

卵巣の機能調節における低酸素環境の生理的意義

西村 亮^{1,2)}, 奥田 潔¹⁾

1) 岡山大学大学院環境生命科学研究科生殖生理学教室

2) 現所属：鳥取大学農学部共同獣医学科獣医繁殖学教室

はじめに

1995年にWangとSemenzaにより低酸素誘導性転写因子(hypoxia-inducible factor: HIF)が見い出されて以来[1], 低酸素環境(hypoxia)における細胞の応答に注目が集まり, これに関する研究報告が年を追うごとに増加している。しかし, 生殖科学の分野において, 黄体内の低酸素環境に関する研究を進めている研究グループは世界においても数えるほどしかない。われわれは, 低酸素環境と黄体機能の関係について, 培養系を用いて検討を重ねてきた。その結果, 低酸素環境は黄体の形成時においては血管新生を促進し, 黄体の退行時においてはプロジェステロン(P4)分泌を衰退させ, アポトーシスを誘導するという新しい知見を得た。本稿では, これらの知見を見い出すに至った一連の研究, および卵巣機能と低酸素環境の関係に関する近年の報告について紹介する。

低酸素誘導性転写因子(hypoxia-inducible factor: HIF)

HIFは α subunitと β subunit (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: ARNT) からなる2量体の転写因子であり, α subunitにはHIF1 α , 2 α および3 α が存在し, それぞれが β subunit (ARNT: HIF1 β)と結合してHIF1, HIF2およびHIF3として機能する。HIFが低酸素環境において活性を高めるシステムは α subunitのタンパク質代謝機構によっている[2, 3]。HIF1の場合, HIF1 α タンパクは通常の酸素環境(normoxia)においては分解されるが, hypoxiaにおいては分解されずにHIF1 β と結合し, 転写因子HIF1として機能する[4, 5]。HIF1 α を含む α subunitは, 酸素依存性分解ドメイン

(oxygen-dependent degradation domain: ODD)を有しており[6], これがnormoxiaではユビキチン-タンパクリガーゼ複合体(von Hippel-Lindau: pVHL)により認識されることで[7-11], α subunitがproteasome系において分解される[5, 6, 12]。一方, hypoxiaではpVHLがHIF1 α のODDを認識できず, 結果としてHIF1 α タンパクが蓄積し, HIF1 β との結合が可能となる[13, 14]。当初, HIF1は赤血球増殖因子(erythropoietin: EPO)の発現を増加させる因子としてWangとSemenzaにより見い出された[1]。その後, 既に低酸素環境で誘導されることのでかっていた血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)の転写をHIF1が強く刺激することが報告され[15], 「hypoxia-HIF1-VEGF-血管新生」というシステムの存在が明らかとなった。VEGFの他にも, 糖輸送(GLUT1)や細胞増殖(insulin-like growth factor [IGF] 2, IGF-binding proteins 1, 2 and 3)など, HIF1により転写制御される遺伝子が数多く見い出されている[2]。また, アポトーシスに関する因子としてはBCL2 and adenovirus E1B-nineteen kilodalton interacting protein-3 (BNIP3)がHIF1による制御を受ける可能性が示されている[16]。アポトーシスは黄体生理のなかでも, 特に黄体退行において黄体組織の構造的消失に必須の現象であり, われわれは先の報告のなかでウシ黄体細胞においてもhypoxiaにおいてHIF1 α タンパクが増加し[17], さらにBNIP3発現の増加することを示している[18]。

卵胞発育・排卵と低酸素環境

卵胞液中の酸素濃度はウシ[19], ブタ[20]およびヒト[21]において示されており, 卵胞の直径が大きいほど酸素濃度が低くなる点は種を超えて共通し, ヒトでは卵胞の成熟に伴い卵胞液中酸素濃度が低下するという報告もある[22]。これら卵胞液中酸素濃度に関しては1970年代から報告されているが, 卵胞発育にVEGFの関与することは1992年Ravindranathらによって初めて明らかにされた[23]。さらに, 卵胞発育におけるHIF

