する卵母細胞と卵丘細胞の接触の有無の影響を解析した結果、驚いたことに、今回定めた有意基準（Q value<0.05、Fold Change>1.5）において、有意発現差のある遺伝子は認められなかった。卵丘細胞と卵母細胞のギャップ結合に必要なタンパク質である connexin37 を欠損させて、卵母細胞と卵丘細胞間のギャップ結合を阻害したマウスでは、胞状卵胞へ発達せず、排卵不全のため不妊となることから（Simon et al., 1997）、卵胞発達における卵母細胞と卵丘細胞のギャップ結合を介したシグナル伝達の重要性は明白であり、今回のマイクロアレイ解析において、ギャップ結合を含む細胞接触の有無によって卵丘細胞での遺伝子発現に全く変化が見られなかったことは驚くべきことである。この理由として、本実験では、ホルモン刺激により十分に発達させた胞状卵胞の卵丘細胞を用いているが、ギャップ結合は、おそ



らく今回用いた卵胞発達時期よりも早い段階の卵胞発達時期において卵丘細胞の発達に重要な役割を果たし、卵胞が十分発達した胞状卵胞期では、ギャップ結合による相互作用よりも、分泌因子による卵丘細胞制御の方が優位になるのだと考えられる。ただし、この時期のギャップ結合が全く必要ないわけではない。例えば、卵母細胞は自身で代謝をまかなえないため、ピルビン酸やアミノ酸の供給をギャップ結合を介して卵丘細胞に依存している (Su et al., 2009)。さらに、卵母細胞は減数分裂を停止しているが、これは卵丘細胞からギャップ結合を介して **cGMP** が卵母細胞に伝達されることで維持されている (Norris et al., 2009)。すなわち、胞状卵胞期でのギャップ結合は、卵丘細胞からの卵母細胞の制御に重要であり、卵母細胞による卵丘細胞制御には必ずしも必要ではないと考えられる。

卵丘細胞遺伝子発現に対する卵分泌因子の影響を解析した結果、卵分泌因子は、卵丘細胞における代謝や細胞増殖を促進することが示唆された。卵母細胞による卵丘細胞での代謝制御については、卵分泌因子は卵丘細胞における解糖系関連遺伝子 (*Eno1*, *Pkm2*, *Ldha*, *Pfkfb*) やコレステロール産生関連遺伝子 (*Hmgcr*, *Mvk*, *Pmvk*, *Mvd*, *Idi1*, *Fdps*, *Fdft1*, *Sqle*, *Lss*, *Cyp51*, *Tm7sf2*, *Sc4mol*, *Ebp*, *Nsdhl*, *Sc5d*, *Dhcr7*)、またはアミノ酸輸送関連遺伝子 (*Slc38a3*) の遺伝子発現を促進することで、卵丘細胞での代謝を制御することが報告されている (Eppig et al., 2005, Sugiura et al., 2005a、Su et al., 2008)。今回のマイクロアレイ解析から、卵分泌因子の制御を受けることが既に報告されてきたこれらの遺伝子に加えて、解糖系関連遺伝子 (*Pfkfb1*, *Aldoc*, *Tpi1*, *Pgk1*, *Pgam1*)、コレステロール新生関連遺伝子 (*Hmgcs1*)、アミノ酸輸送関連遺伝子 (*Slc1a4*, *Slc1a5*, *Slc38a1*, *Slc38a5*, *Slc3a2*, *Slc6a15*, *Slc6a6*, *Slc6a9*, *Slc7a10*) が卵分泌因子によって促進される遺伝子として新たに同定された。

また、卵分泌因子は卵丘細胞のアポトーシスを抑制することは既に報告されているが (Hussein et al., 2005)、今回のマイクロアレイ解析により、それ以外にも、「actin

filament-based process (GO: 0030029)」、「blood vessel development (GO:0001568)」、「cell adhesion (GO:0007155)」といった遺伝子オントロジーを抑制する可能性が示唆された。実際、排卵期卵胞の黄体化初期では、顆粒膜細胞の形態変化や血管新生が起こり (Richards. 2005)、また、卵母細胞は卵胞の黄体化を抑制することが古くから知られている (El-Fouly et al., 1970)。今後、上記の遺伝子オントロジーに関連付けられた遺伝子について、発現の解析や機能面での解析を行う必要があるが、卵母細胞による、これらの遺伝子オントロジーの抑制は卵母細胞が卵胞の黄体化を抑制するメカニズムに関与する可能性が考えられる。

次に、卵丘細胞遺伝子発現に対する E2 の影響を解析した結果、E2 は、卵丘細胞における細胞増殖を促進することが示唆された。これは、エストロゲンがアポトーシスを抑制し (Billig et al., 1993)、顆粒膜細胞の増殖を促進する (Rao et al., 1978) という過去の報告に一致している。一方、E2 は、卵丘細胞の細胞接着を抑制することが示唆された。これまで卵丘細胞の細胞接着能などに対する E2 の影響を解析した報告はされていないため、E2 による遺伝子発現制御が、実際に機能面で卵丘細胞の接着に何らかの影響を及ぼすのかについては、今後の研究課題である。

次に、E2 が卵分泌因子シグナルに与える影響を解析した結果、E2 は、卵分泌因子が制御する遺伝子オントロジーを変化させるような大きな影響は及ぼさなかったが、卵分泌因子、中でも BMP15 のシグナル強度を強めることが示唆された。この点については、今回の解析のみでは不十分であると考えられるため、第 2 章において、BMP15 シグナル下流の SMAD のリン酸化に着目し、E2 の影響を解析する。また、卵母細胞が分泌する増殖因子は他にも GDF9 や線維芽細胞増殖因子 8 (Fibroblast growth factor 8, FGF8) などが知られている。*Gdf9* ノックアウトマウスでは、1 次卵胞期で卵胞発達が停止してしまうため卵丘細胞は存在せず、また、*Fgf8* に関してはノックアウトマウスが致死であり、卵母細胞特異的 *Fgf8* ノックアウトマウスも報告がない。さらに、これらの増殖因

子の合成タンパク質を用いて卵丘細胞での遺伝子発現への影響を網羅的に解析した報告などがないため、今回の BMP15 シグナルと同様の解析は行えなかった。しかしながら、卵丘細胞機能制御において BMP15、GDF9、FGF8 のシグナルは密接に互いに影響を及ぼし合いながら作用することが知られており (Sugiura et al., 2007、2010b)、エストロゲンが GDF9 や FGF8 のシグナルに対しても同様の作用をもつ可能性は十分考えられる。

卵分泌因子に対する E2 の影響とは対照的に、卵分泌因子は E2 によって制御される卵丘細胞での生物現象 (遺伝子オントロジー) を大きく変化させることが明らかとなった。卵分泌因子によって、エストロゲンシグナルは「positive regulation of protein tyrosine kinase activity (GO: 0061097)」、「enzyme linked receptor protein signaling pathway (GO: 0007167)」など、細胞内シグナル伝達に関連した遺伝子オントロジーを促進するようになった。これらのシグナル伝達は、卵胞発達に重要であり、本マイクロアレイ解析で卵母細胞と E2 の制御を受けることが明らかとなった遺伝子には興味深いものが多く存在する。

例えば、リアルタイム PCR で発現確認を行った tyrosine kinase 2 $\beta$  (PTK2B) は、非受容体型チロシンキナーゼの一種で、多くの細胞外シグナルによって活性化される (Avraham et al., 2000)。また、PTK2B は G タンパク質共役受容体 (GPCR) による EGF 受容体のトランス活性化および、RAS/MAPK 経路活性化との関連が示唆されている (Daub et al., 1996、Dikic et al., 1996)。FSH 受容体 (Dierich et al., 1998)、LH 受容体 (Lei et al., 2001) といった GPCR や、EGF 受容体シグナル (Park et al., 2004) や、MAPK シグナル (Fan et al., 2009、Su et al., 2003) は、卵胞発達や排卵の過程に重要な役割を果たすことが知られており、卵母細胞とエストロゲンのシグナルは、PTK2B の発現制御を介して、これらのシグナルにも影響を及ぼしているのかもしれない。

また、「enzyme linked receptor protein signaling pathway」の下流の遺伝子オントロジ

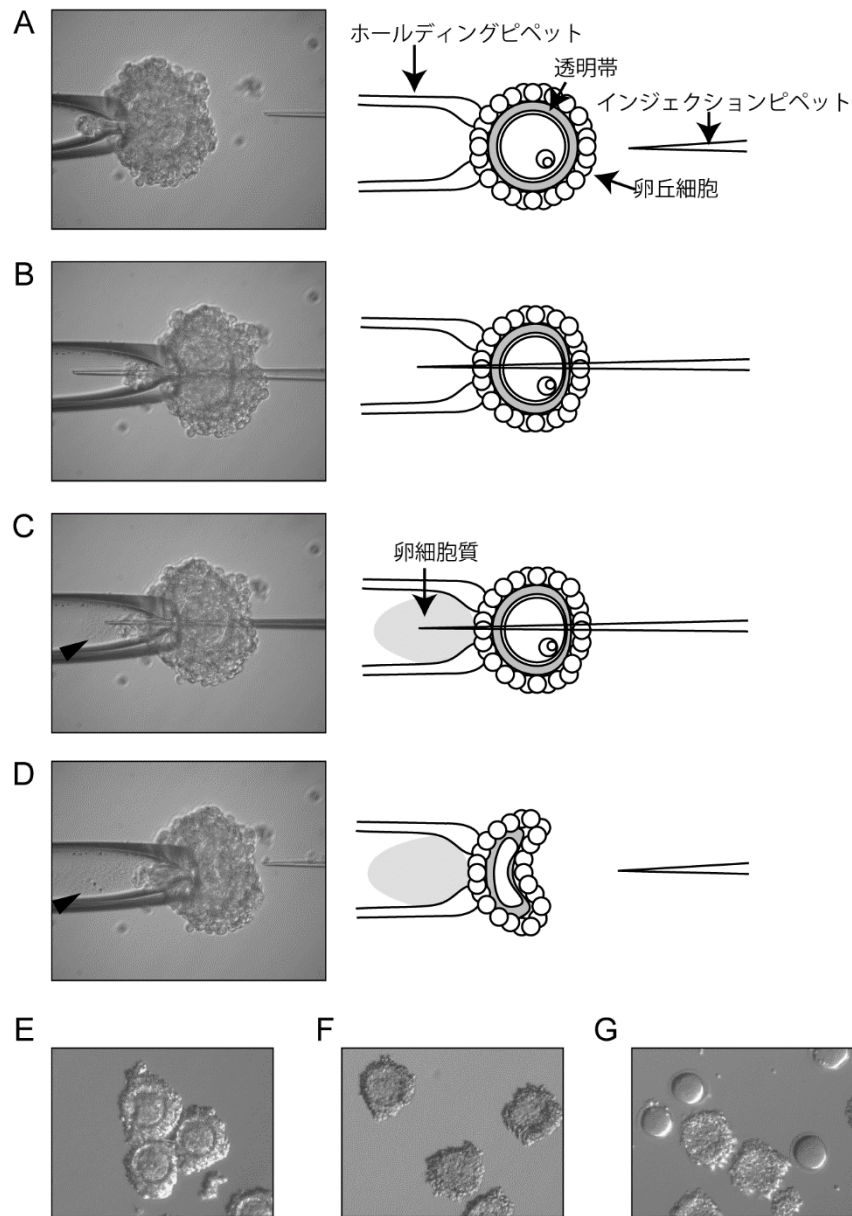
一に着目したところ、PDGF に関連するものが見つかった。今回リアルタイム PCR による発現確認を行った *Pdgfb* を含む PDGF シグナル系は、卵分泌因子存在下において E2 によって促進を受けていたが、卵胞発達における PDGF の重要性はよく理解されていない。これは、PDGF やその受容体の欠損マウスは胎生致死となるためである (Soriano, 1994, 1997、Ding et al., 2004、Leveen et al., 1994、Basciani et al., 2004)。しかしながら、PDGF 受容体 (*Pdgfra*) のヘテロ欠損と、PDGF リガンドの欠損を組み合わせたマウスでは、卵巣に異常が見られ、妊孕性が低下することが報告されている (Schmahl et al., 2008)。さらに、培養実験において、PDGF は胞状卵胞の莢膜細胞の増殖を促進することが報告されている (Duleba et al., 1999)。したがって、卵分泌因子と E2 によって促進される PDGF シグナルは、莢膜細胞の増殖を制御することで卵胞発達に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

次に、エストロゲンシグナルに対する卵分泌因子の影響を解析した結果、卵分泌因子に対する E2 の影響とは異なり、近似直線の傾きは 0.5631 であった。この結果は、卵分泌因子はエストロゲンのシグナル強度を顕著に弱めるとも解釈できるが、E2 によって制御をされる遺伝子の種類が、卵分泌因子の存在の有無で大きく変化するためであると考えられる。すなわち、E2 単体で発現が促進（または抑制）される多くの遺伝子は、卵分泌因子存在下では促進（または抑制）されなくなり、卵分泌因子存在下では、異なる遺伝子が E2 によって促進（または抑制）されるようになるためであると考えられる。実際、卵分泌因子存在下で E2 によって発現促進（または抑制）される遺伝子の約 63% (72%) は、E2 単体では影響を受けないものであり (Fig. 1-9D、1-10D)、これは、卵分泌因子に対する E2 の影響を見た場合 (Fig. 1-7A、B) の約 24% (34%) と比べて顕著に多い。したがって、卵分泌因子がエストロゲンのシグナルの強度を弱めるというよりも、制御される遺伝子が増えるために、近似直線の傾きが 1 より低い結果となったのではないかと考えられる。

以上、本章で行った卵丘細胞における遺伝子発現に対する卵分泌因子とエストロゲンの影響について、遺伝子オントロジー解析とシグナル強度の解析から、卵分泌因子とエストロゲンは互いのシグナルを制御し合っているが、そのメカニズムに差異があることが考えられた。そこで、次章では、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に着目し、解析を行うことにした。

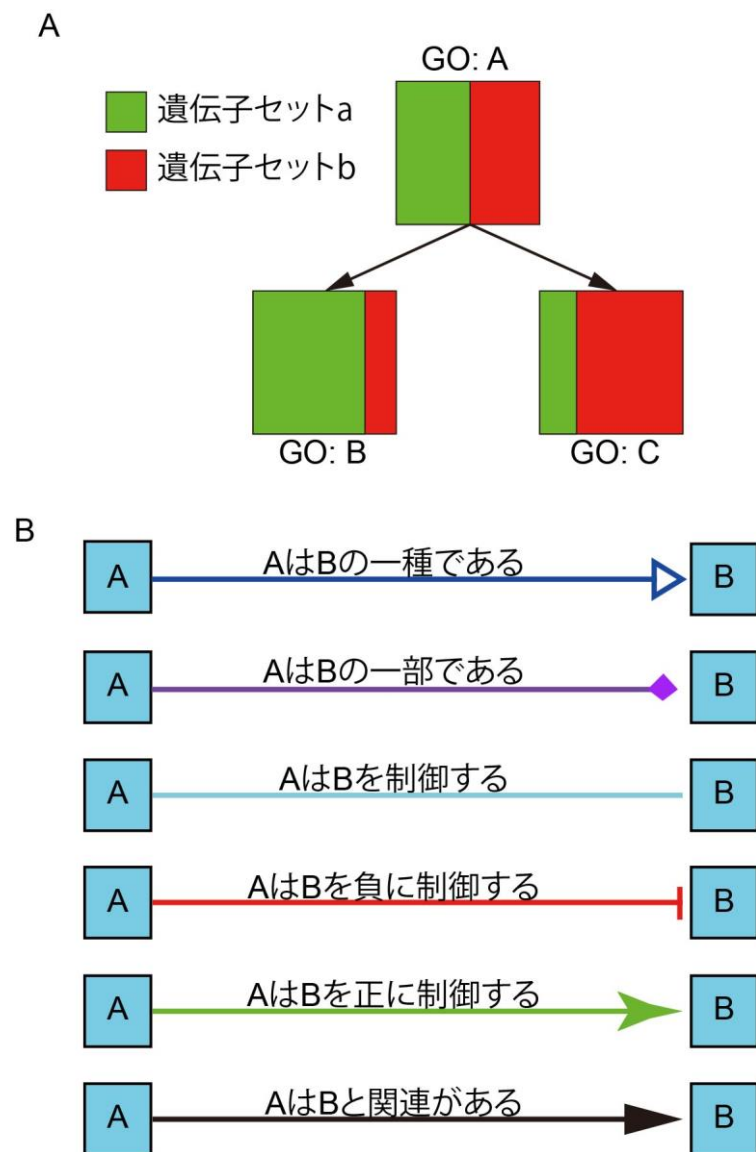
**Table 1-1 本章で用いたプライマー**

Gene symbol	RefSeq Acc. no.	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
<i>Ccnd2</i>	NM_009829	TTACCTGGACCGTTTCTTGG	TGCTCAATGAAGTCGTGAGG
<i>Sgpp2</i>	NM_001004173	TGGGCCAGGAAGTGTTCTAC	GGCATTCCGTACTCTGCAAT
<i>Rgs13</i>	NM_153171	ATTGCAATGCCACAGCACTA	CAGGCTTCAAATCAGCAATG
<i>Rpl19</i>	NM_009078	CCGCTGCGGGAAAAAGAAG	CAGCCCATCCTTGATCAGCTT
<i>Inhbb</i>	NM_008381	CGAGATCATCAGCTTTGCAG	TCCACCTTCTTCTCCACCAC
<i>Pdgfb</i>	NM_011057	CCGGAGTCGGCATGAATC	AGCAGGCGCTGAAGATCA
<i>Ptk2b</i>	NM_001162365	TCCTACGCTTACCAGCCCTA	CATCTTTCCTCTCGCCTCAG



**Fig. 1-1 Oocytectomy (OOX) 法**

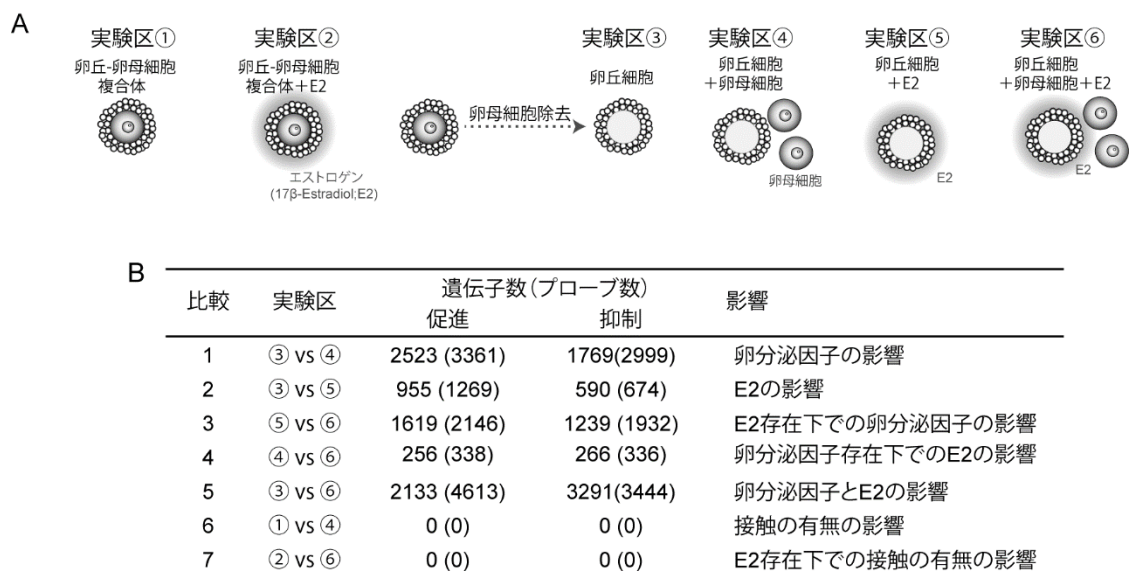
(A) 卵丘-卵母細胞複合体をホールディングピペットで吸引固定し、(B) インジェクションピペットで透明体に小さな穴をあけた。(C) 透明体に穴をあけた卵丘-卵母細胞複合体をホールディングピペットで強く吸引することにより、(D) 卵丘細胞の高次構造を保ったまま、卵母細胞の細胞質をホールディングピペット内へ吸引除去した。矢頭は卵母細胞の細胞質を示す。(E) 卵丘-卵母細胞複合体。(F) OOX 法により卵母細胞を除去した卵丘細胞。(G) OOX 法により卵母細胞を除去した卵丘細胞と卵母細胞。



**Fig. 1-2 VLAD について**

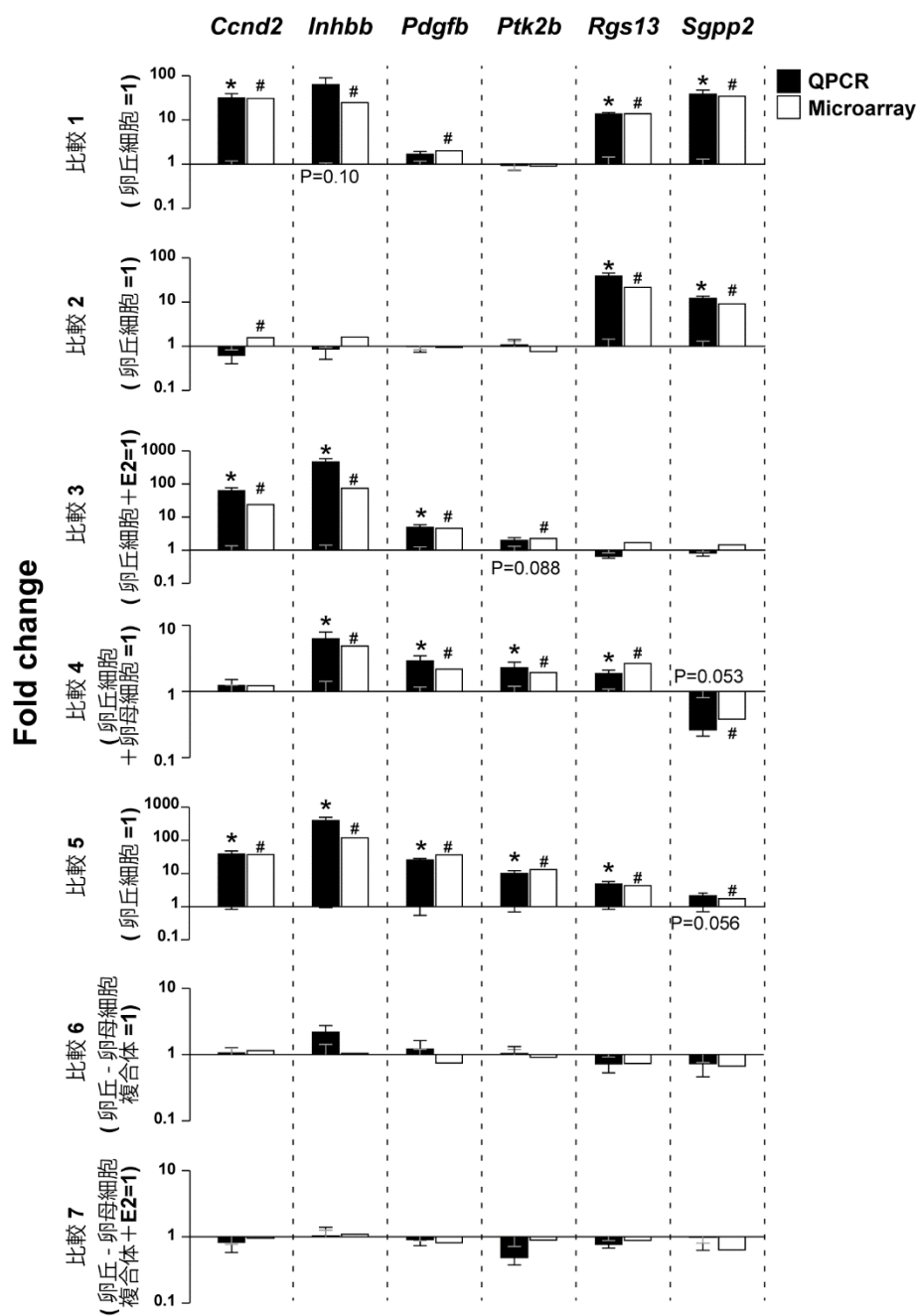
(A) VLAD による解析結果の例。四角は遺伝子オントロジー (GO) を表している。遺伝子セット a の解析結果を緑、遺伝子セット b の解析結果を赤で示す、色の割合は各遺伝子セットから関連付けられた遺伝子の統計的な比率を示す。(B) VLAD で使用される矢印の意味。矢印の種類は 6 種類あり、各 GO の関係性を表している。





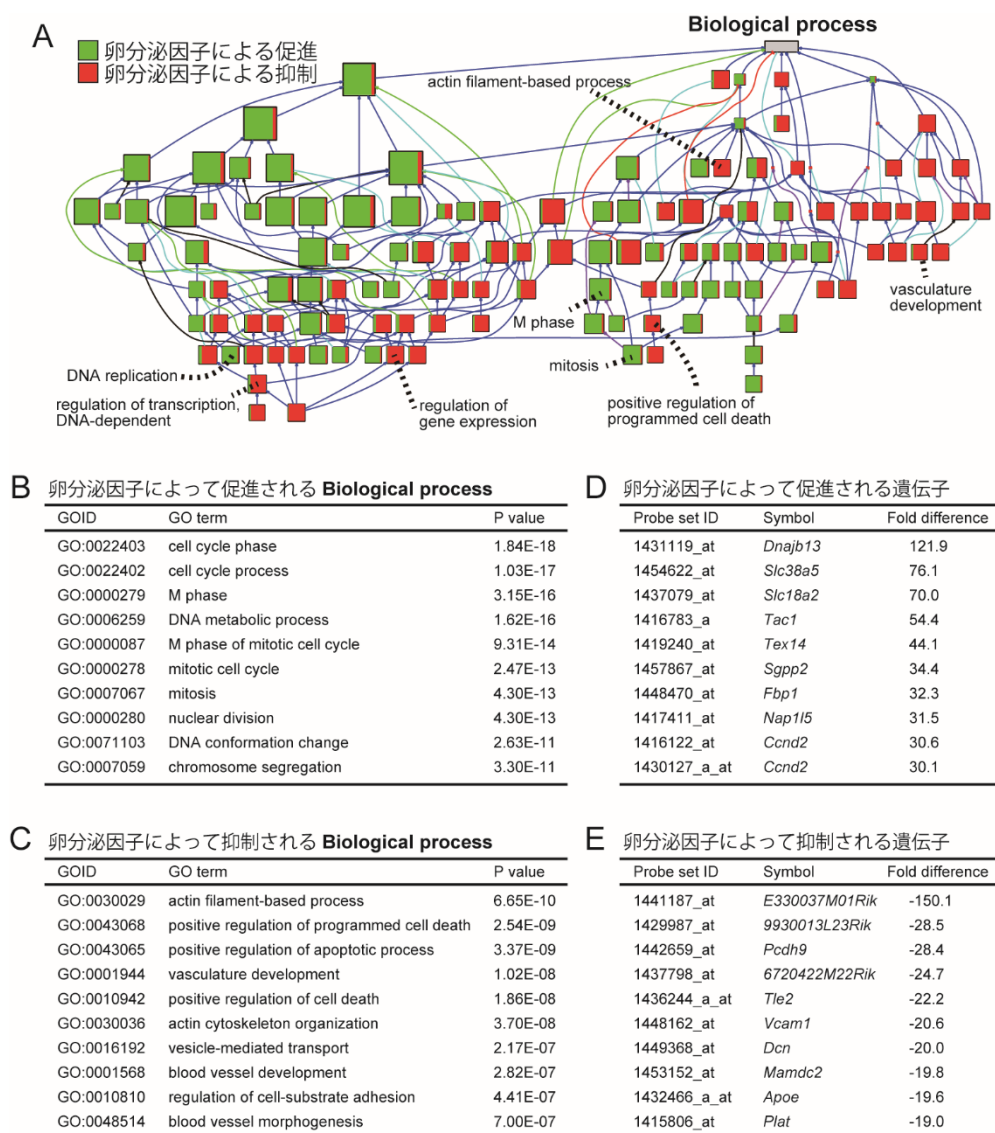
**Fig. 1-3 マイクロアレイ解析に用いた実験デザインと比較のグループ**

