

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

2017 年度 農学博士 学位論文

岩手大学大学院 連合農学研究科 生物生産科学専攻
動物生産学連合講座 動物生殖学・動物発生工学分野

渡辺 連 (山形大学)

主指導教員 木村 直子 (山形大学)

目 次

	ページ
序論	4
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	12
緒論	13
第 1 節 卵母細胞特異的因子 MVH の組織蛍光免疫染色による原始卵 の検出	15
目的	16
材料および方法	16
結果	18
第 2 節 連続切片を用いた卵巣内原始卵胞数および一次卵胞数の評価	21
目的	22
材料および方法	22
結果	23
第 3 節 蛍光免疫染色による卵巣内オートファジー関連タンパク質 局在の解析	28
目的	29
材料および方法	29
結果	30
第 4 節 ウェスタンブロッティングによる卵巣内オートファジー関連 タンパク質発現量の解析	37
目的	38
材料および方法	38
結果	39
考察	47
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	50
緒論	51
第 1 節 連続切片を用いた卵巣内原始卵胞数および一次卵胞数の評価	53
目的	54
材料および方法	54

結果	55
第2節 ウェスタンブロッティングによる卵巣内オートファジー関連タンパク質発現量の解析	58
目的	59
材料および方法	59
結果	59
第3節 原始卵胞形成期のシスチン・グルタミン酸トランスポーター阻害剤投与による原始卵胞数上方制御の検討	66
目的	67
材料および方法	67
結果	68
考察	72
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	74
緒論	75
第1節 連続切片を用いた卵巣内原始卵胞数および一次卵胞数の評価	77
目的	78
材料および方法	78
結果	79
第2節 ウェスタンブロッティングによる卵巣内オートファジー関連タンパク質発現量の解析	82
目的	83
材料および方法	83
結果	83
第3節 性成熟後の生殖能の評価	90
目的	91
材料および方法	91
結果	92
第4節 連続切片による性成熟後の各発育ステージの卵胞数の評価	96
目的	97
材料および方法	97
結果	98
考察	103
総合考察	105

要約	110
引用文献	113
参考図	128
謝辞	133

序 論

はじめに

近年の日本の繁養牛において、乳量が多いとされる3から4産目の受胎可能な雌牛が2割以下と低いことが知られている[1]。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[2]。それゆえに哺乳類におけ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な遺伝資源の保全、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。

哺乳類雌の生殖機能や生殖寿命は、ホルモン産生などの卵巢機能および卵巢内卵子のクオリティ、子宮機能などの生殖器官に支えられている。それらは、遺伝的要因、個体の加齢、生育環境の差異や環境ストレスなど、多数の要因に影響されうる。生殖機能の向上や維持のために、産業動物では高泌乳牛への濃厚飼料多給の改善や暑熱ストレスへの対策などの飼育環境の改善、ヒトにおいてはホルモン補充療法や加齢卵のクオリティ改善法の開発などの多数のアプローチが試みられている。それらの中でも、特に卵巢機能の維持や向上に焦点を当てたアプローチは、個体の潜在的な生殖能の向上や雄に比べて短い雌の生殖寿命の延長につながるものと考えられる。潜在的な卵巢機能やその機能的寿命を大きく左右するものに、生涯を通じた卵供給源となる卵巢内原始卵胞プールのサイズがあげられる。哺乳動物において、原始卵胞プールは胎仔期および新生仔期卵巢内で確立され、ウシ[3, 4]、ヒツジ[5, 6]、ヒトでは胎仔期に[7]、マウスでは出生直後に原始卵胞形成がおきることが報告されている[8, 9]。出生時に卵巢1個当たり、ウシでは約6万個、マウスでは約1万個、ヒトでは約40万個の原始卵胞が存在する。性成熟後、原始卵胞プールから一部の原始卵胞が選抜され(マウスでは一度に1000個程度)、下垂体からの卵胞刺激ホルモン分泌により、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞、グラーフ卵胞への段階的な発育がおこり、下垂体からの黄体形成ホルモンの分泌により排卵される。この過程で99.9%以上の発育卵胞は排卵に達する前に、卵母細胞を取り囲む顆粒層細胞のアポトーシスにより閉鎖し失われるといわれている[10]。胎仔期-新生仔期に確立された原始卵胞プールは周期的な排卵の繰り返しにより消費され、原始卵胞は徐々に枯渇する。これらの変化が、加齢した雌の生殖能の著しい低下につながるものと考えられている[11]。

これらのことから、原始卵胞の形成数を高めそれを維持することができれば卵巢機能を向上できる可能性が考えられる。しかしながら、原始卵胞の形成およびそれらを維持する機構は十分に理解されていない。したがって、本研究は、これらの機構を解明することにより、優良形質雌家畜の卵巢内卵胞の有効利用による効率的生産を念頭に、雌個体の潜在的な生殖機能が決定される原始卵胞形成期での原始卵胞数の上方制御法の開発を目指したものである。

1. 始原生殖細胞から原始卵胞への分化過程

マウスでは、胚性 5 日(E5)から E7 では生殖細胞の出現がおこる。始原生殖細胞(Primordial germ cells: PGCs)は、卵巣において生殖細胞のもととなる二倍体細胞である[12-14]。PGCs は、胚外中胚葉に位置する細胞集団上に生じる[12-14]。E7.25 には約 40 個の PGCs が、原始線条に検出される[15]。PGCs は有糸分裂を受け、未分化細胞のより大きな集団に増殖する。E8 から E9 で生殖腺への PGCs の移行がおこる[16-18]。E11.5~13.5 では、PGCs は生殖隆起に達し体細胞と相互作用して移動を停止する PGCs は卵祖細胞に分化する。E14.5 では、卵巣に約 18,000 個の細胞があり、卵祖細胞は減数分裂に入る前に一次卵母細胞に成長し、減数分裂を開始する[21, 22]。この時、いくつかの卵母細胞はアポトーシスにより退行・消失する。卵母細胞の退行・消失は E14.5 から始まり、出生 4 日目(P4)まで続く。卵母細胞の数は E18 では 13,000 個に減少し、P2 では約 8,000 個に減少する[21]。卵母細胞の退行・消失の期間に、卵母細胞は生殖細胞シストと呼ばれるクラスターを形成する。生殖細胞シストは、不完全な細胞質分裂によって形成され、卵胞上皮細胞のような体細胞に囲まれ相互接続された卵祖細胞である[22]。しかしながら、生殖細胞シスト形成に関与する因子およびその機能的役割はほとんど知られていない。

大多数のマウス系統では、胎生期が終了し約 E20 から 21(P0)で生まれる。この時、発達中の卵巣内には、生殖細胞シストが存在する。E20.5 から 22.5 では、プログラムされた生殖細胞シスト崩壊(Cyst break down: CBD)が、原始卵胞形成を伴いながらおきる。生殖細胞シスト形成と同様に、CBD および原始卵胞形成のメカニズムは十分には理解されていない。CBD は、出生後に髄質領域で始まり、げっ歯類では皮質表面領域に向かって拡大する[23-25]。少数の成熟生殖細胞が卵巣の表面に位置し、徐々に成熟した生殖細胞は胎仔卵巣組織の髄質領域に現れる[25]。CBD は胎盤結合の欠如による性ホルモン濃度の変化と関連している[26]。

原始卵胞形成は、CBD を伴いながら開始され、卵胞上皮細胞がシスト内の卵母細胞の間に侵入を開始し、単一の卵母細胞を取り囲み、最終的に原始卵胞を形成する[27]。原始卵胞は形態学的に単一の卵母細胞として識別され、生殖細胞シスト内のものよりもサイズが大きく、扁平な卵胞上皮細胞の単一層によって完全に囲まれている。原始卵胞内の卵母細胞は、生殖細胞シスト内の卵母細胞と比較して、核の大きさに対してより大きい細胞質を有する[28]。初期卵巣発達中に形成された原始卵胞は、性的成熟時に潜在的に受精可能な卵胞プールを構成し、活性化されるまで休止状態に保たれるが、思春期前に活性化されたものは閉鎖する。性成熟後は、卵胞波に組み込まれた原始卵胞の一群が受精可能な

卵となるが、その過程においてもほとんどの卵胞は閉鎖する[29]。

2. 原始卵胞形成に関わるイベントとそれらを制御しうる要素

哺乳類の原始卵胞形成は、有糸分裂による増殖、減数分裂開始、生殖細胞シストの形成、CBD および原始卵胞集合を含む一連の細胞イベントからなる。

2-1. 卵母細胞の減数分裂

マウスでは、生殖細胞の減数分裂は約 E13.5 から始まり、E18.5 で停止するまで細糸期から複糸期に進行する。卵母細胞は原始卵胞形成に必要な網糸期で減数分裂に入り、停止すると思われる。減数分裂進行は、CBD に付随しておこなうだけでなく、CBD を誘発する可能性がある[27]。さらに、原始卵胞形成は減数分裂の進行と密接に関連していることが実証されており、マウス卵母細胞の網糸期での減数分裂停止が、原始卵胞形成に必須と考えられている[30]。

2-2. 生殖細胞シストの形成

生殖細胞シストは、種間で高度に保存されている構造である。シスト数のピークは減数分裂の開始時点であり、マウスでは E14.5 でおこなう。有糸分裂の終わりに、各シストは不完全な細胞質分裂のために細胞間橋を介して連絡されている約 30 個の生殖細胞(卵母細胞)から構成される[12,31-33]。成長中のシストの一部は E17.5 で小さなシストに分解し、他のシストと結合して減数分裂前に凝集したシストを形成する[21, 34-36]。シストの役割は未だ十分に理解されていないが、シストの構造が生殖細胞間の細胞小器官の交換を促進することは明らかである。Lei と Spradling[33]および、Pepling と Spradling ら[38]の結果によると、マウス卵祖細胞は、同一シスト内の姉妹卵祖細胞(保育細胞)から細胞小器官供与を受け、バルビアニ小体の形成を介して卵母細胞に発達するが、保育細胞は死滅する。シスト構造は、高クオリティ卵母細胞の産生に寄与する可能性があり、原始卵胞形成にとって不可欠である[33, 37]。核に近い細胞質領域にあるバルビアニ小体は、多くの種の発生中の卵母細胞にみられる大きく特徴的な細胞小器官である[38, 39]。シスト内のどの生殖細胞がアポトーシスをおこなうか、またはどのような生殖細胞が原始卵胞に形成されるかを予測することは今のところ困難であるが、原始卵胞内の卵母細胞は一般にバルビアニ小体を含んでいる[38]。

2-3. 前顆粒膜細胞のリクルートとその分化

哺乳類の原始卵胞形成過程には、シスト内の生殖細胞と周囲の卵胞上皮細胞の少なくとも 2 つの細胞型が関与する[8]。体細胞および卵母細胞の適正な同調的発達とそれらの相互伝達が、原始卵胞形成および卵母細胞の生存を決定する

ことが知られている[40, 41]。これらの相互伝達は、卵巢体細胞と卵母細胞間だけではなく、体細胞間でもおこる[42, 43]。マウスでは、原始卵胞形成の基準は、複糸期で停止した卵母細胞および FOXL2 タンパク質を発現する十分な卵胞上皮細胞数の 2 つの必要条件が含まれる[44-50]。FOXL2 は、マウスにおける原始卵胞形成までに、早ければ E12.5 から体細胞内に広範に発現し、胎仔卵巢発達の様々な分子イベントに関与している[51, 52]。FOXL2 は、卵胞上皮細胞の分化および卵巢維持の最重要因子の 1 つと考えられており[51-53]、マウスにおいて *Foxl2* の欠損は、顆粒膜細胞分化および卵胞形成の周囲の基底膜の適切な形成に影響を及ぼし原始卵胞形成を損なうことが報告されている[46]。生理学的には、E17.5 で、FOXL2 陽性前顆粒膜細胞のみがシストに侵入し、原始卵胞構造を形成するために生殖細胞を分離する[25]。また、LGR5 陽性卵巢表面上皮は卵胞上皮細胞の主要な供給源であることが示されている[46, 54, 55]。LGR5 陽性細胞は、卵胞形成の開始時から FOXL2 陽性前顆粒膜細胞に分化するために動員される事が確認されている[54-57]。FOXL2 陽性細胞は髄質内に最初に出現し、次にマウスの E16.5 から P4 の間で卵巢の皮質領域で徐々に出現する[27]。Feng ら[57]は、卵巢支持細胞の適切な分化および増殖が原始卵胞プールの確立に必須であることを報告している。特に、リクルートされた体細胞数とリクルートのスピードは、雌の生殖予備能を決定する可能性がある。

2-4. 性ホルモン

新生仔マウス卵巢のエストラジオール、プロジェステロンのステロイドホルモンやフィトエストロゲン[26, 58-60]への *in vivo* および *in vitro* 暴露は、CBD および原始卵胞形成を損なうことが知られている。ステロイドホルモンで処理した新生仔マウス卵巢は、成熟マウス卵巢で多卵性卵胞の発生率が有意に高く、これらの異常な卵胞形成は不十分な CBD に起因することが示唆されている[61]。生理学的条件下では、CBD はエストロジェンおよびプロジェステロンの劇的な減少によって開始される可能性があり、それらは妊娠の母体環境[26, 27, 32]、または胎仔卵巢での合成[62]に由来する。エストロジェンレセプターの阻害は、*in vitro* では原始卵胞様構造の形成を確実にする[63, 64]。

2-5. プログラム細胞死

多くの哺乳動物種において、個々の原始卵胞が集合する前に多数の卵母細胞が CBD とともに死滅する[7, 65-67]。マウスでは、卵母細胞が減数分裂前期に入る時点で生殖細胞数のピークが観察されるが、卵母細胞の閉鎖・消失は、出生時が最も顕著であり、原始卵胞形成がピークを迎える時点と考えられている。マウスではそれぞれのシスト内で約 30 個の生殖細胞が、P4 までに平均約 6.4 個

の卵母細胞として生存することが報告されている[21, 65, 68-70]。卵胞プールは、卵母細胞の生存とアポトーシスの微妙なバランスによって決定される[71, 72]。

プログラム細胞死は、胚発生中の重要な生理学的プロセスである。プログラム細胞死には、タイプ I(アポトーシス)、タイプ II(オートファジー)、およびタイプ III(非リソソーム性小胞分解)[68, 73]がある。 *In vitro* および *in vivo* の知見によると、CBD における卵母細胞の消失は、アポトーシス[65, 74-78]、オートファジー[79-82]、卵巣からの押し出し[80, 81]を含む複数のメカニズムを介しておけると報告されている。そのうちのアポトーシスは、原始卵胞プールの消耗の主な原因として認識され [27, 83-85]、プロアポトーシス(Bax, PUMA, etc.)および抗アポトーシス(Bcl2, Bcl-xL および Mcl1)の 2 つの群からなる調節因子に制御されている[86]。この機構は、生理学的または細胞ストレスのいずれかによって誘発され[68]、マウスの出生直後の急激なエストロジェンの低下は、卵母細胞のアポトーシスへの関与の可能性が示されている[56, 61, 87, 88]。しかしながら、新生仔マウス卵巣では、アポトーシスを検出する TUNEL 陽性の細胞は稀であり、アポトーシスに限らない経路が卵胞数を制御している可能性も示唆されている[65, 75, 81]。Rodrigues ら[81]は、アポトーシスよりもむしろオートファジーが出生後の卵母細胞数の制御に関与していることを示唆しており、オートファジーが卵母細胞の生存性に関わることも報告されている[82, 89]。

2-6. 栄養状態と mTORC1 シグナル経路

栄養状態は、雌の生殖機能に影響していると以前から考えられている。肥満およびカロリー制限(CR)はいずれも、卵胞発育および妊孕能を障害することが知られている[90]。Nelson ら[91]は、CR が、マウスの繁殖能を低下させ、雌では無排卵を引き起こすが、老齢においては原始卵胞数を高く維持し、12.5 ヶ月齢の給餌制限雌の原始卵胞プールは、同月齢の自由摂取マウスと比較して 2 倍であることを報告している。また Li ら[92]による最近の研究では、CR 処置がラットにおいて mTORC1 シグナル伝達の活性化を阻害し、卵胞発育において、特に原始卵胞から一次卵胞への移行を抑制することを示した。一方、高脂肪食餌誘発性肥満は、ラット卵巣で mTORC1 シグナルを活性化し、原始卵胞数の減少と発育卵胞の割合の増加により卵胞消失を促進させることを示している[93]。

