

卵巣由来Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) による卵成熟機構の解明

河村 和弘¹⁾, 河村 七美²⁾, Aaron JW Hsueh³⁾, 田中 俊誠¹⁾

1) 秋田大学医学部生殖発達医学講座産婦人科分野

2) 秋田大学医学部感覚器学講座皮膚・形成外科学分野

3) Division of Reproductive Biology, Department of Obstetrics and Gynecology, Satford University School of Medicine

はじめに

哺乳動物では卵胞破裂と卵の最終的な成熟は、下垂体由来のluteinizing hormone (LH) 刺激が卵をとりまく顆粒膜細胞および莢膜細胞に作用することによっておこる。LHサージ後すぐに、late prophaseで休止していた卵は減数分裂を再開し、卵核胞崩壊 (germinal vesicle breakdown: GVBD), chromosomeの濃縮, 第一極体の放出がおこり、来るべき受精・胚発育に備える。卵はLH受容体を発現していないため、LHは卵巣体細胞に作用し、そこから産生される局所因子がパラクライン作用により卵の機能を調節していると考えられる。近年、LH刺激により顆粒膜細胞からepidermal growth factor (EGF)-like factorsが、莢膜細胞からinsulin-like 3が産生され、GVBDを促進させることが明らかとなった [1, 2]。第一減数分裂終了時までにGVBDおよび第一極体の放出に代表される卵の核成熟に加え、受精および胚発育能に重要な細胞質成熟 (oocyte conditioning) がおこる。しかし、これまでoocyte conditioningに重要な働きをする卵巣由来因子に関する研究は非常に少ない。

われわれは、oocyte conditioningに関与する卵巣由来パラクライン因子を見出すため、DNA microarrayを用いて排卵期に発現量が著明に増加する卵巣の遺伝子を網羅的に検討した。その結果、新規卵成熟因子の候補としてBrain-derived neurotrophic factor (BDNF) を見出した。BDNFはneurotrophinファミリーに属し、high-affinity tyrosine kinase B (TrkB) 受容体とlow-affinity p75NTR受容体に結合し活性を示す [3]。neurotrophinファミリーは中枢神経系に広く発現し、神経のアポトーシスや分化に重要な役割を果たすが [4]、

末梢組織においても重要な働きをもつことが明らかとなってきた [5]。卵巣においては、BDNFは初期卵胞の発育に必須であることが示されてきたが [6, 7]、卵成熟や排卵への役割については不明である。

本研究では、BDNFの卵成熟への役割についてマウスを用いて分子生物学的な検討を行った。

方法

実験動物としてB6D2F1マウスを用い、すべての動物実験はNational Institute of Healthの指針に沿って行った。本研究では、DNA microarray, real-time RT-PCR, ELISA, 免疫染色, glutathioneアッセイ, 卵胞培養, 第一極体放出試験, in vitro maturation (IVM)-in vitro fertilization (IVF), in vivoアッセイ, 胚盤胞細胞数測定, 統計解析を用いて一連の実験を行った。

Gonadotropinによる卵巣BDNFの発現調節

21日齢マウスにHumegonを投与し、48時間後にPregnylを投与して卵胞成熟および排卵を誘発した。RNA抽出のためHumegon投与後は2時間毎に、Pregnyl投与後は1時間毎に卵巣を採取した。DNA microarray解析はAffymetrix mouse MGU74v2 array A, B, and Cを用いた。

図1A (折れ線グラフ) に示すように、BDNF mRNAの発現量はHumegon投与後に軽度増加し、すぐに減少した後、Pregnyl投与後2時間で再度増加し、3時間後にピークに達した。TrkB mRNAの発現量はgonadotropin投与によって変化しなかった (図1B [折れ線グラフ])。また、TrkBのもう一つのライガンドであるneurotrophin-4/5 (NT-4/5) の基礎値はBDNFと同程度であったが、gonadotropin投与による発現量の変化は認められなかった (図1C [折れ線グラフ])。

