

博 士 論 文

ALDH family に着眼した 排卵卵胞形成に関する分子生物学的研究 (要約)

平成 27 年 3 月

広島大学 大学院生物圏科学研究科

川 合 智 子

哺乳動物において、卵は出生前後に第一減数分裂前期で減数分裂を停止し、それが扁平な細胞に覆われることで原始卵胞を形成している。この原始卵胞は、PI3K経路の活性化により、卵を覆う扁平な細胞形態が立方状へと変化した一次卵胞へと発育する。卵胞発育が開始した一次卵胞では、卵分泌因子が顆粒層細胞のシグナル伝達系と代謝ネットワークを活性化させ、卵の成長と顆粒層細胞の増殖を促し、二次卵胞となる。二次卵胞では、性腺刺激ホルモンであるFSHとLHの受容体がそれぞれ顆粒層細胞と内卵胞膜細胞に発現し卵胞発育が脳下垂体による内分泌を介した制御に切り替わる。これらの性腺刺激ホルモンは、卵胞内でアンドロゲンとエストロゲン（E2）を合成させ、卵胞の発育を急速に促し、卵では母性因子が蓄積される。さらに、卵と顆粒層細胞間に卵胞腔が形成され、その中を卵胞液が占める胞状卵胞へと変化する。胞状卵胞では、卵を覆う細胞が卵と直接接する卵丘細胞と卵胞腔に隔たれた顆粒層細胞とに区別され、これらの卵胞と内卵胞膜細胞による複雑なシグナルネットワークが、卵の減数分裂再開能力と受精・発生能力を獲得させる。一方、顆粒層細胞では、FSHとE2により立方状の細胞形態が円柱型へと変化し、LH受容体が発現し、排卵刺激に応答する排卵前卵胞となる。このFSHによる後期の卵胞発育誘導において、細胞増殖にCcnd2発現が必須であること、E2合成にCyp19a1発現が必要なことなどが明らかにされている。しかし、FSHにより、その刺激直後ではなく、排卵刺激直前になってLH受容体（Lhcgr）が発現する仕組みについて、その詳細な分子生物学的メカニズムは不明である。そこで、本研究では、マウスを用いてFSHがLH受容体発現を誘導するために必須な新規因子の同定とその機能解析を行い、卵の発生能への影響を検討した。

卵胞発育期の卵巣におけるacetaldehyde産生機構とALDH familyの発現解析

FSHが誘起するE2合成機構において、CYP17A1によるPregnenolone側鎖切断時に、細胞毒性を有する副産物acetaldehydeが産生されると予測される。そこで、E2合成に関与する遺伝子群の発現とacetaldehyde濃度の変化を経時的に検出した。その結果、eCG刺激によりCyp17a1発現が有意に上昇し、それに伴ってacetaldehydeが産生され、36時間後に最大値を示した。しかし、卵胞発育に伴って増加傾向を示したacetaldehyde濃度は、eCG投与48時間後ではCyp17a1は高値を維持していたにも関わらず、24時間後と同レベルにまで低下した。この低下は、acetaldehydeの毒性から卵胞を防御する解毒機構と推察し、acetaldehyde分解酵素であるALDH familyについて、mRNAとタンパク質レベルの発現変動と局在を検討した。その結果、Aldh1a1, 1a7の発現がeCG刺激により有意に上昇した。また、ALDH1A1は、内卵胞膜細胞と排卵前卵胞では顆粒層細胞にも検出され、acetaldehyde産生経路と分解酵素の局在が相補的であることが示された。さらに、E2合成経路とALDH1A1の連動性を明らかにするため、Aldh1a1の発現制御機構をプロモーター活性測定により解析した結果、Cyp17a1発現を誘導する転写因子GATA familyがAldh1a1の発現をも制御していることが示された。これらのことから、Aldh1a1がGATA family依存的にE2合成経路と同時期に活性化し、E2合成時に副産物として産生されるacetaldehydeを即座に分解していると考えられた。

卵胞発育期の卵巣におけるALDH1の機能解析

卵胞発育期におけるALDH1の生理的な役割を検討するため、未成熟マウスにALDH抑制剤（Cyanamide）をeCGとともに腹腔内投与し、48時間後に回収した卵巣を用いてacetaldehyde濃度、遺伝子発現、卵巣形態への影響を調べた。その結果、ALDH活性を阻害するとacetaldehyde濃度の上昇が認められ、胞状卵胞内では顆粒層細胞層が不均一で、卵胞腔内に遊離した細胞はTUNEL染色陽性であった。さらに、卵胞発育期の顆粒層細胞に機能するCyp19a1やLhcgr、内卵胞膜細胞で機能するBmp7やCyp17a1の発現がCyanamide投与により有意に減少したことから、ALDH1はacetaldehydeを分解し、顆粒層細胞の生存および細胞接着を介した正常な機能分化に重要な役割を果たすことが明らかになった。

卵胞発育期のALDH1によるacetaldehyde分解機構が卵に与える影響

ALDH1によるacetaldehyde分解機構が卵に及ぼす影響を調べるため、マウスにeCGとCyanamideを同時投与した48時間後にhCGを腹腔内投与し、排卵試験と交配試験を実施した。その結果、排卵数、受精卵数と受精卵の胚盤胞期胚への発生卵数の有意な低下が認められ、卵胞内のacetaldehyde濃度が卵胞発育と卵の発生能と関連していることが明らかになった。