Zhang[94]および Tong ら[95]は、雌ラットまたはマウスへの mTORC1 阻害剤ラパマイシンの注射が、CR 処理と同様の結果を示し、原始卵胞の活性化を抑制することで雌生殖寿命を延長できることを報告した。薬物処理による mTORC1 活性化の抑制は、原始卵胞の生存性を改善する可能性がある。これらの研究は、性成熟後の生殖機能への影響に焦点が当てられているが、胎仔期から新生仔期への移行時もまた、胎盤からの栄養供給が立たれ授乳を開始するまでの間に重度

の飢餓に直面するため、新生仔卵巣内の原始卵胞は、CR 処理と同様に mTORC1 の抑制による影響を受ける可能性が考えられる。

4. シスチン・グルタミン酸トランスポーター遺伝子欠損と高い備蓄卵胞数

シスチン・グルタミン酸トランスポーター(xCT)は、シスチンとグルタミン酸の交換輸送により、細胞内グルタチオンレベルを維持している。この xCT 遺伝子の欠損(xCTKO)は、培養細胞にオートファジーを誘導することが示されている[96]。以前の我々の研究で、12 ヶ月齢以上加齢させた xCTKO マウスでは、同月齢の野生型(WT)マウスに比べ排卵数が高く維持される傾向があることを報告している[97]。そこで、その排卵数の維持が卵巣内貯蓄卵胞数の維持に起因していると考え、各発育ステージの卵胞数を計測したところ、xCTKO マウスでは 2 ヶ月齢で WT マウスに比べ原始卵胞数が有意に高く (WT : 378.9 ± 26.0 , xCTKO : 471.7 ± 45.7 , $P < 0.05$)、結果として総卵胞数も高くなる傾向がみられ、これらは 12 ヶ月齢でも高く維持されたていた(Appendix 2)。また、この xCTKO マウスの卵では、mTOR の発現が WT に比べて低いことも明らかとなっている。xCTKO マウスでは、卵や卵巣で mTOR 経路の抑制や、オートファジーの活性化により、原始卵胞の活性化の抑制や生存性の向上により、原始卵胞の消費が生涯を通して抑えられている可能性が考えられた。xCTKO マウスの卵胞数の維持に、これらの経路が関与しているかは明確ではない。

5. オートファジーの欠如による新生仔卵巣内卵胞数の減少

mTORC1 経路による制御を受け、かつ新生仔初期に活発であり、原始卵胞形成に影響を与え得る機構の一つとして細胞内タンパク質分解リサイクル機構のオートファジーが考えられる[81, 82, 98]。新生仔期の多くの臓器系は、複数のプログラム細胞死によって細胞密度と機能が調節される[99]。プログラム細胞死の 1 つであるオートファジーは、損傷した細胞小器官およびタンパク質の分解によって、細胞の恒常性を維持する高度に保存された細胞内プロセスである[100]。オートファジーは、細胞の生存を促進するが、一方で過剰なオートファジーの活性化が続くと、細胞をアポトーシス導くことも知られている[101]。オートファジーは、損傷したミトコンドリアおよび Caspase を分解し、アポトーシスの調節における Caspase プロセシングのための膜を供給する[101]。オートファジーマーカーの 1 つである LAMP1 は、他の発育ステージの卵胞と比較して、原始卵胞内の卵母細胞において高度に検出されることが報告されている[98]。

近年、オートファジー必須遺伝子の *Atg7* および *Becn1* 遺伝子の欠損が、新生仔マウスにおいて卵巣内原始卵胞の過剰な損失をもたらすことが報告されている[82, 89]。このように、オートファジーの欠如は、新生仔期の原始卵胞数を減

少させることが分かっているが、オートファジーがどのように新生仔期の原始卵胞数を制御するのか、その詳細はよく理解されていない。特に、オートファジーの特異的な誘導が原始卵胞形成に及ぼす影響は調査されていない。

本研究の目的

以上の知見から、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。そこで本研究では、新生仔マウスへの飢餓によるオートファジーの誘導や新生仔 **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、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を制御することによって新規原始卵胞数の上方制御法を開発することを目指した。

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

緒 論

胎生後期から新生仔期における原始卵胞形成の制御の詳細は明確ではない。卵祖細胞が減数分裂を開始し、第一減数分裂の複糸期で停止する頃に、生殖細胞シストの崩壊がおき、原始卵胞形成が同時に開始される。シスト崩壊時の大量の卵母細胞死の後に、一部の一次卵母細胞が卵胞上皮細胞に囲まれ、原始卵胞を形成する。マウスでは出生直後に、ウシやヤギ、ヒトなどの比較的大型の哺乳類では胎生期に原始卵胞形成がおこる[8]。

哺乳類の正常な発達のために重要なステージである胎仔期から新生仔期への移行期に、新生仔は胎盤栄養供給の喪失から、授乳を開始し栄養素を補充するまでの間に重度の飢餓に直面する。これまでの研究から、CR などによる飢餓の誘導は、卵胞発育および妊孕能を障害することが知られており、雌の生殖機能に悪影響を及ぼすものと考えられている[90]。一方で Nelson ら[91]は、給餌制限が老化マウスの原始卵胞の数を増加させることを報告している。また、飢餓により抑制される mTORC1 シグナル伝達経路は、原始卵胞から一次卵胞への移行を促進することが示されていることから[93]、飢餓誘導は、mTOR シグナルを介して卵巣内に貯蔵される原始卵胞数を制御し得る可能性が考えられる。

飢餓により制御される機構の一つにオートファジーがある。新生仔期の多くの臓器は、複数のプログラム細胞死のメカニズムによって細胞密度と機能を調節し、産後飢餓に適応している[99]。プログラム細胞死の 1 つであるオートファジーは、栄養飢餓により、真核細胞において進化的に保存された mTOR の阻害を介して、主に誘導され、過剰なアミノ酸の存在によって抑制される。この機構は、タンパク質やオルガネラを分解・再利用するための主要な細胞内異化機構であり、酵母から哺乳動物へと進化的に保存されている[102]。オートファジーは、ストレス適応に働き細胞生存を促進する[101]。オートファジーの間、隔離膜は細胞質と細胞内小器官の一部を囲み、オートファゴソームと呼ばれる二重膜構造を形成する。この時点で、微小管結合タンパク質 1B 軽鎖 3(LC3B)のサイトゾル型(LC3-I)にホスファチジルエタノールアミンが結合され、オートファゴソーム膜上に動員される LC3-ホスファチジルエタノールアミン結合体(LC3-II)が形成される。次いで、オートファゴソームはリソソームと融合してオートリソソームを形成し、その内容物は常在加水分解酵素によって分解される[103]。選択的オートファジーでは、p62(sequestosome 1 としても知られている)は基質として分解される。一方、オートファジーの過度の活性化がおこると、Caspase ファミリーによるアポトーシス誘導などにより細胞死につながる可能性がある。ショウジョウバエ卵巣における卵形成に、オートファジーが必要であることが報告されている[104]。

最近の報告では、哺乳類の原始卵胞形成へのオートファジーの関与が報告されている。オートファジーに不可欠な *Atg7* または *Becn1* 遺伝子の欠損は、新生仔マウス卵巢原始卵胞の過剰な損失をもたらすことが報告されている[82, 89]。さらに、オートファジーおよびアポトーシスの両方に関与するリソソームのマーカーである LAMP-1 は、他ステージの卵胞と比較して原始卵胞の卵母細胞において高度に発現していることが報告されている[98]。これらの知見は、オートファジーが卵母細胞から原始卵胞への移行に関与している可能性を示唆している。

これらの知見に基づいて、「新生仔期のオートファジー誘導が原始卵胞形成を促進する」と仮説を立てた。そこで本章では、オートファジーの主要な誘導系である飢餓状態下にある新生仔マウス卵巢の原始卵胞数およびオートファジー関連タンパク質の発現動態について調べた。

第 1 節

卵母細胞特異的因子 MVH の組織蛍光免疫染色 による原始卵胞の検出

【目的】

出生後の原始卵胞形成の鍵となる時期を明らかにし、原始卵胞数やその形成過程の動態を把握するために、生殖細胞のマーカーである mouse vasa homolog(MVH)抗体を用いた免疫組織化学により卵母細胞を検出した[105]。MVHはDDX4とも呼ばれるDEADタンパクファミリーのメンバーであり、ATP依存性RNAヘリカーゼと推測されている。MVHタンパク質は、マウス卵胞内の卵母細胞に局在しており、特に原始卵胞から二次卵胞の卵母細胞に強く局在し、発育ステージが進むにつれ漸減的に減少し、減数分裂の再開のために働く可能性が示唆されている[106]。

【材料および方法】

供試動物

Charles River Japan から入手した雌雌の C57BL/6 野生型マウスの交配により自家繁殖で得られた新生仔雌マウスを用いた。新生仔マウスは、体重 1.4 ± 0.2 g の生後 6 時間以内までのマウスを実験に用いた。マウスは、明期 12 (6:00-18:00) 時間、暗期 12(18:00-翌 6:00) 時間の明暗サイクル、室温 22 ± 2 °C で飼育した。親マウスは、食餌(マウス・ラット・ハムスター飼育用飼料 MF、オリエンタル酵母工業株式会社)および飲料水を自由摂取とした。

本研究で使用する動物実験に関しては、山形大学実験動物委員会に実験計画書を提出し、審査を受け、すべて承認されている。

新生仔マウスへの授乳制限

同腹仔の新生仔雌マウスは、母親に同居(対照区)、あるいは飢餓を誘発させるために母親と別居させた飢餓区に同数がランダムに振り分けられた。飢餓区には、スポイトで飲料水のみを与え、生後 12、24 および 36 時間で生存していたマウスを実験に使用した。また、体温低下を防ぐため、飢餓区のケージは 30 °C 設定の恒温坂上に置いた。「げっ歯類の胎仔・新生仔の鎮痛・麻酔および安楽死に関する声明」(第 2 版, 2015)[107]をもとに授乳制限のエンドポイントを定めた。

卵巣の回収

少なくとも 2 匹以上の母親由来の同腹仔から、断頭による安楽死後に生後 12、24、36 時間で各区ともに 5 匹以上の個体から卵巣を回収した。実体顕微鏡下で卵巣嚢と卵管ごと卵巣を採取した。1 匹のマウスから得た卵巣のうち、1 つは原始卵胞ならびに一次卵胞数の計測(第 2 節)、もう 1 つは免疫蛍光染色(本節および第 3 節)またはウェスタンブロッティング解析(第 4 節)に使用した。

卵巣組織固定および包埋

摘出した卵巣を 4% PFA/PBS 固定液により 4 °C で一晩固定した。固定後の卵巣は、0.5 ml 用エッペンチューブに 200 μ l ずつ分注したメタノール(和光純薬工業株式会社)で洗浄し、脱水した。メタノールによる脱水過程は、70%、80%、90%、95%、99.5%、100%メタノール(各 1 時間)で行った。脱水後、エッペンチューブに 200 μ l ずつ分注したキシレン(和光純薬工業株式会社)とメタノールを 1:3 および、1:1 に調製したキシレンアルコールで各 1 時間浸漬後、エッペンチューブに 200 μ l ずつ分注したキシレンで 1.5 時間の透徹処理を行った。透徹処理後、個体および識別番号を記入したティッシュ・テック ユニ・カセット(サクラファインテックジャパン株式会社)内に卵巣を移し、パラフィン溶融器で融解したキシレン・パラフィン(ティッシュ・テック パラフィンワックス II 60 ; サクラファインテックジャパン株式会社)1:1 混合液に 1 時間カセットを沈め、その後、融解パラフィン溶液で一晩浸透させた。浸透後、ピンセットで卵巣を型の中心に置き、包埋用パラフィン液を型に流し入れ包埋した。パラフィンが固化した後、型を火で炙りパラフィンプロックを型から取り出した。熱したパレットナイフでパラフィンプロックの接着部分を融かしながら個体識別番号を記入したパラフィン用木製ブロック(アズワン株式会社)に接着させた。さらに医療用メスを用いてパラフィンプロックをトリミングした。

卵巣切片の作製

大型回転式ミクロトーム(RV-240 大和光機工業)を用いて、刃角 8°で厚さ 5 μ m の卵巣切片を作製した。水を張ったスライドガラスに切片をマウントし、37 °C の恒温版上で切片を伸展させた。伸展後 2 日間室温で乾燥させた。

卵巣組織免疫蛍光染色

切片がマウントされたスライドガラスをガラス層に満たしたキシレン(5 分間×3)、100%エタノール(和光純薬工業株式会社; 5 分間×2)、95%エタノール(5 分間×2)、70%エタノール(5 分間×2)、蒸留水(3 分間×2)に順番に浸し、脱パラフィン・再水和処理をした。その後、温めた 10 mM クエン酸ナトリウムバッファー(pH 6.0)を入れた耐熱容器にスライドガラスを浸しラップをかけ、電子レンジ(500 W)で 5 分間マイクロウェーブ処理を用いて賦活化し、その後 30 分間静置した。

スライドガラスの切片をダコペンで囲い、PBS-3%BSA を滴下し洗浄(5 分×3)後、10%ヤギ血清 PBS-3%BSA で 30 分間ブロッキングした後、希釈した一次抗体 Rabbit-anti-DDX4/MVH (1: 500, ab13840)を滴下し、遮光し 4 °C で一晩、モイストチャンバー内でインキュベートした。

翌日、一次抗体液を除去し PBS-3%BSA で洗浄(5 分間×3)後、二次抗体

Anti-rabbit-IgG-FITC (1:400, Invitrogen, A11034)を添加し室温で 60 分間インキュベートした。二次抗体液を除去し PBS-3%BSA で洗浄(5 分間×3)後、PBS-3%BSA で希釈した PI(1:19)を滴下し、室温で 60 分間インキュベートした後、PBS-3%BSA で洗浄(5 分間×3)した。封入剤(エンテランニュー顕微鏡用速乾性封入剤；メルク株式会社)を数滴垂らし、カバーガラス(松波硝子工業株式会社)をかけ封入した。観察まで遮光し、4 °C で保存した。ネガティブコントロールとして、一次抗体での処理を PBS-3%BSA で置き換えたものを用意した。

卵巣切片の観察および画像処理

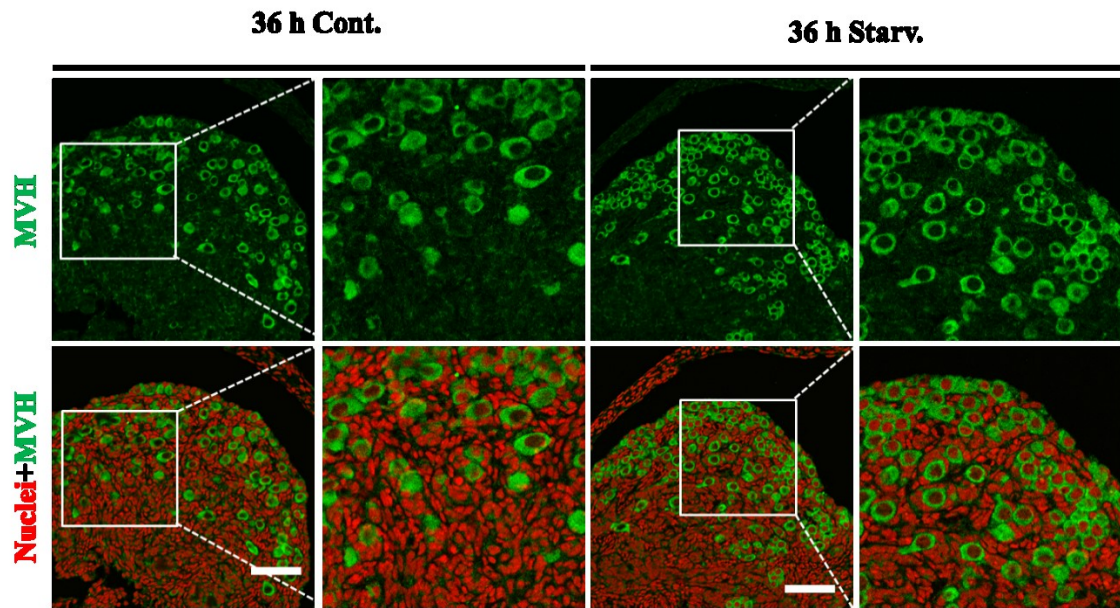
作製したサンプルは、共焦点レーザー顕微鏡(ZEISS LSM700 Laser Scanning Microscope)下で観察した。対物レンズの倍率は 20、40 倍を用い、画像は、LSM Software ZEN 2009 (Carl Zeiss)によって取得し、デジタル画像としてコンピューター内に取り込んだ。撮影時の設定は、ネガティブコントロールのスライドをもとに各倍率ごとにバックグラウンドを設定し、検出を試みた。