DNA microarrayの結果は定量的real-time RT-PCR

連絡先: 河村和弘, 秋田大学医学部生殖発達医学講座産婦人科分野

〒010-8543 秋田県秋田市本道1-1-1

TEL: 018-884-6163

FAX: 018-884-6447

E-mail: kawamura@yf7.so-net.ne.jp

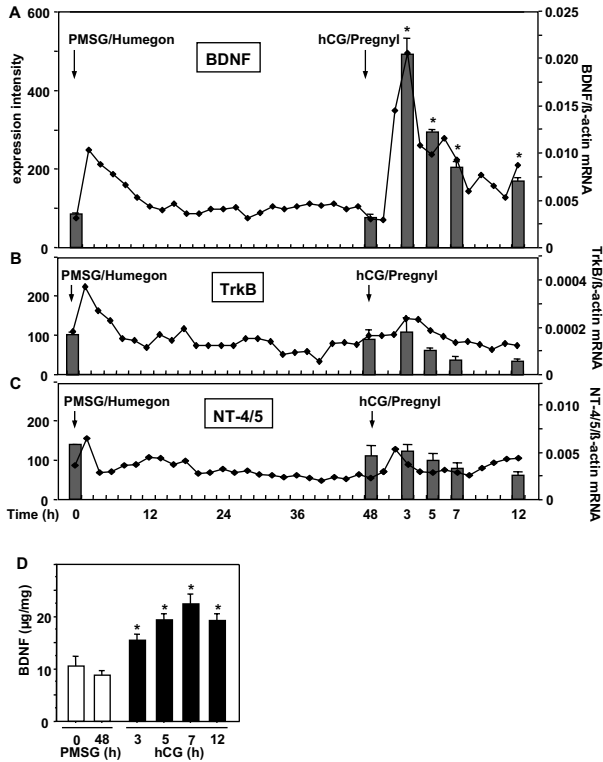


図1 Gonadotropinによる卵巣BDNF発現量の増加。(A-C) マウス卵巣におけるgonadotropinによるBDNF (A), TrkB (B), NT-4/5 (C) mRNAの発現調節。折れ線グラフ: DNA microarray data, 棒グラフ: 定量的real-time RT-PCR data (D) マウス卵巣におけるgonadotropinによるBDNFタンパクの発現調節。卵巣内BDNF量 (μ g/mg ovarian wet weight) はELISAにて測定した。(mean \pm SEM, n=3) *, P < 0.05 vs. 0 h of PMSG treatment. (文献8より一部改変)

にて検証し, 同様の変化が認められることを確認した(図1 A-C [棒グラフ])。さらに, ELISA法を用いて, タンパクレベルでの卵巣BDNFの発現量変化を検討したところ, human chorionic gonadotropin (hCG) 投与にて発現量が増加し, 7時間でピークに達した(図1 D)。

BDNFおよびTrkB受容体の卵巣内局在

卵巣におけるBDNF, TrkB, p75 NTRの局在を調べるため, 排卵前卵胞から単離した卵, 壁側顆粒膜細胞, 卵丘細胞を用いてnested RT-PCRを行った(図2 A)。BDNF mRNAは壁側顆粒膜細胞および卵丘細胞に発現しており, TrkB mRNAは卵のみに発現が認められた。p75 NTR mRNAはすべての細胞に発現していた。さらに, 免疫染色を用いてタンパクレベルでの発現を検討したところ, 図2 Bに示すように, hCG投与後7時間の卵巣において, BDNFのシグナルは排卵前卵胞の壁側顆粒膜細胞および卵丘細胞に強く認められ, 弱いシグナルが

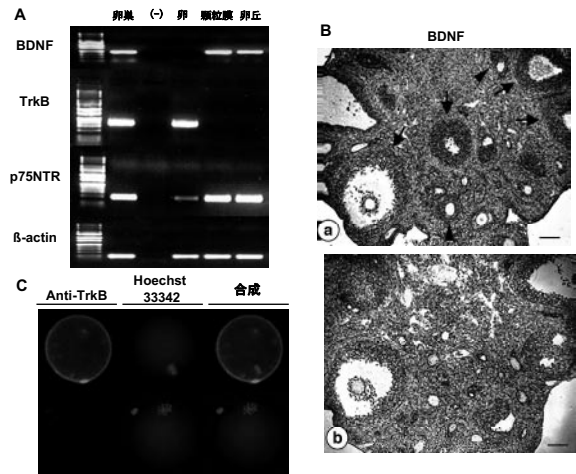


図2 BDNF, TrkB, p75 NTRの卵巣内局在。(A) BDNF, TrkB, p75 NTR mRNAの発現。排卵前卵胞より卵, 壁側顆粒膜細胞(顆粒膜, 卵丘細胞(卵丘))を単離しnested RT-PCRを行った。陽性コントロール: 卵巣, 内因性コントロール: β -actin (B) BDNFタンパクの卵巣内局在。hCG投与後, 7時間の卵巣を用いて免疫染色を行った。BDNFのシグナルは排卵前卵胞の壁側顆粒膜細胞および卵丘細胞に強く認められ(矢印), 前卵胞では壁側顆粒膜細胞が弱く染色される(矢頭)。上: BDNF染色, 下: 陰性コントロール(Scale bars, 40 μ m) (C) TrkBタンパクのMI期卵での発現。上段: TrkB染色, 下段: 陰性コントロール(文献8より一部改変)

