

博士論文要約 (Summary)

平成 27 年 4 月入学

連合農学研究科 生物生産科学専攻

氏 名 渡辺 連

タイトル	<p>哺乳類新生仔期の卵巣におけるオートファジーの生理的役割とそれを利用した原始卵胞数の上方制御法の開発 (Physiological roles of autophagy in mammalian neonatal ovaries and a new approach to up-regulation of primordial follicles number)</p>
<p>序論</p> <p>近年、日本の繁養牛において、乳量が多いとされる3~4産目の受胎可能な雌牛が2割以下に低下していることが知られている。一方ヒトの女性では、20代後半で約80%あった1年間妊娠率が30代後半を境に45%未満まで急激に低下することが知られている。雌の生殖機能の向上と生殖寿命の延長のための技術開発は、産業動物の効率的な生産や希少動物遺伝資源の保全、ヒト高度生殖補助医療の現場において重要な課題とされている。</p> <p>哺乳類雌の潜在的な生殖機能は、卵巣内原始卵胞プールのサイズに左右され、それらは胎仔期から新生仔期にかけて確立される。この原始卵胞数を上方制御することで、生殖機能を向上できる可能性が考えられる。しかしながら、周産期前後の仔にみられる原始卵胞形成機構の詳細は十分には理解されていない。</p> <p>最近、この原始卵胞形成へのオートファジー機構の関与が報告されている。オートファジーはタンパク質やオルガネラなどの細胞質成分を分解・再利用するための進化的に保存された主要な細胞内異化機構であり、細胞の生存に働く。一方、過剰なオートファジーの活性化によりアポトーシスを誘導する細胞死機構でもある。この機構は、主に栄養飢餓によってプロテインキナーゼ mTOR の阻害を介して誘導され、過剰なアミノ酸の存在によって抑制される。オートファジーに必須な遺伝子である <i>Atg7</i> や <i>Becn1</i> の欠損は、新生仔マウス卵巣内原始卵胞の過剰損失を引き起こすことが報告されている。</p> <p>一方、我々は細胞内外のアミノ酸の交換輸送によって抗酸化物質グルタチオンの維持に働くシスチン・グルタミン酸トランスポーター遺伝子が欠損(xCTKO)している2ヶ月齢および13~15ヶ月齢の雌マウスで、同月齢の野生型に比べ残存原始卵胞数や排卵数が維持されることを報告している。その卵では mTOR mRNA 発現が低いことから、オートファジーが活性化していることが予測された。これらの知見から、我々は原始卵胞形成期におけるオートファジーの誘導が原始卵胞数を増加させると仮定した。</p> <p>目的</p> <p>本研究では、オートファジーを誘導した新生仔マウスや新生仔期の xCTKO マウスを用い、卵巣内原始卵胞数の解析やオートファジー関連タンパク質の動態を解析することで、原始卵胞形成期におけるオートファジーの役割を解明し、さらにオートファジー特異的誘導剤あるいは、xCT 阻害剤の投与を用いてそれらを制御することによって原始卵胞数を上方に制御することを目的とした。</p> <p>第1章 飢餓誘導した新生仔マウスにおける卵巣内オートファジー機構の解明と原始卵胞数の評価</p>	

新生仔 C57BL 系雌マウス(対照区)と、その同腹仔雌の一部を生後 36 h まで授乳を制限したマウス(授乳制限区)から生後 12~108 時間(h)で卵巣を回収した。得られた卵巣を用いて、連続切片による原始卵胞および一次卵胞数の評価、組織蛍光免疫染色あるいはウエスタンブロット解析によるオートファジー関連タンパク質の発現解析を行った。

対照区の原始卵胞数は生後 60 h で約 6,000 個まで増加した後減少した。また 60 h 以降から一次卵胞が多数確認された。これらから 60 h までを原始卵胞形成期とし、この期間に授乳制限や薬剤の投与を行った。授乳制限区の原始卵胞数は、12、36 h で対照区に比べ有意に高く、24 h でも高い傾向がみられた。また、一次卵胞数は 36 h において、授乳制限区と対照区に有意な差はみられなかった。これらの結果は、飢餓が原始卵胞形成を促進する、あるいは卵母細胞の退行を抑制している可能性を示唆していた。

