

# 博士論文

Neuregulin1 が雌妊孕性に果たす役割に関する研究

(要約)

平成 30 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物資源科学専攻

梅原 崇

## 要約

### 第一章：緒論

卵は、卵巣内において周囲の体細胞と卵胞を形成しており、各発情周期において、一定数の卵胞コホートが卵胞発育を開始する。発育を開始した卵胞は、脳下垂体から分泌される FSH と卵分泌因子によって、構成する卵胞膜、顆粒層細胞および卵丘細胞の増殖及び分化が時期特異的に誘導されることで、排卵直前卵胞へと発育する。排卵直前卵胞の顆粒層細胞が LH 刺激を感受すると、EGF like factor が分泌され、顆粒層細胞や卵丘細胞に発現する EGF 受容体 (EGFR) を刺激し、ERK1/2 系が活性化される。このような系に依存して、十分な受精能を有した卵 (MII 卵) が卵管へと排卵される。しかしながら、ERK1/2 を欠損したマウスは完全不妊を呈するのに対して、EGFR を欠損したマウスでは排卵異常を呈するものの、産子が得られる。すなわち、排卵現象は EGF like factor だけでなく、それ以外の ERK1/2 を活性化の上流因子によっても制御されていると言える。我々は、ERK1/2 を制御する新たな二次因子として Neuregulin1 (NRG1) が LH 刺激依存的に発現上昇すること、それが卵の発生能力を高めることを見出した。しかしながら、体外培養系は一つの因子の影響を受けやすいことから、遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* 解析を行う必要がある。そこで本研究では、LH 刺激を伝達する二次因子として推定された NRG1 の排卵過程特異的な遺伝子欠損マウスを作製することによって、NRG1 が排卵現象を制御する主要な二次因子であるか検討し、その機能の解明を試みた。それによって、LH 刺激を起点に起こる雌生殖器官の分子学的・形態学的・内分泌学的な変化機序および変化原因の解明と、その知見を基盤とした新たな体外培養系の構築や不妊症例に対する治療法・処置法の開発を試みた。

### 第二章：顆粒層細胞特異的 NRG1 欠損マウス (*gcNrg1KO* マウス) を用いた排卵過程において NRG1 が果たす役割の解析

#### 第一節：顆粒層細胞特異的 NRG1 欠損マウス (*gcNrg1KO* マウス) の作出とその妊孕性解析

NRG1 を全身で欠損したマウスは胚性致死となることから、NRG1 の機能部位である EGF domain を lox P 配列で挟んだ *Nrg1<sup>fllox/fllox</sup>* マウスと胞状卵胞の顆粒層細胞で Cre を発現する *Cyp19-Cre* マウスを交配させ、排卵過程の顆粒層細胞特異的に機能的な NRG1 が発現しない *Nrg1<sup>fllox/fllox</sup>;Cyp19-Cre* マウス (*gcNrg1KO* マウス) を作出した。妊孕性解析の結果、*gcNrg1KO* マウスは、顆粒層細胞の黄体化や卵丘細胞の膨潤は正常である一方で、成熟卵の受精能が低いために、一腹産子数が有意に少なくなるという低妊孕性を呈していた。受精能について詳細に検討したところ、*gcNrg1KO* 卵では、受精能力の獲得は十分である

が、その維持が不十分であるため、排卵後の時間経過に伴って異常受精が多発する“卵の加齢化”が生じていた。

## 第二節：gcNrg1KO マウスをモデルとした卵の減数分裂進行速度と Cytostatic Factor 活性との関連性の解析

卵が加齢化する gcNrg1KO マウスをモデルとして、卵の加齢化メカニズムの解明を試みた結果、gcNrg1KO マウス卵では、卵の減数分裂の再開が早期化することで、卵内ミトコンドリアコピー数が増加せず、卵内 ATP 濃度が低下していた。低 ATP 環境は、卵内カルパインの活性化を導くことで、Mos や Cyclin B1 を早期に分解し、単為発生を誘発していた。このような低 ATP 環境を改善するため、高濃度グルコース環境で MII 卵を培養することによる非生理的な解糖系活性の誘導を試みたところ、卵内 ATP 濃度の上昇とともに、単為発生が抑制された。すなわち、卵の加齢化に伴う低 ATP 環境が卵の単為発生を誘導すること、そして非生理的な高グルコース環境で加齢化卵を培養することで、卵内 ATP 濃度が補完され、単為発生が抑制されることが明らかになった。

## 第三節：卵丘細胞を介した NRG1 の卵成熟調節機構の解明

NRG1 受容体である ErbB3 は、卵ではなく卵丘細胞に発現していることから、gcNrg1KO マウス卵で認められる卵の異常は、NRG1 の欠損が卵丘細胞へ影響した結果である。そこで NRG1 が果たす役割を明確化するため、gcNrg1KO マウスの卵丘細胞を用いて NRG1 が制御するシグナル伝達系の同定を試みた。マイクロアレイ解析の結果、gcNrg1KO マウスでは、発現が WT マウスのそれと比較して過剰化する遺伝子が 234 個も存在していた。In silico 解析より、それら遺伝子の 88% が CREB や SP-1 の結合領域を有することから、これら転写因子を活性化する PKC に着眼したところ、本マウスの卵丘細胞では、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の過剰な上昇に伴う PKC の過剰活性化が生じていることが明らかになった。PKC の過活性は、同時にギャップジャンクションの早期閉鎖に伴う、卵の減数分裂の早期再開も導いていた。すなわち NRG1 は、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇を制御し、PKC 活性を適正值にすることで、遺伝子発現とギャップジャンクションの閉鎖を適切な速度で誘導する排卵現象の律速因子であることが明らかになった。