連絡先：奥田 潔, 岡山大学大学院環境生命科学研究科生殖生理学教室
〒700-8530 岡山市北区津島中1-1-1
TEL: 086-251-8333
FAX: 086-251-8349
E-mail: kokuda@cc.okayama-u.ac.jp

の関与が示されたのは最近のことであり、ブタ[20, 24] および霊長類 [25] において示されている。Basini らがブタにおいて示したのが世界で最も早く、以下のような仮説を示唆している [20]。卵胞が発育しその大きさを増すにつれ、卵胞液中の酸素濃度が減少し、これにより HIF1 α が蓄積する。この HIF1 α が ARNT (HIF1 β) と結合して転写因子 HIF1として機能し、VEGF の転写を促進することにより卵胞周囲の血管新生が促されるという仮説である。また、卵胞は排卵後直ちに黄体へと機能と構造を変化させていく。この変化は血管新生を伴うことから [26–29]、黄体の形成においても同様の HIF1と VEGF を介したシステムが機能している可能性が高い。これについては次項において、われわれの成果を交えながら解説する。

黄体形成と低酸素環境

黄体の形成において、血管新生の起こることは1990年代前半に示されており [26]、2000年までに総説としても報告されている [27–29]。一方、今日では強力な血管新生因子として知られる VEGF は1989年、Ferrara と Henzel により見い出され [30]、その後、黄体形成時の血管新生に VEGF の関与することがウシ [31] およびヒト [32] において示されてきた。さらに、1995年の HIF1 の発見 [1] に続いて、HIF1が VEGF の強力な転写促進因子であることが示された [15]。以上の報告に加え、排卵直後の黄体組織が低酸素環境であることは、その血管系が未熟であることから容易に想像できた。そこでわれわれは黄体の形成において、低酸素環境に起因する HIF1, VEGF を介した血管新生の機能することを推察し、これを証明すべく研究計画を立案、実施した。黄体形成における低酸素環境の役割に関する報告としては、2002年に培養ウシ黄体由来血管内皮細胞において mRNA レベルにおける HIF1 α 発現が VEGF 発現とともに示されている [33]。しかしこの報告では、血管内皮細胞を低酸素環境において培養しても HIF1 α mRNA, VEGF mRNA とともに通常の培養気相における発現との違いが認められていない。一方、ブタにおいては黄体組織中の HIF1 α mRNA 発現が黄体初期において高いことが示され、初めて HIF1が黄体形成に関与することが示唆された [24]。しかし、以上の報告は HIF1発現の mRNA レベルにおける報告であった。HIF1 α はタンパクに翻訳された後、酸素濃度に依存したタンパク質分解によって蓄積量が調節され、組織中の酸素濃度が高い場合に急速に分解される [5]。そのため、HIF1が黄体形成に関与

するかについてはタンパクレベルでの解析が必須と考えられた。最近、Duncan らは霊長類の黄体において HIF1 α タンパク発現が初期に高いことを免疫組織学的に示した [25]。われわれの報告でも同様にウシの黄体組織において初期および形成期に HIF1 α タンパク発現の高いことが Western blot により証明された [34]。同報告ではさらに形成期の黄体細胞を低酸素環境において培養することにより HIF1 α タンパク、VEGF mRNA、さらに VEGF タンパクの増加することが示され、ウシの黄体形成に低酸素環境およびそれによって誘導される血管新生の関与することを示唆した。