(A) 卵丘-卵母細胞複合体 (実験区①)、卵丘-卵母細胞複合体をエストロゲン (17β-estradiol: E2、 $10^{-7}$  M) 添加培地で培養 (実験区②)、または OOX した卵丘細胞を単独培養 (実験区③)、卵丘細胞を卵母細胞と共培養 (実験区④)、卵丘細胞を E2 添加培地で培養 (実験区⑤)、卵丘細胞を卵母細胞と E2 をともに培養 (実験区⑥) の 6 種類の実験区を設定した。(B) 卵丘細胞における遺伝子発現に対する卵分泌因子または E2 の影響、および、卵母細胞と卵丘細胞の接触の影響を解析するために、7 種類の比較を行った。比較に用いた実験区、および、促進または抑制される遺伝子の数 (プローブ数)、比較によって明らかとなる卵丘細胞に与える影響を示した。



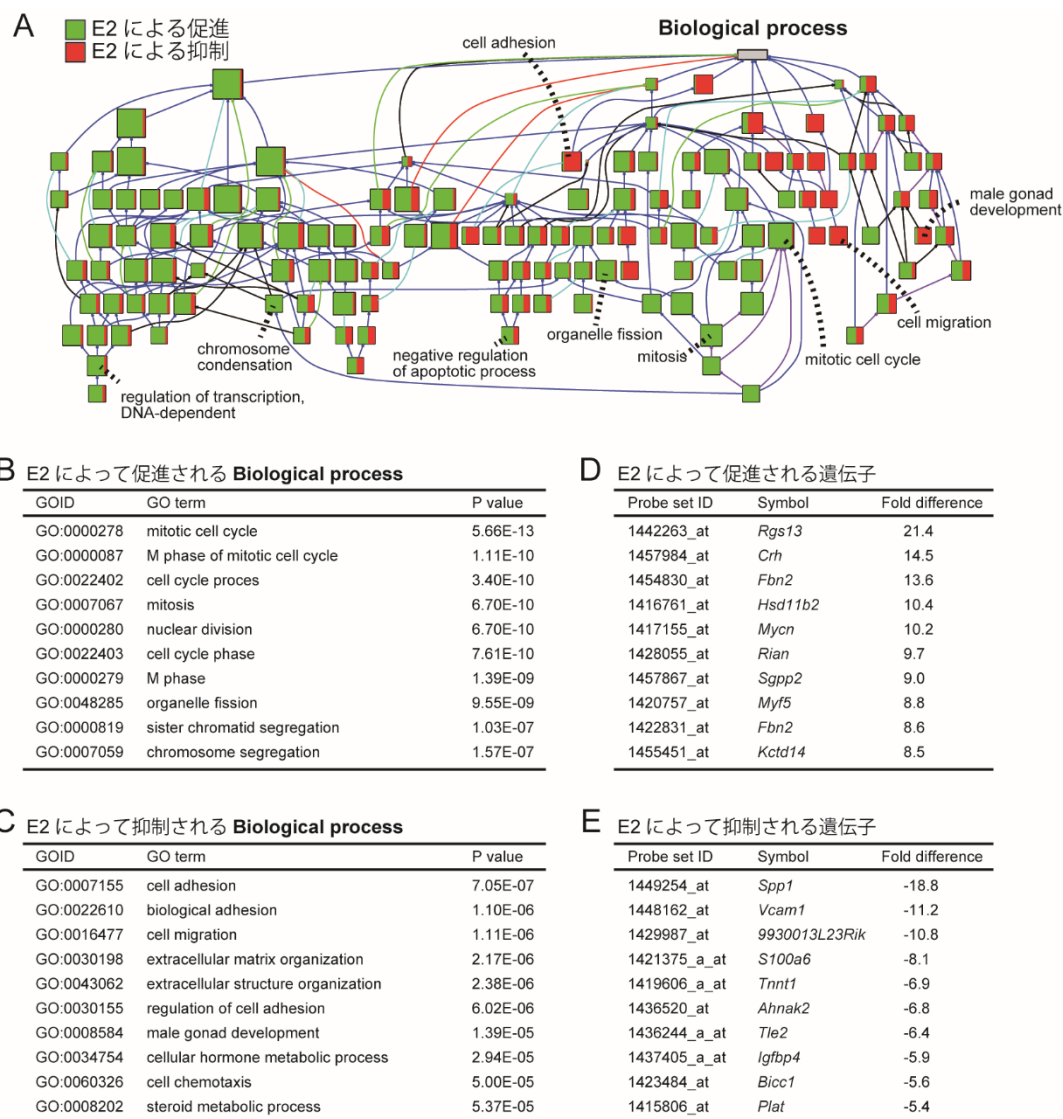
**Fig. 1-4 リアルタイム PCR によるマイクロアレイ解析結果の確認**

マイクロアレイ解析の結果から選んだ遺伝子の発現をリアルタイム PCR を用いて確認した。黒色のバーはリアルタイム PCR によって検出した発現量。白色のバーはマイクロアレイ解析によって検出した発現量。\*, #;  $P < 0.05$



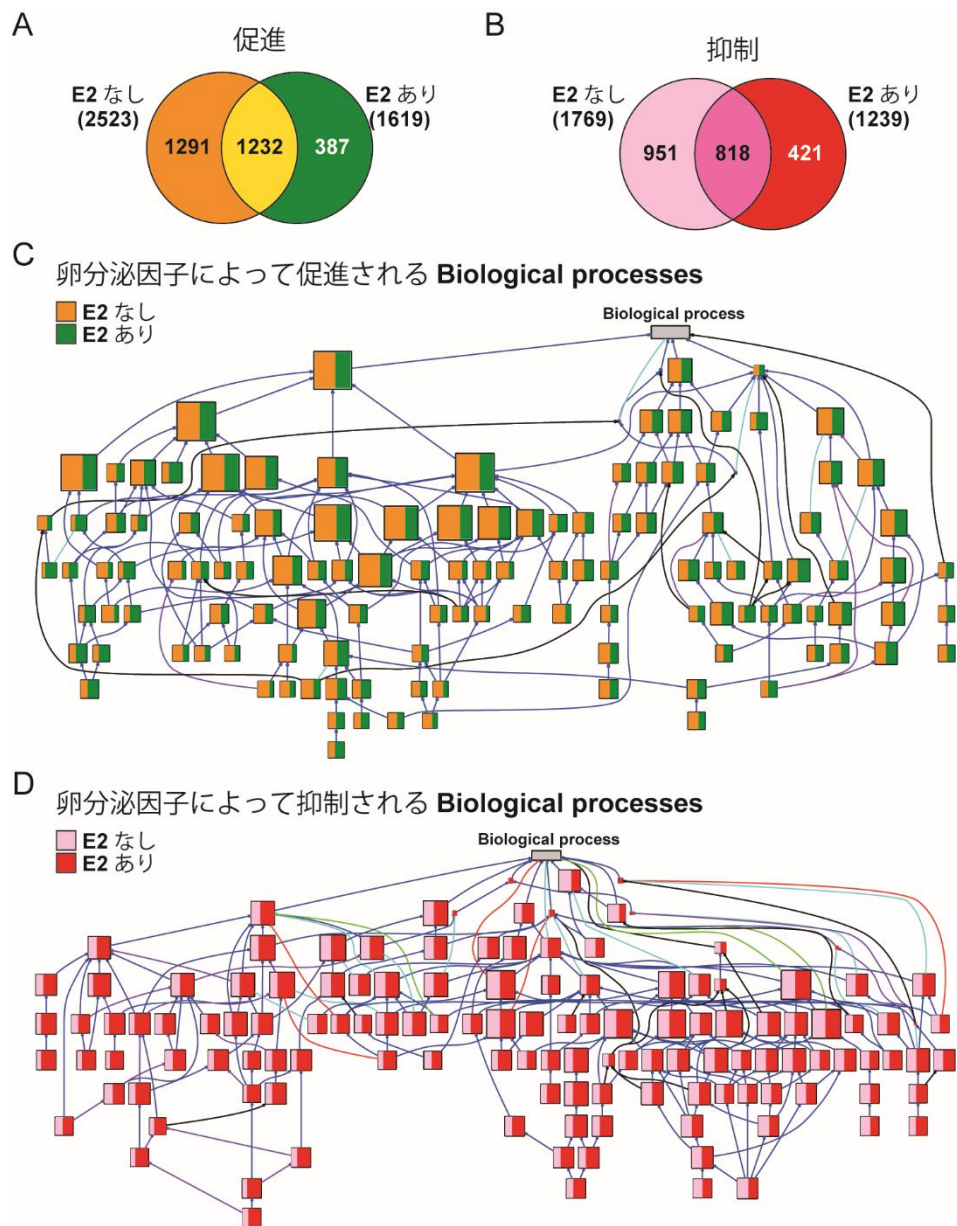
**Fig. 1-5 卵丘細胞遺伝子発現に対する卵分泌因子の影響**

(A) VLAD を用いた遺伝子オントロジー解析結果のアウトプット。卵分泌因子によって促進される遺伝子セットを緑、抑制される遺伝子セットを赤で示した。(B、C) 卵丘細胞において卵母細胞存在下で有意に促進、または抑制を受けた遺伝子オントロジー（500 以上の遺伝子に関連するとされる遺伝子オントロジー）の上位 10 のリスト。(D、E) 卵分泌因子によって有意に発現促進、または抑制を受けた遺伝子の上位 10 のリスト。



**Fig. 1-6 卵丘細胞遺伝子発現に対するエストロゲンの影響**

(A) VLAD を用いた遺伝子オントロジー解析結果のアウトプット。E2 によって促進される遺伝子セットを緑、抑制される遺伝子セットを赤で示した。(B、C) 卵丘細胞において E2 存在下で有意に促進、または抑制を受けた遺伝子オントロジー (500 以上の遺伝子に関連するとされる GO) の上位 10 のリスト。(D、E) E2 によって有意に発現促進、または抑制を受けた遺伝子の上位 10 のリスト。

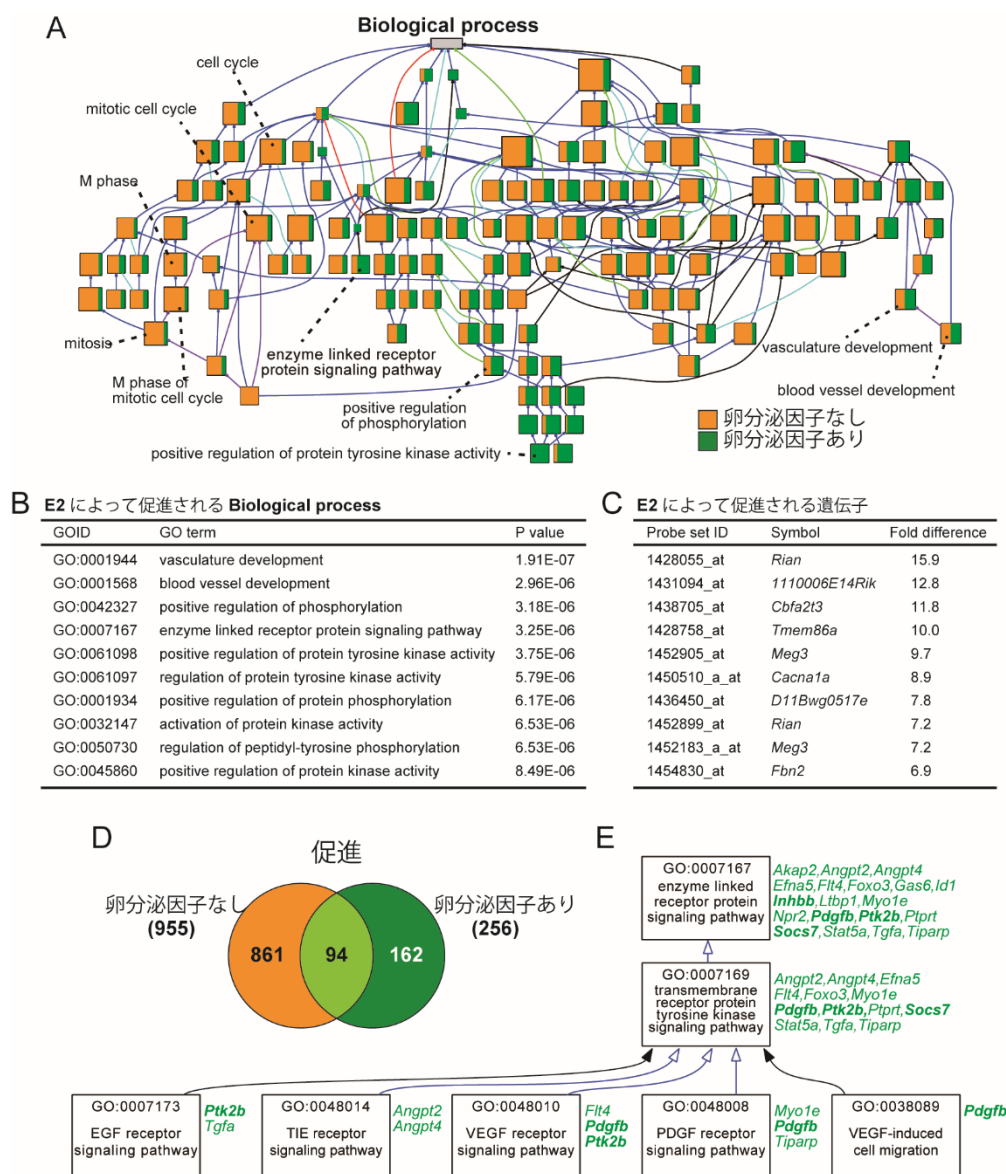


**Fig. 1-7 卵分泌因子によって制御される卵丘細胞遺伝子発現に対するエストロゲンの生物現象に与える影響**

VLAD を用いた遺伝子オントロジー解析結果のアウトプット。(A) 卵分泌因子単独で促進される遺伝子セットをオレンジ、E2 存在下で卵分泌因子によって促進される遺伝子セットを緑で示した。(B) 卵分泌因子単独で抑制される遺伝子セットを桃色、E2 存在下で卵分泌因子によって抑制される遺伝子セットを赤で示した。(C、D) E2 の有無で卵分泌因子によって有意に促進、または抑制される遺伝子について、共通、または非共通な遺伝子の数を示した。



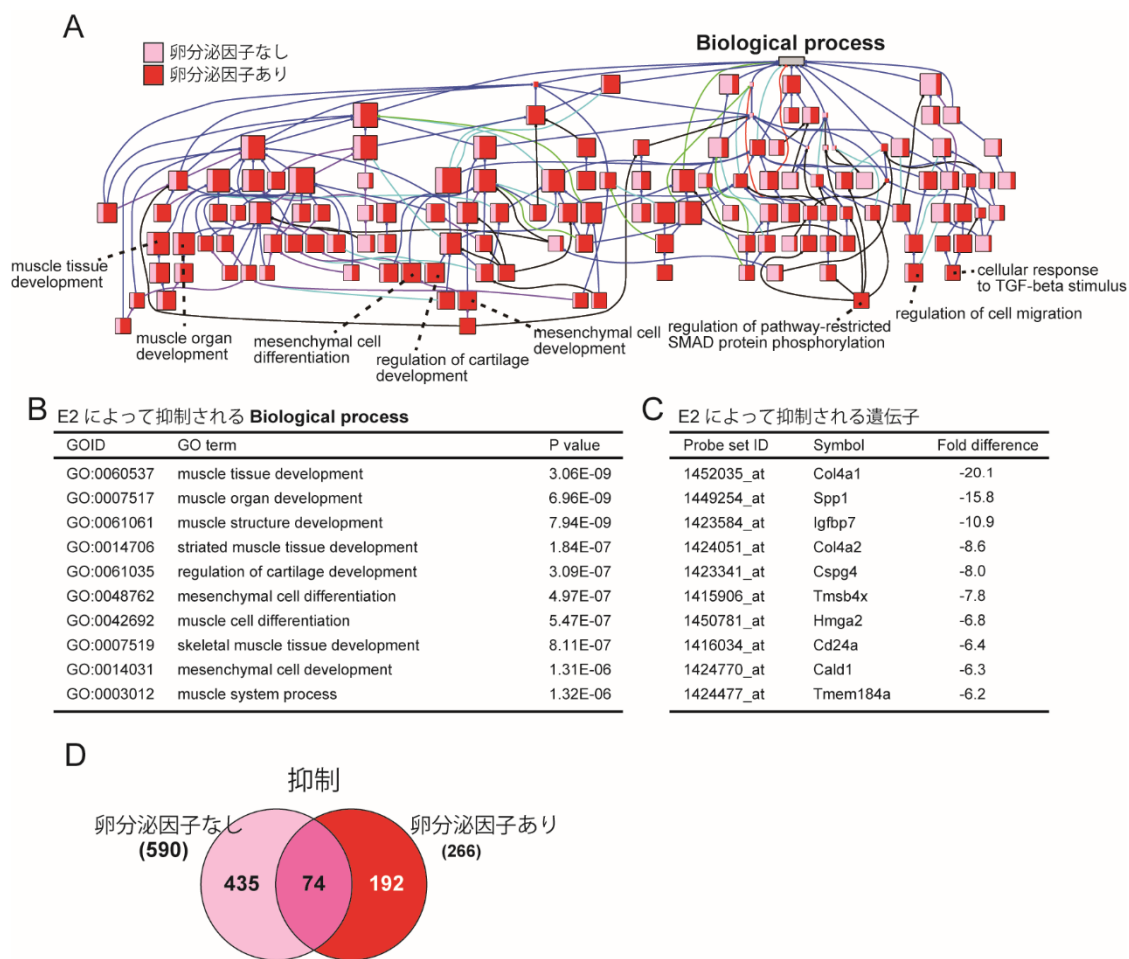




**Fig. 1-9 エストロゲンによって制御される卵丘細胞遺伝子発現に対する卵分泌因子の生物現象に与える影響**

(A) VLAD を用いた遺伝子オントロジー解析結果のアウトプット。E2 単独で促進される遺伝子セットをオレンジ、卵分泌因子存在下で E2 によって促進される遺伝子セットを緑で示した。

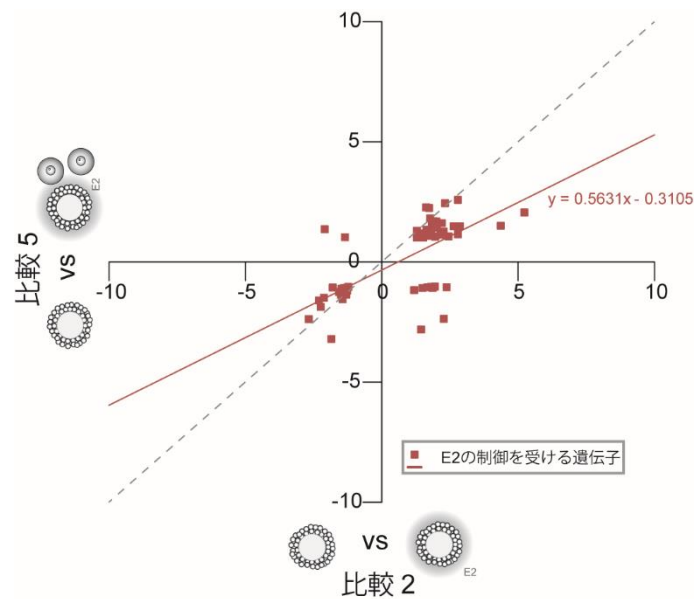
(B) 卵丘細胞において卵母細胞存在下で E2 によって有意に制御を受けた遺伝子オントロジー (500 以上の遺伝子に関連するとされる遺伝子オントロジー) の上位 10 のリスト。(C) 卵分泌因子存在下において E2 によって有意に発現制御を受けた遺伝子の上位 10 のリスト。(D) 卵母細胞の存在の有無によって E2 によって有意に発現促進を受けた遺伝子について、共通、または非共通な遺伝子の数を示した。(E) 卵母細胞存在下で E2 によって有意に促進を受けた GO:0007167 に関連する遺伝子オントロジーの VLAD のアウトプット。卵母細胞存在下で E2 によって有意に促進される遺伝子シンボルを各遺伝子オントロジーの右側に示す。



**Fig. 1-10 エストロゲンによって制御される卵丘細胞遺伝子発現に対する卵分泌因子の生物現象に与える影響 2**

(A) VLAD を用いた遺伝子オントロジー解析結果のアウトプット。E2 単独で抑制される遺伝子セットを桃色、E2 存在下で卵分泌因子によって抑制される遺伝子セットを赤で示した。(B) 卵丘細胞において卵母細胞存在下で E2 によって有意に制御を受けた遺伝子オントロジー (500 以上の遺伝子に関連するとされる遺伝子オントロジー) の上位 10 のリスト。(C) 卵母細胞存在下において E2 によって有意に発現制御を受けた遺伝子の上位 10 のリスト。(D) 卵母細胞の存在の有無によって E2 によって有意に発現抑制を受けた遺伝子について共通、または非共通な遺伝子の数を示した。





**Fig. 1-11 エストロゲンによって制御される卵丘細胞遺伝子発現に対する卵分泌因子のシグナル強度に与える影響**

卵丘細胞遺伝子発現量について、横軸に E2 単独の影響（比較 1）、縦軸に卵分泌因子と E2 の影響（比較 5）をとり、E2 単独によって有意に発現制御を受ける遺伝子の発現量比をプロットし、近似直線を求めた。点線は傾き 1 の直線（ $y=x$ ）を示す。

## 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について

## 第1節

エストロゲンによる卵分泌因子のシグナル制御について

## 緒言

第 1 章において、卵丘細胞での卵分泌因子シグナルに対するエストロゲンの影響を解析したところ、エストロゲンの存在は、卵分泌因子が制御する生物現象に大きな影響を及ぼさないが、卵分泌因子、中でも BMP シグナルの強度を強めることが示唆された。本節では、このエストロゲンが卵母細胞由来の BMP シグナルを強めるメカニズムに着目した。

前述のとおり、BMP を含む TGF $\beta$  スーパーファミリー増殖因子の細胞内のシグナルは SMAD タンパク質によって仲介される (Fig. 0-2 参照)。リガンドの結合により活性化した受容体は、特異型 SMAD をリン酸化する。リン酸化された特異型 SMAD は共役型 SMAD (SMAD4) と結合して核移行し、標的遺伝子の転写を制御する。特異的 SMAD として、BMP のシグナルにおいては、SMAD1、SMAD5、SMAD8 (SMAD1/5/8) が機能し、GDF9 のシグナル伝達では SMAD2 および SMAD3 (SMAD2/3) が機能する (Massaous et al., 1997、Balemans et al., 2002)。

BMP にはそのシグナル伝達を阻害する、多くの阻害因子 (アンタゴニスト) が知られている。例えば、SMAD6 や SMAD7 は阻害 SMAD と呼ばれ、BMP の I 型受容体と結合することで、SMAD1/5/8 のリン酸化を阻害し、SMAD4 とのヘテロ 2 量体形成を阻害し、シグナルを阻害する (Gazzerro et al., 2006)。また、阻害 SMAD 以外にも、BMP リガンドと結合することで受容体との結合を阻害する働きを持つ Noggin (NOG) や Gremlin (GREM) などの BMP アンタゴニストも知られている (Gazzerro et al., 2006、Rider et al., 2010)。

Noggin は、BMP2、4、7 と親和性が高いことが報告されており (Zimmerman et al., 1996)、Noggin のノックアウトマウスでは BMP シグナルが過剰となることにより、体

節や神経管形成異常や (McMahon et al., 1998)、骨格形成異常 (Brunet et al., 1998、Wijgerde et al., 2003) などがおこり、胎生致死となることが報告されている。また、Gremlin は Differential screening-selected gene aberrative in Neuroblastoma (Dan) ファミリーに分類され、BMP2、4、7 と高い親和性をもって結合する (Hsu et al., 1998)。Gremlin のノックアウトマウスでは BMP シグナルが過剰になることで四肢、肺、腎臓の発達異常が報告され、致死となる (Khokha et al., 2003、Michos et al., 2004)。Noggin や Gremlin は卵巣における発現が報告されており、胞状卵胞の顆粒膜細胞において発現し、壁顆粒膜細胞と比較して卵丘細胞で高く発現すること、さらに卵丘細胞において卵分泌因子による発現促進を受けることが報告されている (Sugiura et al., 2009、Pangas et al., 2004)。顆粒膜細胞において発現している BMP シグナルの阻害因子は上記以外にも過去に当研究室の杉浦らによって複数報告されており (Sugiura et al., 2009)、卵胞における BMP シグナル制御にこれらの BMP アンタゴニストは重要な役割を果たすと考えられる。

第 1 章より、エストロゲンは卵母細胞由来の BMP シグナルの強度を強めると考えられたが、この制御に BMP シグナルの阻害因子が関与している可能性がある。すなわち、エストロゲンは、BMP 阻害因子の発現を抑制することで、卵母細胞由来の BMP シグナルを増強しているかもしれない。しかし、これまで卵丘細胞における BMP 阻害因子の発現に対するエストロゲンの影響を解析した報告はない。そこで、顆粒膜細胞での発現の知られる BMP 阻害因子 (Sugiura et al., 2009) について、第 1 章のマイクロアレイ解析結果よりエストロゲンの制御を受ける可能性のあるものを探索した。その結果、詳しくは結果にて述べるが、前述の Noggin のみがエストロゲンによる有意な発現抑制を受けると考えられた。Noggin は、前述のように顆粒膜細胞で発現し、卵分泌因子による発現促進を受ける BMP 阻害因子である (Sugiura et al., 2009)。これらのことから、Fig. 2-1 に示したように、胞状卵胞内では、Noggin を介した卵分泌因子シグナル、特に卵母細胞由来の BMP シグナルに対する負のフィードバック作用が存在し、エストロゲ

ンはNogginの発現を抑制することで卵母細胞由来のBMPシグナルを増強させている可能性が考えられる (Fig. 2-1)。

そこで、本節では Noggin に着目し、上記仮説を検証することを目的とした。さらに、顆粒膜細胞で Noggin を過剰発現するマウスを作製し、Noggin を介した卵分泌因子とエストロゲンのシグナルの相互作用の生体レベルでの重要性についても解析した。