## 第三章：gcNrg1KO マウスをモデルとした加齢に伴う妊孕性低下機構の解析と治療法の開発

### 第一節：gcNrg1KO マウスをモデルとした加齢に伴う妊孕性の変化と内分泌環境の変化の検討

加齢化し妊孕性の低下した雌個体では、内分泌環境が異常化し発情周期が長期化する。また、加齢に伴って卵巣間質に白体の残存物が蓄積し、卵胞外ステロイド産生能が亢進す

ることも知られている。第二章より *gcNrg1KO* マウスでは、卵の加齢化に伴う異常受精の多発によって、発情周期が回転し続けることが明らかになった。ウシやヒトでは、発情周期毎に白体退行残存物が卵巣間質へと蓄積すると言われていることから、*gcNrg1KO* マウスでは発情周期の過回転によって早期に卵巣間質が変化し、内分泌環境が異常化すると仮設立てた。そこで交配試験を行ったところ、*gcNrg1KO* マウスでは 6 か月齢から妊孕性が低下しはじめ、13 か月齢以降では妊孕性が消失していた。そして妊孕性の低下と同時に 1) 分娩間隔の長期化 2) 発情周期の長期化 3) 外因性 FSH 刺激への低反応性 4) 高 E2, 高 T4, 高 LH, そして高 FSH 環境の常態化といった加齢化の兆候が、6 か月齢から認められることも明らかになった。

### 第二節：gcNrg1KO マウスにおける高 E2 および高 T4 環境の原因とそれが卵巣機能に及ぼす影響

加齢に伴う妊孕性低下原因を明確化するため、卵胞形成と加齢に伴う卵巣間質の変化に着眼して解析した結果、本マウスでは 6 か月齢以降の卵巣間質に LH 受容体を有した T4 産生細胞が蓄積するとともに、卵巣間質が線維化し、卵胞発育が初期の二次卵胞で停滞していることが明らかになった。そして、T4 受容体拮抗剤である Flutamide を長期間投与したところ、それら異常が解消されることが示された。すなわち、加齢に伴う妊孕性の低下は、1) 卵巣間質への T4 産生細胞の蓄積 2) T4 産生細胞による高 T4 環境の常態化 3) 高 T4 環境による卵巣の線維化 4) 卵巣線維化に伴う FSH 反応性の低下 という機序によって引き起こされることが明らかになった。

### 第三節：gcNrg1KO マウスで認められた高 LH 環境が卵巣の線維化に果たす役割とその改善が妊孕性に与える影響

卵巣間質に蓄積した T4 産生細胞が LH 受容体を有していること、そして本マウスでは高 T4 環境とともに高 LH 環境も常態化していたことから、高 LH 環境に起因して、卵巣間質の T4 産生細胞が生存あるいは、活性化された結果、高 T4 環境が引き起こされ、卵巣機能が低下すると仮設立てた。LH 分泌を抑制する GnRH-Antagonist (Anta) 投与を行った結果、長期的な Anta 投与によって、卵巣間質の T4 産生細胞が死滅すると同時に、間質が脱線維化されることで、卵胞発育が再開し、FSH 反応性が回復することが明らかになった。さらに、Anta 投与個体を交配試験に供試したところ、若齢個体と同等な産子数が継続的に得られた。すなわち、LH 脱感作処理が視床下部—下垂体—卵巣系のフィードバック機構を正常化させ、卵巣機能を改善する、新たな妊孕性の回復法になりうることを示唆された。

### まとめ

本研究において、*gcNrg1KO* マウスは、①若齢期では、排卵後の MII 卵の減数分裂停

止能が低いため、異常受精が多発するという“卵の加齢化”と、②6ヶ月齢以降では、卵巣間質の T4 産生が高まるために卵巣が線維化した結果、卵胞発育が停滞するという“卵巣の加齢化”という 2つの加齢化モデルであることが明らかになった。すなわち、NRG1 は“卵の加齢化”を抑制することで、若齢における妊孕性を担保するだけでなく、空胎期間を短縮させ、卵胞周期の回転を抑制することで“卵巣の加齢化”を抑制する、雌個体において限りある卵を効率的に長期間利用するための重要因子であることが示された。さらに本解析より、“卵の加齢化”は高グルコース環境で培養することで抑制可能であり、“卵巣の加齢化”は、長期間の LH 脱感作によって完全回復するといった、新たな体外培養系、治療法の可能性も示された。以上のように、マウスをモデルとした妊孕性解析とその原因メカニズムの解明は、得られた基礎データを基盤とすることで、新たな体外培養系の構築のみならず、生体の妊孕性を増強および維持する処置法・治療法の開発にも繋がり、畜産業やヒト不妊治療の発展に大きく貢献すると考えられた。