黄体退行と低酸素環境

卵巣動脈における血流量の周期的な変化に関する知見は1970年代から存在し、ウシおよびヒツジにおいては、電磁的血流計のプローブを卵巣動脈に装着する手法で調べられてきた [35–37]。これらの報告では、一様に、卵巣動脈の血流量が黄体退行期において血中 P4濃度の減少と同調して減少することが示されている。黄体より分泌される P4の血中濃度における減少は、黄体の機能的な退行を意味しており、血流量の減少と黄体退行に何らかの関係があることが示唆されてきた。この関係を裏付けるものとして、Sawyer ら [38] は黄体退行を誘導するために PGF2 α を投与したヒツジにおいて、黄体内の小型血管の血管内皮細胞が血管腔内に脱落することを示している。そして、この現象が卵巣動脈血流の減少と関係し、さらに黄体内の低酸素環境を導くことを示唆している [38]。しかし、この報告を踏まえても、血流量の減少からどういった機構を介して黄体退行が誘導されるかについては、不明な点が多く残されていた。そこでわれわれは、卵巣動脈における血流量の減少は黄体へ供給される酸素量の減少につながると考え、酸素濃度の減少が黄体退行に関与するという仮説の下、黄体細胞の培養系を用いて解明を試みた。ウシの中期黄体細胞を低酸素環境において培養すると、通常の培養環境 (20%O₂) と比較して P4産生が著しく低下した [17]。さらに、この P4産生の低下は、コレステロールの側鎖を開裂し P4の前駆体であるプレグネノロンへと転換する酵素 P450_{sc}c (cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme: CYP11A1) の発現および酵素活性が低酸素環境において低下したためであることが明らかとなった [17]。また、低酸素環境において培養したウシ黄体細胞では、アポトーシスの誘導される割合も増加することが見い出された [18]。アポトーシスは黄体の構造的退行における主徴で

あり [39], 低酸素環境が黄体の機能的退行のみならず構造的退行にも関与することがこの報告により示された。同報告では, アポトーシス誘導機構において機能するシステインプロテアーゼ caspase-3の発現および活性が低酸素環境において増加すること, また, アポトーシス調節因子 Bcl-2 family のアポトーシス促進タンパク BNIP3の発現も低酸素環境において増加することを見出し, これらが低酸素環境において誘導される黄体細胞のアポトーシスに関与することも示した [18]。これら近年の成果からわれわれは, 黄体退行機構において, 血流の減少に起因する黄体内の低酸素環境が, 他の黄体退行誘導機構とともに, 黄体の機能的な退行および構造的な退行に関与すると考えている。

Hypoxia 研究における注意点

われわれは, 本総説のテーマを研究し始める際に, 研究室に初めて低酸素環境に関する実験系を導入した。そして, 研究を進めるなかで hypoxia 研究独特の問題に遭遇し, それらを解決したうえで上述のような成果を得ることができた。問題点のなかで最も印象的なものは, mRNA やタンパク発現に用いられる内部標準に関する問題である。一般的な内部標準としては, アクチン, GAPDH, 18S rRNA などよく知られており [40], われわれも hypoxia 研究を始めるまでは GAPDH を内部標準として頻繁に用いていた。しかし, GAPDH は hypoxia 研究においては内部標準として活用できない。すでに総説においても示されている通り [2], GAPDH は HIF1 の制御する遺伝子の 1 つであり, 低酸素環境においてその発現が増加する。われわれの用いたウシ黄体細胞においても認められている (図 1)。内部標準がその実験系において適切かどうかを調べることは実験系確立の基本であるが, hypoxia 研究が現在もまだ新しい段階にあることから, 内部標準を定める際には最新の文献を調べ, 内部標準として選択した遺伝子またはタンパクが HIF などの制御因子に含まれないかどうか必ず確認すべきである。内部標準の選択の他にも, hypoxia 研究においては低酸素環境を証明する必要がある。培養系において細胞が本当に低酸素環境にさらされていたかを何らかの形で示さなければならない。これには低酸素環境で増加する遺伝子やタンパクが用いられるが, 最も確実な方法の 1 つは HIF1 α の発現増加を mRNA ではなくタンパク質レベルで示すことである。これは, 現在進められている多くの hypoxia 研究が Wang と Semenza による HIF1 の発見 [1] に基づいており, HIF1 のサブユニットで