## 材料と方法

### マウス

マウスは3週齢のBDF1 (C57BL/6×DBA2) マウスを自家繁殖または三協ラボサービスから購入して用いた。また、*Bmp15* ノックアウトマウス (*Bmp15<sup>tm/zuk</sup>*、以下 *Bmp15<sup>-/-</sup>*) は Baylor College of Medicine の Matzuk 博士から譲渡していただき、B6/129 系統の混合バックグラウンドにおいて本研究室で飼育したものを用いた。また、Tulane University の Chen 博士から pMES ベクターに *Nog* 配列を挿入した pMES-*Nog* コンストラクトを保有するマウス (ICR 系統) を譲渡していただいた (Xiong et al., 2009)。pMES-*Nog* コンストラクトは、Fig. 2-2A に示すように、IRES-EGFP 配列の上流に *Noggin* 配列をコードしており、チキン由来  $\beta$  アクチンプロモーターのもと、転写が制御される (Fig. 2-2A)。チキン由来  $\beta$  アクチンプロモーターと *Noggin* 配列の間には *LoxP* 配列に挟まれた STOP 配列が含まれており、Cre リコンビナーゼを発現する細胞では STOP 配列が欠失するため、*Noggin* が発現するようになる。このマウスと、当研究室保有の顆粒膜細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する *Amhr2*-Cre マウス (B6/129 系統) を交配することで、顆粒膜細胞特異的に *Noggin* を過剰発現するマウス (pMES-*Nog*/*Amhr2*-Cre マウス、以下 *Nog* 過剰発現マウス) を作出した。また、実験の対照区のマウスは、同腹子の pMES-*Nog* または *Amhr2*-Cre マウスを区別せずに用いた。

飼育条件は、第1章と同様である。

*Nog* 過剰発現マウスの遺伝子型の確認 (Genotyping) は次のように行った。3週齢前後のマウスからゲノムDNAを抽出した。尾端部を2-3 mm切除した後、50 mM NaOH を 90  $\mu$ l 添加後、95°Cで10分間ボイルを2回行った。1 M Tris-HCl (pH8.0) を 10  $\mu$ l 添加し、中和させた。得られたゲノムDNAを鋳型として、BIOTAQ DNA Polymerase (BIOLINE) を用いてPCRを行った。PCRは下記の条件を用いた。また、用いたプラ

イマーは Table 2-1 に示す。得られた PCR 産物は 1.5%アガロースゲルを用いて 1×TAE (0.04 M Tris-acetate、0.0002 M EDTA) buffer 中で電気泳動し、2 µg/ml エチジウムブロマイド染色後にトランスイルミネータで観察した。

〈PCR 条件〉

95°C	2 分	
95°C	30 秒	} 35 サイクル
60°C	30 秒	
72°C	1 分	
72°C	7 分	

pMES-Nog コンストラクトを保有するマウスは約 500 bp のサイズのコアバンドが検出され、Amhr2-Cre を保有するマウスは約 500 bp のサイズのコアバンドが検出された (Fig. 2-2B)。Fig. 2-2B は結果の一例であるが、個体番号 1、5、6 は pMES-Nog、Amhr2-Cre の両方のコアバンドが確認できたことから、Nog 過剰発現マウスであり、個体番号 2、3、4 は pMES-Nog のコンストラクトのみを保有するマウス、個体番号 7 は Amhr2-Cre のみを保有するマウスであることがわかる。

## 顆粒膜細胞の単離

### (1) 前胞状卵胞顆粒膜細胞

前胞状卵胞顆粒膜細胞は、12 日齢のマウスより、コラゲナーゼ法により単離した (Eppig et al., 1996)。12 日齢のマウスの卵巣を、3 mg/ml コラゲナーゼ I (wako) と 0.2 mg/ml DNase I (Roche) を添加した 2.5 ml の基本培地 (第 1 章参照) の中にいれ、37°C にて 10 分静置後、ピペッティングにより卵巣を小片にして 2 次卵胞をとりだした。得られた 2 次卵胞を基本培地で数回洗浄した後、ピペットを用いて卵母細胞を除いたものを前胞状卵胞顆粒膜細胞として実験に供した。

### (2) 卵丘-卵母細胞複合体、卵丘細胞、壁顆粒膜細胞



第 1 章と同じ方法を用いて、PMSG 刺激、または未刺激の 3 週齢マウス卵巢を小片に切り裂いて、卵丘-卵母細胞複合体、および壁顆粒膜細胞の細胞塊を回収した。卵丘細胞は、得られた卵丘-卵母細胞複合体より、ピペッティングにより卵母細胞を除去して回収した。また、卵丘細胞を培養する際には Oocyectomy 法（第 1 章参照）により卵丘-卵母細胞複合体からマイクロマニピュレーターを用いて卵母細胞を除去した。

## 培養

培養には主に基本培地を用い、37°C、CO<sub>2</sub> 5%、O<sub>2</sub> 5%、湿度 100% に保たれたインキュベーター内で行った。

卵丘細胞は、卵丘-卵母細胞複合体を OOX 法（第 1 章参照）により、卵丘-卵母細胞複合体より卵母細胞を除去した卵丘細胞塊を培養に用いた。一部の実験では、卵丘-卵母細胞複合体の状態での培養、または、OOX 法により単離した卵丘細胞塊を卵母細胞と共培養した。卵母細胞との共培養では、1  $\mu$ l の培地につき 2 個の卵母細胞を加えた。また、合成タンパク質添加実験では、recombinant human BMP15 (R&D systems) (以後 rhBMP15)、recombinant mouse GDF9 (R&D systems) (以後 rmGDF9) をそれぞれ 50 ng/ml の濃度で基本培地に添加した。これらの培養は、流動パラフィン下に作成した 50  $\mu$ l の培地ドロップ内で行った。

また、一部の実験では、基本培地に 17 $\beta$ -Estradiol (E2、10<sup>-10</sup>-10<sup>-7</sup> M)、TGF  $\beta$  スーパーファミリーのシグナルを伝達する受容体の一種である ALK4 阻害剤 SB431542 (wako) (10  $\mu$ M)、または、溶媒である DMSO (0.1%) を添加して培養を行った。その際は、96 ウェルプレートを用い、流動パラフィンは使用しなかった。

壁顆粒膜細胞は、ECL cell attachment matrix (millipore) でコラーゲンコートした 96 ウェルプレートに 10<sup>4</sup> 個ずつ播種し、前培養を 24 時間行って、細胞をプレートに接着させた。その後、卵母細胞との共培養 (1  $\mu$ l の培地につき 2 個の卵母細胞添加)、また

は、合成タンパク質添加実験を行った。合成タンパク質添加実験では、rhBMP15、recombinant human BMP4 (R&D systems) (以後 rhBMP4) をそれぞれ 50 ng/ml の濃度、または recombinant mouse Noggin (R&D systems) (以後 rmNOG) を 500 ng/ml の濃度で添加した基本培地で 20 時間培養した。

### トータル RNA 抽出、cDNA 合成

15-25 個の卵丘-卵母細胞複合体、または OOX した卵丘細胞から RNeasy Micro Kit (Qiagen) (第 1 章参照)、または ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega) を用いトータル RNA を抽出した。ReliaPrep RNA Cell Miniprep System では、100  $\mu$ l の BL + TG buffer で細胞を溶解し、100% イソプロパノールを添加後、細胞抽出液全量を Mini カラムに移し以降はプロトコルに従って、DNase 処理および洗浄を行った。RNA の溶出には 15  $\mu$ l の Nuclease-Free water を用いた。

また、PMSG 刺激後の *Nog* 過剰発現マウスおよび同腹子の pMES-Nog または Amhr2-Cre マウスの卵巣より、ReliaPrep RNA Cell Miniprep System を用いて、上記と同様にトータル RNA を抽出した。卵巣からのトータル RNA の抽出の際には、卵巣に 100  $\mu$ l の BL+TG buffer を添加し、ホモジェナイズ後、500  $\mu$ l にメスアップして用いた。

cDNA 合成には QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) (第 1 章参照)、または、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) をプロトコルに従って用いた。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover では、トータル RNA を 65°C で 5 分間加熱した後、DN Master Mix を加え 37°C で 5 分間反応させた。その後、RT Master Mix II を加え、37°C で 15 分、50 度で 5 分、98°C で 5 分反応させ cDNA を得た。

RNA 抽出キット、cDNA 合成キット、および後述する SYBR 試薬をそれぞれ 2 種類用いているが、それらの違いにより結果に違いは見られなかった。

## リアルタイム PCR

リアルタイム PCR には、QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) (第 1 章参照)、または THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) と StepOnePlus Real-time PCR system (Applied biosystems) を使用し、第 1 章と同様に行った。本節で用いたプライマーは Table 2-1 に示した。

## ウェスタンブロッティング

20-30 個の卵丘-卵母細胞複合体を 0.1%PVP (Poly vinyl pyrrolidone) 添加 PBS (Phosphate buffered saline) で数回洗浄することで培地中の BSA を取り除き、0.1%PVP 添加 PBS に回収した。5×Laemmli バッファー (20%SDS、12.5% 2-Mercaptoethanol、37.5% Glycerol、1.25 M Tris-HCl、Bromophenol blue (BPB)) (Laemmli. 1970) を加えた。また、壁顆粒膜細胞は PBS (Takara) で数回洗浄することで BSA を取り除き、5×Laemmli バッファーを混ぜた PBS を用いてピペッティングにより細胞を回収した。その後、これらのサンプルは 100℃で 5 分間反応させタンパク質を変性させた。15% ポリアクリルアミドゲルを用いて Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli. 1970) を行った後、タンパク質を polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Immobilon™ Transfer Membranes; Millipore) にブロッティングした。ブロッティングには Blotting バッファー (48 mM Tris Base、39 mM Glycine、0.037% SDS、20% Methanol) を用い、10 V で約 40 分間セミドライ式ブロッティング装置 (Trans-blot SD Semi-Transfer cell; BIO RAD) で行った。5% スkimミルク (wako) を添加した TBS-T (20 mM Tris base、137 mM NaCl、1% Tween 20 (pH 7.6) (wako) で 1 時間室温にてブロッキングを行い、TBS-T に 5% スkimミルクを溶かした溶液で希釈した 1 次抗体を 4℃で一晩反応させた。

次に、TBS-T で 5 分間 3 回洗浄後、TBS-T に 5% スキムミルクを溶かした溶液で希釈した 2 次抗体を 90 分間、室温で反応させた。TBS-T で 5 分間 3 回洗浄後、ECL™ Western Blotting Detection Kit (Amersham Pharmacia Biotech UK Limite)、または、Immunostar LD (wako) をプロトコルに従って反応させた後、X 線フィルム (FUJI MEDICAL) またはイメージング機器 C-DiGit (Li-COR) を用いてシグナルの検出を行った。

一次抗体としては、NOG の検出には anti-Noggin antibody (R&D systems) を 2000 倍希釈して用いた。リン酸化 SMAD1/5/8 の検出には Phospho-smad1 (Ser463/465) / smad5 (Ser463/465) / smad8 (Ser426/428) Antibody (Cell Signaling technology) を 2000 倍希釈して用いた。内部標準として用いた  $\beta$  アクチン (ACTB) の検出には、Rabbit Polyclonal antibody to beta Actin (Gene Tex) を用いた。二次抗体は、Rabbit Anti-Goat IgG Antibody (Jackson Immuno Research Laboratories)、Goat Anti-Rabbit IgG Peroxidase Conjugate Antibody (Chemicon International) を 3000 倍希釈で用いた。

## 妊孕性テスト

7 週齢の *Nog* 過剰発現マウス (pMES-Nog/Amhr2-Cre)、または同腹子の pMES-Nog または Amhr2-Cre マウスを同週齢の野生型オスマウス (C57BL/6) と共飼育し、約 5 カ月間、出産回数および、得られた産仔数を計数した。また、交配が行われていることを確認するため、膣栓 (プラグ) の形成も確認した。

## 卵巣組織切片の作成、およびヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色

卵巣を Bouin 固定液 (ピクリン酸 : ホルマリン : 氷酢酸 = 15 : 5 : 1) を用いて浸漬固定し、脱水処理 (70% EtOH 一晚、70% EtOH、80% EtOH、90% EtOH、95% EtOH、100% EtOH 2 回 各 2 時間、100% EtOH 一晚) 後、キシレンで透徹 (Xylene 30 分 3 回) し、さらにパラフィンに浸漬 (50% paraffin / Xylene 一晚 室温、Soft Paraffin、Paraffin 3

回 各 2 時間、60℃) し、金属製包埋プレートと包埋リングを用いて包埋し、一晩静置した。切片の作成はマイクローム (PR-50 小型回転式マイクローム ; 大和光機工業) を用いて厚さ 6  $\mu\text{m}$  に薄切し、水上で皺を伸ばし、さらに 52-55℃の温水中で伸展させた後にスライドグラスに貼り付け、一晩乾燥させた。

作成したパラフィン切片を脱パラフィン処理 (Xylene 5 分 3 回、100% EtOH 5 分 3 回、95% EtOH、80% EtOH、70% EtOH 各 3 分、DW 1 分間) した後、ヘマトキシリン溶液に 5 分間漬けた。流水中で 10 分間洗浄後、エオジン溶液に 10 分間浸漬し、70% EtOH で軽く洗浄した。その後、脱水 (70% EtOH、80% EtOH、95% EtOH 各 3 分、100% EtOH 5 分、2 回、Xylene 5 分、2 回) し、SP15-100 Toluene Solution (Fisher Scientific) で封入した。

## 組織形態の判定

作成した卵巣組織切片を観察し、切片中で卵母細胞が観察される胞状卵胞と、異常な卵胞 (閉鎖卵胞) 数を計数した。閉鎖卵胞は Perez らの報告 (Perez et al., 1999) を参考に、次のいずれかに当てはまるものを定義した。

- (1) 卵母細胞が委縮し、卵丘細胞層との間に隙間が見られる。
- (2) 卵母細胞が球状を保っていない。
- (3) 卵母細胞に断片化 (フラグメント) がみられる。

閉鎖卵胞数は、観察された全胞状卵胞数の割合で示した。

## 統計処理

本実験ではすべて独立した実験を 3 回以上行った。統計処理にはマイクロソフト Excel のアドインソフト Excel 統計 (株式会社 社会情報サービス) を用い、3 区以上の比較には Tukey 法を用い、2 区の比較には t 検定を用いた。また、割合で示した結果の

検定は、正弦変換をしたのちに、t 検定を行った。危険率  $p<0.05$  を有意とした。

## 結果

### SMAD のリン酸化に対するエストロゲンシグナルの影響

第 1 章より、エストロゲンのシグナルは卵母細胞が分泌する BMP のシグナルを強めることが示唆された。そこで、実際に卵丘細胞において、エストロゲンシグナルの有無が卵丘細胞での BMP シグナルを増強するか解析した。卵丘-卵母細胞複合体単独、またはエストロゲン (E2、 $10^{-7}$  M) 添加培地で培養し、卵丘細胞における SMAD1/5/8 のリン酸化状態 (pSMAD1/5/8) をウエスタンブロットにより解析した (Fig. 2-3)。その結果、卵丘-卵母細胞複合体を E2 無添加で培養した場合と比べて、E2 添加培地で培養した場合に、無添加培養と比較して濃い pSMAD1/5/8 のバンドが確認された。したがって、E2 の存在により、卵丘細胞における SMAD1/5/8 のシグナルが強まることが実際に確認された。

### エストロゲンの制御を受ける BMP 阻害因子の探索

前述のように、顆粒膜細胞において発現している BMP シグナルの阻害因子については、当研究室の杉浦らにより既に報告されている (Sugiura et al., 2009)。そこで、これらの BMP 阻害因子について、第 1 章のマイクロアレイ解析データより、エストロゲンの制御を受ける可能性のある候補因子の探索を行った。第 1 章のマイクロアレイ解析より、E2 単独の影響 (比較 2) と、卵分泌因子存在下での E2 の影響 (比較 4) の解析結果を、上記の報告にある BMP シグナル阻害因子について Table 2-2 にまとめた。その結果、12 個の BMP 阻害因子すべてについて、E2 単独では卵丘細胞での発現に影響は見られなかったが、卵分泌因子存在下では Gremlin2 (*Grem2*) が E2 によって有意に発現促進され、一方、Noggin (*Nog*) が有意な抑制を受けることが示唆された。本節では、

卵丘細胞において、E2 による発現抑制を受ける BMP シグナル阻害因子を探索しているため、以降は *Nog* についてより詳しい解析を行うことにした。

## Noggin の発現解析

発達した胞状卵胞では、Noggin は卵丘細胞で高く発現していることが報告されている (Sugiura et al., 2009)。しかし、前胞状卵胞から胞状卵胞への発達過程での Noggin の発現動態の詳細は不明である。そこでまず、2 次卵胞から前胞状卵胞顆粒膜細胞、PMSG 刺激前後の胞状卵胞から卵丘細胞と壁顆粒膜細胞を回収し、*Nog* の mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析した (Fig. 2-4)。その結果、前胞状卵胞顆粒膜細胞と壁顆粒膜細胞における *Nog* の発現に大きな差は見られなかったが、*Nog* の発現は発達途上の胞状卵胞および発達した胞状卵胞ともに、壁顆粒膜細胞と比較して卵丘細胞において有意に高かった。この結果は、卵分泌因子が卵丘細胞での *Nog* の発現を促進するという既報 (Sugiura et al., 2009) を支持するものである。

## Noggin の発現制御解析

### (1) 卵丘細胞における Noggin の発現に対するエストロゲンの影響

前述のとおり、第 1 章のマイクロアレイ解析より卵丘細胞における *Nog* の発現は卵分泌因子存在下で E2 によって抑制されることが示唆された (Table 2-2)。そこで、実際に卵丘細胞における *Nog* の発現が E2 による影響を受けるのか、検討を行った。*Nog* mRNA 発現を回収直後、または E2 ( $0$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ M) 添加培養後の卵丘-卵母細胞複合体において解析した (Fig. 2-5)。まず、*Nog* mRNA 発現は回収直後の卵丘-卵母細胞複合体と比較して、E2 無添加培地で培養することにより約 20 倍の有意な発現上昇が見られた。一方、培地に E2 を添加することで、*Nog* mRNA 発現上昇は E2 濃度依存的



に抑制され、E2  $10^{-9}$  M 以上の濃度で添加した区においては、有意な発現上昇が抑えられた (Fig. 2-5B)。

次に、NOG タンパク質発現についてウエスタンブロット法により解析した。その結果、*Nog* mRNA 発現と同様に、回収直後と比較して培養により NOG のタンパク質発現は上昇し、E2 添加区においてその発現上昇は見られなくなった (Fig. 2-5C)。

以上から、Noggin の発現は生体内では低く維持されており、少なくともエストロゲンが Noggin の発現を抑制する因子の一つであると考えられる。

## (2) 卵丘細胞における Noggin の発現に対する卵分泌因子の影響

卵丘細胞における *Nog* の発現は、卵母細胞との共培養によって促進されることが報告されているが (Sugiura et al., 2009)、具体的に *Nog* の発現を促進する卵分泌因子は同定されていない。そこで、*Nog* の発現促進にかかわる卵分泌因子の解析を行った。

まず、合成タンパク質添加実験を行った (Fig. 2-6A)。その結果、卵母細胞との共培養により、卵丘細胞における *Nog* の mRNA 発現は約 30 倍と有意に上昇した。rhBMP15 添加区では、約 10 倍程度の発現上昇が見られたが、無添加区と比較して有意な差は見られなかった。また、rmGDF9 添加区では無添加区と比較して大きな発現差は確認できなかった。しかしながら、rhBMP15 と rmGDF9 を同時に添加することで、*Nog* mRNA 発現は約 25 倍と卵母細胞添加区と同程度の有意な発現上昇が見られた。

次に、*Bmp15* ノックアウトマウスの卵丘-卵母細胞複合体における *Nog* の mRNA 発現を解析した結果 (Fig. 2-6B)、回収直後の卵丘-卵母細胞複合体における *Nog* mRNA 発現はコントロール (*Bmp15*<sup>+/+</sup>) とノックアウト (*Bmp15*<sup>-/-</sup>) とともに低く抑えられており、有意な違いは見られなかった。しかし、E2 無添加培地での培養によって、ノックアウトではコントロールと比較して有意に低い *Nog* 発現を示した。

さらに、GDF9 の I 型受容体である ALK4 の阻害剤 SB431542 を用いて、*Nog* 発現促進に対する GDF9 の必要性を解析した (Fig. 2-6C)。その結果、コントロール区と比較して、SB431542 添加区では *Nog* の発現は約 1/20 倍と有意に低かった。

以上から、卵丘細胞における *Nog* の発現促進には、卵母細胞が分泌する BMP15 と GDF9 のシグナルが必要であることが示唆された。

### 卵母細胞由来の BMP シグナルに対する Noggin の作用

実際に、Noggin は卵母細胞由来の BMP シグナルを抑制する能力を持つのかどうかについて SMAD1/5/8 のリン酸化状態を指標に解析を行った。また、BMP15 は GDF9 とヘテロダイマーを形成し、SMAD1/5/8 に加えて SMAD2/3 を介してシグナル伝達を行うことが報告されている (Peng et al., 2013)。そのため、SMAD1/5/8 のリン酸化だけでなく、SMAD2/3 のリン酸化についても解析を行った。本実験では、実験区が多いことに加え、SMAD1/5/8、SMAD2/3 のリン酸化状態の解析には多くの細胞を必要とするため、卵丘細胞ではなく、より簡便に大量の細胞を回収できる壁顆粒膜細胞を用いた。壁顆粒膜細胞を単層培養し、卵母細胞、または rhBMP15 を添加して培養し、リン酸化 SMAD1/5/8 (pSMAD1/5/8)、および、リン酸化 SMAD2/3 (pSMAD2/3) に対する Noggin の合成タンパク質の影響を解析した (Fig. 2-7)。また、Noggin により抑制されることの知られている BMP4 を対照区として用いた。まず、rhBMP4 を添加すると、pSMAD1/5/8 の強いリン酸化バンドが検出され、そこに rmNOG を添加することで SMAD1/5/8 リン酸化の抑制が見られた。このとき、pSMAD2/3 には無添加区と比較して変化は見られなかった。また、rhBMP15 を培地に添加すると、rhBMP4 と同様、pSMAD1/5/8 の強いリン酸化バンドが検出され、rmNOG 添加により pSMAD1/5/8 バンドの抑制が見られた。この時も、pSMAD2/3 バンドは無添加区と比較して変化は見られなかった。次に、壁顆粒膜細胞を卵母細胞と共培養することで pSMAD1/5/8 のリン酸化バンドが濃く検出さ

れ、一方、rmNOG を添加することでそのバンドは薄くなった。pSMAD2/3 のバンドも、pSMAD1/5/8 と同様、卵母細胞との共培養により濃く検出され、そのバンドは rmNOG 添加により薄くなった。また、rmNOG (500 ng/ml) を単独で添加したところ、pSMAD1/5/8、pSMAD2/3 のバンドの濃さに変化は見られなかった（データ未掲載）。

これらのことから、rmNOG は実際に、卵母細胞由来の BMP シグナルを抑制できること、さらに rmNOG は卵母細胞由来の GDF9 シグナルにも影響を及ぼしうることが示唆された。

### **Noggin 過剰発現トランスジェニックマウスの解析**

本研究のこれまでの解析より、Noggin は卵分泌因子とエストロゲンのシグナル相互作用の仲介因子として重要な役割を果たすと考えられた。また、本研究より、Noggin の卵丘細胞での発現は、エストロゲンによって抑制されているため低く、*Nog* 欠損マウスを用いた解析では、その機能解析は十分に行えないことが考えられる。そこで、顆粒膜細胞（卵丘細胞および壁顆粒膜細胞）特異的に Noggin を過剰発現するトランスジェニックマウス（以下、*Nog* 過剰発現マウス）を用いて、顆粒膜細胞の発達に与える影響を解析することにした。顆粒膜細胞特異的に Noggin を過剰発現するマウスについては方法にて詳述した。

#### **(1) Noggin 過剰発現の確認**

まず、*Nog* 過剰発現マウスの卵巣での *Nog* 発現量を解析した。生後 3 週齢の *Nog* 過剰発現マウスおよびその同腹子のコントロールマウスに PMSG 刺激により卵胞発達を促進させ、卵巣を回収して *Nog* mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析した (Fig. 2-8)。その結果、*Nog* の発現は *Nog* 過剰発現マウスにおいて、コントロールと比較して約 3.5

倍と有意に高かった。以上から、本マウスでは実際に *Nog* が過剰発現されていることが確認された。

## (2) *Noggin* 過剰発現マウスの妊孕性テスト

顆粒膜細胞特異的 *Nog* 過剰発現がメスマウスの妊孕性に与える影響を解析した。8 週齢の *Nog* 過剰発現メスマウスまたはコントロール (pMES-*Nog* または *Amhr2-Cre*) のメスマウスを、同週齢の野生型オスマウスと共飼育し、約 5 カ月間の出産回数と産仔を記録する交配テストをおこなった (Table 2-3)。その結果、コントロール (2 ケージ、pMES-*Nog* および *Amhr2-Cre*、各 1 ケージずつ) では 5 カ月間で合計 11 回の出産、および平均約 9 匹/回の出産が得られ、これは、当研究室のマウス室において飼育しているほかの野生型マウスと同等であった。これに対し、*Nog* 過剰発現マウス (3 ケージ) では産仔は確認できなかった。しかしながら、交配テストに用いたすべての *Nog* 過剰発現マウスにおいて、期間中、複数回膣栓 (プラグ) が確認されたことから交配自体は正常に行われていると考えられる。これらのことから、*Nog* 過剰発現マウスは不妊であると考えられた。

## (3) *Noggin* 過剰発現マウスの組織形態観察

次に、卵巣の組織切片を作成し、*Nog* 過剰発現が卵胞発達に与える影響を解析した。3 週齢の *Nog* 過剰発現マウスおよびコントロールマウスに PMSG 刺激後、44-48 時間後の卵巣切片を作成し、HE 染色により卵巣形態を観察した (Fig. 2-9)。まず、コントロールでは発達した胞状卵胞が複数観察された (Fig. 2-9A)。一方、*Nog* 過剰発現マウスの卵巣においても、胞状卵胞が複数観察されたものの、卵母細胞の萎縮や卵母細胞と卵丘細胞間に隙間が観察される、異常な卵胞が多く見られた。これらは、閉鎖卵胞 (Atretic follicle) であると考えられたため、方法で示した定義のもと、全胞状卵胞に占める閉鎖

卵胞の割合を計測したところ、コントロールでは約 25% が閉鎖卵胞であったのに対し、*Nog* 過剰発現マウスでは約 80% とコントロールと比較して有意に高かった (Fig. 2-9C)。

また、*Nog* 過剰発現マウスにおいて確認された胞状卵胞のうち、閉鎖卵胞であると認められなかった卵胞では、Fig. 2-9D のように、正常な胞状卵胞と比べて、卵胞内の顆粒膜細胞層が極端に薄かった。これらの結果から、*Nog* 過剰発現マウスでは正常な胞状卵胞の発達が起こらず、このことが *Nog* 過剰発現マウスの不妊の原因の一つである可能性が示唆された。

## 考察

第 1 章のマイクロアレイ解析の結果から、エストロゲンの存在は、卵丘細胞において卵分泌因子によって制御される生物現象には大きな影響を及ぼさないが、卵母細胞が分泌する BMP15 シグナルの増強にかかわることが示唆された。そこで本節ではエストロゲンが卵分泌因子のシグナルを増強するメカニズムを明らかにするために、一般に、BMP シグナルのアンタゴニストとして知られている *Noggin* に着目し、卵分泌因子とエストロゲンのシグナルの仲介因子としての働きを解析した。

