

卵胞直径の拡大で可能となる顆粒膜細胞のレチノイン酸合成が LH 受容体発現を誘導

川合 智子¹⁾, Hoque SAM¹⁾, JoAnne S. Richards²⁾, 島田 昌之¹⁾

1) 広島大学大学院統合生命科学研究科

2) Department of Molecular&Cellular Biology, Baylor College of Medicine

はじめに

卵分泌因子の作用で顆粒膜細胞は細胞分裂を開始し、卵の周りに顆粒膜細胞が層状に構成された二次卵胞が形成される。二次卵胞では、顆粒膜細胞に FSH 受容体が発現し、FSH の作用を受けることでミトコンドリアが活性化される。ミトコンドリア活性に依存して、顆粒膜細胞ではエネルギー ATP が合成され、顆粒膜細胞はさらに増殖していく¹⁾。この間に卵胞直径も拡大し、卵胞内では卵胞腔が形成され、顆粒膜細胞は卵を覆う卵丘細胞と卵胞膜を裏打ちする顆粒膜細胞に分化する。両者の違いは、顆粒膜細胞でのみ LH 受容体 (*Lhcgr*) が高発現することで、この発現が排卵を可能にする。

排卵前卵胞への発育には、卵胞直径の拡大とエストロゲン (E2) 合成が重要と知られている。それに加えてわれわれは、FSH により血中のビタミン A から顆粒膜細胞で合成されるレチノイン酸 (RA) が LH 受容体の発現に機能する新たな因子であることを明らかにした。卵胞発育期に RA 合成系を阻害させても E2 合成に異常は認められなかったことから、RA が誘起する何らかの仕組みが *Lhcgr* 発現の制御に重要と考えられた。本稿では、なぜ、卵胞直径の拡大が顆粒膜細胞における *Lhcgr* 発現に重要なのか？そのメカニズムを解明するために、顆粒膜細胞の増殖過程におこる RA 合成機構と顆粒膜細胞の分化機構に着目して取り組んだ研究を紹介する。

RA の新規合成が顆粒膜細胞の機能変化に果たす役割

排卵前卵胞へと発育する過程では、FSH により E2 が合成され、FSH との相乗作用で顆粒膜細胞の増殖や *Lhcgr* 発現を促進すると考えられている。しかし、どのような仕組みにより十分発達した卵胞の顆粒膜細胞での

み *Lhcgr* 発現が誘導されるのか、これを制御する因子や分子機構は解明されていない。

われわれは、DNA マイクロアレイを用いた経時的な網羅解析から、排卵前卵胞の顆粒膜細胞で発現が有意に上昇する遺伝子群に着目し、ADH/ALDH family 遺伝子群を同定した。これらの遺伝子群は、連動して機能することで食物から摂取されるビタミン A (レチノール) を RA へ変換する。血中のビタミン A 濃度が低い、もしくは、高い症例では卵胞発育異常を呈する割合が高いことから、FSH によって合成された RA は正常な排卵前卵胞形成に重要な役割を担っていると考えた。

卵胞発育過程のマウス卵巣において、RA の合成と分解に関わる遺伝子群の経時的な発現解析を行った結果、eCG 刺激により排卵前卵胞の顆粒膜細胞では RA 合成酵素の発現が有意に上昇するが、RA 分解酵素の発現は有意に低下することが示された。RA 合成酵素阻害剤 (4MP) を eCG や hCG を投与する時にマウスへ同時投与し、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、卵巣形態と卵胞発育期のマーカー遺伝子への影響を調べた結果、卵巣形態に変化は認められなかったが、顆粒膜細胞の *Lhcgr* 発現が有意に低下した。また、4MP と eCG 投与48時間後に hCG を投与した時、排卵期特異的な遺伝子発現も有意に低値を示すことがわかった。これらの表現型は、離乳後からビタミン A 欠乏飼料を給餌したマウスにおいても同様に観察された。すなわち、ビタミン A 欠乏飼料により低ビタミン A 状態のマウスは、発情期の長期化により内因性の排卵刺激では排卵が不十分であるが、これは顆粒膜細胞の *Lhcgr* 発現が有意に抑制されており、その標的遺伝子で排卵に必須な *Areg* や *Ptgs2* の発現が低値であることに起因していた。そのため、過剰排卵処理を行っても排卵数は低いままであり、排卵した成熟卵の数も有意に少なく、成熟卵であっても胚盤胞期胚への発生率が低かった²⁾。以上の結果から、顆粒膜細胞で RA が合成されることも、LH 受容体が高発現する排卵前卵胞形成に必須と考えられた。

連絡先：川合智子，広島大学大学院統合生命科学研究科
〒739-8528 東広島市鏡山1-4-4
TEL：082-424-7899
FAX：082-424-3741
E-mail：tss4@hiroshima-u.ac.jp