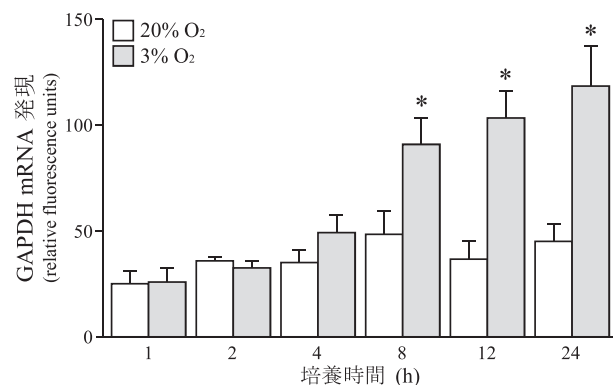


図 1 通常の培養気相 (20% O₂) および低酸素環境 (3% O₂) において培養したウシ中期黄体細胞における GAPDH mRNA 発現。ウシ中期黄体細胞を 20% O₂ もしくは 3% O₂ において 1~24 時間培養した後, 定量的 RT-PCR により GAPDH mRNA 発現を調べた。8 時間以上の培養において, 低酸素環境において培養した細胞では通常の培養気相の細胞と比較して GAPDH mRNA 発現が有意に高い (* 各培養時間において通常の培養気相と比較して有意に発現が高い [P < 0.01; Student's *t*-test])。

ある HIF1 α が低酸素環境においてタンパクレベルで蓄積するからである。このように hypoxia 研究においては特有の注意点が挙げられ, 新しい研究分野であるだけに今後も新たな注意点が出現しうる。低酸素シグナルは既知の赤血球増産, 血管新生やアポトーシスに限らず多岐に広がり, これまでの基本を覆す要素を多く含んでいる。今後も hypoxia 研究を進める際にはより綿密な最新情報の調査が必要である。

おわりに

HIF の発見により, 生体の低酸素応答に関する研究は癌の形成機構や生殖生理をはじめ, 多岐にわたる分野で進められている。HIF の発現はさまざまな組織, 細胞において認められており, 多くの組織において細胞が低酸素環境に対する応答機能を備えていると考えられる。低酸素応答はあるときは組織障害における組織の再構築に寄与し, あるときは生理的な組織変化において機能する。近年のわれわれの研究では, 卵巣の特に黄体における生理的な低酸素応答がどのように機能するかについて追求してきた。興味深いことに, 黄体において, 低酸素環境は黄体の形成と退行, 言い換えれば組織の生と死の両方に関与することが明らかとなった。黄体の形成においては, 黄体を構築する血管新生を促し [34], 退行においては P4 分泌の低下およびアポトーシスの誘導に低酸素環境が関与していた [17, 18] (図 2: 卵巣機能と低酸素環境の関係図)。組織, 細胞において低酸素応答がスタートした後, 生と死の分かれ目がどのようにして決定