まず、第 1 章で示唆された、エストロゲンが卵母細胞由来の BMP シグナルを増強するという点について、BMP の細胞内シグナル伝達を仲介する SMAD1/5/8 のリン酸化を指標に検討を行った。その結果、予想されたように E2 添加によって卵丘細胞における pSMAD1/5/8 の増加が見られた。この時、第 1 章のマイクロアレイ解析結果を見ると、E2 によって BMP シグナルに関係する受容体などの発現に変化は見られなかったことから、E2 は、卵丘細胞での BMP 受容体発現を制御することで BMP シグナルに対する卵丘細胞の応答性に影響している可能性は低いと考えられる。

卵巣で発現することが知られている BMP アンタゴニストについて、マイクロアレイ解析結果を確認した結果、*Nog* のみが E2 による発現抑制を受け、*Grem2* は発現促進を受けていた。今回は、エストロゲンによる BMP シグナルの増強に着目したため、*Grem2* の解析は行わなかったが、GREM2 は原始卵胞顆粒膜細胞から分泌され、BMP4 や抗ミューラー管ホルモン (AMH) のシグナルを阻害することで 1 次卵胞への発達を阻害することが報告されている (Nilsson et al., 2014)。また、胞状卵胞期においては、莢膜細胞が分泌する BMP シグナルを阻害することで卵胞発達を阻害するとされている (Sudo et al., 2004)。*Grem2* は今回着目した *Nog* とは逆の制御を受けることから、今後 GREM2

についてさらなる解析を行うことで、卵分泌因子とエストロゲンのシグナル相互作用において *Noggin* とは異なる新たなメカニズムが明らかとなるかもしれない。

胞状卵胞における *Nog* の発現は、卵丘細胞で壁顆粒膜細胞と比較して有意に高かった。一般に、卵丘細胞と壁顆粒膜細胞間で発現差のある遺伝子は卵母細胞による発現制御を受けていることが多い (Sugiura et al., 2005b)。すなわち、ある遺伝子発現を卵母細胞が卵丘細胞や壁顆粒膜細胞で促進する場合、卵母細胞の近くに存在している卵丘細胞では、壁顆粒膜細胞と比べてより強く卵母細胞の影響を受けるため、壁顆粒膜細胞より高い発現を示すようになる。実際、本章で解析した *Nog* の発現は、卵母細胞により促進されていた。一方、卵丘細胞における *Nog* の発現は、エストロゲンによる抑制を受けることが明らかとなった。卵胞内において、エストロゲンは、莢膜細胞により供給されるアンドロゲンを基質に壁顆粒膜細胞で合成されており、壁顆粒膜細胞周辺では、卵丘細胞周辺と比べて局所的にエストロゲン濃度が高い可能性が考えられる。また、今回データは示さなかったが、壁顆粒膜細胞においても、卵丘細胞と同様な卵分泌因子とエストロゲンによる *Nog* 発現制御が存在することは確認してある。したがって、*Nog* の発現が壁顆粒膜細胞と比較して卵丘細胞で高い理由としては、上記の卵丘細胞における卵分泌因子による発現促進に加えて、壁顆粒膜細胞でのエストロゲンによる抑制による影響だと考えられる。

*Bmp15* ノックアウトマウスの卵丘-卵母細胞複合体を用いた解析から、BMP15 は *Nog* の発現促進に必要であることが明らかとなった。また、卵丘-卵母細胞複合体を SB431542 添加培地で培養することで *Nog* の発現低下が見られたことから、*Nog* 発現促進には GDF9 も必要であることが示唆された。実際に、培養下で rhBMP15 と rmGDF9 を添加することで *Nog* の発現は促進されたことから、これらの BMP15 と GDF9 が協調的に働いて *Nog* の発現を促進していると考えられる。しかし、rmGDF9 の単独添加によって *Nog* の発現上昇は見られていなかったことや、*Bmp15* ノックアウトマウスの卵丘-

卵母細胞複合体においても、*Nog* の発現上昇が見られたことから、これら以外の因子の関与も考えられる。卵母細胞は他にも BMP6 や FGF8 など分泌することが知られており、これらの因子が *Noggin* の発現促進にかかわっている可能性が考えられる。

本研究の結果から、少なくとも培養下では、NOG は BMP15 のシグナルを抑制できることが明らかとなった。BMP15 の合成タンパク質は、動物種によりアミノ酸配列が異なり、大きく異なる活性を持つことが知られている (McNatty et al., 2005a, 2005b)。特に、マウスの BMP15 は、その合成タンパク質は安定性が低く、単離が困難であるため (Hashimoto et al., 2005, Peng et al., 2013)、市販されておらず、今回の解析ではヒトの BMP15 合成タンパク質を用いている。今後、NOG が実際にマウス由来の BMP15 シグナルを抑制できるのかについて解析していく必要はあるが、卵分泌因子による SMAD1/5/8 のリン酸化が NOG 合成タンパク質の添加によって抑制できることから、*Noggin* は卵母細胞由来の BMP15 シグナルを抑制できると考えられた。

本節の結果より、NOG の添加は、卵分泌因子刺激による壁顆粒膜際細胞での SMAD1/5/8 のリン酸化のみではなく、SMAD2/3 リン酸化にも影響を及ぼしていた。これは rmNOG が GDF9 と直接結合し、そのシグナルを抑制する可能性も考えられるが、これまでにそのような報告はない。一般に、TGF $\beta$  スーパーファミリーに属するタンパク質は 2 量体 (ダイマー) を形成して機能するが、最近、BMP15 と GDF9 はヘテロダイマーを形成して機能し、SMAD2/3 がそのシグナルを仲介すると報告された (Peng et al., 2013)。しかし、この報告では、BMP15 と GDF9 の合成タンパク質が培養下でヘテロダイマーを形成できることを報告したのみであり、実際に卵母細胞が分泌している BMP15 と GDF9 がヘテロダイマーを形成しているかどうかについては不明である。本研究において、BMP アンタゴニストである NOG の添加が、GDF9 の下流シグナルである SMAD2/3 のリン酸化を減弱させたという結果は、NOG が卵母細胞由来の BMP15/GDF9 ヘテロダイマーを形成している BMP15 と結合してそのシグナルを阻害し



た可能性が考えられる。この結果は、いまだ実際に卵分泌因子中における存在が証明されていないヘテロダイマーの存在を支持するものである。

以上の *in vitro* での解析から、Fig. 2-1 に示したような *Noggin* を介した卵分泌因子シグナル、特に **BMP** シグナルの負のフィードバック作用を、エストロゲンが抑制する機構が存在すること、さらにこの機構が第 1 章で明らかとなったエストロゲンによる卵分泌因子シグナルの増強メカニズムである可能性が示唆された。さらに、*Nog* 過剰発現マウスでは、卵胞発達異常が見られ、不妊であったことから、この *Noggin* を介した卵分泌因子とエストロゲンの相互作用は、正常な卵胞発達に必須であると考えられる。

*Nog* 過剰発現マウスでは、閉鎖卵胞の増加が顕著であり、また、閉鎖卵胞でない胞状卵胞においても、顆粒膜細胞層の希薄化が見られた。これまでの研究より、**BMP15** は顆粒膜細胞のアポトーシスを抑制し、増殖を促進することが知られており (Hussein et al., 2005、Moore et al., 2003)、*Nog* 過剰発現マウスで見られた異常は、**BMP15** のこれらの機能が *Noggin* によって抑制されたためであると考えられる。

これまで卵巣における **BMP** シグナルの重要性については、*Bmp15* ノックアウトマウス (Yan et al., 2001)、**BMP15** 受容体 (*Bmpr1a* と *Bmpr1b*) のダブルノックアウトマウス (Edoson et al., 2010)、さらにシグナルを仲介する *Smad1/5/8* のトリプルノックアウトマウス (Pangas et al., 2008) などを用いて研究されてきたが、興味深いことに、これらのマウスモデルでは、排卵数が低下し、産仔数の減少が見られるものの、妊孕性は確認されている。一方、本研究において *Nog* 過剰発現マウスは不妊であった。*Bmp15* ノックアウトマウスでは、排卵前の卵胞において、卵丘細胞がほとんど見られない卵母細胞が確認されており、これは本研究の *Nog* 過剰発現マウスにおいても同様であったことから、本研究の *Nog* 過剰発現マウスにおいても **BMP15** は減弱していると考えられる。これまでの報告と本研究での *Nog* 過剰発現マウスの表現型で妊孕性に差が見られた理由としては、**BMP15** と **GDF9** のヘテロダイマーの関与の可能性が考えられる。前述の

ように、Noggin は BMP15 シグナルだけでなく、BMP15/GDF9 ヘテロダイマーの機能を阻害できる可能性が考えられ、これが、*Nog* 過剰発現マウスでの不妊につながったのではないかと考えられる。また、上記の BMP 受容体や SMAD のノックアウトマウスでは、加齢（8 カ月以上）に伴って顆粒膜細胞の癌化（顆粒膜細胞腫）が報告されている（Edson et al., 2010、Pangas et al., 2008）。本研究では *Nog* 過剰発現マウスを最大 6 カ月齢までしか観察しておらず、癌化の様子は確認されていないが、今後、*Nog* 過剰発現マウスを加齢させることで、卵分泌因子とエストロゲンの相互作用と顆粒膜細胞の癌化の関連についても検討できる可能性がある。





以上、本節では BMP アンタゴニストの Noggin に着目し、エストロゲンが卵分泌因子のシグナルを制御するメカニズムとして一つの知見を得ることができた。エストロゲンと卵分泌因子により、発現制御を受ける Noggin は、実際に卵母細胞が分泌する BMP シグナルを抑制しており、さらに、生体内において Noggin を過剰発現させることで個体は不妊となる可能性が示唆された。これは、エストロゲンと卵分泌因子の相互作用の生体内での重要性を強く示唆する結果である。しかし、今回の解析のみでは、*Nog* 過剰発現マウスが不妊となる具体的な原因を解明するまでに至らなかったため、今後、ホルモン刺激による過剰排卵処理など、より詳しい解析を行うことで Noggin を介した卵分泌因子とエストロゲンの相互作用の重要性をより解明できると考えられる。

第 2 節では、第 1 章のマイクロアレイ解析で明らかとなった、卵分泌因子によるエストロゲンシグナルによって制御される生物現象の変化のメカニズムについて解析を行う。

**Table 2-1 本節で用いたプライマー**

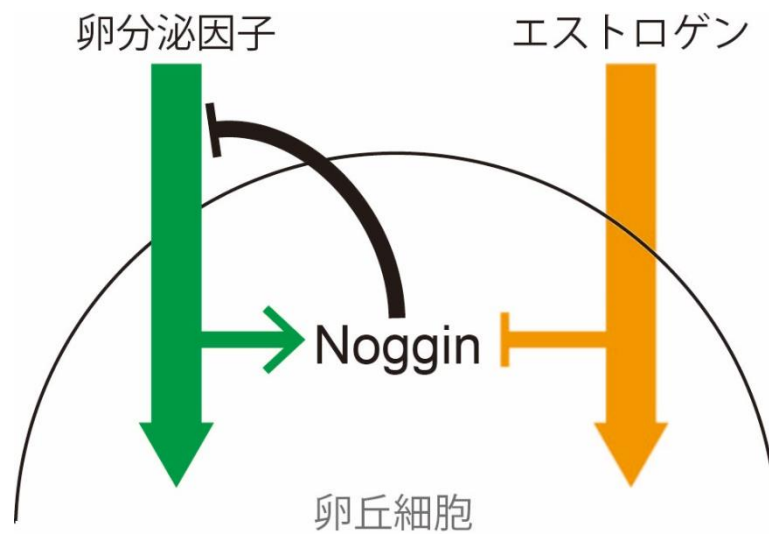
Gene symbol	RefSeq Acc. no.	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
リアルタイム PCR 用			
<i>Rpl19</i>	NM_009078	CCGCTGCGGGAAAAAGAAG	CAGCCCATCCTTGATCAGCTT
<i>Nog</i>	NM_008711	TGTACGCGTGGAATGACTA	TGAGGTGCACAGACTTGGA
Genotyping 用			
pMES-Nog		CCCCCTGAACCTGAAACATA	GCGTCTCGTTCAGATCCTTC
Amhr2-Cre		GCCTGCATTACCGGTCGATGC	CAGGGTGTATAAGCAATCCC

Table 2-2 SMAD 阻害因子および BMP アンタゴニスト

Gene Symbol		比較 2  vs 	比較 4  vs 
SMAD 阻害因子	<i>Smad6</i>	—	—
	<i>Smad7</i>	—	—
	<i>Tob1</i>	—	—
	<i>Tob2</i>	—	—
BMP アンタゴニスト	<i>Bambi</i>	—	—
	<i>Fst</i>	—	—
	<i>Grem1</i>	—	—
	<i>Grem2</i>	—	促進
	<i>Htra1</i>	—	—
	<i>Htra3</i>	—	—
	<i>Nog</i>	—	抑制
	<i>Twsg1</i>	—	—

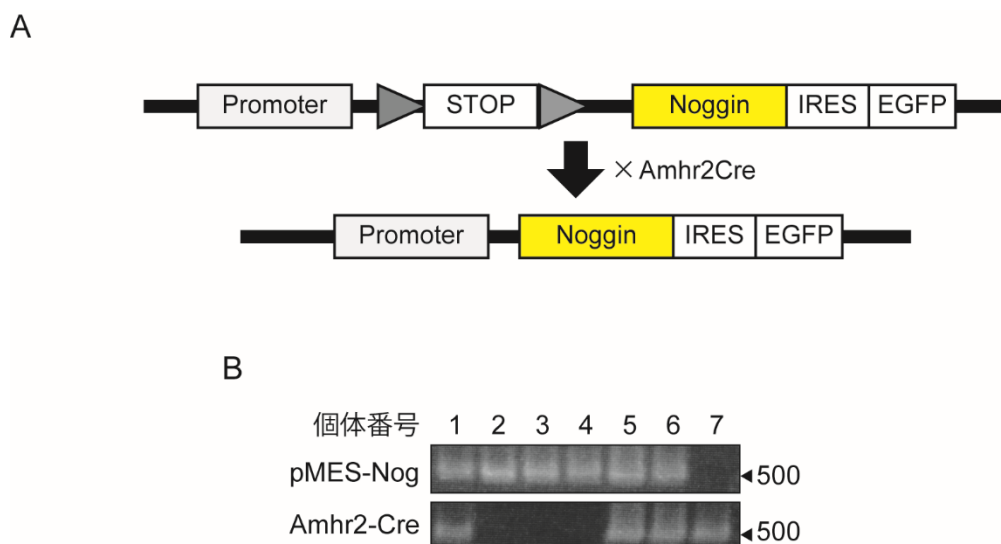
**Table 2-3** **Noggin 過剰発現マウス妊孕性テスト**

	交配ペア数	出産回数	産仔数 (±SEM)
Control	2	11	9.09 (±0.50)
Tg	3	0	0



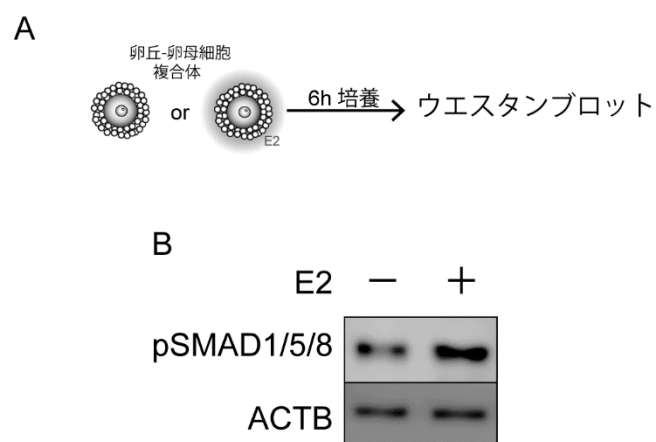
**Fig. 2-1 エストロゲンが卵分泌因子を制御するメカニズムの仮説**

胞状卵胞の卵丘細胞では、BMP アンタゴニスト Noggin を介した卵分泌因子シグナルに対する負のフィードバック作用が存在し、エストロゲンは Noggin の発現を抑制することで、卵分泌因子シグナルを増強させる可能性が考えられる。



**Fig. 2-2 pMES-Nog/Amhr2-Cre マウスの遺伝子型の確認**

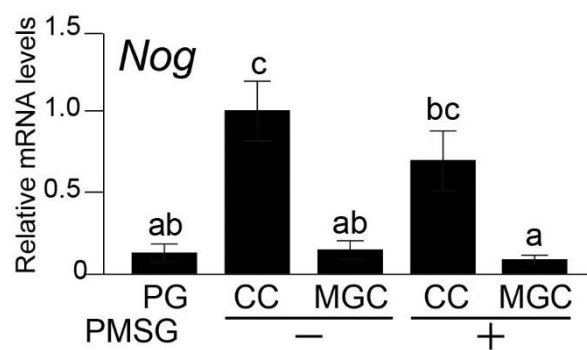
(A) pMES-Nog コンストラクトについて。IRES-EGFP 配列の上流に *Noggin* 配列をコードしており、チキン由来  $\beta$  アクチンプロモーターと *Noggin* 配列の間には *LoxP* 配列に挟まれた *STOP* 配列を含み、*Cre* リコンビナーゼを発現する細胞では *STOP* 配列が欠失するため、*Noggin* が発現する。今回は、当研究室保有の顆粒膜細胞特異的に *Cre* リコンビナーゼを発現する *Amhr2-Cre* マウスを交配した。(B) Genotyping 結果の一例。pMES-Nog コンストラクトを保有するマウスは約 500 bp のサイズのコピーが検出され、*Amhr2-Cre* を保有するマウスは約 500 bp のサイズのコピーが検出される。個体番号 1、5、6 は *Nog* 過剰発現マウスであり、個体番号 2、3、4 は pMES-Nog のコンストラクトのみを保有するマウス、個体番号 7 は *Amhr2-Cre* のみを保有するマウスである。



**Fig. 2-3 SMAD のリン酸化に対するエストロゲンの影響**

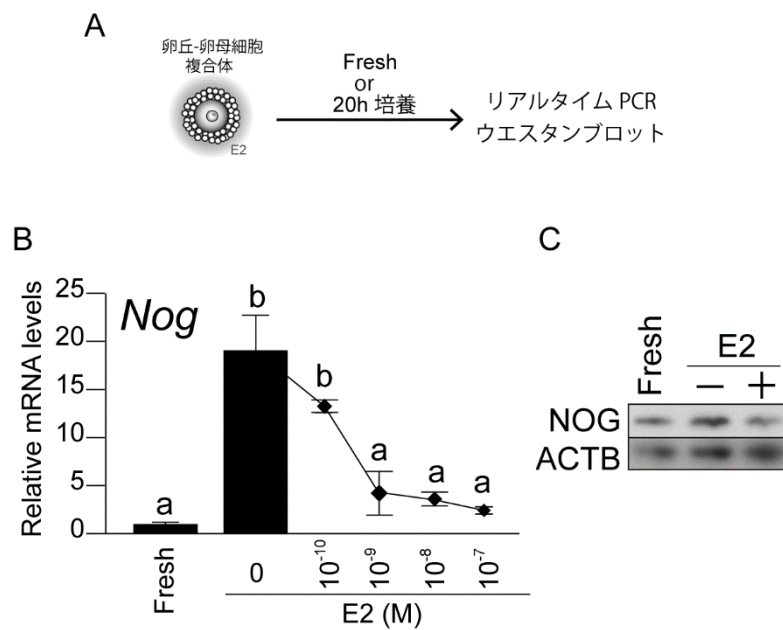
(A) 実験の概要。卵丘-卵母細胞複合体を単独、または E2 ( $10^{-7}$  M) 添加培地で培養し、6 時間後の卵丘細胞における SMAD1/5/8 のリン酸化状態 (pSMAD1/5/8) をウェスタンブロットにより解析した。(B) ウェスタンブロットの結果。内部標準として  $\beta$  アクチン (ACTB) を用いた。





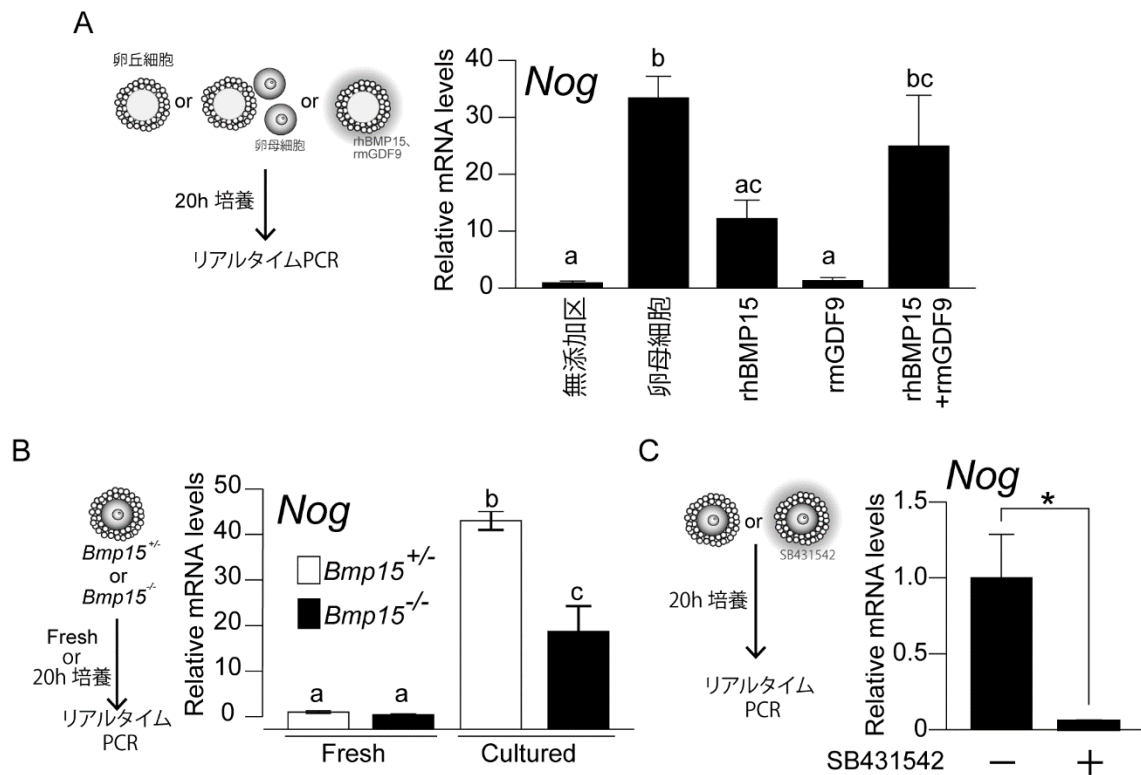
**Fig. 2-4 Noggin の発現解析**

2 次卵胞の前胞状卵胞顆粒膜細胞 (PG) および PMSG 刺激前後の胞状卵胞の卵丘細胞 (CC)、壁顆粒膜細胞 (MGC) を回収し、各細胞における *Nog* mRNA 発現をリアルタイム PCR により解析した。異符号同士に有意差あり、 $p < 0.05$ 。



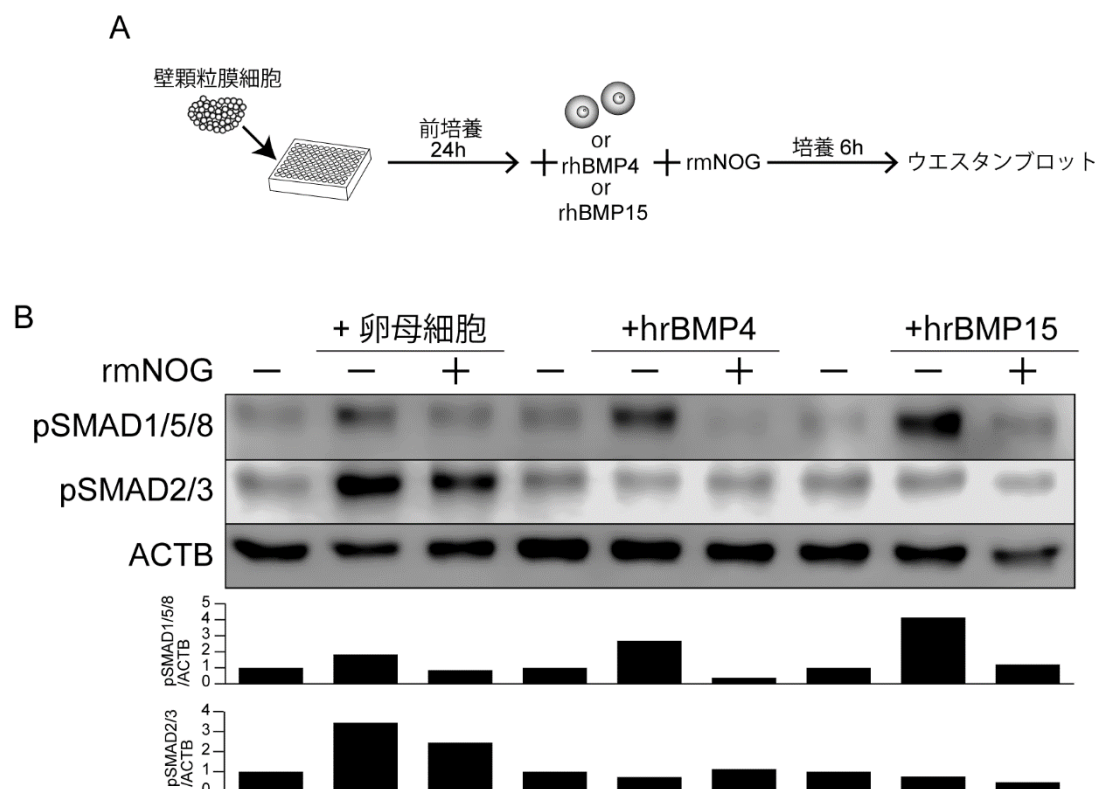
**Fig. 2-5 卵丘細胞における Noggin の発現に対するエストロゲンの影響**

(A) 実験の概要。卵丘-卵母細胞複合体を回収し、回収直後 (Fresh) と E2 (0、 $10^{-10}$ - $10^{-7}$  M) 添加培地で 20 時間培養後の (B) *Nog* mRNA をリアルタイム PCR で、(C) 卵丘-卵母細胞を回収直後と E2 (0、 $10^{-7}$  M) 添加培地で 20 時間培養後の NOG タンパク質発現をウエスタンブロットで解析した。異符号同士に有意差あり、 $p < 0.05$ 。



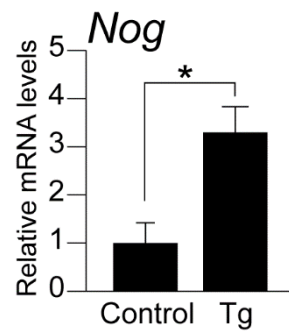
**Fig. 2-6 卵丘細胞における Noggin の発現に対する卵分泌因子の影響**

(A) 実験の概要。OOX した卵丘細胞を卵母細胞 (2 個/ $\mu$ l) と共培養、または rhBMP15 (50 ng/ml)、rhGDF9 (50 ng/ml) をそれぞれ単独、または同時に添加培養し、20 時間後の *Nog* の mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析した。(B) *Bmp15* ノックアウトマウス (*Bmp15*<sup>-/-</sup>) と同腹子のコントロールマウス (*Bmp15*<sup>+/-</sup>) から卵丘-卵母細胞複合体を回収し、回収直後と培養 20 時間後の *Nog* mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析した。(C) 卵丘-卵母細胞複合体を ALK4 の阻害剤 SB431542 を添加し、培養 20 時間後の *Nog* mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析した。異符号間に有意差あり、\*;  $p < 0.05$ 。