【結果】

本実験において、MVH は卵母細胞の細胞質に強く局在していた(Figure 1, A)。そのシグナルは卵巣皮質の縁に沿って頻繁に検出される傾向がみられた。また、卵母細胞質が円形に独立して染色された原始卵胞内の卵母細胞と考えられるものと、原始卵胞の卵母細胞に比べ小さく、卵母細胞質が連なって染色された卵母細胞シスト様のものと両方が認識された。36 時間では他の時間に比べ、シグナルが検出される頻度が高い傾向があった。

飢餓区の平均体重は、対照区に比べ、生後 12, 24, 36 時間の全ての時間で有意に低下した($P<0.05$, Supplementary Figure 1)。飢餓マウスにおいて、12 時間と 36 時間で同時間の対照区に比べ、卵巣皮質側でシグナルが頻繁に観察される傾向がみられた(Figure 1, B)。

(A)



(B)

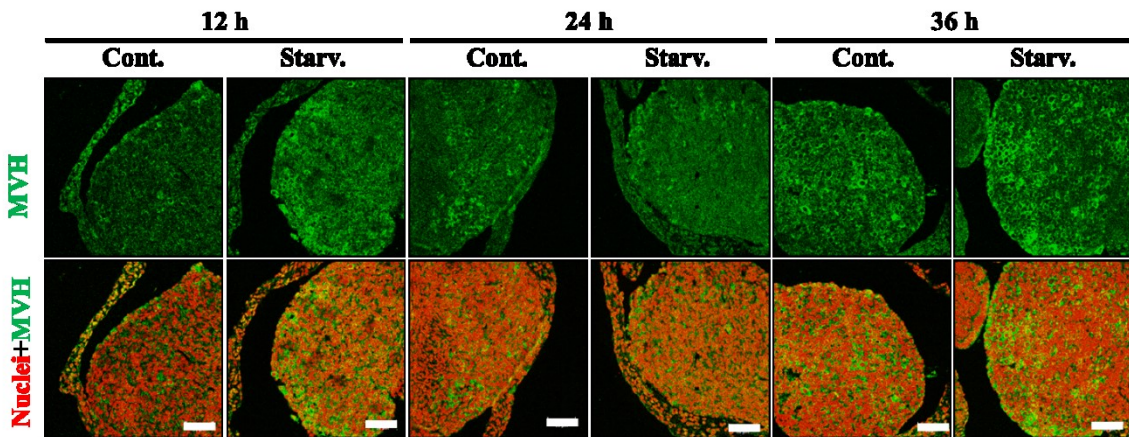
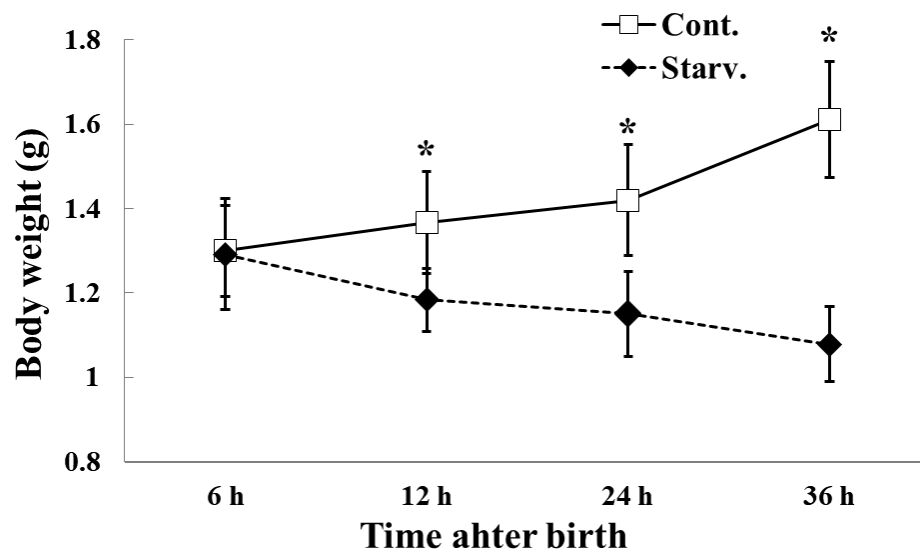


Figure 1. (A) Fluorescent images from immunostaining of the PGCs (primordial germ cells) marker MVH in ovaries from control (Cont.) and starved (Starv.) mice at 36 hours (h) after birth. Scale bars = 50 μm . The images on the right side of each experimental group are the quadruple enlargement of the white frame from images on the left. MVH was strongly localized in the oocyte cytoplasm, and its signals tended to be detected along the rim of the ovary cortex. (B) Fluorescent images from immunostaining of MVH in ovaries from Cont. and Starv. mice at 12, 24, 36h after birth. Scale bars = 50 μm .



Supplementary Figure 1. The mean body weight of control and starved mice at 6-36 h after birth. Each value is expressed as mean \pm SD ($n = 6-25$). Asterisks indicate significant differences between two groups ($P < 0.05$).

第 2 節

連続切片を用いた卵巣内原始卵胞数および 一次卵胞数の評価

【目的】

原始卵胞形成の動態を確認するために、出生後 12, 24, 36, 60, 84, 108 時間の全卵巢連続切片において原始卵胞と一次卵胞を形態観察し計測した(Figure 2)。

得られた結果をもとに、原始卵胞形期での飢餓状態が原始卵胞数ならびに一次卵胞数に与える影響を調べた。

【材料および方法】

供試動物

第 1 章第 1 節【材料および方法】供試動物に示したように使用した。

新生仔マウスへの授乳制限

第 1 章第 1 節【材料および方法】新生仔マウスへの授乳制限に示したように行った。

卵巢の回収

第 1 章第 1 節【材料および方法】卵巢の回収に示したように行った。対照区は、生後 12、24、36、60、84、108 時間で、飢餓区は、生後 12、24、36 時間で卵巢を回収した。

卵巢組織固定および包埋

750 μ l 飽和ピクリン酸、250 μ l ホルムアルデヒド液(和光純薬工業株式会社)、50 μ l 酢酸(和光純薬工業株式会社)を混合したブアン固定液を 200 μ l 分注した PCR 用チューブに卵巢を沈め、室温で 2 時間固定した。その後の工程は、第 1 章第 1 節【材料および方法】卵巢組織固定および包埋に示したように行った。

連続卵巢切片の作製

大型回転式ミクロトーム(RV-240 大和光機工業)を用いて、刃角 8°で厚さ 7 μ m の連続切片を作製した。連続切片は薄片した順番で一列 9~11 枚で水を張ったスライドガラスにマウントし、37 °C の恒温版上で切片を伸展させた。伸展後 2 日間の室温で乾燥させた。

連続切片のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色

連続切片がマウントされたスライドガラスを金属製のバスケットに入れ、バスケットをキシレンの入ったガラス層に 5 分間ずつ 3 回沈め脱パラフィンを行い、95%メタノールのガラス層で 2 分間ずつ 2 回沈めることで再水和した。水洗した後、ティッシュ・テック マイヤー・ヘマトキシリン(サクラファインテック

ジャパン株式会社)で3分間染色し、流水で15分間色出しを行い、再び水洗した後、ティッシュ・テック エオジン(サクラファインテックジャパン株式会社)で1分間染色することでHE染色を行った。95%メタノールで1分間ずつ2回沈め脱水し、キシレンで1分間ずつ3回沈め透徹を行った。乾燥後、封入剤(エンテラニュー顕微鏡用速乾性封入剤; メルク株式会社)を数滴垂らし、カバーガラス(松波硝子工業株式会社)をかけ封入し、乾燥させた。

原始卵胞数の評価

光学顕微鏡(10×20倍)を用いて卵胞数の評価を行った。卵胞は、原始卵胞、一次卵胞に分類した。Pedersen と Peters[108]により確立された基準に基づき、顆粒膜細胞と卵母細胞の形態、顆粒層の厚さをもとに以下のように分類を行った。

- ① 原始卵胞：ほぼ卵母細胞のみ。一層で少数の平たい顆粒膜細胞のみに囲まれている直径 20 μm 以下のもの(Supplementary Figure 2-1, B)。
- ② 一次卵胞：一層の丸い顆粒膜細胞のみに囲まれているもの(Supplementary Figure 2, A, B)。

一つの卵巣あたり全切片で原始卵胞数と一次卵胞数を計測した。重複を避けるために明瞭な卵核が一番大きく見えたものをカウントした。

統計分析

すべてのデータは平均 \pm 標準偏差(SD)として表した。データは、エクセル統計ソフトを用いて Tukey の一元配置分散分析により、同一時間の実験区間で平均値の差を検定した。有意水準 $P<0.05$ で統計的に有意とした。

【結果】

出生後 12, 24, 36, 60, 84, 108 時間の全卵巣連続切片において原始卵胞と一次卵胞を形態観察し計測した(Figure 2)。

対照区の 12 時間での原始卵胞の形成は疎であり($1,086\pm296.3$)、その数は、24 時間($1,943\pm833.2$)および 36 時間($2,473\pm686.0$)と比較して少なかった(Figure 2, A)。しかし、原始卵胞数は 60 時間($6,191\pm1,105.7$)でピークに達し、その後 84 時間($4,058\pm833.0$)で減少し、これらのレベルは 108 時間($3,729\pm1,175.8$)まで維持された。

一方、一次卵胞は 36 時間(30 ± 14.4)からわずかに観察され、60 時間(198 ± 47.9)からは比較的多く観察され、108 時間(266 ± 66.9) からさらに高くなる傾向がみられた(Figure 2, B)。一方で、二次卵胞以降のステージの卵胞は観察されなかった。また、性成熟後の卵巣ではほとんど確認されない、一層の卵胞上皮細胞を保ったまま、卵母細胞が肥大し、核が膨化し細胞死に向かっているように見える卵

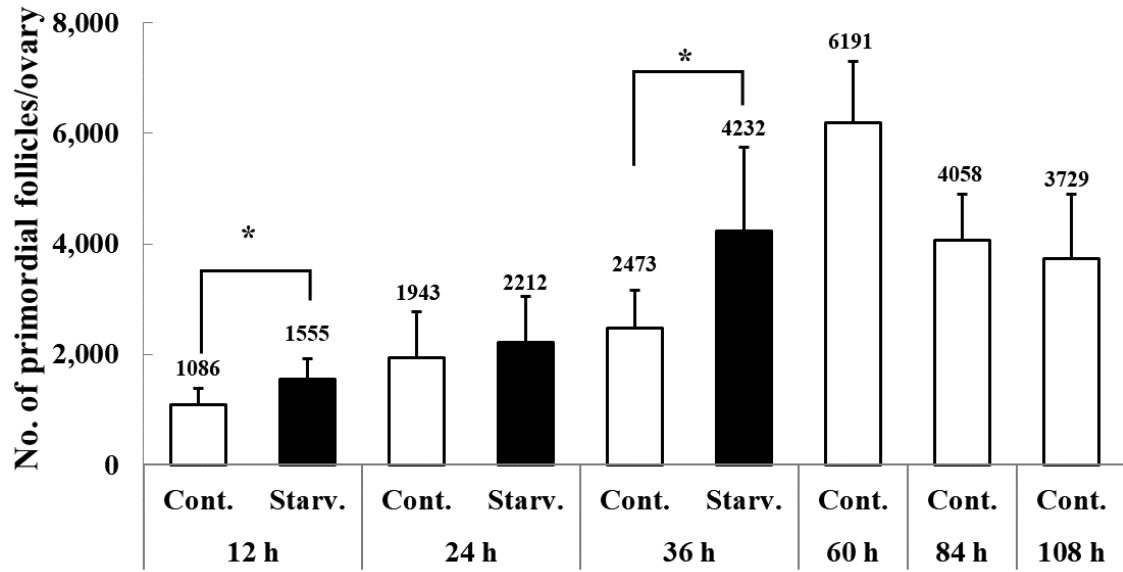
胞が、時間を経るに従い髄質側で多数みられるようになった。

したがって、卵母細胞から原始卵胞への移行は、12 時間から 60 時間におけると推定された。一次卵胞への移行は、60 時間から本格的に開始されと考えられ、84 時間からの原始卵胞数の減少は、原始卵胞から一次卵胞への移行とその過程での卵胞閉鎖に起因すると考えられた。

授乳制限による飢餓が原始卵胞形成に及ぼす影響を調べた (Supplementary Figure 2, C)。飢餓区は全ての時間において、各時間の対照区に比べ高い原始卵胞数を示した。特に、12 時間 (Starv. $1,555 \pm 374.0$ vs. Cont. $1,086 \pm 296.3$) および 36 時間 (Starv. $4,232 \pm 1,519.0$ vs. Cont. $2,473 \pm 686.3$) で有意に高くなった ($P < 0.05$, Figure 2, A)。

また、一次卵胞数は、36 時間において、飢餓区と対照区に有意な差はみられなかった (Starv. 31 ± 8.7 vs. Cont. 30 ± 14.4 , Figure 2, B)。これらの結果は、飢餓が一次卵胞への移行を抑制するのではなく、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。

(A)



(B)

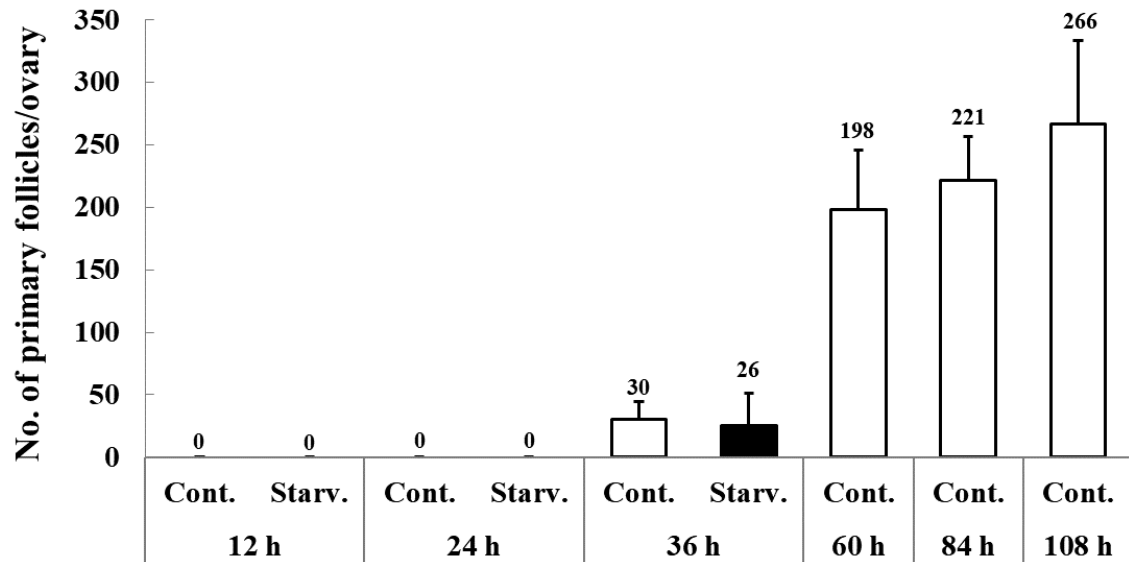
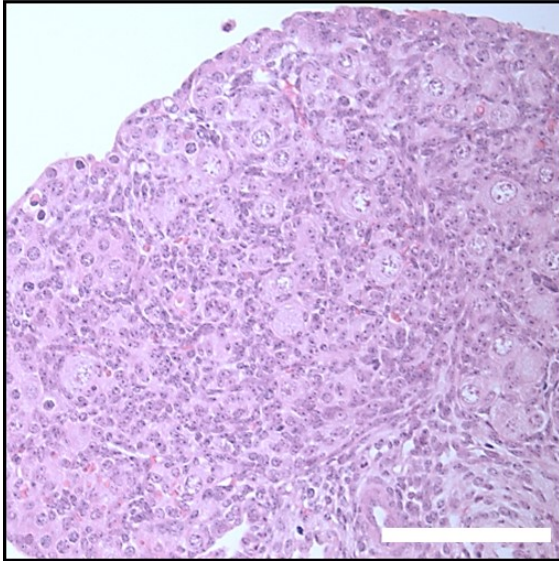


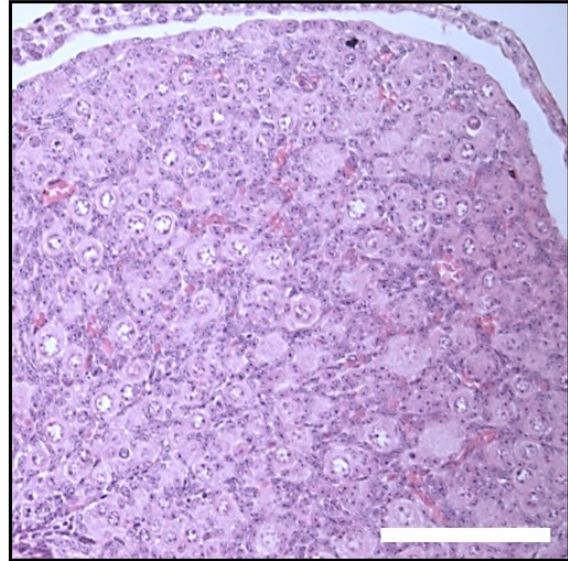
Figure 2. The numbers of primordial follicles (A) and primary follicles (B) per ovary from control (Cont.) and starved(Starv.) mice at 12-108 h after birth. Each bar is expressed as the mean \pm SD ($n = 4-6$). Asterisks indicate significant differences between two groups ($P < 0.05$). The number of primordial follicles peaked at 60 h. Starv. groups showed a higher number of primordial follicles than Cont. groups at each time point.

