

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 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

広島大学大学院生物圏科学研究科
生物資源科学専攻
学生番号 D110735
氏 名 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する。LH 受容体が発現し、排卵刺激にตอบสนอง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要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, *Aldh* 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 の卵巣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、卵巣形態や卵胞発育期や排卵期に必須のマーカー遺伝子発現、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, ALDH family 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。