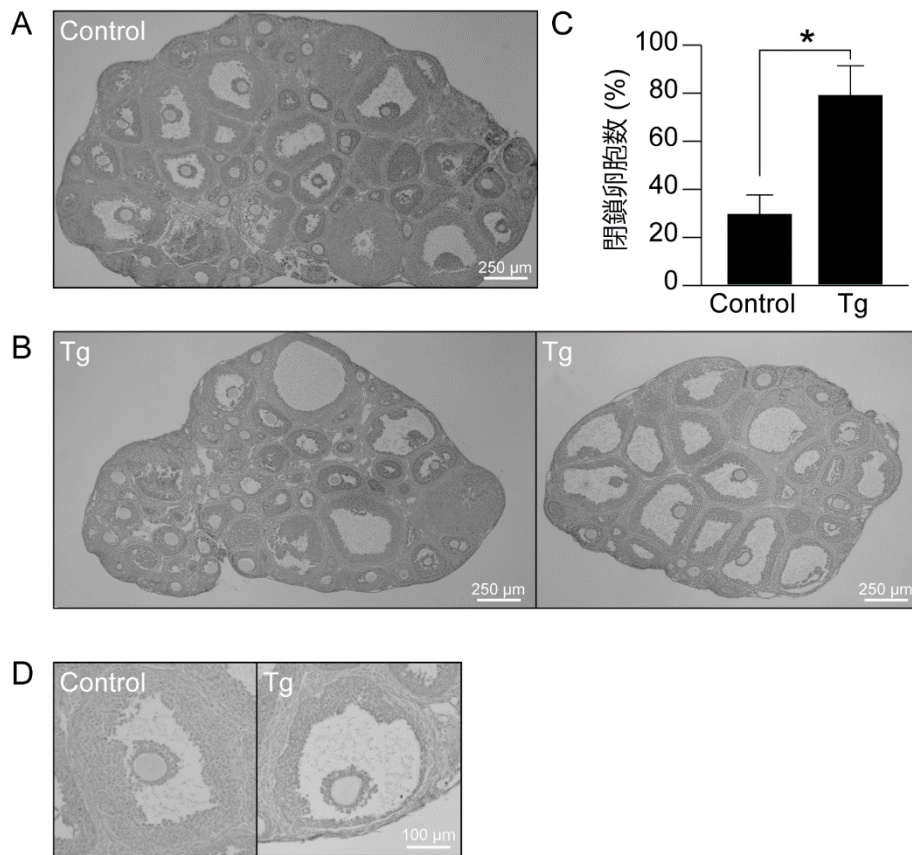
**Fig. 2-7 卵母細胞由来の BMP シグナルに対する Noggin の作用**

(A) 実験の概要。壁顆粒膜細胞を卵母細胞（2 個/ $\mu$ l）または rhBMP15（50 ng/ml）添加培地で培養し、SMAD のリン酸化を促進し、rmNOG（500 ng/ml）の SMAD リン酸化に対する影響を（B）ウエスタンブロットで解析した。また、NOG が結合することが知られている rhBMP4（50 ng/ml）を NOG による SMAD1/5/8 のリン酸化の抑制のコントロールとして用いた。内部標準として  $\beta$  アクチン（ACTB）を用いた。



**Fig. 2-8 Noggin 過剰発現の確認**

*Nog* 過剰発現マウス (pMES-Nog/Amhr2-Cre マウス: Tg) および、同腹子のコントロール (pMES-Nog または Amhr2-Cre) の卵巣における *Nog* 発現をリアルタイム PCR で解析した。\*;  $p < 0.05$ 。



**Fig. 2-9 Noggin 過剰発現マウスの組織形態観察**

3 週齢 PMSG 刺激後の *Nog* 過剰発現マウス (pMES-Nog/Amhr2Cre) の卵巣と、同腹子のコントロール (Amhr2Cre、または pMES-Nog) の卵巣の組織切片を用いた解析を行った。(A) コントロールマウスの卵巣切片。(B) *Nog* 過剰発現マウスにおける卵巣切片。同じ遺伝子型を持つ異なる 2 個体の卵巣切片を示した。(C) 各卵胞において、全胞状卵胞に対する異常卵胞 (閉鎖卵胞) 数の割合を算出した。\*;  $p < 0.05$ 。(D) コントロールマウス (左) と *Nog* 過剰発現マウス (右) において観察された胞状卵胞。

## 第2節

卵分泌因子によるエストロゲンのシグナルの制御について

## 緒言

第 1 章のマイクロアレイ解析の結果から、卵丘細胞で卵分泌因子はエストロゲンによって制御される生物現象を変化させること、すなわち、卵分泌因子は、卵丘細胞におけるエストロゲンの応答性を変化させることが示唆された。しかしながら、卵分泌因子がどのように卵丘細胞におけるエストロゲンのシグナルに影響を与えるのかについては不明である。そこで本節では卵分泌因子がエストロゲンのシグナルを制御するメカニズムに着目した。

前述のように、エストロゲンのシグナルは、主に、エストロゲン受容体 (estrogen receptor: ESR) によって仲介される (Fig. 2-10)。細胞質中の ESR は、エストロゲンと結合すると二量体を形成し、核内に移動後、エストロゲン受容体応答領域と呼ばれる DNA 配列に特異的に結合してエストロゲンシグナルのターゲットとなる遺伝子の転写を制御する (Couse et al., 1999b, Klinge, 2001)。このとき、ESR の転写活性は複数の ESR 結合因子によって制御され、エストロゲンシグナルによって制御を受ける遺伝子の発現は相互作用する ESR 結合因子の種類によって促進または抑制を受ける (Klinge, 2000)。したがって、卵分泌因子が ESR 結合因子の発現を制御することでエストロゲンシグナルに影響を与えている可能性が考えられる。しかし、卵丘細胞における ESR 結合因子の発現や、卵分泌因子による制御に関しては報告が少ない。

そこで、本節では、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、卵分泌因子により発現が制御される ESR 結合因子の探索を行った。

また、第 1 章のマイクロアレイ解析結果では、卵丘細胞での *Esr2* 発現は卵分泌因子によって促進されることが示唆された。これまで、卵丘細胞における *Esr2* の発現制御は研究されておらず、卵分泌因子による *Esr2* 発現制御は興味深い。そこで、本節では、上記の ESR 結合因子に加えて、卵丘細胞における *Esr2* 発現に対する卵分泌因子の



影響についても解析した。

一般に、顆粒膜細胞において卵分泌因子の制御を受ける遺伝子発現は、卵丘細胞と壁顆粒膜細胞で発現に差が生じることが知られている (Sugiura et al., 2005b)。例えば、細胞の代謝に関連する遺伝子、中でもアミノ酸輸送に関連した遺伝子や解糖系関連遺伝子の発現は、壁顆粒膜細胞と比較して、卵丘細胞で高いことが知られているが (Eppig et al., 2005, Sugiura et al., 2005a)、これは、卵分泌因子が近傍に存在する卵丘細胞でこれらの遺伝子の発現を促進するためである。また、LH の受容体をコードする *Lhcgr* 遺伝子の発現は、壁顆粒膜細胞と比較して卵丘細胞で低く維持されている。これは、卵分泌因子が卵丘細胞における *Lhcgr* の発現を抑制しているためである (Eppig et al., 1997)。このように、卵母細胞の制御を受ける遺伝子は、その結果として卵丘細胞と壁顆粒膜細胞間で発現差が生じることが多い。そこで、卵丘細胞の卵母細胞との共培養実験に加えて、卵丘細胞と壁顆粒膜細胞間での遺伝子発現を比較し、培養下で観察された卵母細胞による制御が実際に生体内においても見られるかについても調べた。

## 材料と方法

### マウス

マウスは3週齢のBDF1 (C57BL/6×DBA2) マウスを自家繁殖または三協ラボサービスから購入して用いた。飼育条件は第2章1節と同様である。

### 顆粒膜細胞の単離

発現解析に用いた卵丘-卵母細胞複合体と壁顆粒膜細胞は、PMSG 刺激、または未刺激の3週齢マウスから、第2章 第1節と同様の方法で回収した。卵丘細胞の培養はOocyctectomy 法（第1章参照）により卵丘-卵母細胞複合体から卵母細胞を除去した卵丘細胞を用いた。

### 培養

培養には、第1章と同様の基本培地を用い、37℃、CO<sub>2</sub> 5%、O<sub>2</sub> 5%、湿度 100% に保たれたインキュベーター内で行った。卵丘細胞は、OOX 法（第1章参照）により、卵丘-卵母細胞複合体より卵母細胞を除去した卵丘細胞塊を培養に用いた。卵母細胞との共培養では1 µl の培地につき2個の卵母細胞を加え、流動パラフィン下の50 µl の培地のドロップ内で培養した。壁顆粒膜細胞は、第2章、第1節と同様の方法で、96 ウェルプレートを用いて単層培養を行った。卵母細胞との共培養には1 µl あたり2個の卵母細胞を加えた。

### トータル RNA 抽出、および cDNA 合成

トータル RNA の抽出には ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega) を用い、

第2章第1節と同様の方法でトータル RNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を第2章第1節と同様の方法で用い、cDNA を得た。

### **リアルタイム PCR**

リアルタイム PCR には、第2章第1節と同様、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) と StepOnePlus Real-time PCR system (Applied biosystems) を使用した。本章で用いたプライマーは Table 2-4 に示した。

### **統計処理**

本実験ではすべて独立した実験を3回以上行った。統計処理にはマイクロソフト Excel のアドインソフト Excel 統計を用い、3区以上の比較には Tukey 法を用い、2区の比較には t 検定を用いた。危険率  $p < 0.05$  を有意とした。

## 結果

### エストロゲン受容体の発現解析

まず、前胞状卵胞から胞状卵胞への発達過程でのエストロゲン受容体 (*Esr2*) の発現動態の解析を行った。12 日齢のマウスから採取した前胞状卵胞顆粒膜細胞と 3 週齢の PMSG 刺激前後の卵丘細胞、および壁顆粒膜細胞における *Esr2* mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析した (Fig. 2-11)。その結果、*Esr2* の mRNA 発現は、前胞状卵胞顆粒膜細胞と比較して PMSG 刺激前後の壁顆粒膜細胞において約 3 倍程度、有意に高かった。一方、卵丘細胞は前胞状卵胞顆粒膜細胞と比較して有意な発現差は見られなかった。また、卵丘細胞と壁顆粒膜細胞間では、壁顆粒膜細胞において *Esr2* の発現が高い傾向が見られたが、有意差を検出するに至らなかった。

### エストロゲン受容体の発現制御解析

次に、卵丘細胞および壁顆粒膜細胞におけるエストロゲン受容体 (*Esr2*) の発現に対する卵分泌因子の影響を解析した (Fig. 2-12)。細胞を卵母細胞と共培養し、*Esr2* mRNA 発現を解析したところ、卵丘細胞における *Esr2* mRNA 発現は、卵丘細胞を単独で培養した区と比較して、卵母細胞との共培養の区において約 3 倍と有意に上昇した。一方、壁顆粒膜細胞における *Esr2* mRNA 発現は卵母細胞添加の有無にかかわらず変化は見られなかった。このことから、卵丘細胞における *Esr2* mRNA 発現は、卵分泌因子によって高く維持されており、一方、壁顆粒膜細胞での *Esr2* 発現は、卵分泌因子の影響を受けないことが明らかとなった。

## 卵丘細胞におけるエストロゲン受容体結合因子の発現に対する卵分泌因子の影響

解析した ESR 結合因子は、MGI (Mouse Genomic Informatics, <http://informatics.jax.org/>) データベースにおいて、遺伝子オントロジー「Estrogen receptor binding (GO: 0030331)」に定義されている遺伝子のうち、過去の論文で ESR との結合が証明されているものとした。「Estrogen receptor binding」とされる遺伝子は 40 個あり (2015 年 11 月 26 日現在)、その中で、実験的に ESR との結合が証明されているものは 9 個であった (Table 2-5)。また、Table 2-5 では、第 1 章でのマイクロアレイ解析結果を参考として示した。

これらの ESR 結合因子について、卵丘細胞における遺伝子発現に対する卵分泌因子の影響を解析した (Fig. 2-13)。その結果、*Ddx17*、*Ncoa3*、*Nrip1* の発現は、卵丘細胞と卵母細胞の共培養によって、卵丘細胞単独で培養した場合と比較して約 1/10、1/2、1/3 と有意に低下した。一方、*Psmc3ip* の発現は約 4 倍と有意に上昇した。卵丘細胞におけるこれらの ESR 結合因子の発現は、少なくとも培養下では、卵分泌因子による制御を受けると考えられる。また、第 1 章のマイクロアレイ解析では卵母細胞による *Dnmt1*、*Hsd17b10* の有意な発現促進が見られ、一方 *Arrb1*、*Ncor1* は有意な発現抑制が見られたが、本解析ではそれぞれ促進、抑制傾向が見られたものの、有意差を検出するには至らなかった。

## エストロゲン受容体結合因子の発現解析

次に、胞状卵胞期の卵丘細胞と壁顆粒膜細胞において、それぞれの ESR 結合因子の遺伝子発現をリアルタイム PCR で比較した (Fig. 2-14)。その結果、卵丘細胞の卵母細胞との共培養実験で、卵分泌因子によって抑制の見られた *Ddx17*、*Ncoa3*、*Nrip1* の発現は、それぞれ約 4 倍、6 倍、2 倍と壁顆粒膜細胞で卵丘細胞より高かった。一方、共培養実験で卵分泌因子による有意な促進が見られた *Psmc3ip* の発現は卵丘細胞、壁顆粒

膜細胞間で差は見られなかった。

## 考察

本節では、第1章で明らかとなった、卵分泌因子がエストロゲンのシグナルを制御するメカニズムに着目し、卵分泌因子がエストロゲンシグナルに影響をもつ ESR 結合因子の遺伝子発現を制御する可能性を検討した。その結果、*Ddx17*、*Ncoa3*、*Nrip1*、*Psmc3ip* などの複数の ESR 結合因子の発現が、少なくとも mRNA レベルでは、卵丘細胞において卵分泌因子の制御を受けることが明らかとなった。これは、卵母細胞が ESR 結合因子の発現を制御することで卵丘細胞でのエストロゲンシグナルを制御するという仮説に反しないものである。

また、本節では、*Esr2* 自身の発現が卵母細胞の制御を受ける可能性についても検討した。興味深いことに、*Esr2* の発現は卵丘細胞では卵分泌因子による発現促進を受けるが、壁顆粒膜細胞では卵分泌因子による影響が見られなかった。壁顆粒膜細胞において、*Esr2* の発現が卵分泌因子に依存しない理由は不明である。一方、卵丘細胞における *Esr2* の発現は、卵分泌因子による促進を受けていた。すなわち、卵分泌因子はエストロゲンのシグナルを増強すると考えられるが、第1章のシグナル強度の解析では、卵分泌因子によるエストロゲンのシグナルの増強は見られなかった。卵分泌因子は、多くの ESR 結合因子の発現も制御することから、ESR 結合因子の発現を制御した結果、変化したエストロゲンのシグナルの強度を補償する（バランスをとる）ために *Esr2* の発現を促進するのかもしれない。しかし、今回行った解析は、mRNA 発現のみであるため、この点については、今後タンパク質発現解析などを行う必要がある。

今回、解析を行った ESR 結合因子のうち、NRIP1 に関しては卵巣における報告がされており、そのノックアウトマウスは排卵異常により不妊となること (White et al., 2000)、また、卵母細胞が分泌する BMP15 と GDF9 が卵丘細胞での *Nrip1* 発現を抑制す

ることが報告されている (Sugiura et al., 2010b)。また、NRIP1 は RIP140 としても知られ、ESR による転写を促進、抑制のどちらにも制御できることが報告されている (Cavailles et al., 1995、Klinge et al., 2000、Augereau et al., 2006)。今後、タンパク質発現や、個々の ESR 結合因子の機能について解析をする必要はあるが、本節の実験により、今回 *Nrip1* に加え、新たに *Ddx17*、*Ncoa3*、*Psmc3ip* の発現が、少なくとも mRNA レベルでは、卵丘細胞において卵分泌因子による制御を受けることが明らかとなった。

DDX17 は p72 としても知られる DEAD-box RNA ヘリカーゼで、ヒト乳腺癌由来の MCF-7 細胞では、ESR1 による転写制御における主要制御因子であることが報告されている (Samaan et al., 2014)。また、NCOA3 は、SRC1 としても知られ、主に脳での研究から、ESR による転写を活性化する働きをもち (Stashi et al., 2013)、ESR1 だけでなく、ESR2 と結合することが報告されている (Paramanik et al., 2011)。PSMC3IP (または HOP2) は ESR による転写活性を促進する因子であり、PSMC3IP 遺伝子に欠損があるヒト患者では、卵巣形成に異常が報告されている (Zangen et al., 2011)。また、本研究で、卵丘細胞における *Psmc3ip* の発現は卵分泌因子による促進を受ける一方で、卵丘細胞と壁顆粒膜細胞間では発現差は見られなかった。これについては、*Esr2* と同様に壁顆粒膜細胞では、卵分泌因子非依存的に *Psmc3ip* を高発現している可能性や、他の何らかの卵胞内因子が *Psmc3ip* の発現に強い影響を持つことで、生体内では卵分泌因子の影響が見られない可能性が考えられた。これらの ESR 結合因子は、これまで卵胞内で発現動態やその機能については不明であったが、本研究により顆粒膜細胞で発現し、卵母細胞による発現制御を受けることが初めて明らかになった。今後、タンパク質発現や、個々の ESR 結合因子の機能について解析していくことで、卵巣における複雑なシグナル制御のさらなる解析が期待される。

前述のように、卵丘細胞における *Nrip1* の発現抑制には、BMP15 と GDF9 が関わることが報告されているが (Sugiura et al., 2010b)、今回、卵分泌因子による発現制御を



受けることが明らかとなった他の 3 つの ESR 結合因子は卵母細胞が分泌するどの因子の制御を受けるのだろうか。既報 (Su et al., 2008) の *Bmp15* ノックアウトマウス、および *Bmp15* と *Gdf9* のダブルノックアウトマウス (*Bmp15<sup>-/-</sup>Gdf9<sup>+/-</sup>*) の卵丘細胞における遺伝子発現を比較したマイクロアレイ解析の結果によると、*Psmc3ip* の発現は、*Bmp15* ノックアウトマウス、ダブルノックアウトマウスともに、野生型と比較して有意に低下しており、*Psmc3ip* の発現制御にもこれらの因子の関与が示唆される。一方、*Ddx17* と *Ncoa3* の発現は *Bmp15* ノックアウトマウス、およびダブルノックアウトマウスにおいて野生型と比較して有意な差は見られなかった。卵母細胞は、BMP15 と GDF9 のほかに、BMP6 や FGF8などを分泌しているため、これらの増殖因子によって制御されている可能性が考えられるが、これらの解明については今後の課題である。

本節では、卵分泌因子がエストロゲンのシグナルを制御するメカニズムの理解を深めるために、ESR 結合因子に着目し、それらの発現が卵分泌因子による影響を受けるかについての解析を行った。卵丘細胞において、いくつかの ESR 結合因子が卵分泌因子によって発現制御を受けることが、本研究で初めて明らかとなり、これらの発現差がエストロゲンによるシグナルの差を生み出す要因になりうることが示唆された。しかしながら、本研究はその可能性を提示するにとどまっており、実際にこれら ESR 結合因子が ESR2 に結合するのか、これらの複合的な作用が実際にエストロゲンのシグナルを制御しているのかといった検証は行えていない。今後、これらの点を解析していくことで、卵分泌因子によるエストロゲンシグナル制御機構の一端を明らかにできると期待される。

以上、第 1 章、第 2 章では、卵丘細胞に着目し、卵丘細胞における遺伝子発現に対する卵分泌因子とエストロゲンの影響を網羅的に解析し、そのメカニズムについての解析を行ってきた。では、壁顆粒膜細胞において、卵分泌因子とエストロゲンの協調作用はどのような役割を果たすのだろうか。第 3 章では壁顆粒膜細胞における卵分泌因子と

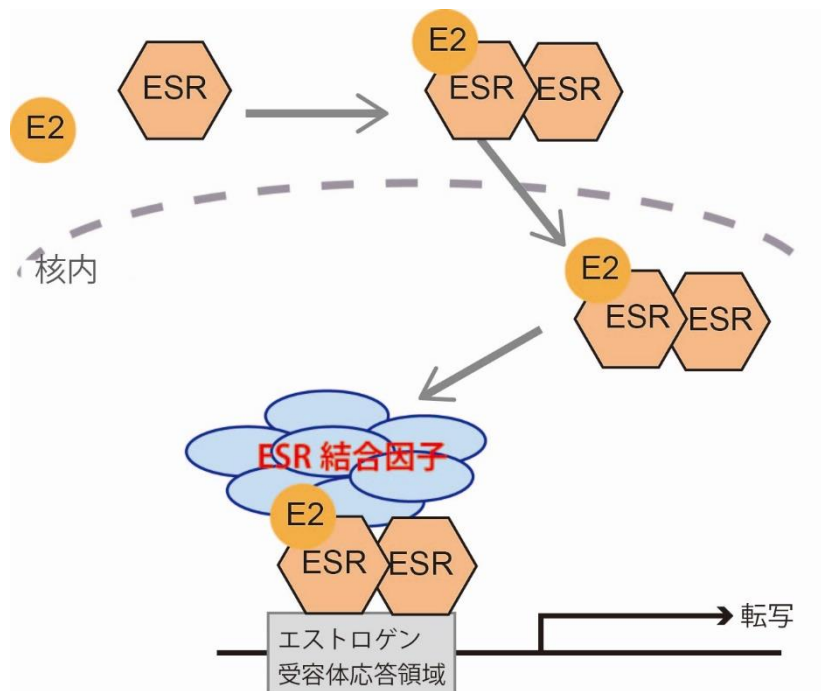
エストロゲンの協調作用の役割について解析を行う。

**Table 2-4 本節で用いたプライマー**

Gene symbol	RefSeq Acc. no.	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
<i>Arrb1</i>	NM_177231	CACTGACACGGCTACAGGAG	CAGGCTGCAGAGTGACTGAG
<i>Ctnnb1</i>	NM_007614	TGCAGAAAATGGTTGCTTTG	TTACTAAGGCTTGGGGTCCA
<i>Ddx17</i>	NM_199080.2	TCCAAAATTGATGCAGCTTG	GCAGAATTTGGGCTTCCATA
<i>Dnmt1</i>	NM_001199433	CGTTGTGGTGGATGACAAGA	CTCAGAATTCGAGGCTCCAT
<i>Esr2</i>	NM_207707.1	GGGTGATTTGGAAGAGTGGA	CGTGTGAGCATTGAGCATCT
<i>Hsd17b10</i>	NM_016763	CCTGACTCAGAGGGTGAAGC	GCACAGTTGACAGCCACATC
<i>Ncoa3</i>	NM_008679.3	CATGGGAATGGGAGTCAATC	GACCTGTGGCATCTGTGTTG
<i>Ncor1</i>	NM_001252313	CCCATTTCCAGCGTGTTAGT	GGAGCTTCATGTTTGCTTCC
<i>Nrip1</i>	NM_173440	AACAGCCTTCTCAGCTTCCTTTC	TCATCTTTCGTTGCTCACCAAA
<i>Psmc3ip</i>	NM_008949.3	CCAGGAAGGCAAGATCAAAG	GGCAGCTCTGCTGTAAGCTC
<i>Rpl19</i>	NM_009078	CCGCTGCGGGAAAAAGAAG	CAGCCCATCCTTGATCAGCTT

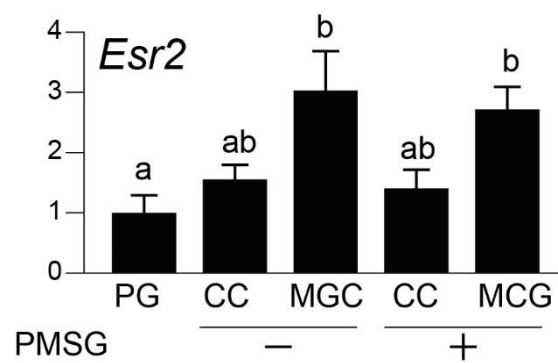
Table 2-5 エストロゲン受容体（ESR）結合因子

Gene Symbol	比較 1 vs	Reference
<i>Arrb1</i>	抑制	Wong et al., 2015
<i>Ctnnb1</i>	—	Yin et al., 2015
<i>Ddx17</i>	抑制	Samaan et al., 2014, Wortham et al., 2009
<i>Dnmt1</i>	促進	Yan et al., 2003
<i>Hsd17b10</i>	促進	Jazbutyte et al., 2009, Yang et al., 2014
<i>Ncoa3</i>	抑制	Wagner et al., 2013
<i>Ncor1</i>	抑制	Bartella et al., 2012
<i>Nrip1</i>	抑制	Castet et al., 2006
<i>Psmc3ip</i>	促進	Zangen et al., 2011



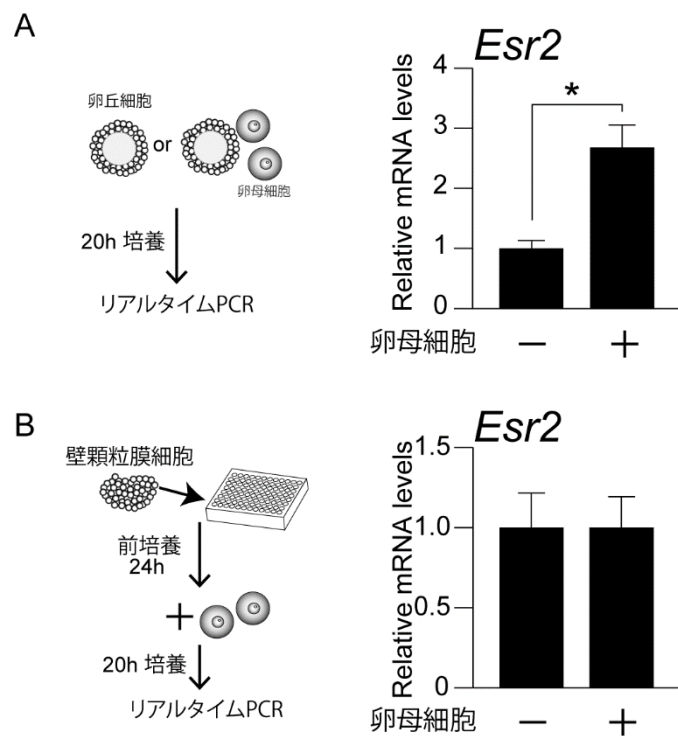
**Fig. 2-10 エストロゲンのシグナル伝達**

細胞質中の ESR は、エストロゲン（E2）と結合すると二量体を形成し、核内に移動後、エストロゲン受容体応答領域と呼ばれる DNA 配列に特異的に結合してエストロゲンシグナルのターゲットとなる遺伝子の転写を制御する。このとき、ESR の転写活性は複数の ESR 結合因子によって制御される。