(A)

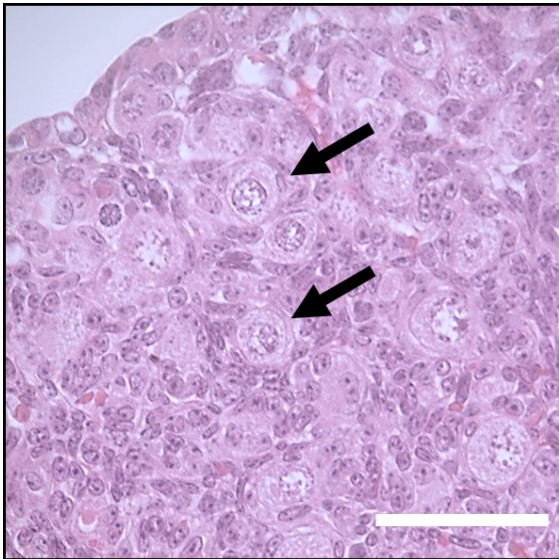
36 h Cont.



36 h Starv.

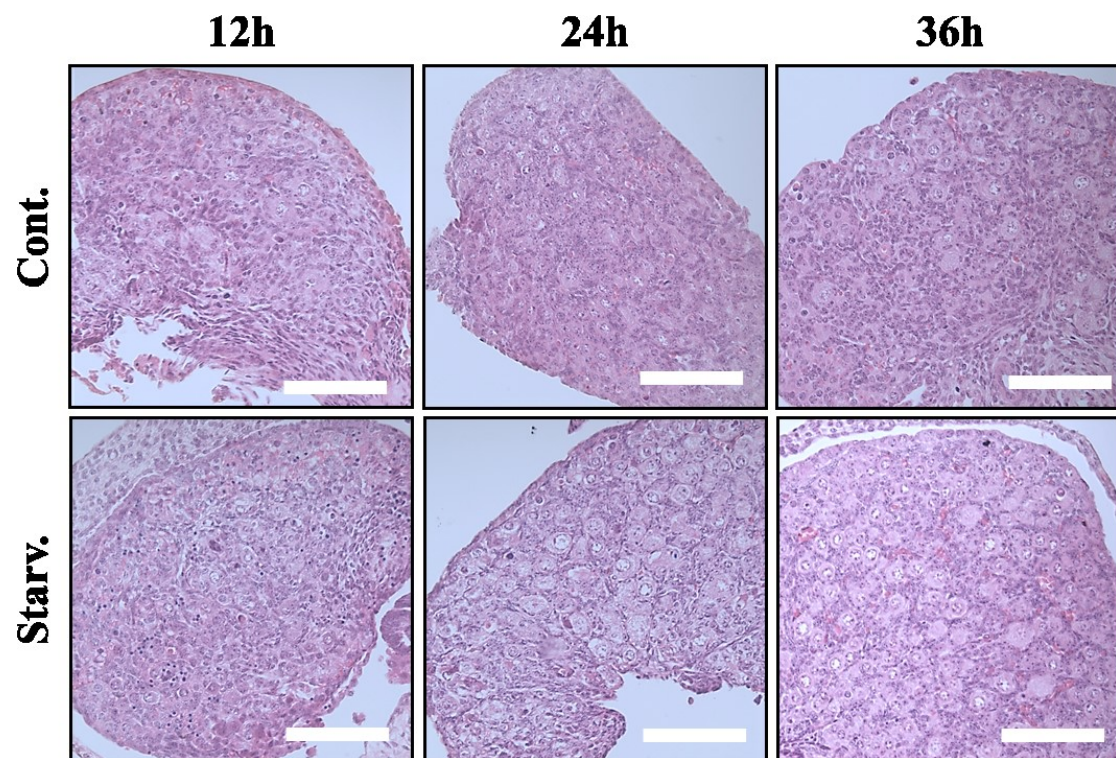


(B)



Supplementary Figure 2-1. (A) Images of hematoxylin and eosin staining in ovaries from Cont. and Starv. groups at 36 h after birth. Scale bar = 50 μm . (B) Primordial follicles were counted if they contained an oocyte surrounded by a partial or complete layer of squamous follicular epithelial cells. Black arrows point to representative Primordial follicles. Scale bar = 25 μm .

(C)



Supplementary Figure 2-2. (C) Images of hematoxylin and eosin staining in ovaries from Cont. and Starv. groups at 12-36 h after birth. Scale bar = 50 μm.

第3節

蛍光免疫染色による卵巣内オートファジー関連 タンパク質局在の解析

【目的】

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、その免疫染色による輝点は、オートファゴソームの指標となる[109]。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 の増加した発現は、オートファジーの特徴であるため[110]、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。したがって、p62 の総細胞内発現レベルは、一般的にはオートファジーと逆相関するとされているため、p62 は、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[111-113]。

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。Caspase-3 は、卵巣アポトーシスにおいて重要な役割を果たしている。Caspase-3 活性化の複数の経路が同定されており、そのいくつかは、ミトコンドリアシトクロム c の放出および Caspase-9 機能に依存している。

【材料および方法】

供試動物

第 1 章第 1 節【材料および方法】供試動物に示したように使用した。

新生仔マウスへの授乳制限

第 1 章第 1 節【材料および方法】新生仔マウスへの授乳制限に示したように行った。

卵巣の回収

第 1 章第 1 節【材料および方法】卵巣の回収に示したようにおこなった。

卵巣組織固定および包埋

第 1 章第 1 節【材料および方法】卵巣組織固定および包埋に示したように行った。

卵巣切片の作製

第 1 章第 1 節【材料および方法】卵巣切片の作製に示したように行った。

卵巣組織免疫蛍光染色

第 1 章第 1 節【材料および方法】卵巣組織免疫蛍光染色に示したように行った。また、一次抗体および二次抗体は **Supplementary Table1** に示したものをを用いた。ネガティブコントロールは、各種の二次抗体ごとに作製した。

卵巣切片の観察および画像処理

第 1 章第 1 節【材料および方法】卵巣切片の観察および画像処理に示したように行った。

【結果】

LC3B のシグナルは、対照区および飢餓区の両方において卵母細胞の細胞質に強く局在していた(**Figure 3, A**)。また、両区ともに、36 時間では、12 時間および 24 時間に比べ強いシグナルが確認された(**Figure 3, B**)。

LAMP-1 のシグナルは、対照区および飢餓区の両方において卵母細胞の細胞質に強く局在していた(**Figure 4, A**)。また、両区ともに、36 時間では、12、24 時間に比べ強いシグナルが確認された(**Figure 4, B**)。

p62 のシグナルは、対照区および飢餓区の両方において、一部の卵母細胞の細胞質に局在していた(**Figure 5, A, B**)。

Caspase-9 は、卵母細胞と体細胞(顆粒膜細胞)の両方の細胞質に局在していたがシグナルは弱かった(**Figure 6, A, B**)。一方、Caspase-3 の活性型である Cleaved-Caspase-3 は、卵母細胞と体細胞の両方の細胞質に局在しており、36 時間において、飢餓区で対照区に比べ弱いシグナルが検出された(**Figure 7**)。

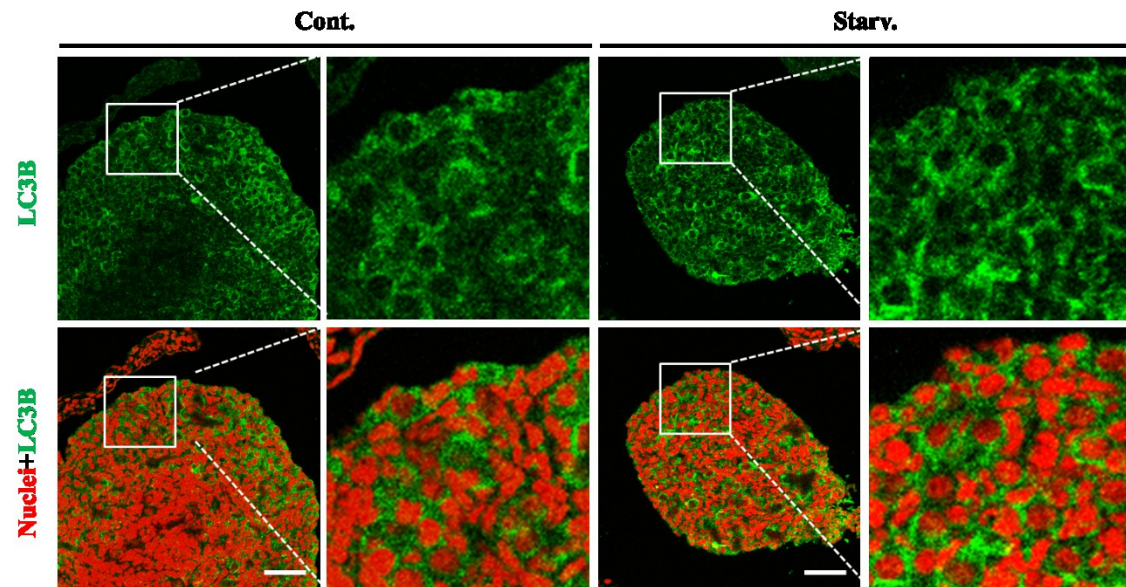
Supplementary Table1.

List of antibodies used for immunohistochemical staining and western blot analysis.

Primary antibodies	Manufacturer	Dilution used		Application (size in kDa)
		for WB	for IF	
Anti-MVH	Abcam (ab13840)		1:500	IF
Anti-LC3B	Abcam (ab48394)	1:500	1:500	WB, IF (19; LC3-I, 17; LC3-II)
Anti-LAMP-1	Abcam (ab24170)	1:1000	1:200	WB, IF (120)
Anti-p62	MBL (PM045)	1:2000	1:1000	WB, IF (62)
Anti-Caspase-9	Bioss (ba-0049R)	1:500	1:200	WB, IF (50; Cas9, 35; Act-Cas9)
Anti-Caspase-3	BD T L (610323)	1:1000		WB (32; Cas3, 20-21; Act-Cas3)
Anti-Cleaved-Caspase-3	Cell signaling (#9664)		1:400	WB, IF (17-19)
Anti-GAPDH	SIGMA (G9545)	1:3000		WB (37)

WB, western blot; IF, immunofluorescence.

(A)



(B)

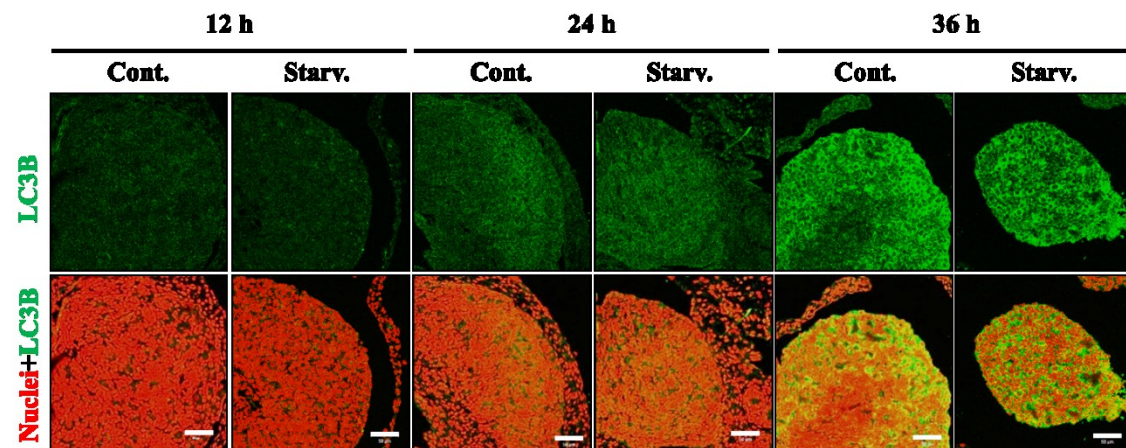
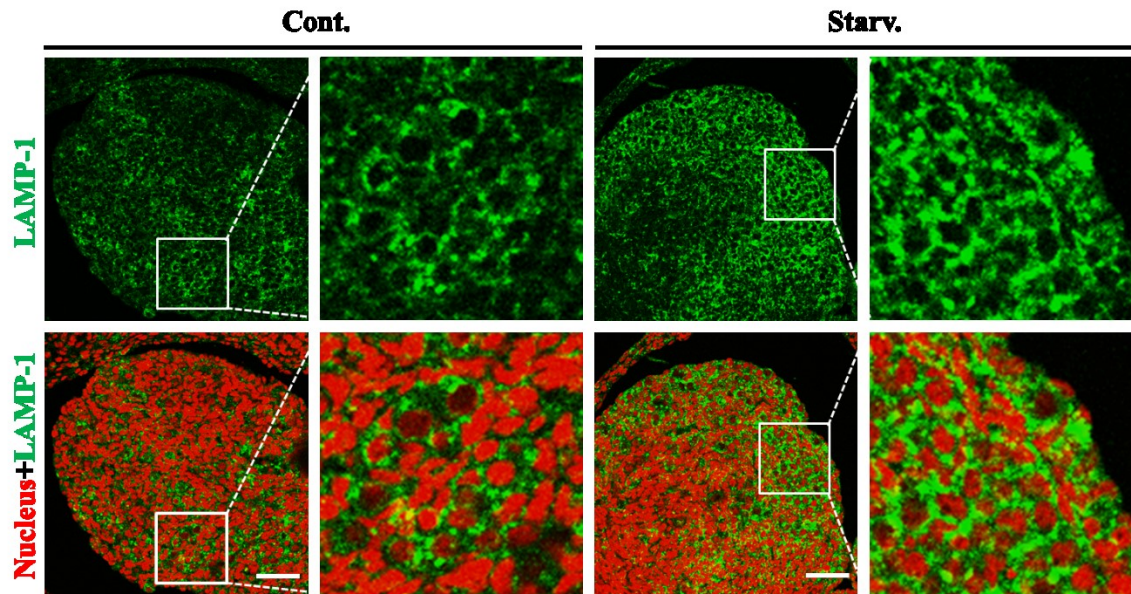


Figure 3. (A) Fluorescent images from immunostaining of the LC3B protein in ovaries for Cont. and Starv. groups at 36 h after birth. The photographs on the right side of each experimental group are the quadruple enlargement of the white frame from images on the left. (B) Fluorescent images from immunostaining of the LC3B protein in ovaries for Cont. and Starv. groups at 12-36 h after birth. Scale bar = 50 μ m. LC3B was localized highly in the oocyte cytoplasm.