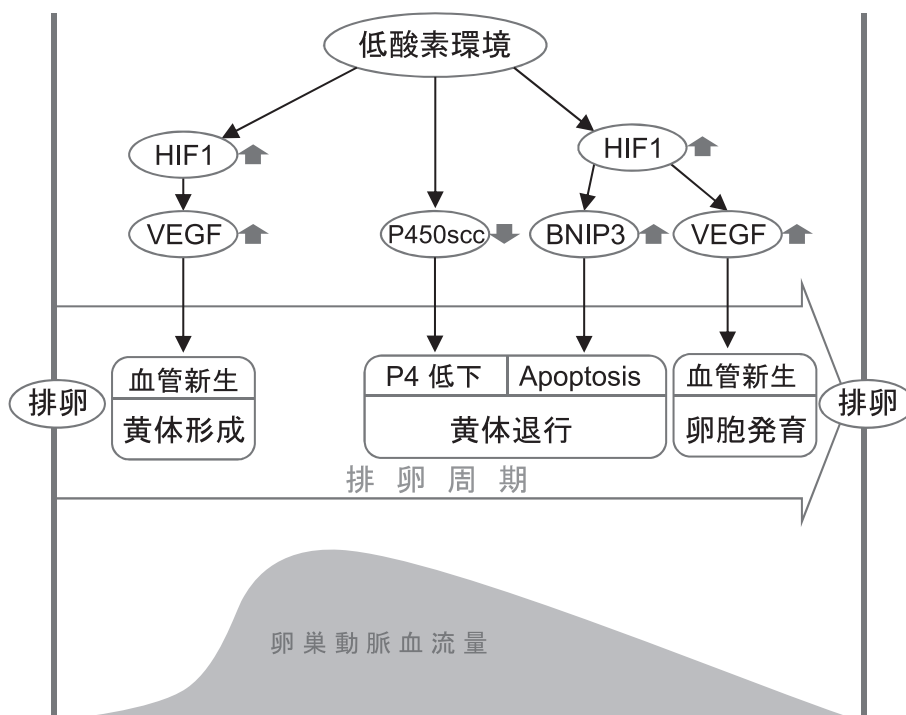


図2 卵巣機能と低酸素環境の関係図

卵巣内において組織構造や血流の変化に伴って形成される低酸素環境はさまざまなシグナルを介して黄体形成，黄体退行，卵胞発育などの現象に関与する。

されるのかは完全には明らかにされていない。一説には、酸素濃度が1つの分かれ目とされており、基本的に低酸素環境であれば血管新生などの「生」の応答がなされ、anoxia（無酸素環境）に近づくにつれてアポトーシスなどの「死」の応答が増強されると考えられている [41]。また最近では、通常の酸素濃度においても HIF1 α の発現調節機構の存在が示されており、ヒトの顆粒層細胞ではヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）が通常酸素濃度下において HIF1 α 発現を増加させることが明らかにされている [42]。このような卵巣機能を調節するホルモンによる HIF 発現調節機構と既知の低酸素環境によるシグナルの関係、さらにこれらに加えてホルモンの周期性を合わせて解析することにより、卵巣機能における低酸素シグナルの役割がより明確にできると考えられる。

謝 辞

本研究は、日本学術振興会(科学研究費補助金基盤研究B：24380155) および農林水産省(委託プロジェクト研究「ゲノム情報を活用した家畜の革新的な育種・繁殖・疾病予防技術の開発」；REP1002) の援助を受けました。

引用文献

1. Wang GL, Semenza GL (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem 270, 1230-1237.
2. Wenger RH (2002) Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. FASEB J 16, 1151-1162.
3. Bruick RK (2003) Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. Genes Dev 17, 2614-2623.
4. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH (1996) Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. Am J Physiol 271, C1172-1180.
5. Salceda S, Caro J (1997) Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. J Biol Chem 272, 22642-22647.
6. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. Proc Natl Acad Sci USA 95, 7987-7992.
7. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.