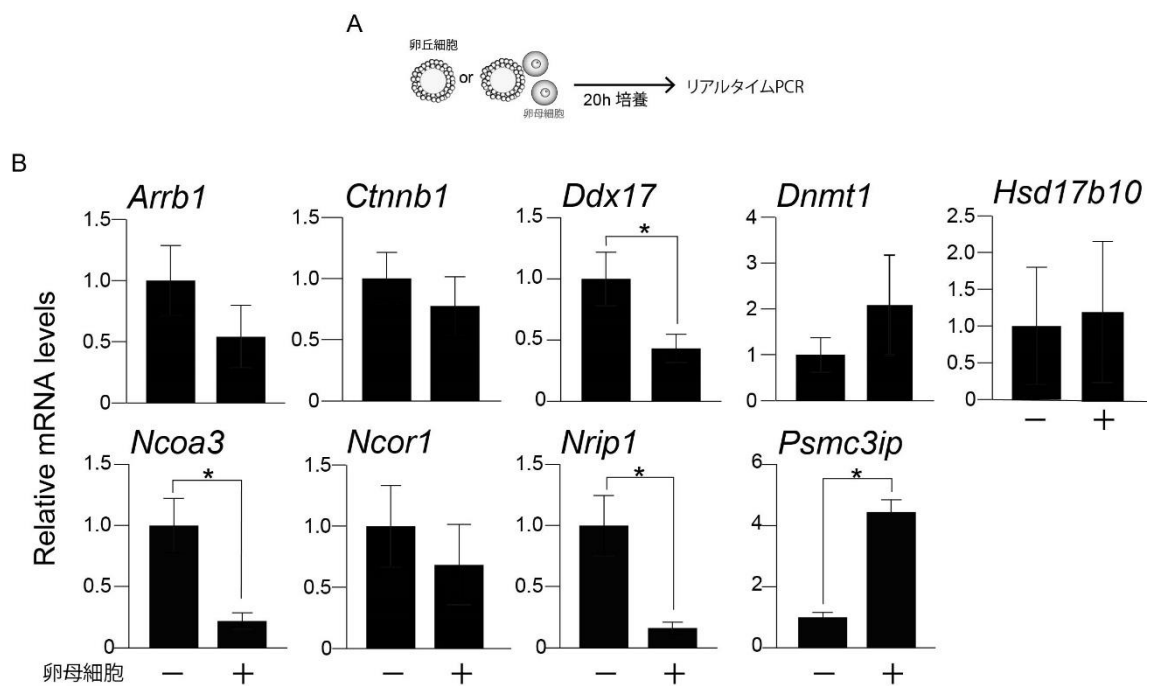
**Fig. 2-11 *Esr2* の発現解析**

2 次卵胞の前胞状卵胞顆粒膜細胞（PG）および PMSG 刺激前後の胞状卵胞の卵丘細胞（CC）、壁顆粒膜細胞（MGC）を回収し、各細胞における *Esr2* mRNA 発現をリアルタイム PCR により解析した。異符号同士に有意差あり、 $p < 0.05$ 。



**Fig. 2-12 卵丘細胞、壁顆粒膜細胞における *Esr2* の発現に対する卵分泌因子の影響**

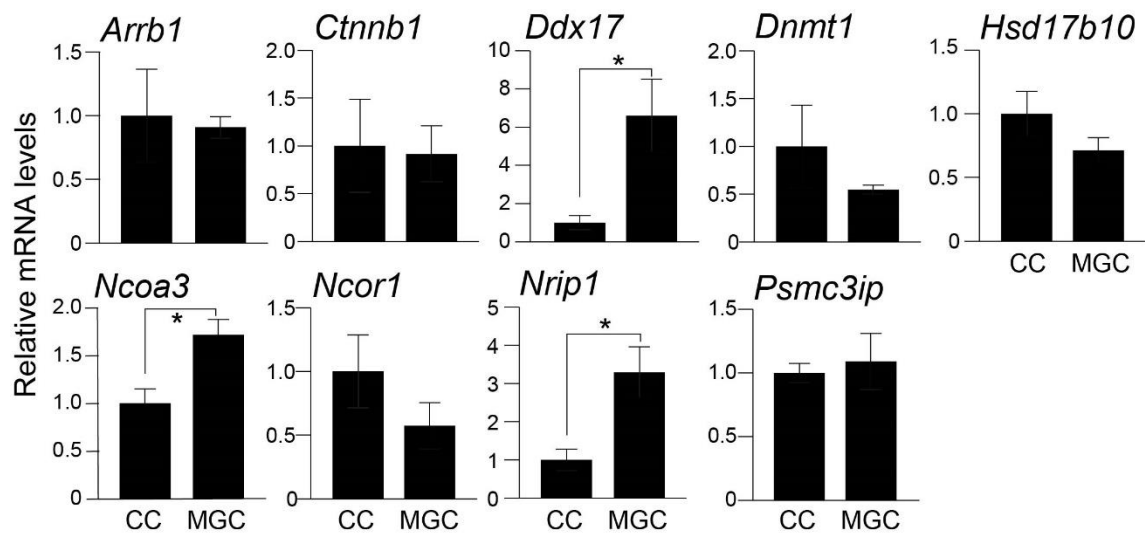
(A) OOX した卵丘細胞を単独培養、または卵母細胞 (2 個/μl) と共培養し、20 時間後の *Esr2* mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析した。(B) 単層培養した壁顆粒膜細胞を単独培養、または卵母細胞 (2 個/μl) と共培養し、20 時間後の *Esr2* mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析した。\*;  $p < 0.05$ 。



**Fig. 2-13 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**

OOX した卵丘細胞を単独培養、または卵母細胞 (2 個/ $\mu$ l) と共培養し、20 時間後の ESR 結合因子の mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析した。\*;  $p < 0.05$ 。





**Fig. 2-14 ESR 結合因子の発現解析**

PMSG 刺激後の胞状卵胞の卵丘細胞 (CC)、壁顆粒膜細胞 (MGC) を回収し、各細胞における ESR 結合因子の mRNA 発現をリアルタイム PCR により解析した。\*;  $p < 0.05$ 。

## 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

## 緒言

第1章、および第2章では卵丘細胞に着目してきたが、卵分泌因子とエストロゲンは、壁顆粒膜細胞の発達制御にも関与していると考えられる。例えば、前述したように、卵母細胞と体細胞の発達ステージの異なる再構築卵胞では、卵胞発達は卵母細胞の発達ステージと一致するようになるが (Eppig et al., 2002)、これは、卵丘細胞だけでなく壁顆粒膜細胞の発達も卵母細胞、すなわち卵分泌因子の影響を受けることを意味している。また、*Esr2* 欠損マウス卵巢では壁顆粒膜細胞の分化に異常があり、胞状卵胞が正常なホルモン応答を示さないことが報告されている (Couse et al., 2005)。また、*Esr1*、*Esr2* を同時に欠損させたマウス卵巢では、加齢に伴って *Sox9* などの精巣特異的遺伝子の発現上昇が見られ、壁顆粒膜細胞がセルトリ様細胞へと分化転換することも報告されている (Couse et al., 1999a)。このように、卵分泌因子とエストロゲンはそれぞれ壁顆粒膜細胞の発達に影響を及ぼすことが知られているが、両者が関わる壁顆粒膜細胞の発達制御は不明である。そこで、本章では、卵分泌因子とエストロゲンの協調作用が壁顆粒膜細胞の発達に果たす役割に着目することにした。

壁顆粒膜細胞の分化や機能制御に重要な因子として、Forkhead box L2 (FOXL2) 転写因子が知られている。FOXL2 は初め、眼瞼裂狭小症候群 (Blepharophimosis-Ptoxis-Epicanthus Inversus Syndrome; BPES) の原因遺伝子として同定されたが (Crisponi et al., 2001)、BPES の患者では卵巢機能不全 (premature ovarian failure; POF) が多いことが知られていた。その後、ノックアウトマウスを用いた研究などにより、卵巢における FOXL2 の機能が明らかとなってきた。例えば、*Foxl2* を完全に欠損させたマウスでは、1次卵胞から2次卵胞へ発達する際の、顆粒膜細胞の形態変化に異常が見られ、正常な2次卵胞が作られなくなることが報告されている。(Schmidt et al.,

2004、Uda et al., 2004)。また、FOXL2 は StAR (Pisarska et al., 2004) や *Cyp19a1* (Pannetiere et al., 2006) など、ステロイド合成に関わる遺伝子の転写に関与することが知られている。そのため、FOXL2 は壁顆粒膜細胞の正常な発達や機能制御に必須の転写因子である。

また、FOXL2 は生殖巣の性分化過程においても重要な転写因子として知られている。マウスの性分化過程において FOXL2 は胎齢 12.5 日ごろからメスの生殖腺で発現し (Crisponi et al., 2001、Schmidt et al., 2004、Ottolenghi et al., 2005)、精巣の発達に中心的な役割を果たすとされている *Sox9* や *Dhh* の発現を抑制することで生殖腺のメスへの性分化に貢献しているとされている (Garcia-Ortiz et al., 2009)。また、Uhlenhaut らの報告により、成体マウス卵巢において *Foxl2* を欠損させると、顆粒膜細胞がセルトリ様細胞へと分化転換することが報告されている (Uhlenhaut et al., 2009)。すなわち、FOXL2 は生殖巣のメス化のみでなく、その後の雌性の維持にも必須であると考えられている。

このように、壁顆粒膜細胞の発達や機能制御に必須の FOXL2 であるが、その発現制御には不明な点が多い。前述の Uhlenhaut らの報告では、卵母細胞を死滅させた卵巢における FOXL2 発現を解析し、*Foxl2* の発現に影響がなかったことから、*Foxl2* 発現制御に卵母細胞は関与しないと結論されている (Uhlenhaut et al., 2009)。しかしながら、この報告では、卵巢全体の *Foxl2* 発現を解析しており、壁顆粒膜細胞において卵母細胞が FOXL2 発現に影響するののかについて直接解析した報告はされていない。本研究でこれまで述べてきたように、卵巢発達制御における卵分泌因子の重要性を考えると、卵分泌因子が壁顆粒膜細胞での FOXL2 発現に何らかの影響を持つ可能性は高いと考えられる。また、*Esr1/2* 欠損マウス卵巢においても *Foxl2* 欠損マウスと同様に、顆粒膜細胞のセルトリ様細胞化が報告されていることから、エストロゲンシグナルも、FOXL2 の発現制御に関与する可能性が考えられるが、これまでエストロゲンの FOXL2 発現に対する影響を調べた報告はない。

そこで、本章では、壁顆粒膜細胞での FOXL2 発現に対する卵分泌因子とエストロゲンの影響を解析することを目的とした。

## 材料と方法

### マウス

マウスは BDF1 (C57BL/6 × DBA2) マウスを自家繁殖または三協ラボサービスから購入して用いた。飼育条件は第 1 章、2 章と同様である。

### 卵巣、精巣の回収、顆粒膜細胞の単離、培養

卵巣は、生後 0-4、12 日齢、および PMSG 刺激後 44-48 時間の 3 週齢のマウスから回収した。また、精巣は 7 週齢のマウスから回収した。

前胞状卵胞顆粒膜細胞、卵丘細胞、壁顆粒膜細胞は、第 1 章、および第 2 章と同様の方法で単離した。壁顆粒膜細胞の培養には第 2 章の方法と同様に、ECL cell attachment (Millipore) で処理をおこなった 96 ウェルプレートを用いて単層培養を行った。一部の実験には  $17\beta$ -estradiol (E2) を  $10^{-7}$  M の濃度で添加した。また、卵母細胞との共培養には 1  $\mu$ l あたり 2 個の卵母細胞を加えた。さらに、一部の実験において、壁顆粒膜細胞の培養条件をより生体内の環境に近づけるために、基本培地に卵胞液を添加した。マウスの卵胞液は採取が困難であるため、屠場由来のブタ卵巣から採取した卵胞液 (porcine follicular fluid: pFF) を既報 (Naito et al., 1988) に従って採取し、結果やレジェンドに示した濃度で添加した。培養は、37°C、CO<sub>2</sub> 5%、O<sub>2</sub> 5%、湿度 100% に保たれたインキュベーター内で行った。

### トータル RNA 抽出、cDNA 合成

トータル RNA の抽出には ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega) を、cDNA 合成には ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を第 1 章、

第2章と同様の方法で用いた。

## リアルタイム PCR

リアルタイム PCR には、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) と StepOnePlus Real-time PCR system (Applied biosystems) を第1章、第2章と同様の方法で使用した。また、本章で用いたプライマーは Table 3-1 に示した。

## ウエスタンブロッティング

第2章と同様の方法でサンプルを回収し、ウエスタンブロットを行った。

一次抗体としては、FOX L2 の検出には Anti-FOX L2 (Sigma) を 1000 倍希釈で用いた。SOX9 の検出には Anti-SOX9 (Millipore) を 1000 倍希で用いた。 $\beta$  アクチン (ACTB) の検出には、Rabbit Polyclonal antibody to beta Actin (Gene Tex) を 1000 倍希釈で用いた。二次抗体は、Goat Anti-Rabbit IgG Peroxidase Conjugate Antibody (Chemicon International) を 3000 倍希釈で用いた。

## 統計処理

本実験ではすべて独立した実験を3回以上行った。統計処理にはマイクロソフト Excel のアドインソフト Excel 統計を使用し、3区以上の比較には Tukey 法を用い、2区の比較には t 検定を用いた。危険率  $p < 0.05$  を有意とした。

## 結果

### FOXL2 の発現解析

マウスにおいて卵胞の形成は、個体の出生後に開始し、出生後 3 週間までの間に一過的に卵胞発達が起こる。この過程で、出生後 0 日の卵巣では、卵胞は形成されておらず、出生後 1、2 日後に原始卵胞の形成、3 日以降で 1 次卵胞が形成され、12 日齢では多くの 2 次卵胞（前胞状卵胞）、3 週齢で初期胞状卵胞形成が見られる。また、3 週齢のマウスに PMSG を投与することで、発達した胞状卵胞が形成される。この過程では、卵胞発達が同調して起こるため、各卵胞発達ステージを研究する上でのモデルとして有用である。そこで、この初期卵巣発達過程をモデルに、*Foxl2* 遺伝子発現をリアルタイム PCR で解析した (Fig. 3-1A)。その結果、*Foxl2* 発現は生後 0 日齢から徐々に増加し、12 日齢において最も高値に至った。また、PMSG 刺激した 3 週齢においても *Foxl2* は 12 日齢と同程度と高く発現していた。

次に、12 日齢の卵巣より 2 次卵胞期の前胞状卵胞顆粒膜細胞、PMSG 刺激前後の 3 週齢のマウスから卵丘細胞および壁顆粒膜細胞を回収し、これらの細胞における FOXL2 発現を解析した (Fig. 3-1BC)。その結果、*Foxl2* mRNA 発現は、壁顆粒膜細胞において、前胞状卵胞顆粒膜細胞や卵丘細胞と比較して、有意に高く発現していた。FOXL2 タンパク質の発現も同様に、卵丘細胞と比較して、壁顆粒膜細胞で高く発現していた。これらの結果より、出生後の卵巣において FOXL2 の発現は発達した胞状卵胞の壁顆粒膜細胞において高く発現していることが明らかとなった。

### 壁顆粒膜細胞における FOXL2 発現に対する培養の影響

次に、壁顆粒膜細胞における FOXL2 の発現制御を解析した。まず、壁顆粒膜細胞



を単層培養し、培養 24、48、72 時間後における *Foxl2* mRNA 発現および FOXL2 タンパク質発現解析したところ (Fig. 3-2)、興味深いことに、*Foxl2* mRNA は培養によって発現に変化は見られなかったが (Fig. 3-2B)、FOXL2 タンパク質発現は、培養 24 時間後から大きく低下し、72 時間ではほとんど検出されなかった (Fig. 3-2C)。すなわち、壁顆粒膜細胞における FOXL2 タンパク質発現は、生体内では何らかの因子によって高く維持されており、本培養条件下ではその因子が存在しないために発現低下してしまう可能性が考えられた。

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

次に、壁顆粒膜細胞における FOXL2 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。壁顆粒膜細胞を単層培養し、卵母細胞 (2 個/ $\mu$ l) またはエストロゲン (E2,  $10^{-7}$ M) を添加して、24 時間培養し、*Foxl2* mRNA および、FOXL2 タンパク質発現をそれぞれ解析した (Fig. 3-3)。その結果、*Foxl2* mRNA 発現は、卵母細胞または E2 の単独または共添加によって有意な変化が見られなかった (Fig. 3-3B)。一方、FOXL2 タンパク質発現は、卵母細胞単独添加によって若干の上昇が見られ、卵母細胞と E2 を同時に添加培養すると、さらに高い発現が確認された (Fig. 3-3C)。この時、E2 単独添加では FOXL2 タンパク質発現に顕著な影響は見られなかった。以上から、卵分泌因子とエストロゲンは壁顆粒膜細胞における FOXL2 発現維持に必要であることが示唆された。また、この制御は mRNA の発現量の制御ではなく、タンパク質発現量 (翻訳または分解) の制御であると考えられた。

### 壁顆粒膜細胞での遺伝子発現に対する FOXL2 発現変化の影響

次に、壁顆粒膜細胞における上記の FOXL2 発現変化が、FOXL2 による転写制御を受けるとされる *Cyp19a1* と *Sox9* の発現に与える影響を解析した (Fig. 3-4)。その結果、

*Cyp19a1* の発現は、卵母細胞または E2 を単独添加した場合には有意な影響は見られなかったが、卵母細胞と E2 を同時に添加したときに、無添加区と比較して約 6 倍と有意な上昇が見られた。一方、*Sox9* の発現は、いずれの区においても有意な発現差は認められなかった。これらのことから、卵分泌因子とエストロゲンによる FOXL2 の発現促進は *Cyp19a1* の発現に十分影響を及ぼしうるが、一方で FOXL2 による発現抑制を受ける *Sox9* の発現には、FOXL2 低下による発現抑制の解除のみでは十分ではなく、他の何らかの因子が必要であると考えられた。

### 壁顆粒膜細胞における SOX9 の発現誘導

*Foxl2* 欠損マウスの卵巣においては SOX9 の発現上昇が報告されているが (Uhlenhaut et al., 2009)、本研究で卵母細胞や E2 非添培養によって FOXL2 発現が低下した壁顆粒膜細胞においても *Sox9* の発現上昇は見られなかった。このことから、本研究で用いた培養系には存在しない何らかの因子が生体内 (卵胞内) には存在し、SOX9 の発現誘導にかかわるのではないかと考えられる。実際に卵胞内にそのような因子が存在するか確かめるために、培地に卵胞液を添加し、その影響を解析することにした (Fig. 3-5)。その際、マウス卵巣より卵胞液を回収することは困難であるため、より採取が容易であるブタ卵胞液 (pFF) を用いた。その結果、*Sox9* の発現は、pFF 添加によって濃度依存的に上昇し、30%pFF 添加区においては無添加区と比較して有意な上昇が見られた (Fig 3-5B)。

次に、ウェスタンブロットによる SOX9 タンパク質発現の確認を行った。前述の成獣マウス卵巣における *Foxl2* 欠損マウスの報告では、*Foxl2* の発現低下後、数日経って初めて SOX9 のタンパク質発現上昇が認められる (Uhlenhaut et al., 2009)。そこで、壁顆粒膜細胞を pFF (10%) 添加培地で 48-72 時間培養し、ウェスタンブロットによりタンパク質発現を解析した (Fig. 3-5D)。その結果、pFF 添加後 24 時間では SOX9 発現は

ほとんど確認できなかったが（データ未掲載）、pFF 添加後 48 時間で pFF 添加区のみで SOX9 発現が確認され、72 時間ではさらに濃く検出された。このことから、卵胞液内には、FOXL2 発現が低下した壁顆粒膜細胞に SOX9 の発現を誘導できる何らかの因子が存在することが示唆された。

### 卵分泌因子とエストロゲンが pFF による SOX9 発現誘導に与える影響

本章におけるこれまでの研究から、少なくとも培養下では、卵分泌因子とエストロゲンが FOXL2 の発現に必要であり、また、pFF には培養下で壁顆粒膜細胞での SOX9 の発現を誘導する因子が存在することが明らかとなった。そこで、次に、卵分泌因子とエストロゲンによる FOXL2 の発現誘導が、pFF 内の因子による *Sox9* の発現誘導を抑制できるのかについて解析した。

壁顆粒膜細胞を単層培養し、卵分泌因子とエストロゲン、および pFF 添加が *Foxl2* や *Sox9* の mRNA 発現に与える影響を解析した。（Fig. 3-6）。その結果、壁顆粒膜細胞における *Sox9* の発現は、pFF 添加区において無添加区と比較して約 3 倍と有意に上昇し、一方、卵母細胞とエストロゲンを添加した区では、pFF 添加による *Sox9* 発現上昇は見られず、無添加区と同等の発現を示した（Fig. 3-6B）。

この時、FOXL2 および、SOX9 タンパク質発現をウエスタンブロットにより解析したところ（Fig. 3-6C）、FOXL2 は、pFF 単独添加により若干の発現上昇が確認され、卵母細胞とエストロゲン存在下ではさらに高く発現していた。一方、SOX9 発現は、pFF 単独添加区で高い発現が確認されたが、これは卵母細胞とエストロゲン添加により抑制された。

このことから、卵分泌因子とエストロゲンの存在によって、pFF による SOX9 の発現促進は抑えられることが明らかとなった。

## 考察

本章では、卵分泌因子とエストロゲンのシグナル協調作用が壁顆粒膜細胞の発達制御に果たす役割の一端を解明するために、壁顆粒膜細胞の発達に重要な FOXL2 転写因子に着目し、その発現に対する卵分泌因子とエストロゲンの影響について解析を行った。

まず、卵巣発達過程における *Foxl2* の発現動態を解析したところ、胞状卵胞において *Foxl2* は卵丘細胞で発現が低く維持され、壁顆粒膜細胞では高く発現していることが明らかとなった。第 2 章において議論したが、このように卵丘細胞と壁顆粒膜細胞間で発現差がある場合、卵分泌因子の制御を受ける可能性が考えられる。実際、卵丘細胞における *Foxl2* 発現に対する卵分泌因子の影響を解析したところ、*Foxl2* 発現は、卵母細胞との共培養によって低下した（データ未掲載）。一方、本章において壁顆粒膜細胞での *Foxl2* mRNA 発現は卵分泌因子の影響を全く受けなかった。このような卵分泌因子に対する応答性の差異が、生体内における卵丘細胞と壁顆粒膜細胞での *Foxl2* 発現差を生みだしているのだと考えられる。

また、12 日齢と PMSG 刺激後の 3 週齢の卵巣における *Foxl2* 発現に有意な差は見られなかったのに対し、それらの卵巣より単離した前胞状卵胞顆粒膜細胞と壁顆粒膜細胞では *Foxl2* 発現に有意な発現差が見られた。これは、卵巣に占める各細胞の割合が影響していると考えられる。すなわち、12 日齢の卵巣では、2 次卵胞が多く存在するため、その分、卵巣全体での *Foxl2* 発現は、前胞状卵胞顆粒膜細胞での *Foxl2* 発現を反映しており、一方、PMSG 刺激後の 3 週齢のマウスでは卵巣が発達するため、胞状卵胞以外にも間質の細胞など多くの細胞が存在し、相対的に壁顆粒膜細胞の割合が低下しているのだと考えられる。しかし、前胞状卵胞顆粒膜細胞と卵丘細胞、壁顆粒膜細胞は採取方法が異なるため、この差が *Foxl2* 発現差に影響してしまった可能性も否定できないため、

今後、*in situ* ハイブリダイゼーション法や、免疫染色法などにより、生体内での FOXL2 mRNA 発現やタンパク質発現を確認する必要がある。

壁顆粒膜細胞における FOXL2 タンパク質発現は卵分泌因子とエストロゲンにより高く維持されており、この時、*Foxl2* mRNA 発現には変化が見られなかった。これは、卵分泌因子とエストロゲンの相互作用は、これまで本研究の第 1 章、2 章で着目してきたような mRNA 発現制御のほかに、タンパク質量の制御にもかかわることを示唆している。mRNA 発現が変化せず、タンパク質量のみに変化が見られる場合、その原因として mRNA からの翻訳の制御や、タンパク質の分解の制御などが考えられる。FOXL2 タンパク質はリン酸化や SUMO 化 (Sumoylation) といった翻訳後修飾を受けることが知られ、例えば、SUMO 化は FOXL2 タンパク質を安定化させ、さらに、核へと局在を変化させることで FOXL2 の転写活性を促進することが報告されている (Marongiu et al., 2010)。また、FOXL2 は、セリン 33 がリン酸化されるとユビキチン化を受け、プロテオソーム系による分解を受ける (Kim et al., 2014)。これらのことから、卵分泌因子とエストロゲンによる FOXL2 のタンパク制御に、SUMO 化やリン酸化などの翻訳後修飾の関与が考えられる。すなわち、卵分泌因子とエストロゲンが、FOXL2 の SUMO 化やリン酸化に関わる因子の発現を制御することで FOXL2 のタンパク質の安定性に影響を及ぼしている可能性がある。そこで、予備実験として、FOXL2 の SUMO 化を制御する PIAS1 と UBC9 (Marongiu et al., 2010)、リン酸化を制御する LATS1 (Pisarska et al., 2010) について、壁顆粒膜細胞における発現制御解析を行ったが、これらをコードする mRNA の発現は、卵分泌因子とエストロゲンによる影響を受けなかったため (データ未掲載)、この可能性の検証までには至らなかった。今後、これらのタンパク質発現や、活性についての解析を行うことで卵分泌因子とエストロゲンが FOXL2 のタンパク質発現を制御するメカニズムを解明できるかもしれない。

今回の解析で、卵胞液中には、SOX9 の発現を誘導する因子が存在することが示唆

されたが、この卵胞液中に存在する因子は不明である。胎齢 11.5 日のメスの生殖腺の培養実験において、プロスタグランジン D2 (PGD<sub>2</sub>) を添加することで、*Sox9* の発現が上昇し、セルトリ様細胞への分化転換を誘導できることが報告されている (Wilhelm et al., 2005)。そこで、この卵胞液中の SOX9 発現誘導因子が PGD<sub>2</sub> である可能性を考え、壁顆粒膜細胞の培養時に PGD<sub>2</sub> を添加し *Sox9* の発現を解析したが、壁顆粒膜細胞における *Sox9* の発現は PGD<sub>2</sub> 添加によって影響は見られなかった (データ未掲載)。すなわち、この卵胞液中の因子は PGD<sub>2</sub> ではない可能性が高く、現在のところ完全に不明である。今回、SOX9 の発現を誘導するこの因子を同定するには至らなかったが、卵胞液に含まれるこの因子の同定は生殖巣における体細胞の性分化転換機構の理解に重要であると考えられる。

卵胞液中には、卵分泌因子やエストロゲンが含まれると考えられるが、卵胞液の添加は壁顆粒膜細胞での FOXL2 発現を少し促進したのみで、卵母細胞とエストロゲンの両方を添加したときほどの影響は見られなかった (Fig. 3-6)。これは今回用いた卵胞液がブタのものであったためだと考えられる。今回、ブタの卵胞液は直径 2-5 mm 程度の卵胞から採取したが、これはマウスの卵胞 (0.2-0.5 mm) と比べて顕著に大きい。そのため含まれる卵分泌因子の量はマウスと比べてブタではかなり少ないと考えられる。また、マウスの壁顆粒膜細胞に対して、マウスとブタの卵分泌因子は異なる作用を持つことが報告されている (Matsuno et al., 2015)。さらに、今回卵胞液を採取したブタ卵胞は発達途上の卵胞であり、エストロゲン濃度も発達した胞状卵胞ほど高くはなかったと考えられる。このように、今回用いたブタ卵胞液では、マウスの胞状卵胞内の卵胞液と比較して、卵分泌因子やエストロゲンの濃度は低く、さらに、ブタ卵分泌因子はマウスの細胞に対して十分な活性を持っていなかったため、FOXL2 発現促進能が低く、SOX9 発現誘導能が顕著に観察された可能性が考えられる。