(A)



(B)

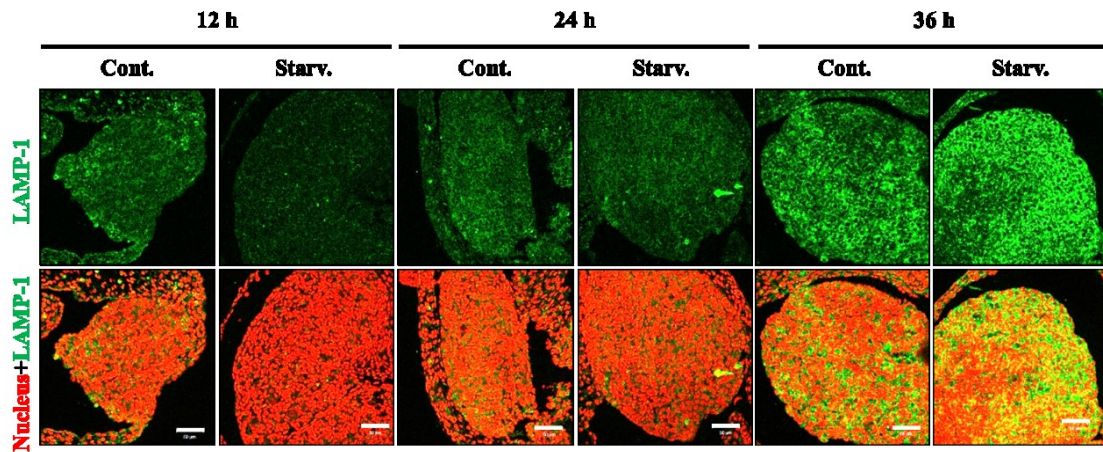
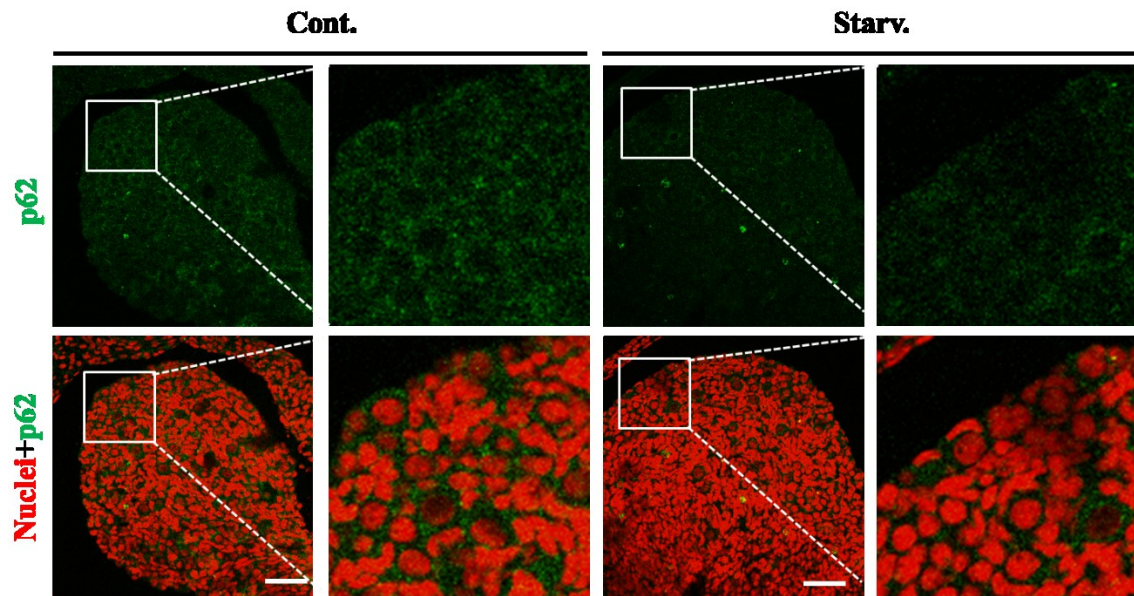


Figure 4. (A) Fluorescent images from immunostaining of the LAMP-1 protein in ovaries from Cont. and Starv. groups at 36 h after birth. The photographs on the right side of each experimental group are the quadruple enlargement of the white frame from images on the left. (B) Fluorescent images from immunostaining of the LAMP-1 protein in ovaries for Cont. and Starv. groups at 12-36 h after birth. Scale bar = 50 μ m. LAMP-1 was localized highly in the oocyte cytoplasm.

(A)



(B)

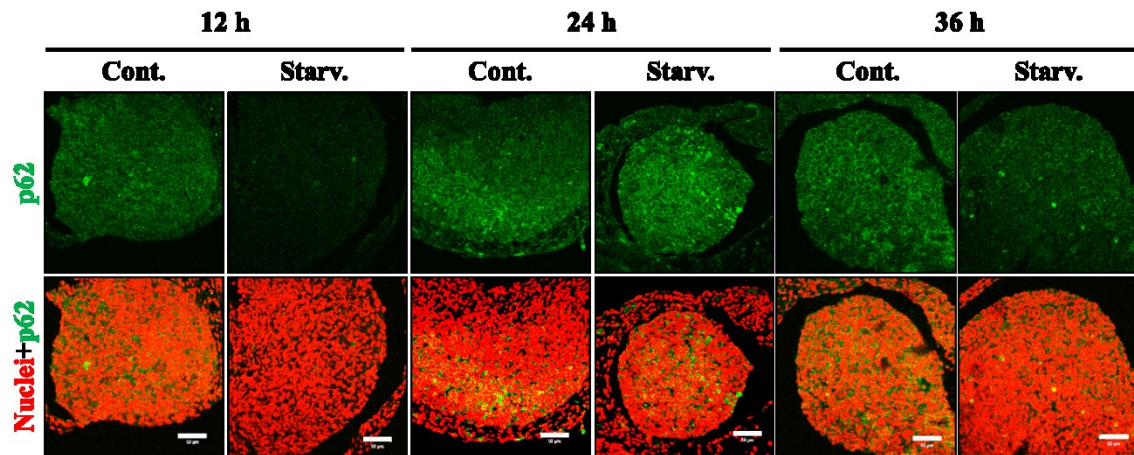
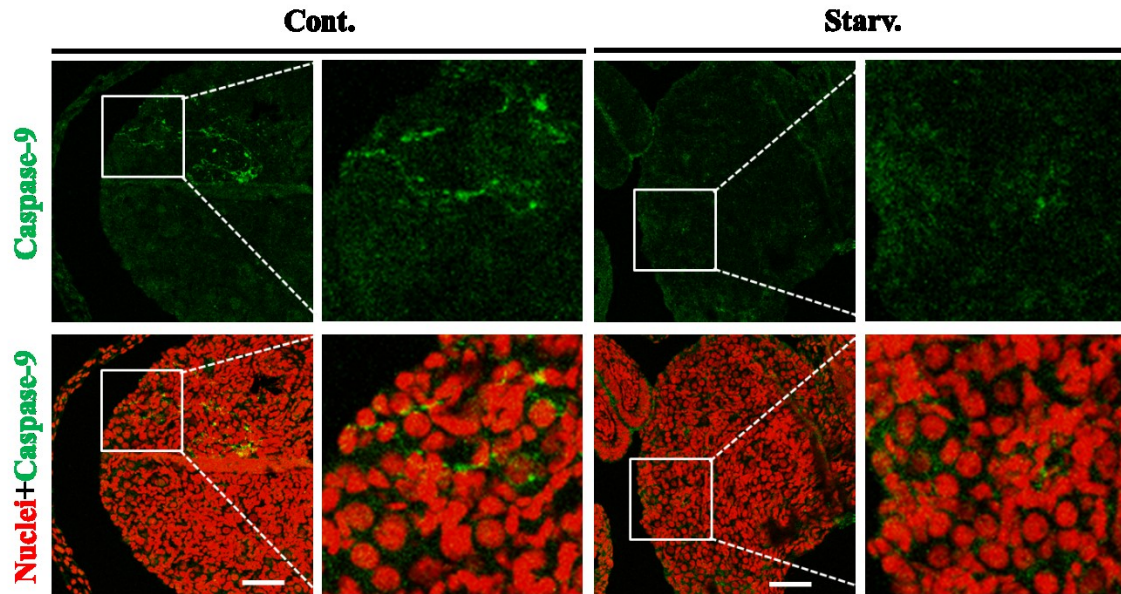


Figure 5. (A) Fluorescent images from immunostaining of the p62 protein in ovaries from Cont. and Starv. groups at 36 h after birth. The photographs on the right side of each experimental group are the quadruple enlargement of the white frame from images on the left. (B) Fluorescent images from immunostaining of the p62 protein in ovaries from Cont. and Starv. groups at 12-36 h after birth. Scale bar = 50 μ m. The signals of p62 were detected in the cytoplasm of oocytes.

(A)



(B)

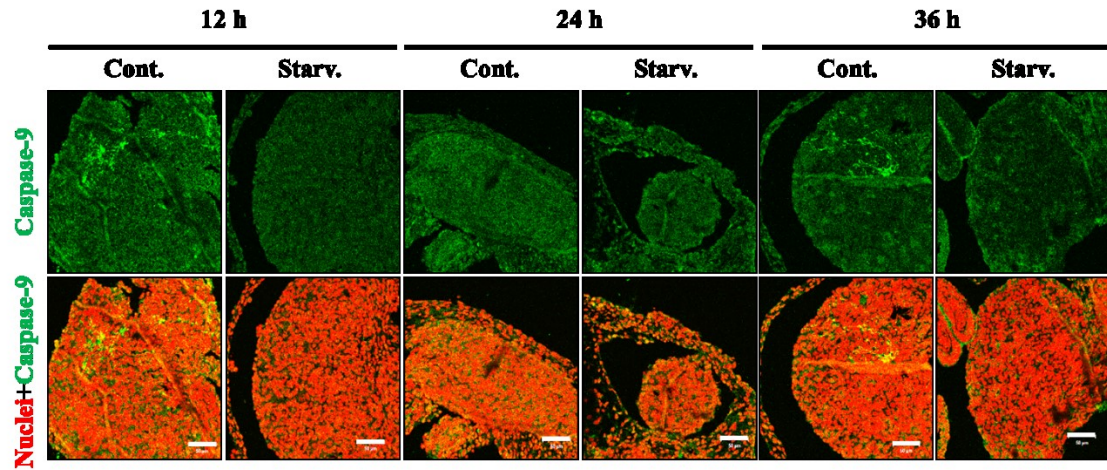


Figure 6. (A) Fluorescent images from immunostaining of the Caspase-9 protein in ovaries from Cont. and Starv. groups at 36 h after birth. The photographs on the right side of each experimental group are the quadruple enlargement of the white frame from images on the left. (B) Fluorescent images from immunostaining of the Caspase-9 protein in ovaries from Cont. and Starv. groups at 12-36 h after birth. Scale bar = 50 μ m. Caspase-9 was localized in the cytoplasm of both oocytes and somatic cells.

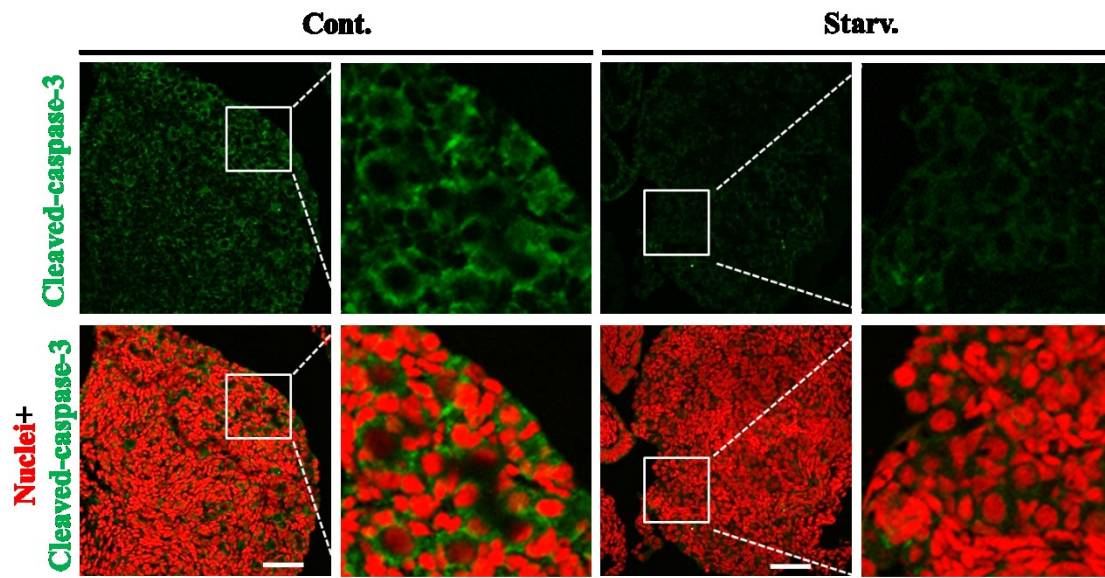


Figure 7. Fluorescent images from immunostaining of the Cleaved-Caspase-3 protein in ovaries from Cont. and Starv. groups at 36 h after birth. The photographs on the right side of each experimental group are the quadruple enlargement of the white frame from images on the left. Scale bar = 50 μ m. Cleaved-Caspase-3 was localized in the cytoplasm of both oocytes and somatic cells.

第 4 節

ウエスタンブロッティングによる卵巣内
オートファジー関連タンパク質発現量の解析

【目的】

飢餓状態により新生仔マウス卵巢内にオートファジーが誘導されるのかを確認するために、ウエスタンブロッティング解析により新生仔卵巢内のオートファジー関連タンパク質の発現量の動態を調べた。

【材料および方法】

供試動物

第1章第1節【材料および方法】供試動物に示したように使用した。

新生仔マウスへの授乳制限

第1章第1節【材料および方法】新生仔マウスへの授乳制限に示したように行った。

卵巢の回収

第1章第1節【材料および方法】卵巢の回収に示したようにおこなった。

卵巢サンプルの調製

サンプリングバッファー(PBS(-): 2×SDS buffer: β -ME = 10 μ l: 9 μ l: 1 μ l)は、要時調製した。回収した卵巢をシャーレ上でPBS(-)に沈め、実体顕微鏡下で27G注射針を用いて卵巢嚢や卵管、脂肪を除去した。単離した卵巢をPBS(-)で1回洗浄し、ホモジナイズ用エッペンチューブ(バイオマッシャーII, Nippi)に分注した100 μ lのサンプリングバッファー中に針で沈め、氷上でサンプルをホモジナイズ(10回転)した。サンプルを氷水中で、超音波処理し(30秒×3)、軽くスピンドウンし、25 μ lずつに分注し、解析を行うまで-80℃で凍結保存した。

ゲルの作成

電気泳動のためのゲルには、SDS-PAGEゲルを常法に従って自作し使用した。分離ゲル濃度は10-12%、濃縮ゲル濃度は4%で構成した。

ウエスタンブロッティング

サンプルはゲルにアプライする直前に融解し、スピンドウン後氷上に静置した。ストッパーの付けられたサンプルチューブは、超音波装置(SHARP)で15秒間の超音波処理後、3分間熱湯でボイリングした。その後、サンプルチューブを急冷、スピンドウン後、氷上で静置した。ウェルごとに20 μ lのサンプルをアプライし、空のウェルを同量のボイリングしたサンプリングバッファーで埋めたのち、電気泳動を開始した。泳動後、目的タンパク質は常法に従って電氣的に

PVDF メンブレン (Millipore) に転写した。その後、メンブレンは 0.1%(v/v)TWEEN-20-tris-buffered saline(TBS-T)にスキムミルクを 5%になるように加えたブロッキング液で 1 時間ブロッキングした。メンブレンを Can Get Signal® I (Toyobo)で Supplementary Table1.に示した通りに希釈した一次抗体と共にインキュベートした(4 °C、一晚)。翌日、TBS-T で洗浄し(5 分間×3 回)、Can Get Signal Solution® II (Toyobo)で希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)結合二次抗体と共にインキュベート後(4 °C、1 時間)、TBS-T で洗浄した(5 分間×3)。メンブレン上の目的タンパク質を視覚化するために、ImmunoStar®LD(Wako)で 5 分間インキュベートした。フォト用フィルムでシーリングし、検出を行った。

検出後、メンブレンから抗体を除去するために、ストリッピングバッファー (2% SDS, 0.1M β -mercaptoethanol, 62.5mM Tris-HCl)でインキュベートし (50°C、10 分間)、再びブロッキング以降の操作を繰り返し、複数のタンパク質を検出した。

画像取得および解析

撮影は Ez-Capture MG (ATTO)で行い、画像は Ez-Capture Image Saver 5 から得た。得た画像は ImageJ 1.47v (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA)を利用して定量化した。さらに、定量化した標準化酵素グリセルアルデヒド-3 リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)の数値で割ることで正規化し、相対的な数値を算出した。

統計分析

すべてのデータは GAPDH を用いて正規化し、平均 \pm 標準誤差(SE)として表した。LC3B に関しては、LC3-II を LC3-I で割った比を用いた。LAMP-1 に関しては、タンパク質サイズにごく近接した 2 本のバンドを合わせてデータとした。データはエクセル統計ソフトを用いて Tukey の一元配置分散分析により、同一時間の実験区間で平均値の差を検定した。有意水準 $P<0.05$ で統計的に有意とした。