新生仔マウス卵巣内におけるオートファジーの動態と局在を確認するために、免疫染色により新生仔卵巣内のオートファジー関連タンパク質の発現局在を調べた。本研究では、オートファジーの指標として一般的によく用いられている、LC3B、LAMP-1、p62 を利用した。LC3B は、拡張する隔離膜に安定かつ特異的に結合するタンパク質であり、隔離膜の拡張の際に LC3-I は LC3-II にプロセシングされる。ゆえに、免疫染色による輝点や、ウエスタンブロットによる LC3-II と LC3-I の発現量比を用いることで、オートファジー活性を推定することができる。リソソームは、オートファゴソームと結合し、内在の加水分解酵素でオートファゴソームの内容物の分解に働く。リソソームの膜は、リソソーム関連膜タンパク質(LAMPs)と呼ばれる特定の膜タンパク質に富んでいる。リソソームや LAMPs 発現の増加は、オートファジーの特徴であるため、オートファジーの指標と考えられている。p62 は、LC3 への直接的な結合を介してオートファゴソームに選択的に取り込まれ、オートファジーによって効率的に分解される。一般的に、p62 の総細胞内発現レベルはオートファジーと逆相関するとされているため、オートファジーの動態をモニターするために使用されている。また、オートファジーが細胞の生存あるいは細胞死のどちらに機能しているのかを推測するために、アポトーシスマーカーとして Caspase-3 と Caspase-9 を用いた。

オートファジーマーカー LC3B は、原始卵胞の卵細胞質中に強く検出された。LC3-II/LC3-I 発現量比でオートファジーを定量したところ、授乳制限区では 36 h で対照区に比べ有意に高くなった。LAMP-1 は、出生後の時間に伴って増加する傾向があり、飢餓区では、対照区よりも 24 h および 36 h で高い傾向がみられた。p62 の発現レベルは、対照区では、24 h から 36 h にかけて発現量が高まった。一方、飢餓区では 36 h で低下し、同時間の対照区と比較して有意に減少した。アポトーシス誘導因子の Caspase-9 は授乳制限区で低くなる傾向がみられた。Caspase-3 は、すべての実験区で検出されなかった。また活性型である Cleaved-Caspase-3 も、すべての実験区で検出されなかった。

本章では、出生直後の授乳制限による飢餓は、卵巣へのオートファジーの誘導を伴いながら、卵母細胞から原始卵胞への分化または形成を促進し得ることを明らかにした。これらから、第 2 章および第 3 章では、原始卵胞の上方制御が一時的なものか、そしてこの上方制御がオートファジーの誘導に特異的なものであるのかを、原始卵胞数のピークでの原始卵胞形成やオートファジー機構の動態ならびに性成熟以降の生殖機能を解析することで検証した。

第 2 章 シスチン・グルタミン酸トランスポーター遺伝子欠損新生仔マウスにおける卵巣内オートファジー機構および原始卵胞数の評価

xCTKO マウスが WT に比べて高い原始卵胞数を示すことから、本章では、新生仔の原始卵胞形成期からそれらが維持されているのかを確認した。さらに WT マウスの新生仔期

に xCT 阻害剤を投与することで、xCTKO マウスと同様の結果が得られるかについても検証した。生後 6、30、54 h の新生仔 xCTKO 雌マウス、または生後 6、30、54 h の WT 雌マウスに xCT 阻害剤 Sulfasalazine(0.09 mg/g)を腹腔内投与したもの (SSZ 区)と、同腹仔の生理食塩水投与マウス(対照区)から、生後 36、60、84 h で卵巣を回収した。得られた卵巣を用いて、連続切片による原始卵胞および一次卵胞数の評価、ウエスタンブロッティング解析によるオートファジー関連タンパク質の発現解析を行った。

xCTKO の平均原始卵胞数は、全ての時間においても、WT に比べ高い傾向がみられた。一方、xCTKO の平均一次卵胞数は、60 h において同時間の WT に比べ有意に低く、他の時間でも低い傾向がみられた。

LC3II/I 比は、xCTKO では同時間の WT に比べ、36 h と 60 h では有意に高く、84 h では高い傾向がみられた。p62 は、36 h と 84 h の xCTKO では、同時間の WT に比べて低い傾向がみられた。Caspase-9 は、xCTKO では、60 h で WT に比べ低い傾向がみられた。これらのことから、xCTKO 新生仔期卵巣では、オートファジーは WT に比べ定常的に高い傾向にあり、それはアポトーシスの誘導には作用しておらず、細胞の生存に働いていると考えられた。これらの結果から、飢餓処理に比べると有意ではないものの、xCT 欠損により原始卵胞形成は促進される傾向があり、またオートファジー活性も WT に比べ、定常的に高く維持されていることが明らかとなった。60 h において一次卵胞数が有意に低下していたことから、xCTKO でみられる原始卵胞数の増加は、特に一次卵胞への移行を抑制することにより、原始卵胞数を高めているものと考えられた。

一方、xCT の特異的阻害剤 SSZ を新生仔 WT マウスに投与すると、生後 60 h における SSZ 区の原始卵胞数は対照区に比べ増加する傾向がみられた。また一次卵胞数は、SSZ 区で減少する傾向がみられた。