前卵胞の壁側顆粒膜細胞に認められた。また, TrkBはMI期の卵に発現が認められた(図2 C)。

BDNFによる卵の核成熟誘導

BDNFは卵巣顆粒膜細胞においてhCG刺激により発現が増加し, その受容体であるTrkBが卵に局在していることから, BDNFはパラクリン因子として卵の機能を調節している可能性が示唆された。そこで, BDNFの卵の核成熟への影響を調べるため, 排卵前卵胞培養試験を行い, GVBDへの作用について検討した(図3 A)。6時間の培養にてLHはGVBDを誘導したが, BDNFは高濃度でも効果を示さなかった。

次に, BDNFの卵における第一極体放出への作用を排卵前卵胞より取り出した卵-卵丘細胞複合体を培養することで検討した(図3 B, C)。図3 Bに示すように, BDNFは濃度依存性に卵の第一極体放出を促進した。しかし, 他のneurotrophinファミリーである, nerve growth factor (NGF) およびneurotrophin-3 (NT-3) による第一極体放出は認められなかった。また, このBDNFによる作用は, TrkBの細胞外ドメインとの共培養によって抑制された(図3 C)。TrkBの細胞外ドメイン単独による培養は卵の第一極体放出に影響を及ぼさなかった(図3 C)。さらに, Trkキナーゼの抑制剤であ

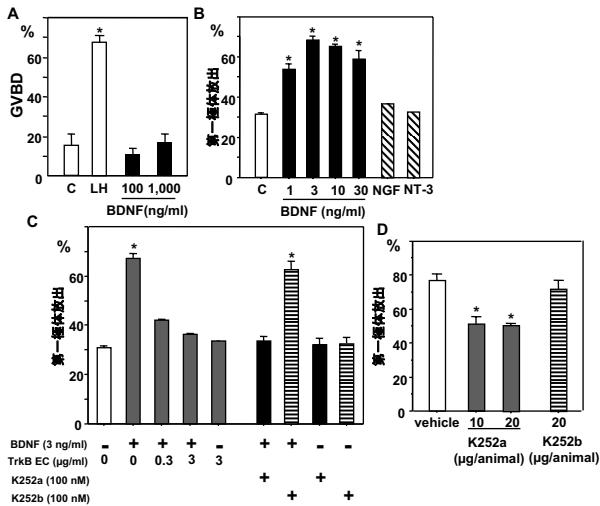


図3 BDNFによる卵の核成熟促進。(A) BDNFのGVBD促進作用の欠如。排卵前卵胞を培養液のみ (control, C), LH (5 µg/ml), BDNFで6時間培養後, 卵のGVBDを判定した。(n=3, 39-68 oocytes per experiment) (B) *in vitro*におけるBDNFの第一極体放出への作用。排卵前卵胞より採取した卵-卵丘細胞複合体を培養液のみ (control, C), BDNF, NGF (10 ng/ml), NT-3 (10 ng/ml)で20時間培養後, 卵の第一極体の放出を判定した。(n=3, 30-148 oocytes per experiment) (C) BDNFの第一極体放出促進作用の特異性。卵-卵丘細胞複合体をBDNFの存在, 非存在下でTrkBの細胞外ドメイン (TrkB EC), Trkキナーゼ抑制剤 (K252a), K252bと培養した。(n=3, 11-82 oocytes per experiment) (D) *in vivo*におけるTrkキナーゼ抑制剤の第一極体放出への作用。PMSG投与したマウスにhCGのみ, hCG+K252a, hCG+K252bを腹腔内投与し, 12時間後に排卵された卵の第一極体の放出を判定した。(n=4)*, P < 0.05 vs. control or vehicle group. (文献8より一部改変)

るK252aを用いて, BDNFの作用の特異性に関して検討したところ, K252aはBDNFによる卵の第一極体放出を抑制したが, K252aの細胞膜非透過型であるK252bでは抑制効果は認められなかった (図3C)。