3週齢メスマウスの卵巣を用いた体外培養試験において、RA単独処理は*Lhcgr*発現を誘導できなかったのに対し、FSHとtestosterone (T)を添加した培養液へのレチノール添加は、その濃度依存的に*Lhcgr*発現が誘導された。さらに、RA合成酵素の抑制剤添加は濃度依存的にその発現を抑制した。レチノールを高濃度で添加すると、この*Lhcgr*発現の上昇効果が抑制されたことから、RAの機能には作用濃度も重要と示唆された²⁾。

卵丘細胞と顆粒膜細胞におけるRA合成機構の違い

卵丘細胞では、排卵前卵胞においてもLH受容体が高発現しないことから、卵胞発育期の顆粒膜細胞と卵丘細胞におけるRA合成・分解酵素の発現、複数コピーのRA応答配列が組み込まれ、その下流にLacZをレポーター遺伝子として繋いだトランスジェニックマウスを用いたRA活性測定の比較解析を行った。eCG投与により、卵丘細胞ではRA合成酵素の上昇割合が顆粒膜細胞と比較して低く、また、顆粒膜細胞で検出されたRA分解酵素の有意な低下が認められず、その結果、LacZ活性が変化しないことがわかった。つまり、eCG刺激を受けた各卵胞内細胞では、RAの合成機構が異なっており、それが*Lhcgr*発現の違いを生み出している可能性が示唆された。

卵丘細胞と顆粒膜細胞は、卵からの距離が異なる。卵と顆粒膜細胞を共培養すると、*Lhcgr*の高発現が抑制されるとの報告から、われわれは、卵分泌因子の濃度低下が*Lhcgr*発現を含む排卵刺激への応答獲得に重要と仮説を立て、顆粒膜細胞と卵の共培養実験と卵丘細胞・卵複合体(COC)にSMAD阻害剤を添加する実験を行い、卵がRA合成機構と*Lhcgr*発現に与える影響を調べた。

顆粒膜細胞を卵と共培養した時、RA合成酵素の発現が有意に低下し、RA分解酵素の発現が有意に上昇する結果、RA活性が有意に抑制された。また、FSH+Tにより誘導された*Lhcgr*発現は、共培養した卵の数依存的に減少した。一方、COCの体外培養系にSMAD抑制剤を添加すると、RA分解酵素の発現に変化は認められなかったが、RA合成酵素の発現は有意に上昇し、RA活性も有意に上昇することが明らかになった³⁾。これらの結果から、顆粒膜細胞の増殖は卵胞直径を拡大させ、それにより卵分泌因子の濃度が低下することが、LH受容体発現をはじめとする顆粒膜細胞の機能変化を制御していると考えられた。

RA合成機構の違いと卵胞直径の拡大がLH受容体発現を誘導する仕組み

卵によるRA合成機構の違いが、どのように顆粒膜細胞の機能変化、とくに*Lhcgr*発現の制御機構に影響しているのかを明らかにするため、*Lhcgr*プロモーター領域を調べた。*Lhcgr*は、FSHにより誘起される転写因子SP1とSF1が制御すると報告されている。また、FSHによりcAMP合成に伴って活性化するPKAが、上述の転写因子を介して*Lhcgr*の転写活性と遺伝子発現を10倍以上上昇させることも報告されている。しかし、*Lhcgr*のプロモーター活性試験において、FSHにより直ちにプロモーター活性が上昇するのに対して、実際に遺伝子発現が誘導されるまでには36時間以上という長時間を要する。これらのことから、これら転写因子以外の時間軸を制御する因子の働きが必要と示唆された。

RAは核内でRA受容体に結合し、プロモーター領域のRA応答配列を介して転写因子として直接的に、もしくは、RA受容体を介して他の転写因子や転写開始複合体と相互作用することで間接的に遺伝子発現を制御する。*Lhcgr*プロモーター領域において、転写因子SP1は、CとGの配列に富むCpGアイランドと呼ばれるDNA領域に結合する。CpGアイランドはDNAメチル化の標的となるため、メチル化されるとSP1が結合できなくなる結果、遺伝子発現が抑制される。*Lhcgr*発現が低いJAR細胞株ではこの領域が高メチル化されていること、*Lhcgr*発現が高いMCF7細胞ではこの領域のメチル化割合が低いことから、CpGアイランドのDNA脱メチル化が*Lhcgr*の発現時間に影響を与えていると推察した。