以上、本章では、飢餓とは異なる経路でのオートファジー誘導により原始卵胞形成のピークにおける原始卵胞数やオートファジー機構の解析を試みた。xCTKO マウスでは、原始卵胞形成の促進ならびに一次卵胞への移行が抑制され、備蓄卵胞数が高く維持されていることが明らかとなった。また xCT 阻害による備蓄卵胞数の上方制御の可能性が示された。

第 3 章 原始卵胞形成期でのオートファジー誘導剤投与による原始卵胞数上方制御および生殖能の検証

本章では、オートファジー特異的誘導剤の投与により、原始卵胞形成の促進へのオートファジー機構の直接的関与を検証し、生体レベルでの原始卵胞数の上方制御法を検討した。生後 6、30、54 h でオートファジー誘導剤 Tat-beclin1 D-11 peptide(0.02 mg/g)を腹腔内投与した雌マウス(Tat-bec.1 区)と、同腹仔の非投与マウス(対照区)から、生後 36、60、84 h で卵巣を回収した。得られた卵巣を用いて、連続切片による原始卵胞および一次卵胞数の評価、ウエスタンブロッティング解析によるオートファジー関連タンパク質の発現解析を行った。また投与後 2 ヶ月齢での各発育ステージの卵巣内卵胞数の解析、2 および 6 ヶ月齢で生殖能を評価した。

Tat-bec.1 区では、すべての時間で、対照区に比べ原始卵胞数を高めた。特に原始卵胞数のピークの 60 h では顕著に高くなった。一方、Tat-bec.1 区の一次卵胞数は、有意ではないものの 60、84 h で、対照区に比べ低い傾向がみられた。

Tat-bec.1 区は、全ての時間で LC3-II/LC3-I 比が有意に高くなった。また、p62 は Tat-bec.1 区では、時間経過に伴い低下し、60、84 h では、同時間の対照区に比べ低い傾向がみられた。一方、Caspase-9 の発現は、対照区では各時間で同等に維持されたが、Tat-bec.1 区は、時間が進むにつれて低下する傾向がみられ、対照区に比べ卵巣全体でのアポトーシスの誘

導が抑制されている可能性が示された。

以上から、原始卵胞形成期の薬剤投与によるオートファジーの誘導によって新生仔期の原始卵胞数が高まることが示された。

さらに原始卵胞数の上方制御は性成熟後の生殖能に影響を与えるのか、増加した原始卵胞数は生殖寿命を通して維持されるのかを2および6ヶ月齢の投与マウスを用いて評価した。妊娠率は、各実験区いずれも、同月齢間で有意な差はみられなかった。また、Tat-bec.1区の産仔数は同月齢の対照区に比べ、2ヶ月齢では有意に高く、6ヶ月齢では高い傾向がみられた。これらの結果は、Tat-beclin1 D-11の投与は、少なくとも6ヶ月齢までの生殖能を対照区に比べて高めることを示している。また、産仔が得られたことから上方制御された原始卵胞は、正常な発生能を持つことが示された。

これらの生殖能の向上を裏付けるために、2ヶ月齢における卵胞数の評価を行った。Tat-bec.1区の原始卵胞数および一次卵胞数は、対照区に比べ、有意に高くなった。特に原始卵胞数では、約1.5倍高くなり、総卵胞数もまた有意に高くなった。これらのことから、上方制御された原始卵胞数は、性成熟後も維持されているものと考えられた。

以上から、出生直後に一定期間、オートファジー誘導剤を投与することで、新生仔期の原始卵胞数が概ね1.2~1.5倍に増加することが明らかとなり、出生後に生体レベルで原始卵胞数を上方制御できることが示された。また、性成熟後も高い原始卵胞数は維持され、個体の生殖能を向上させ、生殖寿命を延長する可能性が示唆された。

総括

本研究から、新生仔マウスへの授乳制限やオートファジー誘導剤の投与による卵巣への積極的なオートファジー誘導を介し、原始卵胞形成が促進されることが明らかとなった。拡大した原始卵胞プールは、性成熟後も維持され、個体生殖能を向上させており、生殖寿命延長に繋がる可能性が示された。加えて新生仔期の薬剤投与による生体レベルの原始卵胞数の上方制御が可能であることを明らかにした。本研究を産業動物に応用展開できれば、雌個体の潜在的生殖機能の向上による繁殖成績の向上や、乳量生産の安定化などにつながる可能性が考えられた。

※注1 博士論文要約はインターネットの利用により公表されるので、記載内容については十分注意してください。

※注2 公表できない「やむを得ない事由」(特許、知的財産等に係る部分)は記載しないでください。

※注3 全体で4頁~5頁程度を目処にしてください。