DNA microarrayの解析結果から, BDNF以外の neurotrophins (NGF, NT-3, NT-4/5) は排卵前期に増加しなかったため, Trkキナーゼ抑制剤のK252a投与により*in vivo*におけるBDNFの卵機能への役割について検討した。K252aおよびK252b投与は排卵数には影響を及ぼさなかったが (vehicle, 40.2 ± 7.5; K252a-treated, 37.8 ± 5.3; K252b-treated, 38.4 ± 8.7), K252aは排卵された卵の第一極体の放出を有意に抑制した (図3D; P < 0.05)。K252b投与は卵の第一極体の放出に影響を与えなかった (図3D)。排卵された卵はほぼすべてGVBDをおこしており, 卵は拡張した卵丘細胞に覆われていた (cumulus expansion)。

BDNFによる卵の細胞質成熟誘導

BDNFのoocyte conditioningへの役割に関して, 卵の

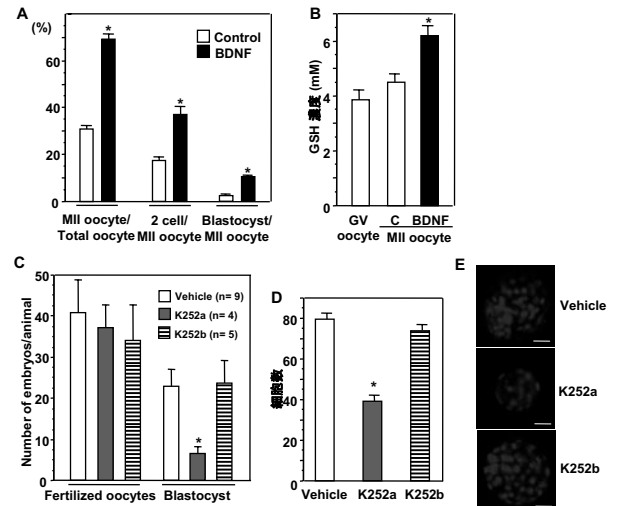


図4 BDNFによる卵の細胞質成熟促進。(A) *in vitro*におけるBDNFのoocyte conditioningへの作用。排卵前卵胞より採取した卵-卵丘細胞複合体を培養液のみ (control), BDNF (3 ng/ml)で16時間培養後, 卵の第一極体の放出を判定した。MII期卵のみを受精させ, 5日間培養し, 2細胞期胚および胚盤胞期胚への到達率を評価した。(n=5, 34-95 oocytes per experiment) (B) BDNFの卵内glutathione (GSH)濃度への影響。卵-卵丘細胞複合体を培養液のみ (control), BDNFで16時間培養後, MII期卵内GSH濃度を測定した。(mean ± SEM, n=6) (C) *in vivo*におけるTrkキナーゼ抑制剤のoocyte conditioningへの作用。PMSG処理をおこなったマウスにhCG, hCG+K252a, hCG+K252b (10 µg, injections at 0, 4, and 8 h after hCG)を投与し, 交配させた。受精卵を卵管より採取し, 5日間培養後, 胚盤胞への到達を評価した。(D) *in vivo*におけるTrkキナーゼ抑制剤の胚盤胞細胞数への影響。(E) Hoechst 33342染色の胚盤胞像 (Scale bars, 20 µm)*, P < 0.05 vs. control or vehicle group. (文献8より一部改変)

受精能と胚発生能について*in vitro*で検討した。PMSG 48時間処理によって得られた排卵前卵胞から卵-卵丘細胞複合体を採取し, BDNFの存在・非存在下で16時間培養した。その際, 透明帯の硬化を防ぐため, 5%のFBSを添加した。FBS (-)のとき (図3B)と同程度に, BDNFは第一極体の放出を促進した (図4A, MII-stage oocytes)。得られたMII期卵を*in vitro*で受精させたところ, BDNF前処理群では2細胞期胚, 胚盤胞期胚への発生率が, それぞれ約2倍, 5倍に増加した (図4A)。

卵内 glutathione (GSH) 濃度は精子核のdecondensationに重要であり, 細胞質成熟の指標の一つとなる [9]。そこで, 卵内GSH濃度を測定したところ, germinal vesicle (GV) 期卵では低く, BDNF非存在下で培養したMII期卵も低値を示した (図4B)。しかし, BDNF前処理を行ったMII期卵では卵内GSH濃度は有意に上昇した (図4B; P < 0.05)。