今回、FOXL2 による転写制御を受ける遺伝子として解析した *Cyp19a1* や *Sox9* は、

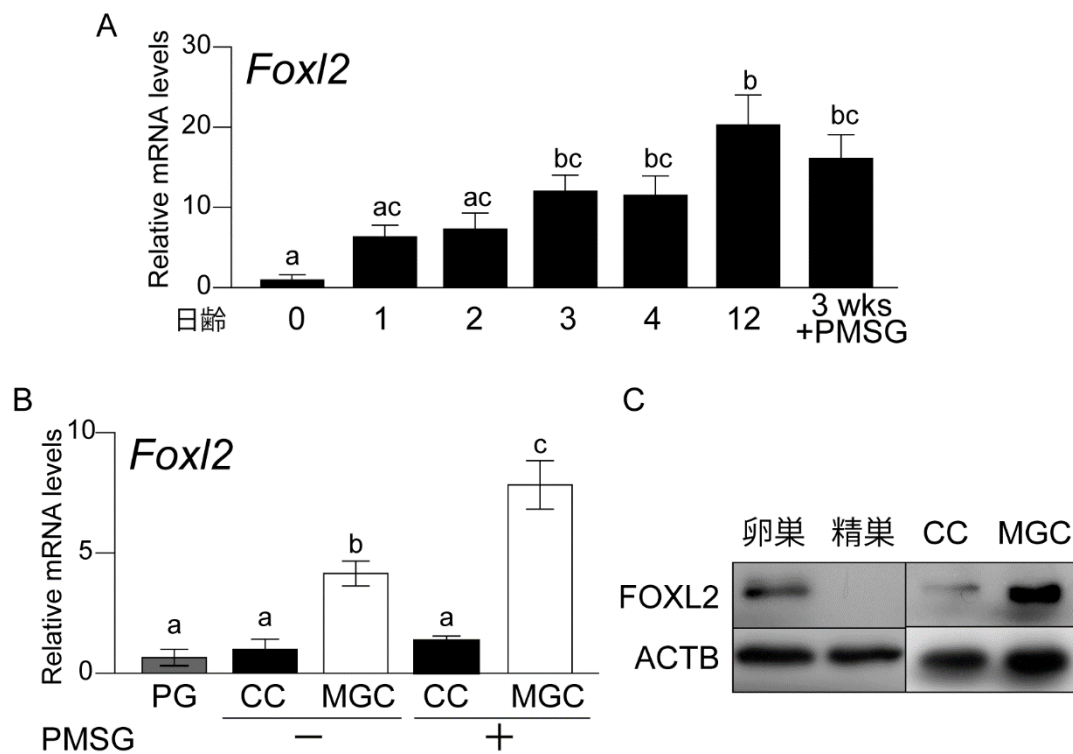
それぞれ卵巣や精巣特異的な遺伝子として知られている。本研究では、今回結果を掲載したこれらの遺伝子のほかにも卵巣や精巣特異的に発現するとされる遺伝子について発現制御解析を行ったが、卵巣特異的な遺伝子 (*Hsd17b1*、*Inhbb*) の発現は、pFF 添加後長期培養によって低下し、一方、精巣特異的な遺伝子 *Sox8* や *Dmrt1* の発現上昇は見られなかった (データ未掲載)。pFF 添加後長期培養後の壁顆粒膜細胞では SOX9 発現が顕著に増加しているのに対し、これら精巣特異的な遺伝子の発現は上昇しなかったことから、FOXL2 発現の低下したこの壁顆粒膜細胞では、雌性は低下した状態にいますが、一方で完全な雄性の獲得にまでは至っていない不安定な状態だと考えられる。しかし、本研究において、今回、培養下で壁顆粒膜細胞での SOX9 の発現を誘導することができたことは、生殖巣の体細胞の分化転換機構を理解していく上で重要な研究モデルになりうると考えている。

以上、本章では、壁顆粒膜細胞に着目し、転写因子 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。卵分泌因子とエストロゲンが FOXL2 のタンパク質量の制御にかかわることが明らかとなり、これは、卵分泌因子とエストロゲンの相互作用が、これまで卵丘細胞で着目してきた遺伝子発現制御に加えてタンパク質量制御に関わることを意味している。さらに、壁顆粒膜細胞の雌性に着目した場合、卵胞液による SOX9 の発現誘導が、卵分泌因子とエストロゲンによって抑制されることから、卵分泌因子とエストロゲンの協調作用は壁顆粒膜細胞の雌性維持にも重要な役割を果たす可能性が示唆された。

**Table 3-1 本章で用いたプライマー**

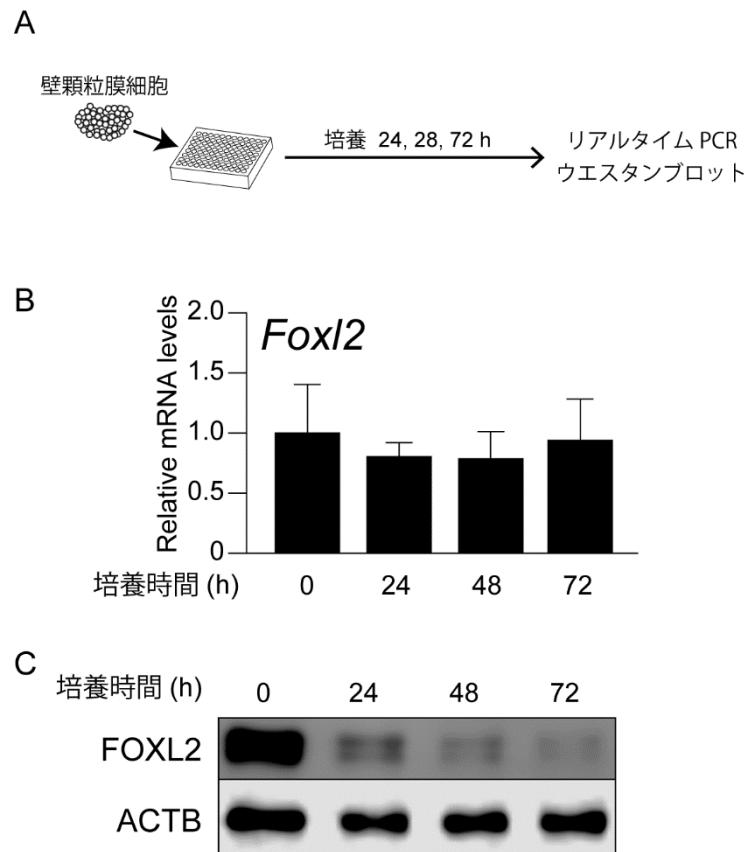
Gene symbol	RefSeq Acc. no.	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
<i>Cyp19a1</i>	NM_007810.3	AGCAGCAATCCTGAAGGAGA	AGCCGTCAATTACGTCATCC
<i>Foxl2</i> (Dai et al., 2013)		GAGCGGTCCCCCAGCCCTATC	CGGAGGCGACAAAGCGGAGT
<i>Rpl19</i>	NM_009078	CCGCTGCGGGAAAAAGAAG	CAGCCCATCCTTGATCAGCTT
<i>Sox9</i>	NM_011448.4	GAGGAAGTCGGTGAAGAACG	CTGAGATTGCCCAGAGTGCT





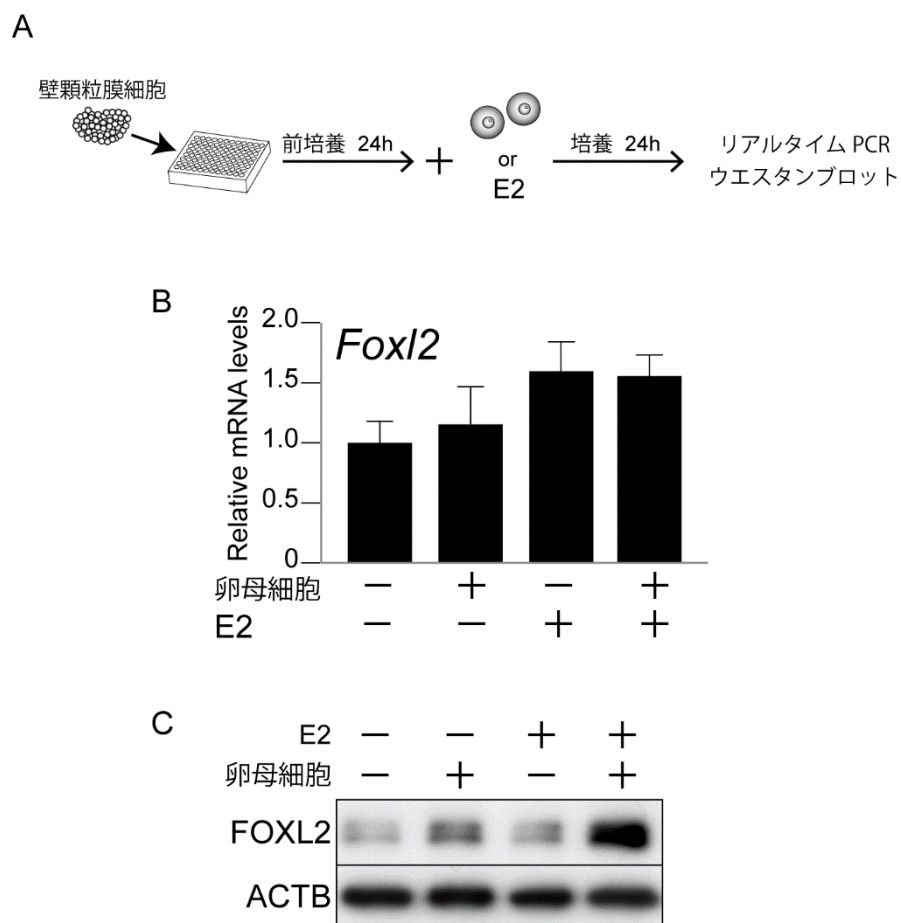
**Fig. 3-1 FOXL2 の発現解析**

(A) 生後 0-4、12 日齢、および PMSG 刺激した 3 週齢の卵巣 (3wks+PMSG) における *Foxl2* mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析した。(B) 12 日齢の卵巣から採取した前胞状卵胞顆粒膜細胞 (PG) と 3 週齢の PMSG 刺激前後の卵丘細胞 (CC) および壁顆粒膜細胞 (MGC) における *Foxl2* mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析した。異符号間に有意差あり、 $p < 0.05$  (C) 3 週齢の卵巣、7 週齢の精巣、3 週齢の PMSG 刺激後の卵丘細胞 (CC)、壁顆粒膜細胞 (MGC) における FOXL2 タンパク質発現をウエスタンブロットで解析した。内部標準として  $\beta$  アクチン (ACTB) を用いた。



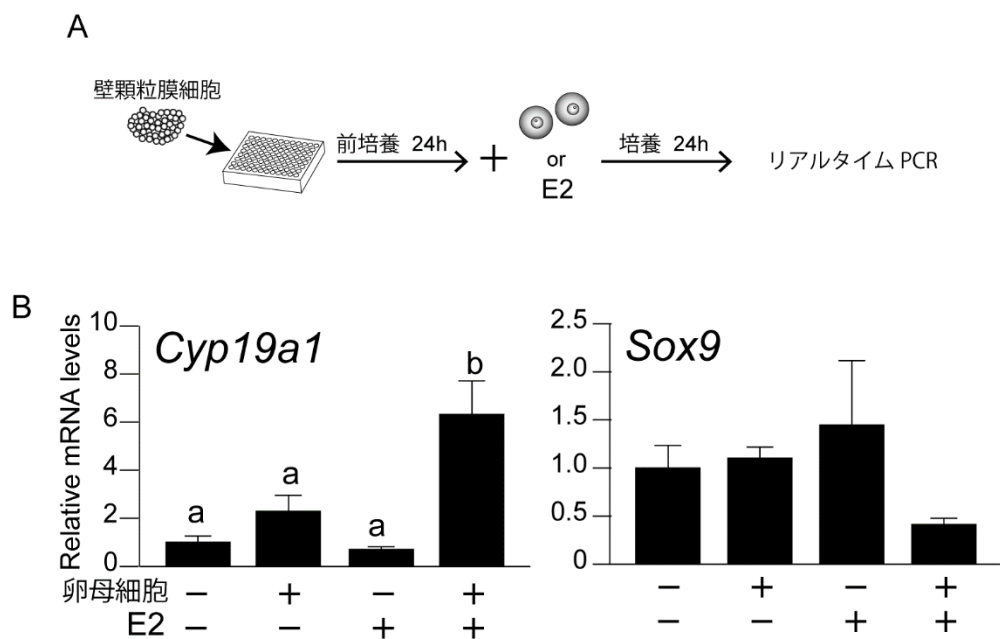
**Fig. 3-2 壁顆粒膜細胞における FOXL2 発現に対する培養の影響**

(A) 実験の概要。壁顆粒膜細胞を単層培養し、24、48、72 時間後に回収し、(B) *Foxl2* mRNA 発現をリアルタイム PCR によって、(C) FOXL2 タンパク質発現をウエスタンブロットにより解析した。



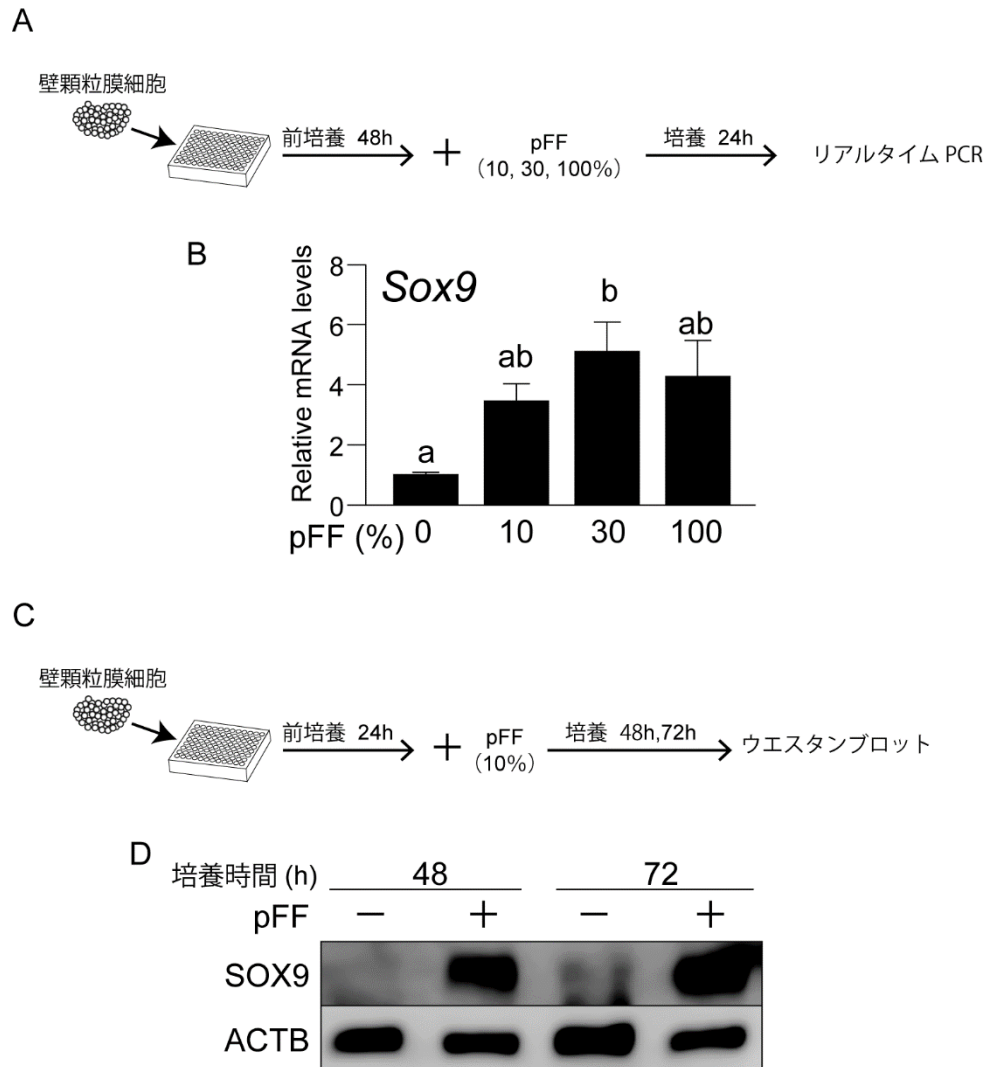
**Fig. 3-3 壁顆粒膜細胞における FOXL2 発現に対する卵分泌因子とエストロゲンの影響**

(A) 実験の概要。壁顆粒膜細胞を単層培養した。前培養 24 時間後卵母細胞 (2 個/ $\mu$ l)、または E2 ( $10^{-7}$  M) を添加し、培養 24 時間後に回収し、(B) *Foxl2* mRNA 発現をリアルタイム PCR によって、(C) FOXL2 タンパク質発現をウエスタンブロットにより解析した。



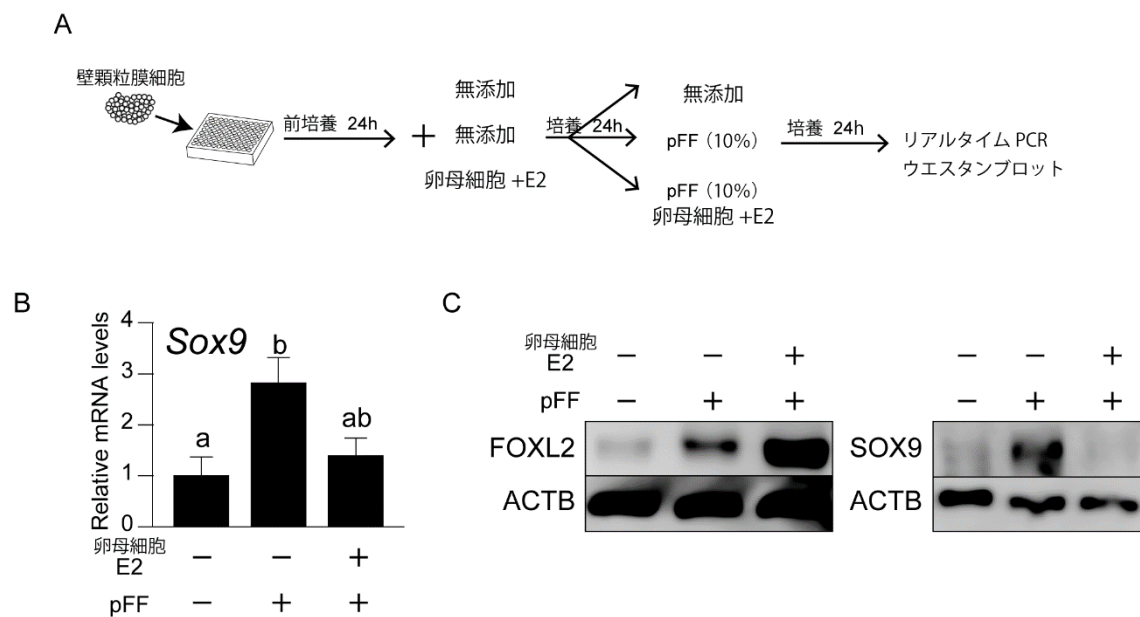
**Fig. 3-4 壁顆粒膜細胞における FOXL2 の転写制御を受ける遺伝子の発現に対する卵分泌因子とエストロゲンの影響**

(A) 実験の概要。壁顆粒膜細胞を単層培養した。前培養 24 時間後卵母細胞 (2 個/ $\mu$ l)、または E2 ( $10^{-7}$  M) を添加し、培養 24 時間後に回収し、(B) FOXL2 による転写制御を受けるとされる *Cyp19a1* と *Sox9* の mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析した。異符号間に有意差あり。、 $p < 0.05$ 。



**Fig. 3-5 壁顆粒膜細胞における SOX9 発現の誘導**

(A) 実験の概要。壁顆粒膜細胞を単層培養した。前培養 24 時間後、ブタ卵胞液 (pFF) を 10、30、100% の濃度で添加し、培養 24 時間後に回収し *Sox9* の mRNA 発現を (B) リアルタイム PCR で解析した。異符号間に有意差あり、 $p < 0.05$ 。(C) 実験の概要。壁顆粒膜細胞を前培養 24 時間後、pFF を 10% 添加、48、72 時間培養後に回収し SOX9 のタンパク質発現を (D) ウェスタンブロットにより解析した。



**Fig. 3-6 卵分泌因子とエストロゲンが pFF による SOX9 発現誘導に与える影響**

(A) 実験の概要。壁顆粒膜細胞を単層培養した。前培養 24 時間後、一部に卵母細胞 (2 個/ $\mu$ l) および E2 ( $10^{-7}$  M) を添加しさらに 24 時間培養し、ブタ卵胞液 (pFF、10%) 添加、または pFF と卵母細胞と E2 を同時添加培養、24 時間後に回収し、(B) *Sox9* の mRNA 発現をリアルタイム PCR により、(C) FOXL2、SOX9 タンパク質発現をウェスタンブロットにより解析した。異符号間に有意差あり、 $p < 0.05$ 。

## 総括

本研究では、卵巣機能の制御を理解するために、顆粒膜細胞の発達に着目し、これまで個々の重要性が知られてきた卵分泌因子とエストロゲンの協調作用が顆粒膜細胞の発達制御に与える影響を明らかにすることを目的とした。

第1章では、卵分泌因子とエストロゲンが卵丘細胞遺伝子発現に与える影響を、マイクロアレイ解析によって網羅的に解析した。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解析した結果、エストロゲンは卵分泌因子によって制御される生物現象（遺伝子オントロジー）に変化を及ぼさないが、卵分泌因子のシグナル強度、中でも **BMP** シグナルを増強することが示唆された。一方で、卵分泌因子はエストロゲンによって制御される生物現象を大きく変化させ、**VEGF**、**PDGF**、**EGF** といった卵胞発達に重要だとされるシグナル伝達に関連した遺伝子の発現を促進させることが示唆された。

第2章では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解析を行った。

第2章第1節では、エストロゲンが卵母細胞の分泌する **BMP** シグナルを増強するメカニズムについて、**BMP** アンタゴニスト **Noggin (NOG)** に着目して解析した。発現制御解析の結果、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、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、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の解析を行った結果、このマウスは不妊であり、これは、顆粒膜細胞の発達異常が原因であることが示唆された。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ついて、ESR2 および ESR 結合因子に着目して解析し、これらの発現が卵分泌因子により制御されることを見出した。ESR 結合因子の *Nrip1*、*Ddx17*、*Ncoa3* の mRNA 発現は卵分泌因子により抑制され、一方 *Psmc3ip* は促進されたことから、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が示唆される。しかし、今回解析を行ったのは、mRNA 発現のみであるため、ESR2 および ESR 結合因子それぞれのタンパク質発現制御などの解析は必要であるが、これまで、卵丘細胞に特化してエストロゲンのシグナルの影響を見た例は少なく、このシグナルを卵分泌因子が制御することはとても興味深い知見である。

第3章では、壁顆粒膜細胞の発達に重要な役割を果たす FOXL2 転写因子に着目し、その発現に対する卵分泌因子とエストロゲンの影響について解析した。興味深いことに、壁顆粒膜細胞における FOXL2 タンパク質量は、培養によって低下するが、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。この時、FOXL2 mRNA 量には変化は見られなかったことから、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考えられた。この結果は、第1章と第2章で解析してきた卵分泌因子とエストロゲンによる卵丘細胞遺伝子発現制御とは異なる制御が存在する可能性を示唆している。さらに、卵分泌因子とエストロゲンの協調作用は FOXL2 のタンパク質発現の制御を介してエストロゲン産生に必要な酵素 CYP19A1 の発現を促進し、一方で生殖巣をオス化させる SOX9 の発現を抑制している可能性が示唆された。これらの結果は、卵分泌因子とエストロゲンの協調作用が、壁顆粒膜細胞機能制御にも重要な役割を担っていることを示す初めての知見である。

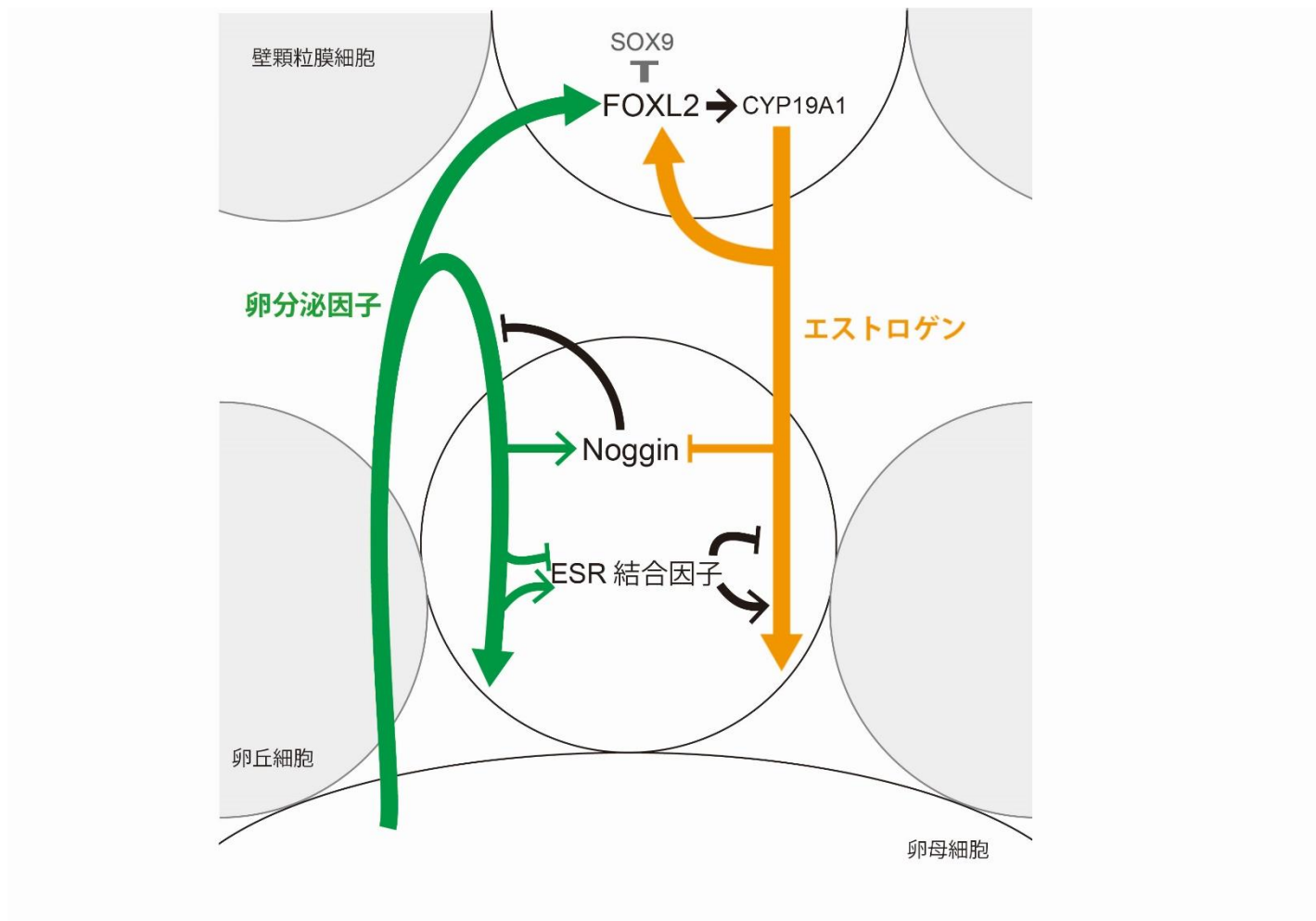


ここで、本研究で示唆された、卵分泌因子とエストロゲンの協調作用による顆粒膜細胞の発達メカニズムについて、実際の卵胞発達過程において、どのように機能しているのかについて考察する (Fig. 4-1)。卵分泌因子である GDF9、BMP15 は 1 次卵胞期から発現を開始し (Dong et al., 1996、Elvin et al., 2000)、一方、エストロゲンの生産は初期胞状卵胞期より増加する (Drummond, 2006)。すなわち、顆粒膜細胞は、まず卵分泌因子の制御を受けながら発達すると考えられる。卵胞が発達して初期胞状卵胞に至ると、顆粒膜細胞は卵丘細胞と壁顆粒膜細胞とに分かれて発達するが、この時、卵丘細胞では **Noggin** が発現し卵母細胞由来の **BMP** シグナルが抑制されるようになる。同時に、壁顆粒膜細胞では卵分泌因子とエストロゲンの協調作用によって **FOXL2** 発現が促進され、その結果、**CYP19A1** 発現が上昇するため、エストロゲン産生量が増加し、卵胞内のエストロゲン濃度が上昇する。エストロゲンは卵丘細胞にも働きかけ、卵丘細胞での **Noggin** の発現を抑制する。その結果、**BMP** シグナルが増強され、卵丘細胞の増殖やアポトーシスの抑制が起こり、卵丘細胞の発達が促進される。卵丘細胞の発達が促進されることによって卵母細胞の発達も促進され、その結果、卵分泌因子もさらに増加し、卵分泌因子とエストロゲンの協調作用がさらに働くようになるのではないかと考えられる。その機能の 1 つに卵分泌因子による **ESR** 結合因子の発現制御を介したエストロゲンシグナルの制御があり、これにより、卵丘細胞内で細胞内シグナル伝達に関連する遺伝子発現が促進され、卵胞発達促進に働いているのではないだろうか。