【結果】

オートファゴソームの隔離膜の拡張中、LC3-I は LC3-II にプロセッシングされる。このことから、LC3-II と LC3-I のウエスタンブロットによる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。LC3-II / LC3-I 比は、両区ともに 36 時間で、他の時間に比べ高まり、飢餓区は、対照区に比べ有意に高い LC3-II / LC3-I 比を示した($P<0.05$, Figure 8, B)。

LAMP-1 抗体を用いたウエスタンブロットでは、予測された位置に、非常に近

接して2つのバンドが検出された(Figure 9, A)。2つのバンドは、それらを別々に、あるいは同時に定量した場合もどちらも同様の变化傾向を示した。したがって、本研究では、2つのバンドを同時に定量化した値を分析に採用した。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時間および36時間で高い傾向がみられた(Figure 9, B)。

オートファジーに選択的に分解される p62 の発現レベルは、対照区では、24時間から36時間にかけて発現量が高まった。一方、飢餓区では36時間で低下し、同時間の対照区と比較して有意に減少した($P<0.05$, Figure 10, B)。

アポトーシスのイニシエーターである Caspase-9 の発現レベルは、対照区では、生後からの時間に伴い高まった(Figure 11, B)。飢餓区では、12時間から24時間にかけて高まった発現が、36時間では12時間と同等のレベルまで減少した。また、36時間において、飢餓区では、同時間の対照区と比較して1/4程度まで減少した。一方、Caspase-3は、すべての実験区で検出されなかった(Figure 12)。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(Figure 13)。

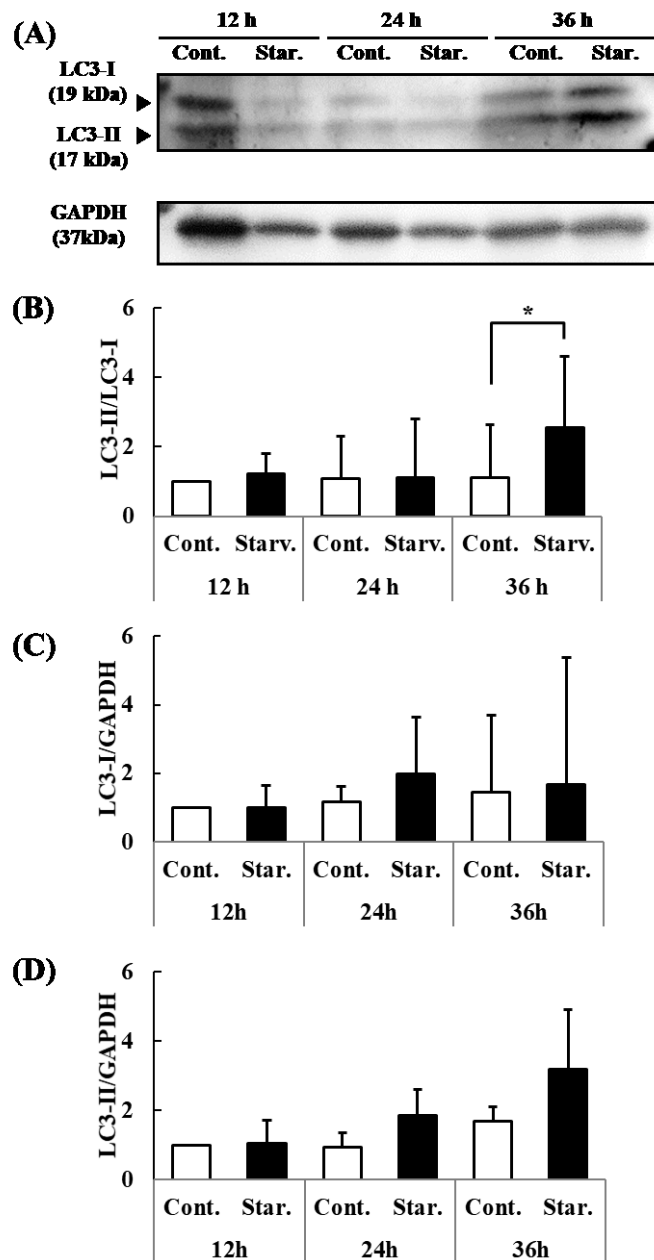


Figure 8. Protein expression of the autophagy marker LC3B in ovaries for Cont. and Starv. groups at 12-36 h after birth. (A) Immunoblotting bands pattern of LC3-I and LC3-II. Relative expression levels of LC3-II/LC3-I (B) and LC3-I/GAPDH (C), and LC3-II/GAPDH ratio (D) are shown in bar graphs. GAPDH was used as a loading control. Each bar is expressed as mean \pm SE ($n = 9$). An asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$). Starv. groups showed a higher ratio of LC3-II/LC3-I than the Cont. groups at 36 h.

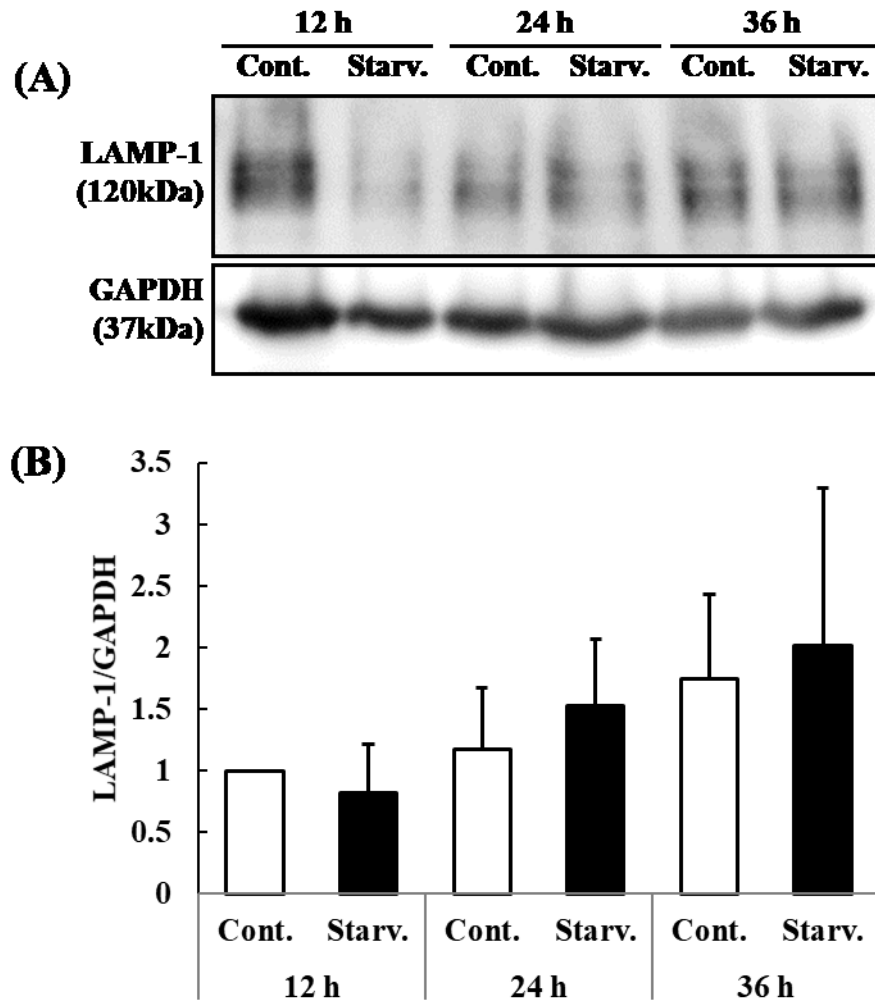


Figure 9. Protein expression of the lysosomal marker LAMP-1 in ovaries from Cont. and Starv. groups at 12-36 h after birth. (A) Immunoblotting bands pattern of LAMP-1. (B) Relative expression levels of LAMP-1 are shown in bar graphs. GAPDH was used as a loading control. Each bar is expressed as the mean \pm SE ($n = 7$). The LAMP-1 expression level tended to increase with time after birth.

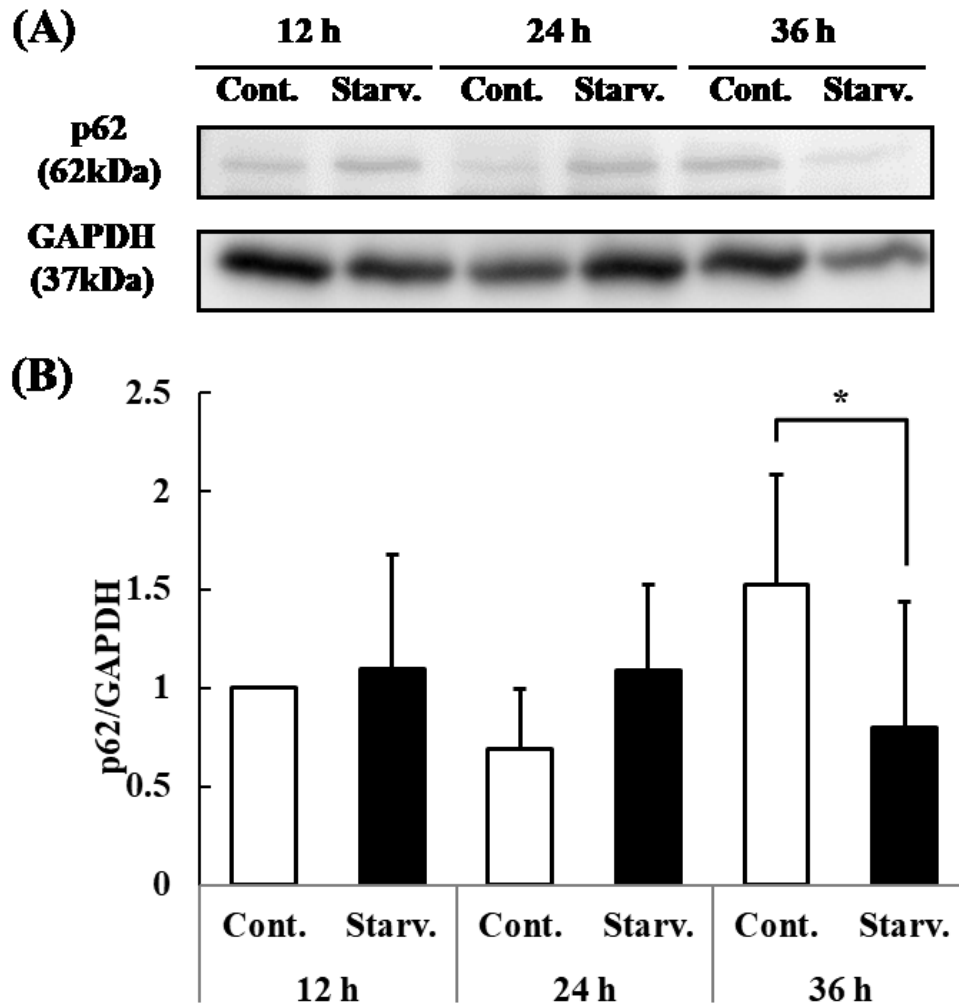


Figure 10. Protein expression of the selective autophagy substrate p62 in ovaries from Cont. and Starv. groups at 12-36 h after birth. (A) Immunoblotting bands pattern of p62. (B) Relative levels of expression of p62 are shown in bar graphs. GAPDH was used as an internal control. Each bar is expressed as the mean \pm SE ($n = 7$). An asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$). The p62 expression level was decreased in the Starv. group compared with the Cont. group at 36 h.

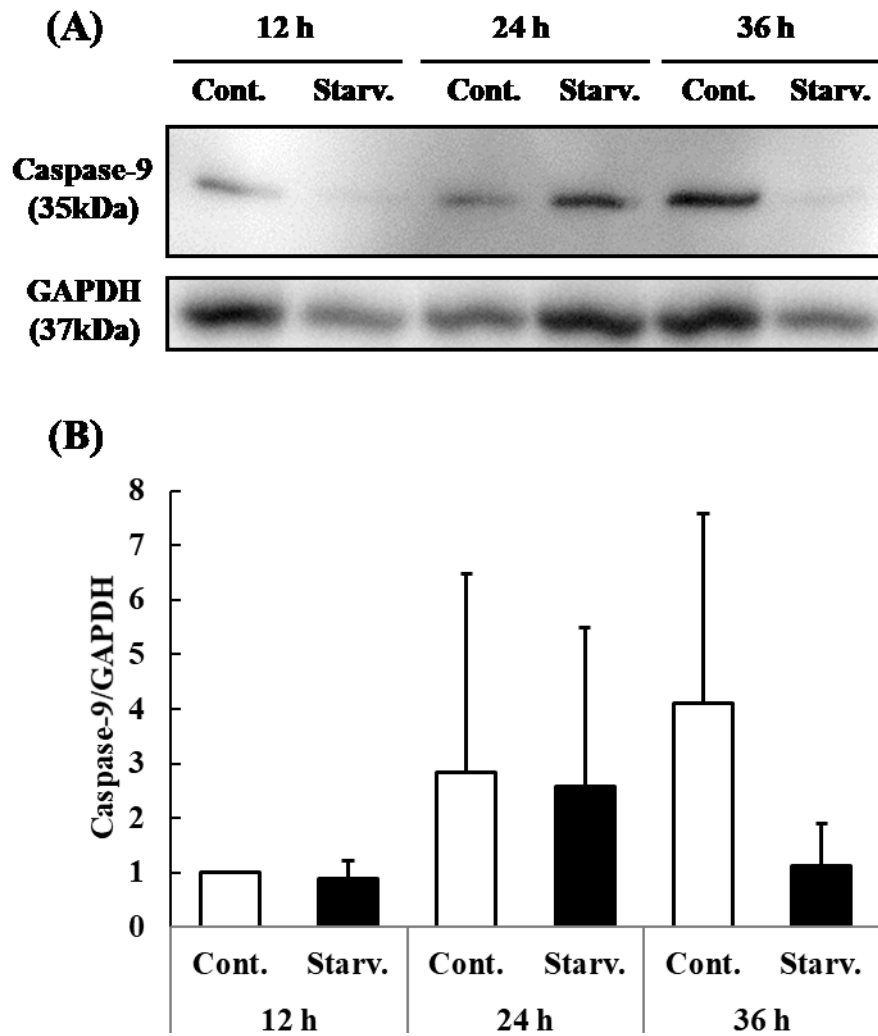


Figure 11. Protein expression of the apoptosis marker Caspase-9 in ovaries from Cont. and Starv. groups at 12 to 36 h after birth. (A) Immunoblotting bands pattern of Caspase-9. (B) Relative expression levels of Caspase-9 are shown in bar graphs. GAPDH was used as an internal control. Each bar is expressed as the mean \pm SE ($n = 4$). The Caspase-9 expression level was decreased in the Starv. group compared with the Cont. group at 36 h.

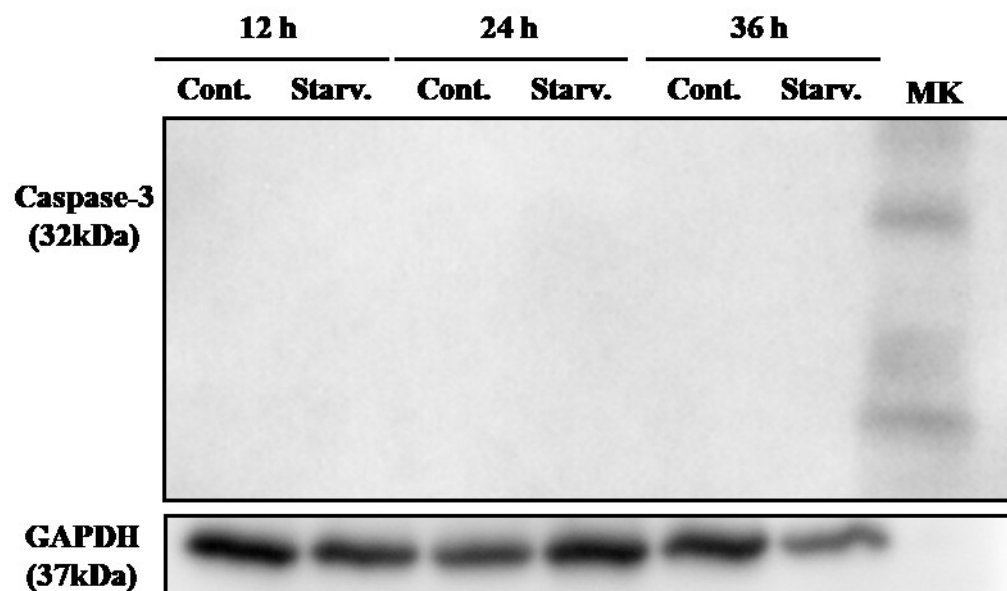


Figure 12. Protein expression of the apoptosis marker Caspase-3 in ovaries from Cont. and Starv. groups at 12 to 36 h after birth. GAPDH was used as an internal control. Caspase-3 was not detected in any group. MK is a molecular weight marker.