Trkキナーゼ抑制剤を用いて, *in vivo*におけるBDNFのoocyte conditioningへの作用について検討した。

PMSG処理を行ったマウスに、hCGおよびhCG+K252a投与を行い、交配させた。hCG投与後22時間で、マウス卵管より受精卵を採取し、体外培養を行った。受精卵の胚盤胞への発生は、コントロール群 (vehicle) およびK252b投与群に比較し、K252a投与群では有意に減少した (図4C; $P < 0.05$)。K252a投与群から得られた胚盤胞は他の群より小さいものが多く (図4E)、その細胞数を比較したところ、K252a投与群の胚盤胞の細胞数は他の群の約1/2に減少していた (図4D)。

結 論

本研究ではDNA microarrayを用いてLH/hCG刺激により卵巣における産生が急増する分子を手がかりに、卵巣由来の卵成熟因子を検索した。得られた候補のうち、BDNFがパラクライン因子として卵に作用し、核成熟のうちの第一極体の放出と最適な受精・胚発育に必要な oocyte conditioningを誘導することを明らかにした [8]。

Neurotrophinファミリーは卵巣機能に深く関与していることが明らかにされつつある。既知のneurotrophinファミリーのうち、NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5とその受容体 (TrkA, TrkB, TrkC, p75 NTR) が卵胞に発現している [10]。TrkBまたはBDNFとNT-4/5のノックアウトマウスの卵胞は一次卵胞で発育が停止する [6, 7]。さらに、Trkキナーゼ抑制剤のK252a、あるいはBDNFとNT-4/5の中和抗体の投与により、primordial follicleの発育が阻害される [7]。しかし、BDNFおよびTrkBの排卵前卵胞における役割は不明であった。

これまで、BDNFの他にepidermal growth factor (EGF) が第一極体の放出の促進 [11, 12] と胚盤胞の細胞数増加 [13] に関与することが報告されてきた。われわれのDNA microarrayによる検索の結果、BDNF以外にも卵成熟因子の候補となる分子がいくつか見い出されており、これらの分子の卵成熟への役割を明らかにしていくことで、総合的な卵成熟機構が解明され、今後の臨床応用へつながっていくと期待している。

引用文献

1. Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M (2004) EGF-like growth factors as mediators of LH action in the

- ovulatory follicle. *Science* 303, 682-684.
2. Kawamura K, Kumagai J, Sudo S, Chun SY, Pisarska M, Morita H, Toppari J, Fu P, Wade JD, Bathgate RA, Hsueh AJ (2004) Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 7323-7328.
3. Barbacid M (1994) The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol.* 25, 1386-1403.
4. Jones KR, Farinas I, Backus C, Reichardt LF (1994) Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell* 76, 989-999.
5. Ip NY, Stitt TN, Tapley P, Klein R, Glass DJ, Fandl J, Greene LA, Barbacid M, Yancopoulos GD (1993) Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the Trk receptors in neuronal and nonneuronal cells. *Neuron* 10, 137-149.
6. Paredes A, Romero C, Dissen GA, DeChiara TM, Reichardt L, Cornea A, Ojeda SR, Xu B (2004) TrkB receptors are required for follicular growth and oocyte survival in the mammalian ovary. *Dev Biol.* 267, 430-449.
7. Spears N, Molinek MD, Robinson LL, Fulton N, Cameron H, Shimoda K, Telfer EE, Anderson RA, Price DJ (2003) The role of neurotrophin receptors in female germ-cell survival in mouse and human. *Development* 130, 5481-5491.
8. Kawamura K, Kawamura N, Mulders SM, Sollewijn Gelpke MD, Hsueh AJ (2005) Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 9206-9211.
9. Perreault SD, Barbee RR, Slott VL (1998) Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol* 125, 181-186.
10. Ojeda SR, Romero C, Tapia V, Dissen GA (2000) Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. *Mol Cell Endocrinol* 163, 67-71.
11. Sakaguchi M, Dominko T, Yamauchi N, Leibfried-Rutledge ML, Nagai T, First NL (2002) Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. *Reproduction* 123, 135-142.
12. Das K, Stout LE, Hensleigh HC, Tagatz GE, Phipps WR, Leung BS (1991) Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fertil Steril* 55, 1000-1004.
13. De La Fuente R, O'Brien MJ, Eppig JJ (1999) Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. *Hum Reprod* 14, 3060-3068.