そのため、この制御に異常が生じた場合、例えば本研究では *Nog* 過剰発現マウスをモデルとしたが、卵丘細胞は正常に発達できず、増殖能の低下やアポトーシスの増加がみられ、さらに、十分な卵母細胞の発達支持ができず、その結果、卵胞全体の発達異常を引き起こし不妊となるのではないかと考えられる。本研究では **Noggin** の抑制を介した **BMP** シグナルの増強を示唆したが、**GDF9** のシグナルにおいても同様のメカニズムが存在する可能性は十分考えられる。また、本研究の結果より、いまだその存在が証

明されていない BMP15 と GDF9 のヘテロダイマーの存在を示唆できたこと、さらにそのシグナルの制御に **Noggin** が関わっている可能性は興味深い。

以上、本研究により卵分泌因子とエストロゲンの協調作用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。さらに、**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。これらの知見は、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ものである。



**Fig. 4-1 本研究が提唱する卵分泌因子とエストロゲンによる卵巢顆粒膜細胞の発達制御機構のモデル**

胞状卵胞期において、卵分泌因子とエストロゲンの協調作用によって壁顆粒膜細胞では FOXL2 発現が上昇し、その結果、CYP19A1 の発現が上昇することで壁顆粒膜細胞でのエストロゲン産生量が増加する。卵丘細胞においては、卵分泌因子が ESR 結合因子の発現制御を介してエストロゲンによって制御される遺伝子発現に影響を及ぼす。またエストロゲンは Noggin の発現を抑制することで卵母細胞由来の BMP シグナルを増強し、卵丘細胞の発達を促進する。

## 参考文献

- Augereau P, Badia E, Carascossa S, Castet A, Ffrisch S, Harmand PO, Jalaguire S, Cavailles V.** (2006)  
The nuclear receptor transcriptional coregulatory RIP140.  
*Nuclear Receptor Signaling* **4**, 2-5.
- Avraham H, Park SY, Schinkmann K, Svraham S.** (2000)  
RAFTK/Pyk2-mediated cellular signaling.  
*Cell Signaling* **12**, 123-133.
- Balemans W, Hul WV.** (2002)  
Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators.  
*Developmental Biology* **250**, 231-250.
- Bartella V, Rizza P, Barone I, Zito D, Giordano F, Giordano C, Catalano S, Mauro L, Sisci D, Panno ML, Fuqua SAW, Ando S.** (2012)  
Estrogen receptor beta binds Sp1 and recruits a corepressor complex to the estrogen receptor alpha gene promoter.  
*Brest Cancer Res Treat* **134**, 569-581.
- Basciani S, Mariani S, Arizzi M, Brama M, Ricci A, Betsholtz C, Bondjers C, Ricci G, Catizone A, Galdieri M, Spera G, Gnassi L.** (2004)  
Expression of platelet-derived growth factor (PDGF) in the epididymis and analysis of the ependymal development in PDGF-A, PDGF-B, and PDGF receptor  $\beta$  deficient mice.  
*Biology of reproduction* **70**, 168-177.
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJ.** (1993)  
Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis.  
*Endocrinology* **133**, 2204-2212.
- Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM.** (1998)  
Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton.  
*Science* **280**, 1455-1457.
- Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ, Eppig JJ.** (1990)  
FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte.  
*Developmental Biology* **138**, 16-25
- Castet A, Herledan A, Bonnet S, Jalaguier S, Vanacker JM, Cavailles V.** (2006)  
Receptor-interacting protein 140 differentially regulates estrogen receptor-related receptor transactivation depending on target genes.  
*Molecular Endocrinology* **20**, 1035-1047.
- Cavaillès V, Dauvois S, L'Horsset F, Lopez G, Hoare S, Kushner PJ, Parker MG.** (1995)

- Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by estrogen receptor.  
*EMBO journal* **14**, 3741-3751.
- Chen L, Russell PT, Larsen WJ.** (1993)  
Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass.  
*Molecular Reproduction and Development* **34**, 87-93.
- Cheng G, weihua Z, Makinen S, Makela S, Saji S, Warner M, et al.** (2002)  
A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary.  
*Biology of Reproduction* **66**, 77-84.
- Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, Korach KS.** (1999a)  
Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ .  
*Science* **286**, 2328-2331.
- Couse JF, Korach KS.** (1999b)  
Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?  
*Endocrinology Rev* **20**, 358-417.
- Couse JF, Yates MM, Deroo BJ, Korach KS.** (2005)  
Estrogen receptor-beta is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins.  
*Endocrinology* **146**, 3247-3262.
- Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, Ristaldi MS, Marzella R, Rocchi M, Nicolino M, Lienhardt-Roussie A, Nivelon A, Verloes A, Schlessinger D, Gasparini P, Bonneau D, Cao A, Pilia G.** (2001)  
The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome.  
*Nature Genetics* **27**, 159-166.
- Dai A, Sun H, Fang T, Zhang Q, Wu S, Jiang Y, Ding L, Yan G, Hu Y.** (2013)  
MicroRNA-133b stimulates ovarian estradiol synthesis by targeting Foxl2.  
*FEBS Letters* **587**, 2474-2482.
- Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A.** (1996)  
Role of transactivation of the EGF receptor in signaling by G-protein-coupled receptors.  
*Nature* **379**, 557-560.
- Dierich A, Sariram MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone-Corsi P.** (1998)  
Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 13612-13617.
- Ding H, Wu X, Bostrom H, Kim I, Wong N, Tsoi B, O'Rourke M, Koh GY, Soriano P, Betsholtz C, Hart TC, Marazita ML, Field LL, Tam PP, Nagy A.** (2004)  
A specific requirement for PDGF-C in palate formation and PDGFR- $\alpha$  signaling.

- Nature Genetics* **36**, 1111-1116.
- Dikic I, Tokiwa G, Lev S, Courtneidge SA, Schlessinger J.** (1996)  
A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation.  
*Nature* **383**, 547-550.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM.** (1996)  
Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis.  
*Nature* **383**, 531-535.
- Drummond AE.** (2006)  
The role of steroids in follicular growth.  
*Reproductive Biology and Endocrinology* **4**, 16
- Duleba AJ, Spaczynski RZ, Arici A, Carbone R, Behrman HR.** (1999)  
Proliferation and differentiation of rat theca-interstitial cells: comparison of effects induced by platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-I.  
*Biology of Reproduction* **60**, 546-550.
- Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M.** (2000)  
Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER $\beta$ ) on mouse reproductive phenotypes.  
*Development* **127**, 44277-4291.
- Edson MA, Nalam RL, Clementi C, Franco HL, Demayo FJ, Lyons KM, Pangas SA, Matzuk MM.** (2010)  
Granulosa cell-expressed BMPR1A and BMPR1B have unique functions in regulating fertility but act redundantly to suppress ovarian tumor development.  
*Molecular Endocrinology* **24**, 1251-1266.
- El-Fouly MA, Cook B, Nekola M, Nalbandov AV.** (1970)  
Role of the ovum in follicular luteinization.  
*Endocrinology* **87**, 286-293.
- Elvin JA, Yan C, Matzuk MM.** (2000)  
Oocyte-expressed TGF- $\beta$  superfamily members in female fertility.  
*Molecular and Cellular Endocrinology* **159**, 1-5.
- Emmen JM, Couse JF, Elmore SA, Yates MM, Kissling GE, Korach KS.** (2005)  
In vitro growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER) alpha and ER beta null mice indicate role for ER beta in follicular maturation.  
*Endocrinology* **146**, 2817-2826.
- Emori C, Wigglesworth K, Fujii W, Naito K, Eppig JJ, Sugiura K.** (2013)  
Cooperative effects of 17  $\beta$  -estradiol and oocyte-derived paracrine factors on the transcriptome of mouse cumulus cells.  
*Endocrinology* **154**, 4859-4872.
- Emori C, Sugiura K.** (2014)  
Role of oocyte-derived paracrine factors in follicular development.

- Animal Science Journal* **85**, 627-633.
- Eppig JJ, O'Brien MJ.** (1996)  
Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles.  
*Biology of Reproduction* **54**, 197-207.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL, Hirao Y.** (1997)  
Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells.  
*Biology of reproduction* **56**, 976-984.
- Eppig JJ.** (2001)  
Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals.  
*Reproduction* **122**, 829-838.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL.** (2002)  
The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 2890-2894.s
- Eppig JJ, Pendola FL, Wigglesworth K, Pendola JK.** (2005)  
Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport.  
*Biology of reproduction* **73**, 351-357.
- Fan HY, Liu Z, Shimada M, Stemeck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS.** (2009)  
MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility.  
*Science* **324**, 938-341.
- Garcia-Ortiz JE, Pelosi E, Omari S, Nedorezov T, Piao Y, Karmazin J, Uda M, Cao A, Cole SW, Forabosco A, Schlessinger D, Otteolenghi C.** (2009)  
Foxl2 functions in sex determination and histogenesis throughout mouse ovary development.  
*BMC Developmental Biology* **9**, 36.
- Gazzerro E, Canalis E.** (2006)  
Bone morphogenetic proteins and their antagonists.  
*Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* **7**, 51-65.
- Goff AK, Henderson KM.** (1979)  
Changes in follicular fluid and serum concentration of steroids in PMS treated immature rats following LH administration.  
*Biology of Reproduction* **20**, 1153-1157.
- Hashimoto O, Moore RK, Shimasaki S.** (2005)  
Posttranslational processing of mouse and human BMP-15: potential implication in the determination of ovulation quota.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5426-5431.
- Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM.** (1998)  
The xenopus dorsalizing factor gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities.  
*Molecular Cell* **1**, 673-768.
- Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB.** (2005)

- Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins.  
*Journal of Cell Science* **118**, 5257-5268.
- Jazbutyte V, Kehl F, Neyses L, Pelzer T.** (2009)  
Estrogen receptor alpha interacts with 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in mitochondria.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications* **384**, 450-454.
- Khokha MG, Hsu D, Brunet LJ, Dionne MS, Harland RM.** (2003)  
Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning.  
*Nature Genetics* **34**,303-307. .
- Kim JH, Kim YH, Kim HM, Park HO, Ha NC, Kim TH, Park M, Lee Kangseok, Bae Jeehyeon.** (2014)  
FOXO2 posttranslational modifications mediated by GSK3 $\beta$  determine the growth of granulosa cell tumours.  
*Nature communications* **5**, 2936.
- Klinge CM.** (2000)  
Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors.  
*Steroids* **65**, 227-251.
- Klinge CM.** (2001)  
Estrogen receptor interaction with estrogen response elements.  
*Nucleic Acids Research* **29**, 2905-2919.
- Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, et al.** (1998)  
Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 15677-15682
- Laemmli UK.** (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
*Nature* **227**, 680-685.
- Lanuza GM, Fixchman ML, Baranao JL.** (1998)  
Growth promoting activity of oocytes on granulosa cells is decreased upon meiotic maturation.  
*Developmental Biology* **197**, 129-139.
- Lei ZM, Mishra S, Zou W, Xu B, Foltz M, Li X, Rao CV.** (2001)  
Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene.  
*Molecular Endocrinology* **15**, 184-200.
- Leveen P, Pekny M, Gevre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betscholtz C.** (1994)  
Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities.  
*Genes and development* **8**, 1875-1887.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** (2001)  
Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> $\Delta\Delta C_t$  method.  
*Method* **25**, 402-408.
- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O.** (1993)



- Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse oestrogen receptor gene.
- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 11162-11166.
- Massaous J, Hata A.** (1997)
- TGF-beta signaling through the smad pathway.
- Trends in Cell Biology* **7**, 187-192.
- Matsuno Y, Oonuma A, Fujioka Y, Emori C, Fujii W, Naito K, Sugiura K.** (2015)
- Effects of porcine oocytes on the expression levels of transcripts encoding glycolytic enzymes in granulosa cells.
- Animal Science Journal*
- Marongiu M, Deiana M, Meloni A, Marcia L, Puddu A, Cao A, Schlessinger D, Crisponi L.** (2010)
- The forkhead transcription factor Foxl2 is sumoylated in both human and mouse: Sumoylation affects its stability, localization, and activity.
- PLoS ONE* **5**, e9477.
- McMahon JA, Takada S, Zimmerman LB, Fan C-M, Harland RM, McMahon AP.** (1998)
- Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite.
- Gene development* **12**, 1438-1452.
- McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP, Ritvos O, Laitinen MPE.** (2005a)
- Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function.
- Reproduction* **129**, 473-480.
- McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP, Ritvos O, Laitinen MPE.** (2005b)
- Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants.
- Reproduction* **129**, 481-487.
- Michos O, Panman L, Vinterstern K, Beier K, Zeller R, Zuniga A.** (2004)
- Gremlin- mediated BMP antagonism induces the epithelial mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. (2004)
- Development* **131**, 3401-310.
- Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S.** (2003)
- Molecular Basis of Bone Morphogenetic Protein-15 signaling in granulosa cells.
- The Journal of Biological Chemistry* **278**, 304-310.
- Naito K, Fukuda Y, Toyoda Y.** (1988)
- Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro.
- Gamete Research* **21**, 289-295.
- Nilsson EE, Larsen G, Skinner MK.** (2014)

- Roles of Gremlin 1 and Gremlin 2 in regulating ovarian primordial to primary follicle transition.  
*Reproduction* **147**, 856-874.
- Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA, Wang H, Ke H, Nikolaev VO, Jaffe LA.** (2009)  
Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte.  
*Development* **136**, 1869-1878.
- Ottolenghi C, Omari S, Garcia-Ortiz JE, Uda M, Crisponi L, Forabosco A, Pilia G, Schlessinger D.** (2005)  
Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation.  
*Human Molecular Genetics* **14**, 2053-2062.
- Pangas SA, Jorgez CJ, Matzuk MM.** (2004)  
Growth differentiation factor 9 regulates expression of the bone morphogenetic protein antagonist Gremlin.  
*The Journal of Biological Chemistry* **279**, 32281-32286.
- Pangas SA, Li X, Umans L, Zwijsen A, Huylebroeck D, Gutierrez C, Wang D, Martin JF, Jamin AP, Behringer RR, Robertson EJ, Matzuk MM.** (2008)  
Conditional deletion of Smad1 and Smad2 in somatic cells of male and female gonads leads to metastatic tumor development in mice.  
*Molecular and Cellular Biology* **28**, 248-257.
- Pannetier M, Fabre S, Batista F, Koser A, Renault L, Jolivet G, Mandon-Pepin B, Cotinot C, Veitia R, Pailhoux E.** (2006).  
FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development.  
*Journal of Molecular Endocrinology* **36**, 399-413.
- Paramanik V, Thakur MK.** (2011)  
AIB1 shows variation in interaction with ER $\beta$ TAD and expression as a function of age in mouse brain.  
*Biogerontology* **12**, 321-328.
- Park JY, Su YQ, Ariga M, Laq E, Jin SL, Conti M.** (2004)  
EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle.  
*Science* **303**, 682-684.
- Peng J, Li Q, Wigglesworth K, Rangarajan A, Kattamuri C, Peterson R, Eppig JJ, Thompson TB, Matzuk MM.** (2013)  
Growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian function.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 776-785.
- Perez GI, Robles R, Kundson CM, Flaws JA, Korsmeyer SJ, Tilly JL.** (1999)  
Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency.  
*Nature Genetics* **21**, 200-203.
- Pisarska MD, Bae J, Klein C, Hsueh AJ.** (2004)  
Forkhead L2 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene.  
*Endocrinology* **145**, 3424-3433.
- Pisarska MD, Kuo FT, Bentsi-Barnes IK, Khan S, Barlow GM.** (2010)

- LATS1 phosphorylates forkhead L2 and regulates its transcriptional activity.  
*American Journal of Physiological Society Endocrinology and Metabolism* **299**, E101-E109.
- Rao MC, Midgley AR, Richards JS.** (1978)  
 Hormonal regulation of ovarian cellular proliferation.  
*Cell* **14**, 71-78.
- Richards JS.** (2005)  
 Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization.  
*Molecular and Cellular Endocrinology* **234**, 75-79.
- Rider CC, Mulloy B.** (2010)  
 Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists.  
*Biochemical Journal* **429**, 1-12.
- Rosenfeld CS, Murray AA, Simmer G, Hufford MG, Smith MF, Spears N, Lubahn DB.** (2000)  
 Gonadotrophin induction of ovulation and corpus luteum formation in young oestrogen receptor- $\alpha$  knockout mice.  
*Biology of reproduction* **62**, 599-605.
- Samaan S, Tranchevent LC, Dardenne E, Espinoza MP, Zonta E, Germann S, Gratadou L, Dutertre M, Auboeuf D.** (2014)  
 The Ddx5 and Ddx17 RNA helicases are cornerstones in the complex regulatory array of steroid hormone-signaling pathways.  
*Nucleic Acids Research* **47**, 2197-2207.
- Schmahl J, Rizzolo K, Soriano P.** (2008)  
 The PDGF signaling pathway controls multiple steroid-producing lineages.  
*Genes and Development* **22**, 3255-3267.
- Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treire AC, Treire M.** (2004)  
 The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance.  
*Development and disease* **131**, 933-942.
- Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL.** (1997)  
 Female infertility in mice lacking connexin 37.  
*Nature* **385**, 525-529.
- Soriano P.** (1994)  
 Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF  $\beta$ -receptor mutant mice.  
*Genes and Development* **8**, 1888-1896.
- Soriano P.** (1997)  
 The PDGF  $\alpha$  receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites.  
*Development* **124**, 2691-2700.
- Stashi E, Wang L, Mani SK, York B, O'Malley BW.** (2013)  
 Research Resource: Loss of the steroid receptor coactivators confers neurobehavioral consequences.  
*Molecular Endocrinology* **27**, 1776-1787.
- Su YQ, Denegre JM, Wigglesworth K, Pendola FL, O'Brien MJ, Eppig JJ.** (2003)

Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex.

*Developmental Biology* **263**, 126-138.

**Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit JP, Pangas SA, Matzuk MM, Eppig JJ. (2008)**

Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells.

*Development* **135**, 111-121.

**Su YQ, Sugiura K, Eppig JJ. (2009)**

Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism.

*Seminars in Reproductive Medicine* **27**, 32-42.

**Sudo S, Avsian-Kretchmer O, Wang LS, Hsueh AJW. (2004)**

Protein related to DNA and Cerberus is a bone morphogenetic protein antagonist that participates in ovarian paracrine regulation.

*The Journal of Biological Chemistry* **279**, 23134-23141.

**Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ. (2005a)**

Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism.

*Developmental Biology* **279**, 20-30.

**Sugiura K, Eppig JJ. (2005b)**

Society for reproductive biology founders' lecture 2005 control of metabolic cooperativity between oocytes and their companion granulosa cells by mouse oocytes.

*Reproduction, Fertility and Development* **17**, 667-674.

**Sugiura K, Su YQ, Diaz F, Pangas SA, Sharma S, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Matzuk MM, Shimasaki S, Eppig JJ. (2007)**

Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells.

*Development* **134**, 2593-2603.

**Sugiura K, Su YQ, Li Q, Wigglesworth K, Matzuk MM, Eppig JJ. (2009)**

Fibroblast growth factors and epidermal growth factor cooperate with oocyte-derived members of the TGFbeta superfamily to regulate Spry2 mRNA levels in mouse cumulus cells.

*Biology of Reproduction* **81**, 833-841.

**Sugiura K, Su YQ, Eppig JJ. (2010a)**

Dose bone morphogenetic protein 6 (BMP6) affect female fertility in the mouse?

*Biology of Reproduction* **83**, 997-1004

**Sugiura K, Su YQ, Wigglesworth K, Matzuk MM, Eppig JJ. (2010b)**

Estrogen promotes the development of mouse cumulus cells in coordination with oocyte-derived GDF9 and BMP15.

*Molecular Endocrinology* **24**, 1-11.

**Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G. (2004)**

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

*Human Molecular Genetics* **13**, 1171-1181.

- Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, Treier AC, Klugmann C, Klasen C, Holter NI, Riethmacher D, Schutz G, Cooney AJ, Lovell-Badge R, Treier M. (2009)**  
Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation.  
*Cell* **139**, 1130-1142.
- Vanderhyden BC, Telfer EE, Eppig JJ. (1992)**  
Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro.  
*Biology of Reproduction* **46**, 1196-1204.
- Vanderhyden BC and Tonary AM. (1995)**  
Differential regulation of progesterone and estradiol production by mouse cumulus and mural granulosa cells by a factor(s) secreted by the oocyte.  
*Biology of Reproduction* **53**, 1243-1250.
- Wagner M, Koslowski M, Paret C, Schmidt M, Dureci Ozlwm, Sahin Ugur. (2013)**  
NCOA3 is a selective co-activator of estrogen receptor alpha-mediated transactivation of PLAC1 in MCF-7 breast cancer cells.  
*BMC cancer* **13**, 570-579.
- White R, Leonardsson G, Rosewell I, Jacobs MA, Milligan S, Parker M. (2000)**  
The nuclear receptor co-repressor Nrip1 (RIP140) is essential for female fertility.  
*Nature Medicine* **6**, 1368-1374.
- Wigglesworth K, Lee KB, Emori C, Sugiura K, Eppig JJ. (2015)**  
Transcriptomic diversification of developing cumulus and mural granulosa cells in mouse ovarian follicles.  
*Biology of Reproduction* **92**, 1-14.
- Wijgerde M, Karp S, McMahon J, McMahon AP. (2003)**  
Noggin antagonism of BMP4 signaling controls development of the axial skeleton in the mouse.  
*Developmental Biology* **286**, 149-157.
- Wilhelm D, Martinson F, Bradford S, Wilson MJ, Combes AN, Beverdam A, Bowles J, Mizusaki H, Koopman P. (2005)**  
Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination.  
*Developmental Biology* **287**, 111-124.
- Wong AM, Abrams MC, Micevych PE. (2015)**  
 $\beta$ -Arrestin regulates estradiol membrane initiated signaling in hypothalamic neurons.  
*PLoS One* **24**, e0120530.
- Wortham NC, Ahamed E, Nicol SM, Thomas RS, Periyasamy M, Jiang J, Ochocka AM, Shousha S, Huson L, Bray SE, Coombes RC, Ali S, Fuller-Pace FV. (2009)**  
The DEAD-box protein p72 regulates ER $\alpha$ -oestrogen-dependent transcription and cell growth, and is associated with improved survival in ER $\alpha$ -positive breast cancer.  
*Oncogene* **28**, 4053-4061.
- Xiong W, He F, Morikawa Y, Yu X, Zhang Z, Lan Y, Jiang R, Cserjesi P, Chen Y. (2009)**

Hand2 is required in the epithelium for palatogenesis in mice.

*Developmental Biology* **330**, 131-141.

**Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ,**

**Matzuk MM.** (2001)

Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function.

*Molecular Endocrinology* **15**, 854-866.

**Yin X, Wang X, Hu X, Chen Y, Zeng K, Zhang H.** (2015)

ER $\beta$  induces the differentiation of cultured osteoblasts by both Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and estrogen signaling pathways.

*Experimental Cell Research* **335**, 107-114.

**Yan L, Nass SJ, Smith D, Nelson WG, Herman JG, Davidson NE.** (2003)

Specific inhibition of DNMT1 by antisense oligonucleotides induces re-expression of estrogen receptor alpha (ER) in

ER-negative human breast cancer cell lines.

*Cancer Biology and Therapy* **5**, 552-556.

**Yang SY, He XY, Isaacs C, Dobkin C, Miller D, Philipp M.** (2014)

Roles of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type10 in neurodegenerative disorders.

*Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **143**, 460-472.

**Zangen D, Kaufman Y, Zeligson S, Perlberg S, Fridman H, Kanaan M, Abdulhadi-Atwan M, Libdeh AA, Gussow A,**

**Kisslov I, Carmel L, Renbaum P, Levy-Lahad E.** (2011)

XX ovarian dysgenesis is caused by Psmc3ip/Hop2 mutation that abolishes coactivation of estrogen-driven transcription.

*The American journal of Human Genetics* **89**, 572-579.

**Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Xia G, Eppig JJ.** (2010)

Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes.

*Science* **330**, 366-369.

**Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, Xia G, Eppig JJ.** (2011)

Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro.

*Endocrinology* **152**, 4377-4385.

**Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM.** (1996)

The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4.

*Cell* **86**, 599-606.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、多大なご指導をいただきました、指導教員の東京大学大学院農学生命科学研究科応用動物科学専攻応用遺伝学研究室、杉浦幸二准教授に感謝いたします。杉浦先生には博士進学を志すきっかけを与えていただき、研究の進行をはじめ、学会発表、論文の執筆などあらゆる面において手厚いご指導をいただきました。深く感謝いたします。また、同応用遺伝学研究室の内藤邦彦教授、藤井渉助教には研究のご指導だけでなく、研究室での生活等に関してもお世話になりました。ここに感謝いたします。

東京大学大学院農学生命科学研究科応用動物科学専攻、並びに獣医学専攻の皆様には様々な形でご助言や励ましをいただきました。特に、私の所属する応用遺伝学研究室の皆様には公私ともに大変お世話になりました。また、資金面では、日本学生支援機構、並びに日本学術振興会に大変お世話になりました。ここに深謝いたします。

最後に、私の選択した道をいつも暖かく見守り、応援してくれた両親に心から感謝いたします。

2016 年 3 月

江森 千紘