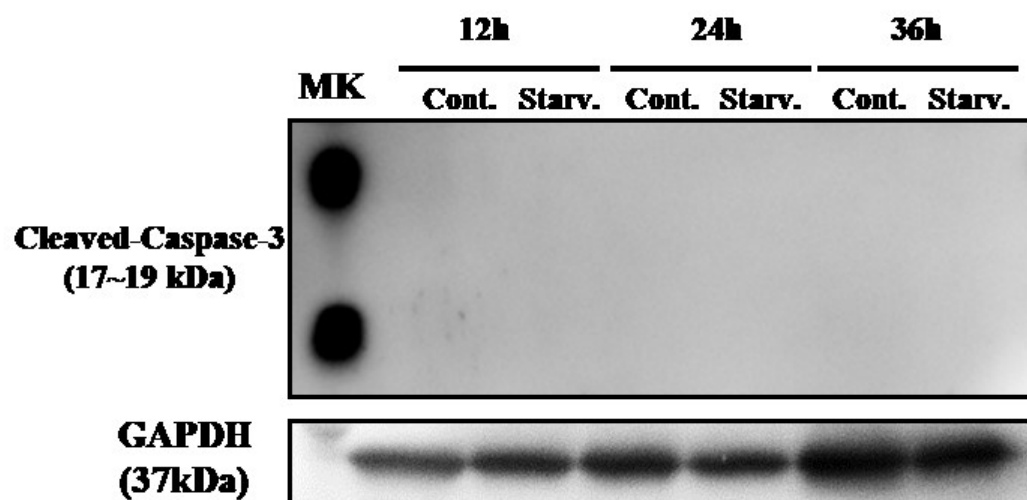


Figure 13. Protein expression of the apoptosis marker Cleaved-Caspase-3 in ovaries from Cont. and Starv. groups at 12 to 36 h after birth. GAPDH was used as an internal control. Cleaved-Caspase-3 was not detected in any group. MK is a molecular weight marker.

考 察

本章では、新生仔初期の授乳制限による飢餓が、新生仔の卵巣内原始卵胞数を増加させた。また、一次卵胞数に有意な差がみられないことから、原始卵胞数の増加が、一次卵胞への移行の抑制によるものではなく、原始卵胞形成の促進によるものと考えられた。

周産期では、新生仔は授乳を介して栄養を得るまで、新生仔体内の貯蔵エネルギーを使用しなければならない。周産期におけるオートファジーの重要性を示唆する報告がなされている。オートファジーの機能の一つとして、細胞内成分をリサイクルし、生物または細胞が飢餓状態に耐えられるようにすることである。オートファジーは、哺乳類新生仔の発育中の組織におけるエネルギー恒常性および、組織生存率の維持に関与している[114-116]。この機構は、細胞内または細胞外の各栄養素量の減少によって引き起こされる飢餓状態に、細胞が適応するために用いられていると考えられている。栄養およびストレスへの適応に加え、オートファジーは、細胞死および発生、腫瘍抑制などの他の多くの生理学的プロセスに関与している[73, 106, 108-121]。オートファジー必須遺伝子 *Atg5* および *Atg7* のノックアウト研究では、周産期中の致死(出生1日以内の死亡)が、この早期飢餓期のオートファジーの消失と関連していることを示している[114, 122]。したがって、オートファジーは新生仔のエネルギー恒常性を維持するために不可欠なメカニズムと考えられる。

オートファジーの著しい活性化は、出生時に誘発され、12時間以内にピークに達し、1-2日以内に基底レベルに戻る。同様に、LC3の蛍光強度による解析ではあるが、出生直後の新生仔卵巣ではオートファジーが誘導され、出生直後3~6時間に最大レベルに達し、次いで約24時間で基底レベルまで徐々に低下することが報告されている[89]。この報告では、新生仔マウスは、生後1~2時間で授乳されたが、これはオートファジー活性の最大レベルの前であった。

Hulas-Stasiak ら[98]は、リソソームの増幅を伴った LAMP-1 発現の有意な増加を含む、出生後1日齢でのトゲネズミ原始卵胞における LAMP-1 の強い免疫シグナルを報告している。オートファジーの欠如が、新生仔マウス卵巣内原始卵胞の過剰喪失をもたらすことも他の研究でいくつか報告されている。最近、オートファジーの必須遺伝子である *Becn1* 欠損卵巣における生殖細胞数の減少が報告されている[82]。また生殖細胞特異的 *Atg7* ノックアウトが、3日齢マウスにおいて原始卵胞の喪失を導くことも報告されている[89]。

本研究の結果は、オートファジーマーカーの発現が卵母細胞に局在し、飢餓によりその発現が増加し、新生仔マウス卵巣においてオートファジーが誘導されることを示している。したがって、我々の研究結果から、このオートファジ

一誘導が、卵母細胞から原始卵胞への移行および形成される原始卵胞数に関与していることを提案する。周産期における異なる時点での飢餓の原始卵胞数に及ぼす影響は、以前の研究で報告されている[113, 123]。母体への栄養制限は、その仔の卵巣内原始卵胞プールの減少および、早期卵巣老化をもたらす可能性がある[113]。他の報告では、出生直後から 20 時間に栄養制限された 3 日齢のマウスの卵母細胞および原始卵胞数は、正常マウスよりも低いことを報告している[89]。この報告では、飢餓状態のマウスにおけるオートファジー活性は調査されていなかった。本研究では、飢餓による 36 時間での原始卵胞数の有意な増加が一時的である可能性は否定できない。しかし、36 時間での原始卵胞数の増加が、観察されたオートファジー関連タンパク質の増加から、出生後 24 時間以上にわたるより高いレベルのオートファジーの継続的な誘導に起因し得ることを示唆する。本研究の結果とは対照的に、分娩後 1.5 日目から 3 日目に飢餓した CD1 マウスでは、1 切片あたりの原始卵胞数が減少した[123]。これは、マウス系統の差による可能性も考えられる。あるいは、その違いは、原始卵胞形成のピークに対しての飢餓タイミングの違いに起因する可能性がある。我々の研究では、原始卵胞数は出生後約 60 時間でピークに達した。我々は原始卵胞数の増加期を標的とし、以前の研究よりも早期に飢餓を実施した。したがって、原始卵胞形成のピークの前あるいは減少期で飢餓が施された場合、原始卵胞数に対する影響は変化し得る可能性が考えられる。

アポトーシスは、胎仔発生中の生殖細胞喪失[113, 124, 125]、CBD [123, 126]、出生後の顆粒膜細胞死[113, 126, 127]の主要なメカニズムであると考えられている。本研究では、オートファジーが主に細胞生存あるいはアポトーシスのどちらに関与するのかを調べるために、卵巣で顆粒層細胞のアポトーシスに重要な役割を果たす Caspase-3 とそれを誘導する Caspase-9 を調べた。卵巣全体における Caspase-9 の発現は、飢餓によって抑制される傾向がみられた。また、第 3 節での局在の解析とあわせて、卵母細胞と卵胞上皮細胞の両方でアポトーシスの誘導が抑制されていると考えられた。しかしながら、時間や飢餓の有無にかかわらず Caspase-3 の発現は検出できず、アポトーシスの頻度は低いと考えられた。これらの結果は、げっ歯類およびヒト原始卵胞におけるアポトーシスマーカー発現およびアポトーシス陽性染色の TUNEL 反応の欠如と一致している。

以前の研究では、*Atg7* ノックアウトマウスは、第 2 世代において 6 ヶ月齢で産仔数が有意に少なく、不妊症を発症することが判明している[89]。さらに、老化した *Atg7* ノックアウトマウスは、原始卵胞が非常に少なく、ほとんどのマウスがほぼ完全に不妊である。我々は、飢餓新生仔マウスを 36 時間の授乳制限後に、母親と同居させ、仔成熟後の生殖能への影響を確認しようとしたが、すべての仔が 36 時間の授乳制限後、数時間以内に死亡し解析が困難であった。その

ため、新生仔期の原始卵胞数の増加がその後も維持され、成熟後の生殖能に影響を与えるかどうかは不明となっている。

本章では、出生直後の授乳制限による飢餓は、卵巢へのオートファジーの誘導を伴いながら、原始卵胞形成を促進し、オートファジーが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示唆している。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

緒 論

酸化ストレスから細胞の保護に働くシスチン・グルタミン酸トランスポーター(xCT)遺伝子を欠損したマウス(xCTKO)の体外成熟卵では、卵成熟期でのグルタチオンの低下を伴う桑実胚以降の発生異常がみられることが報告されており、xCT が卵における酸化ストレスの保護に関わっていることが明らかになっている[128]。一方、xCTKO マウスでは、野生型(WT)マウスと比べて3産目までの平均産仔数が予想外に高い傾向がみられている。xCT の生体における雌生殖機能に与える影響については情報が限られており、特に、卵巣内原始卵胞プールに与える影響については全く報告されていない[128, 129]。

そこで、実際の生体内において長期間にわたる xCT の欠損が雌の生殖機能にどのような影響を与えるのかを検証するために、12 ヶ月齢まで加齢させた xCTKO マウスを用いて、卵巣機能や、卵胞数、排卵される卵のクオリティを解析した[130-132]。予想に反し、同月齢の WT に比べ xCTKO では過排卵処理後の卵巣重量および排卵数が高い傾向がみられ、その卵クオリティ(体外発生能、ATP 含量、GSH 含量)も維持されていることが明らかとなった。xCTKO マウスでみられた排卵数の維持が卵胞プールのサイズによるものかを確認するために、各発育ステージの卵巣内卵胞数を測定したところ、2 ヶ月齢の時点から原始卵胞数が WT に比べ xCTKO で有意に高く(2-month; xCTKO 471.7 ± 45.7 vs. WT 378.9 ± 26.0 , $p > 0.05$, 12-month; xCTKO 131.5 ± 23.2 vs. WT 113.9 ± 22.7)、結果として総卵胞数も高くなる傾向がみられた(2-month; xCTKO 677.3 ± 60.7 vs. WT 589.4 ± 38.5 , 12-month; xCTKO 166.9 ± 30.8 vs. WT 158.1 ± 23.4)。血漿エストラジオールの濃度は、実験区間で有意な差はなく、ホルモンに依存しない卵胞数の維持が xCTKO でみられたことを明らかにしている。加えて、xCTKO 卵ではオートファジーを抑制する mTOR mRNA の発現が WT 卵に比べ低かった。xCT 欠損や阻害は、オートファジーを誘発することが報告されており[133]、xCTKO 卵はオートファジーが促進されている可能性が示された。これらの結果は、xCT の欠損が、予想外に原始卵胞の数を維持するポテンシャルを向上させる可能性があることを示唆している。

以上から、xCT 欠損によるオートファジーの誘導が、高い原始卵胞数の維持をもたらすという仮説を立てた。そこで本研究では、新生仔 xCTKO マウスを用いて、第 1 章から推定された原始卵胞数のピークから、飢餓マウスでは確認できなかった、生後 60 時間とその前後における卵巣内原始卵胞数とオートファジー関連タンパク質を解析し、オートファジー機構と原始卵胞形成との関係を明らかにすることを試みた。特に、xCT の制御を受けるオートファジー機構と卵胞形成や卵胞発育、卵の発生の関係に着目した研究は今までになく、本研究は

xCT が卵胞数の維持に働く可能性を検証する初めてのものであり、オートファジーを利用した卵胞備蓄や胚発生の改良につながる可能性が考えられる。さらに、xCT 特異的阻害剤の WT 新生仔マウスへの投与により xCT 欠損の表現型を再現できるか検討した。

第 1 節

連続切片を用いた卵巣内原始卵胞数 および一次卵胞数の評価

【目的】

性成熟後に備蓄卵胞数が高い xCTKO マウスでは、原始卵胞形成期においても原始卵胞数が高いのかを明らかにするために、新生仔 xCTKO マウスの原始卵胞数の動態を調べた。

【材料および方法】

供試動物

第 1 章第 1 節【材料および方法】供試動物に示したように使用した。本実験には、雌雄の C57BL/6 由来 xCTKO マウスを親マウスとして使用した。xCTKO マウスは、佐藤ら[134]によって作製され、ターゲティングベクターで xCT 遺伝子の Exon1 の 1-20 番目のアミノ酸を欠損させたノックアウトマウスを作製し、さらに、Cre 発現マウスと交配し loxp 配列を除き(P.135, Appendix figure 3)、C57BL/6 マウスと 10 回以上バッククロスを行い作出された。C57BL/6 WT マウスを対象区として用いた。

本研究で使用される遺伝子組み換え生物の作出および使用については、山形大学遺伝子組み換え実験委員会の審議を経て、全て承認されている。

卵巣の回収

第 1 章第 1 節【材料および方法】卵巣の回収に示したように行い、第 1 章 2 節の結果から原始卵胞数のピークとその前後となる生後 36、60、84 時間で少なくとも 2 匹以上の母親由来の同腹仔から 5 匹以上の個体の卵巣を回収した。1 匹のマウスから得た卵巣のうち、1 つは原始卵胞ならびに一次卵胞数の計測(第 1 節)、もう 1 つはウェスタンブロッティング解析(第 2 節)に使用した。

卵巣組織固定および包埋

第 1 章第 2 節【材料および方法】卵巣組織固定および包埋に示したように行なった。

連続切片の作製

第 1 章第 2 節【材料および方法】連続切片の作製に示したように行なった。

連続切片の HE 染色

第 1 章第 2 節【材料および方法】連続切片の HE 染色に示したように行なった。

原始卵胞数の評価

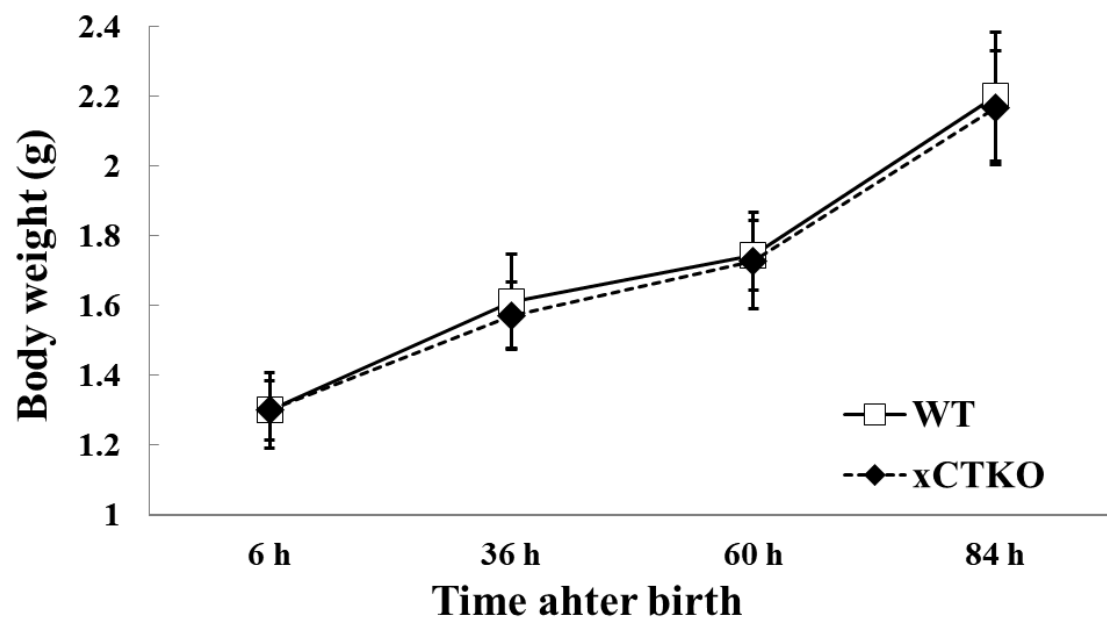
第 1 章第 2 節【材料および方法】原始卵胞数の評価に示したように行なった。

統計分析

第 1 章第 2 節【材料および方法】統計分析に示したように行った。

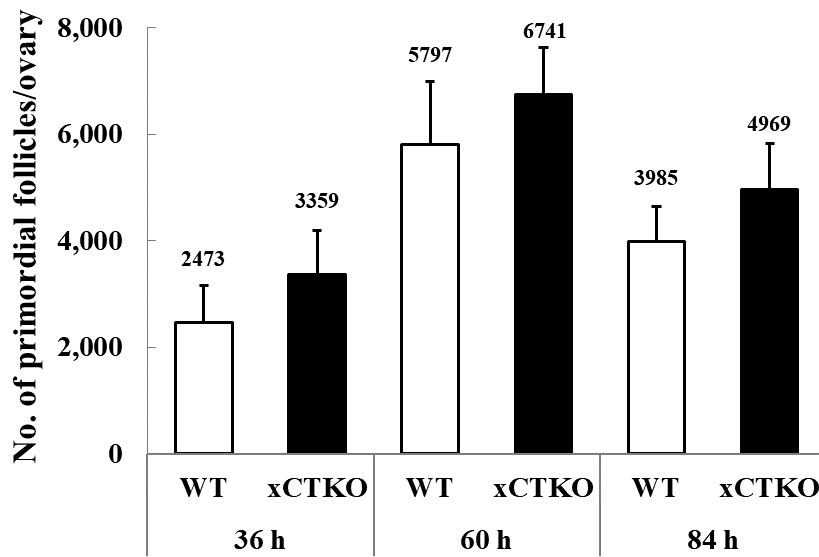
【結果】

各時間の体重に、両区間で有意な差はみられなかった(Supplementary Figure 3)。xCTKO の平均原始卵胞数は、全ての時間においても、WT に比べ有意ではないものの高い傾向がみられた(36 h; xCTKO 3359 ± 832.0 vs. WT 2473 ± 686.3 , 60 h; xCTKO 6741 ± 878.4 vs. WT 5797 ± 1196.2 , 84 h; xCTKO 4969 ± 862.1 vs. WT 3985 ± 656.4 ; Figure 14, A)。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(xCTKO 113 ± 32.1 vs. WT 204 ± 42.3 , $P < 0.05$)、他の時間でも低い傾向がみられた(36 h; xCTKO 20 ± 5.6 vs. WT 30 ± 14.4 , 84 h; xCTKO 169 ± 62.8 vs. WT 186 ± 62.8 ; Figure 14, B)。



Supplementary Figure 3. The mean body weight of WT and xCTKO mice at 0-84 h after birth. Each value is expressed as mean \pm SD (n = 6-39). The mean body weights of each group were not different.