ヒト不妊治療時に、様々な卵巣刺激法を促した患者からの採卵時に、卵と卵胞液を回収した。卵を体外受精し、受精率と良好胚への発生率を検討し、卵胞液はacetaldehyde濃度測定に供試した。その結果、卵胞中のacetaldehyde濃度が同一患者の卵胞間で大きく異なり、正常に受精と胚発生が誘起される卵が属する卵胞内acetaldehyde濃度は有意に低いこと、これはLong法を用いた時に最も高く、バリエーションも大きいことが示された。従って、acetaldehyde分解機構を考慮することは、最も発生能の高い卵を発育させるための刺激法考案と卵胞発育障害の原因解明の手がかりになると考えられた。

Adh, *Alch* family遺伝子が制御するRA合成系の役割

ALDH1は、食物から摂取されるビタミンAをレチノイン酸（RA）に変換する役割も担うことが知られている。ALDH1抑制剤によるLhcgr発現抑制がRA投与により回復したことから、ALDH1は、acetaldehyde分解とRA新規合成に関与し、両機能が排卵前卵胞への発育に重要と考えられた。そこで、*Aldh1* familyに加えて、*Adh*などRA合成関連遺伝子の発現変化とRA新規合成、および卵胞発育に果たす役割を解析した。内卵胞膜細胞では*Adh1*と*Aldh1a1*、顆粒層細胞では*Adh5*と*Aldh1a7*が発現し、排卵前卵胞の顆粒層細胞で新規合成されたRAが遺伝子発現作用を持つことも明らかになった。ADH阻害剤（4MP）をeCGやhCGを投与する時にマウスの腹腔内へ投与し、排卵への影響を調べた結果、eCGとの同時投与が排卵数を有意に低下させた。さらに、卵巣形態および血中のE2濃度に変化は認められなかったが、顆粒層細胞のLhcgr発現が特異的に低下した。また、4MPとeCG投与48時間後にhCGを投与したとき、排卵期特異的な遺伝子発現も有意に低値を示した。以上の結果から、卵胞発育期に合成されたRAが顆粒層細胞に作用し、LH受容体形成に必須であること

が示された。

RA合成に必要なビタミンAの欠乏飼料を供与したマウスの解析

RA合成系は，経口摂取したビタミンAを基質としてRAを新規合成する．そこで，ビタミンA欠乏飼料を離乳後からマウスに供与し，栄養学的にRAの卵巢機能に及ぼす役割を探求するため，欠乏飼料により低レチノール状態となった個体の性周期，卵巢形態や卵胞発育期や排卵期に必須のマーカ―遺伝子発現，卵の排卵や受精，胚盤胞期胚への発生能への影響を検討した．その結果，発情期が長期化し，内因性の排卵刺激で排卵が起こっていないこと，この原因は，顆粒層細胞のLhcgr発現が有意に抑制されていることを明らかにした．さらに，過剰排卵処理を行っても排卵数や卵の成熟率，胚盤胞期胚への発生率が改善されなかった．以上の結果から，卵胞発育期に合成されるRAは，排卵前卵胞のLH感受性を高めることで，高い発生能を有する卵を排卵させると考えられた．

RAにより制御されるLH受容体の発現制御機構

RAがLhcgr発現を誘導する仕組みを解明するため，Lhcgrプロモーター領域を解析したが，RA受容体の結合部位は転写開始点5,000 bp上流までは認められなかった．そこで，Lhcgr発現を直接的に制御すると報告されている転写因子Sp1がCpGアイランドに結合すること，このCpGアイランドはメチル化されると転写因子との結合能を消失するとの知見から，Lhcgrプロモーター領域のメチル化解析を行った．その結果，eCG投与前ではLhcgrプロモーター領域におけるCpG配列の50%以上がメチル化されていたが，eCG投与によりその割合は著しく減少していた．さらに，このメチル化割合の減少が，RA合成阻害剤により有意に抑制された．

Sp1は，排卵刺激により発現上昇する遺伝子のプロモーター領域にも結合することから，プロモーター領域のDNAメチル化を次世代シーケンサーにより網羅的に解析した．その結果，eCG投与による卵胞発育期に全遺伝子の14.15%でプロモーター領域の脱メチル化が誘導されていた．また，この脱メチル化は，いずれの常染色体においても15%前後で検出されたことから，大規模な選択的脱メチル化機構が卵胞発育期に機能していると推察された．その1つのメカニズムとして，Lhcgrでは領域特異的な脱メチル化を誘起するプロモーター領域相補的なpancRNAが発現し，それがRA合成により制御される可能性を見出した．

まとめ

本研究において，①ADH，ALDHfamilyが，卵胞発育期にALDH1がE2合成に関与する遺伝子と共に発現上昇し，E2合成の副産物であるacetaldehydeを直ちに分解すること，②これにより，顆粒層細胞の生存と接着が担保され，細胞の増殖，細胞間コミュニケーションを円滑化していることが明らかになった．さらに，③ALDH1はビタミンAをRAへと変換することにも関与し，Lhcgrの転写開始に関わるプロモーター領域の脱メチル化を介して，顆粒層細胞にLH刺激に対する応答能を獲得させていた．これら①～③から，acetaldehyde

代謝機構とRA合成系による脱メチル化を介したLhcgr発現機構が、排卵前卵胞の形成と卵の発生能を支配していることを初めて明らかにした。

一つの酵素が複数の機能を有する仕組みとその意義を解明した本研究の成果から、排卵前卵胞形成機構の解明とビタミン A 欠乏が DNA 脱メチル化異常による排卵障害を引き起こすという栄養学と繁殖学を統合する新たな知見も得られた。これにより、遺伝的な背景に加えて、細胞内や生育環境、飼養環境が引き起こす繁殖障害や不妊病態の解明とその予防法の考案にまでつながる可能性があり、家畜繁殖やヒト不妊治療の分野への貢献が期待される。