- Nature 399, 271-275.
8. Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG (2000) Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* 2, 423-427.
9. Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L (2000) Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J* 19, 4298-4309.
10. Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH (2000) Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 275, 25733-25741.
11. Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, Conaway JW (2000) Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 10430-10435.
12. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L (1999) Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 274, 6519-6525.
13. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr (2001) HIF1alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science* 292, 464-468.
14. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim AV, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Targeting of HIF-1alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.
15. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16, 4604-4613.
16. Bruick RK (2000) Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 9082-9087.
17. Nishimura R, Sakumoto R, Tatsukawa Y, Acosta TJ, Okuda K (2006) Oxygen concentration is an important factor for modulating progesterone synthesis in bovine corpus luteum. *Endocrinology* 147, 4273-4280.
18. Nishimura R, Komiya J, Tasaki Y, Acosta TJ, Okuda K (2008) Hypoxia promotes luteal cell death in bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 78, 529-536.
19. de Castro E, Paula LA, Andrzejewski J, Julian D, Spicer LJ, Hansen PJ (2008) Oxygen and steroid concentrations in pre-ovulatory follicles of lactating dairy cows exposed to acute heat stress. *Theriogenology* 69, 805-813.
20. Basini G, Bianco F, Grasselli F, Tirelli M, Bussolati S, Tamanini C (2004) The effects of reduced oxygen tension on swine granulosa cell. *Regul Pept* 120, 69-75.
21. Redding GP, Bronlund JE, Hart AL (2008) Theoretical investigation into the dissolved oxygen levels in follicular fluid of the developing human follicle using mathematical modeling. *Reprod Fertil Dev* 20, 408-417.
22. Fischer B, Künzel W, Kleinstein J, Gips H (1992) Oxygen tension in follicular fluid falls with follicle maturation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 43, 39-43.
23. Ravindranath N, Little-Ihrig L, Phillips HS, Ferrara N, Zeleznik AJ (1992) Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology* 131, 254-260.
24. Boonyaparakob U, Gadsby JE, Hedgpeth V, Routh PA, Almond GW (2005) Expression and localization of hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA in the porcine ovary. *Can J Vet Res* 69, 215-222.
25. Duncan WC, van den Driesche S, Fraser HM (2008) Inhibition of vascular endothelial growth factor in the primate ovary up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha in the follicle and corpus luteum. *Endocrinology* 149, 3313-3320.
26. Reynolds LP, Killilea SD, Redmer DA (1992) Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB J* 6, 886-892.
27. Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Killilea SD, Redmer DA (1994) Mitogenic factors of corpora lutea. *Prog Growth Factor Res* 5, 159-175.
28. Redmer DA, Reynolds LP (1996) Angiogenesis in the ovary. *Rev Reprod* 1, 182-192.
29. Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Redmer DA (2000) Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine* 12, 1-9.
30. Ferrara N, Henzel WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161, 851-858.
31. Grazul-Bilska AT, Redmer DA, Killilea SD, Zheng J, Reynolds LP (1993) Initial characterization of endothelial mitogens produced by bovine corpora lutea from the estrous cycle. *Biochem Cell Biol* 71, 270-277.
32. Kamat BR, Brown LF, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF (1995) Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *Am J Pathol* 146, 157-165.
33. Tschentschursuren G, Aust G, Nieber K, Schilling N, Spanel-Borowski K (2002) Microvascular endothelial cells differ in basal and hypoxia-regulated expression of angiogenic factors and their receptors. *Microvasc Res* 63, 243-251.
34. Nishimura R, Okuda K (2010) Hypoxia is important for establishing vascularization during corpus luteum formation in cattle. *J Reprod Dev* 56, 110-116.
35. Niswender GD, Reimers TJ, Diekmann MA, Nett TM (1976) Blood flow: a mediator of ovarian function. *Biol Reprod* 14, 64-81.
36. Nett TM, McClellan MC, Niswender GD (1976) Effects of prostaglandins on the ovine corpus luteum: blood flow, secretion of progesterone and morphology. *Biol Reprod* 15, 66-78.
37. Wise TH, Caton D, Thatcher WW, Barron DH, Fields MJ (1982) Ovarian function during the estrous cycle of the cow: ovarian blood flow and progesterone release rate. *J Anim Sci* 55, 627-637.
38. Sawyer HR, Niswender KD, Braden TD, Niswender GD (1990) Nuclear changes in ovine luteal cells in response to

- PGF2 α . Domest Anim Endocrinol 7, 229-237.
39. Juengel JL, Garverick HA, Johnson AL, Youngquist RS, Smith MF (1993) Apoptosis during luteal regression in cattle. Endocrinology 132, 249-254.
 40. de Leeuw WJ, Slagboom PE, Vijg J(1989)Quantitative comparison of mRNA levels in mammalian tissues: 28S ribosomal RNA level as an accurate internal control. Nucleic Acids Res 17, 10137-10138.
 41. Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C (2002) Is HIF-1 α a pro- or an anti-apoptotic protein? Biochem Pharmacol 64, 889-892.
 42. van den Driesche S, Myers M, Gay E, Thong KJ, Duncan WC (2008) HCG up-regulates hypoxia inducible factor-1 α in luteinized granulosa cells: implications for the hormonal regulation of vascular endothelial growth factor A in the human corpus luteum. Mol Hum Reprod 14, 455-464.