そこで、RAが*Lhcgr*発現を制御するメカニズムを解明するため、各卵胞ステージの顆粒膜細胞からDNAを回収し、*Lhcgr*プロモーター領域におけるシトシンのメチル化をバイサルファイトシークエンス法で解析した。初期胞状卵胞から回収した顆粒膜細胞では、CpGアイランドのシトシンが50%以上メチル化されていたが、排卵前卵胞では約20%にまで低下した。体外培養系においてもFSHによるメチル化割合の低下が検出され、この脱メチル化は、卵と共培養することで有意に抑制されたが、RAを添加すると有意に回復することもわかった。一方、COCの卵丘細胞では、排卵前卵胞においても*Lhcgr*プロモーター領域のメチル化割合は高いまま維持されていたが、SMAD抑制剤もしくはRAで処理した時、プロモーター領域の脱メチル化と*Lhcgr*発現が有意に上昇した³⁾。RAで処理したCOCの卵丘細胞では、黄体関連遺伝子の発現も有意に上昇しており、顆粒膜細胞様に変化

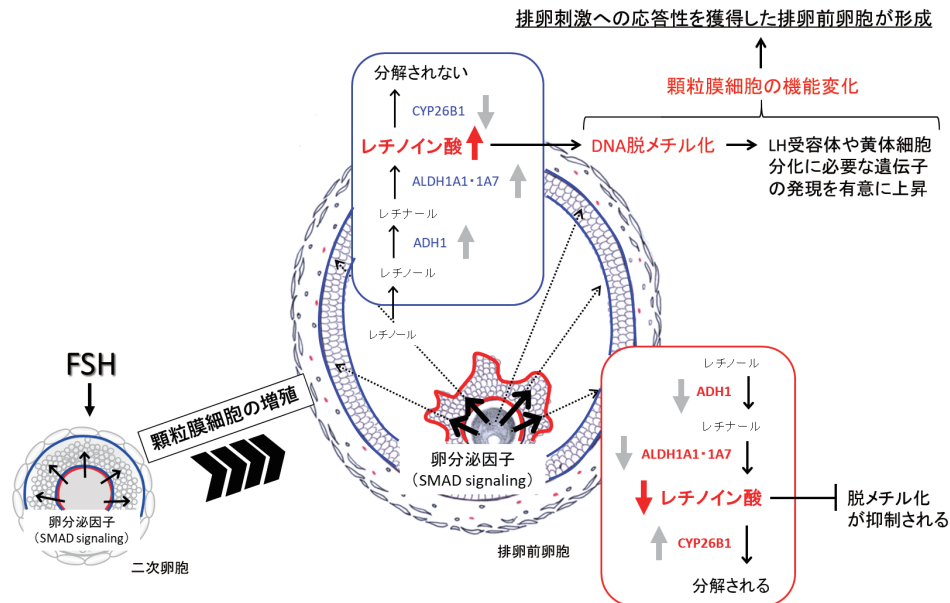


図1 卵胞直径の拡大で可能となる顆粒膜細胞のレチノイン酸合成がLH受容体発現を誘導する分子メカニズム

している可能性が考えられた。以上のことから、卵胞発育期における卵胞直径の拡大は、卵によるRA合成機構の差異を生み出し、それが顆粒膜細胞のDNAメチル化を引き起こすこと、この仕組みがLH受容体が発現する排卵前卵胞の形成に重要(図1)であることが明らかになった。

まとめ

ARTの卵巣刺激法では、卵胞直径が排卵刺激をスタートする基準とされている。しかし、トランスクリプトーム解析から、PCOS病態の顆粒膜細胞ではRA合成やSMADシグナル伝達経路に関与する遺伝子の発現異常が報告されている。また、卵胞発育期の初期段階で*Lhcgr*が高発現した時、顆粒膜細胞の早期黄体化が起こり、排卵異常を呈するとの報告もある。さらに、年齢が高くなると卵の質が低下し、卵分泌因子も減少する。そのため、若い女性の卵巣刺激法と比較して卵胞発育がうまくいかない理由の1つに、卵によるRA合成機構の差異が制御

する顆粒膜細胞の脱メチル化異常が関係している可能性が考えられた。本研究から、ARTの卵巣刺激法における卵の影響を考慮した卵胞直径の基準は、質の高い成熟卵を得るために重要と示唆され、現在は、卵胞発育期の顆粒膜細胞で起こる脱メチル化の詳細な制御メカニズムを解明する研究に取り組んでいる。

引用文献

1. Hoque SAM, Kawai T, Zhu Z, Shimada M (2018) Mitochondrial Protein Turnover Is Critical for Granulosa Cell Proliferation and Differentiation in Antral Follicles. *J Endocr Soc*, 3 : 324-339.
2. Kawai T, Yanaka N, Richards JS, Shimada M (2016) De Novo-Synthesized Retinoic Acid in Ovarian Antral Follicles Enhances FSH-Mediated Ovarian Follicular Cell Differentiation and Female Fertility. *Endocrinology*, 157 : 2160-2172.
3. Kawai T, Richards JS, Shimada M (2018) The Cell Type-Specific Expression of *Lhcgr* in Mouse Ovarian Cells: Evidence for a DNA-Demethylation-Dependent Mechanism. *Endocrinology*, 159 : 2062-2074.