(A)



(B)

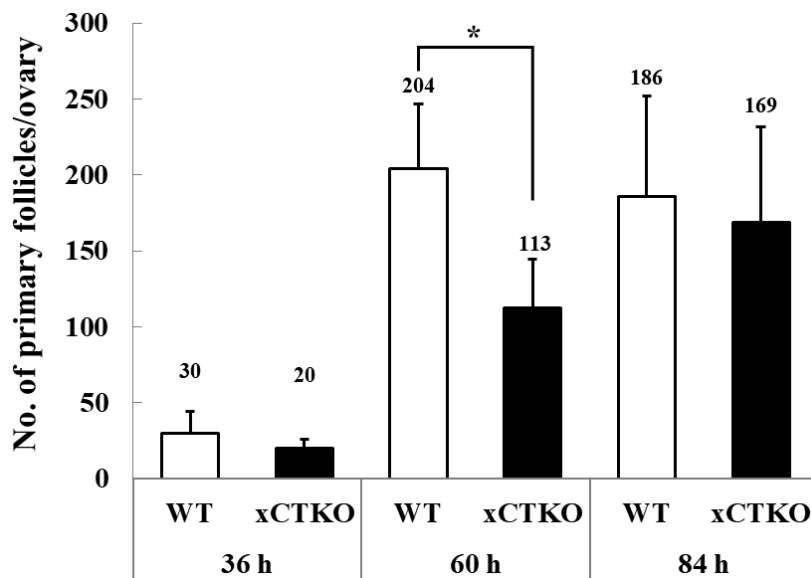


Figure 14. The numbers of primordial follicles (A) and primary follicles (B) per ovary from WT and xCTKO mice at 36-84 h after birth. Each bar is expressed as the mean \pm SD ($n = 5-8$). An asterisk indicates significant difference between two groups ($P < 0.05$). The number of primordial follicles peaked at 60 h. xCTKO groups tended to be higher number of primordial follicles than WT groups at each time point. xCTKO group showed lower number of primary follicles than WT groups at 60 h.

第 2 節

ウエスタンブロッティングによる卵巣内
オートファジー関連タンパク質発現量の解析

【目的】

性成熟後に備蓄卵胞数が高い xCTKO マウスの卵では、オートファジーを抑制する mTOR の mRNA 発現量が低く、卵や卵巣でオートファジーが活性化している可能性が考えられた。飢餓マウスでもみられた新生仔期のオートファジーの誘導が、xCTKO マウスでもおきているのかを調べるため、オートファジー関連タンパク質の発現量を解析した。

【材料および方法】

供試動物

第 2 章第 1 節【材料および方法】供試動物に示したように使用した。

卵巣の回収

第 2 章第 1 節【材料および方法】卵巣の回収に示したように行った。

卵巣サンプルの調製

第 1 章第 3 節【材料および方法】卵巣サンプルの調製に示したように行った。

ゲルの作成

第 1 章第 3 節【材料および方法】ゲルの作成に示したように行った。

ウエスタンブロッティング

第 1 章第 3 節【材料および方法】ウエスタンブロッティングに示したように行った。

画像取得および解析

第 1 章第 3 節【材料および方法】画像取得および解析に示したように行った。

統計分析

第 1 章第 3 節【材料および方法】統計分析に示したように行った。

【結果】

LC3II/I 比は、WT では、36、60 時間に比べ、84 時間で高くなったが、xCTKO では、全ての時間で WT の 84 時間と同等のレベルに維持された(Figure 15, B)。また、xCTKO では、36、60 時間において同時間の WT に比べ有意に高く、84 時間では高い傾向がみられた。LAMP-1 は、各時間で、ほぼ同等に維持され、各時間の実験区間に有意な差はみられなかった(Figure 16, B)。p62 は、WT では、

各時間で同等に維持されたが、xCTKO では、60 時間で高まり同時時間の WT と比べて高い傾向がみられた(Figure 17, B)。また、36 時間と 84 時間の xCTKO では、同時時間の WT に比べて低い傾向がみられた。Caspase-9 の発現は、両区ともに時間が進むにつれて低下した(Figure 18, B)。xCTKO では、60 時間で WT に比べ低い傾向がみられた。Caspase-3 の発現は、すべての実験区で検出されなかった(Figure 19)。

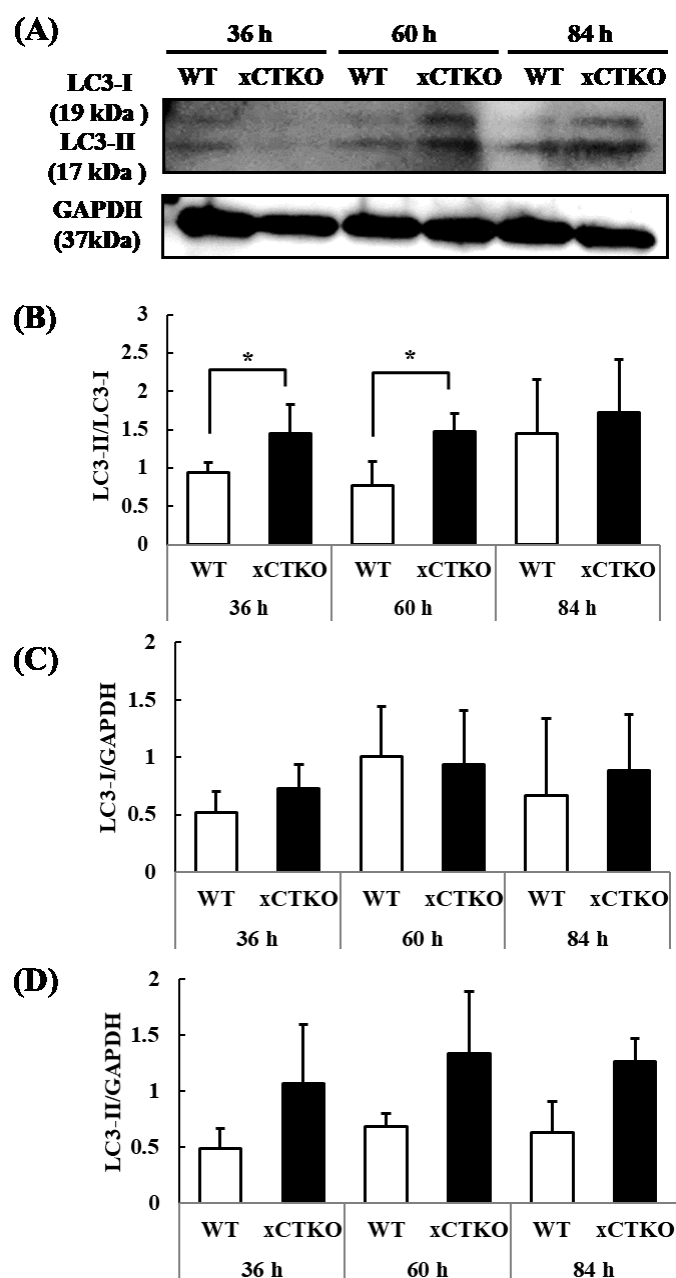


Figure 15. Protein expression of the autophagy marker LC3B in ovaries from WT and xCTKO groups at 36-84 h after birth. (A) Immunoblotting bands pattern of LC3-I and LC3-II. Relative expression levels of LC3-II/LC3-I (B) and LC3-I/GAPDH (C), and LC3-II/GAPDH ratio (D) are shown in bar graphs. GAPDH was used as an internal control. Each bar is expressed as mean \pm SE ($n = 4$). Asterisks indicate significant differences between two groups ($P < 0.05$). xCTKO groups showed higher expression ratio of LC3-II/LC3-I than WT groups at 36 and 60 h.

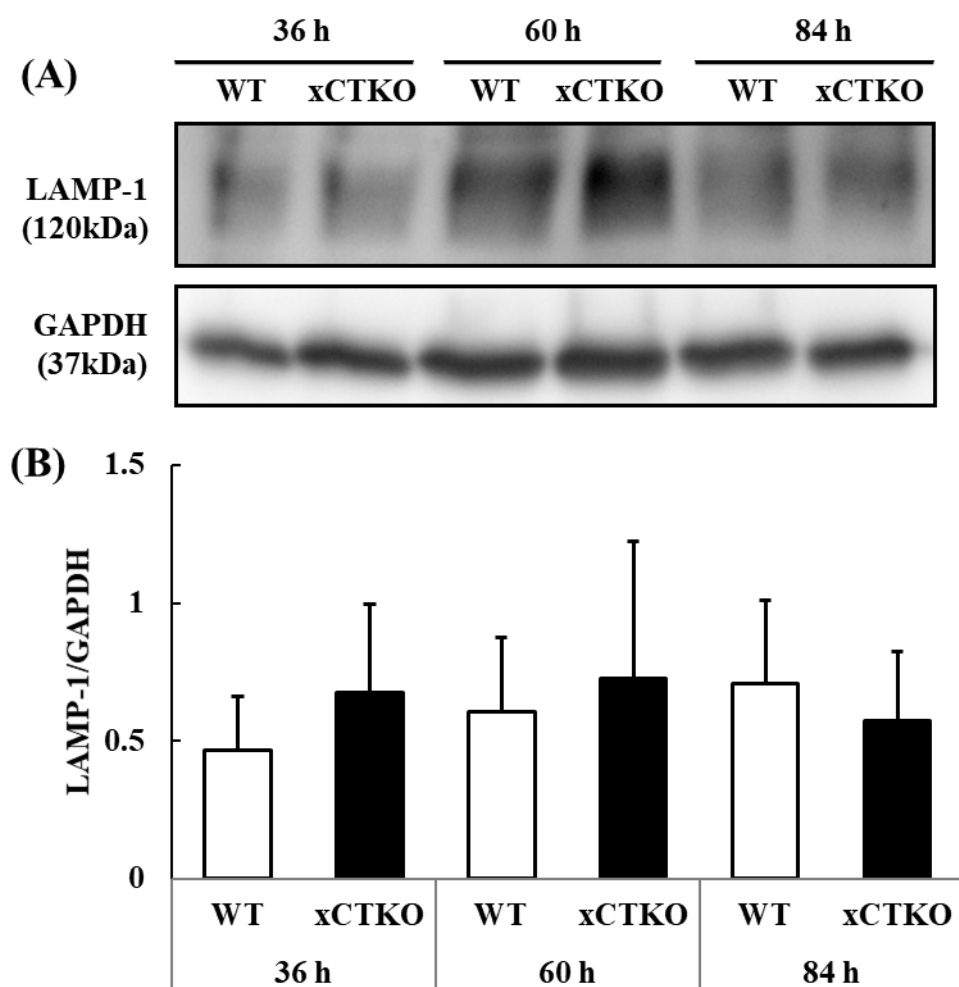


Figure 16. Protein expression of the lysosomal marker LAMP-1 in ovaries from WT and xCTKO groups at 36-84 h after birth. (A) Immunoblotting bands pattern of LAMP-1. (B) Relative expression levels of LAMP-1 are shown in bar graphs. GAPDH was used as an internal control. Each bar is expressed as the mean \pm SE ($n = 3$). The LAMP-1 expression levels were tended to be higher in the xCTKO groups compared with the WT groups at 36 and 60 h.

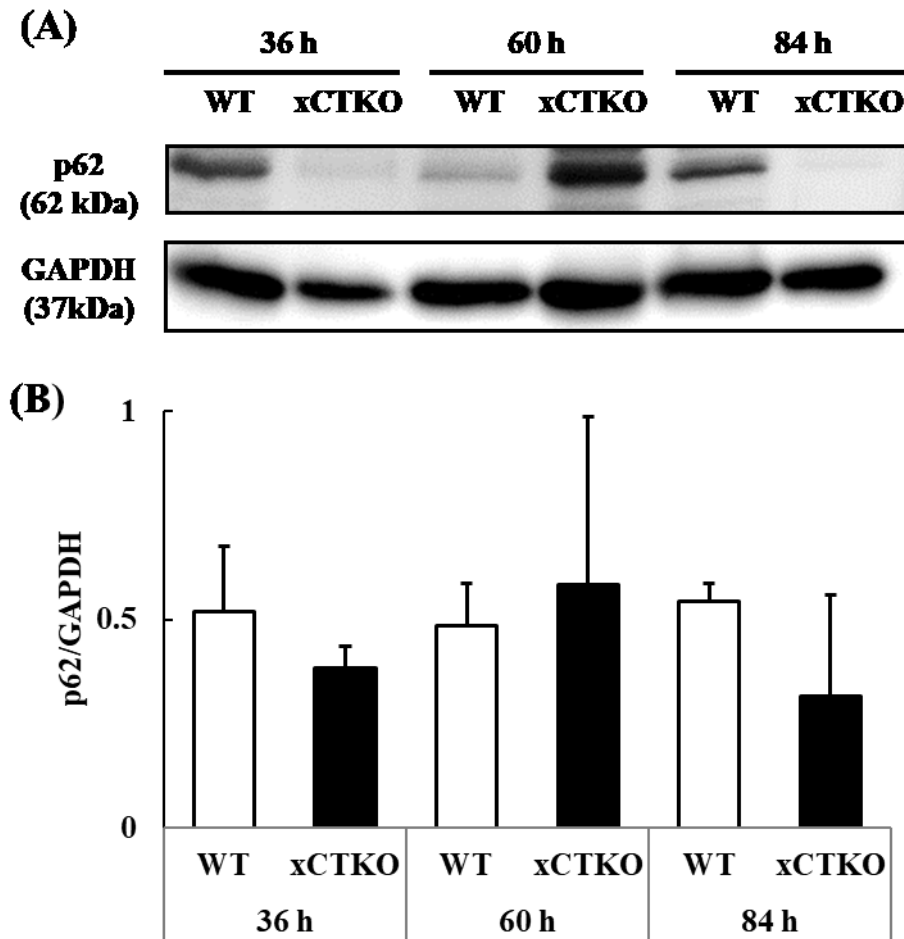


Figure 17. Protein expression of the selective autophagy substrate p62 in ovaries from WT and xCTKO groups at 36-84 h after birth. (A) Immunoblotting bands pattern of p62. (B) Relative expression levels of p62 are shown in bar graphs. GAPDH was used as an internal control. Each bar is expressed as the mean \pm SE ($n = 3$). The p62 expression levels were tended to be lower in the xCTKO groups compared with the WT groups at 36 and 84 h.

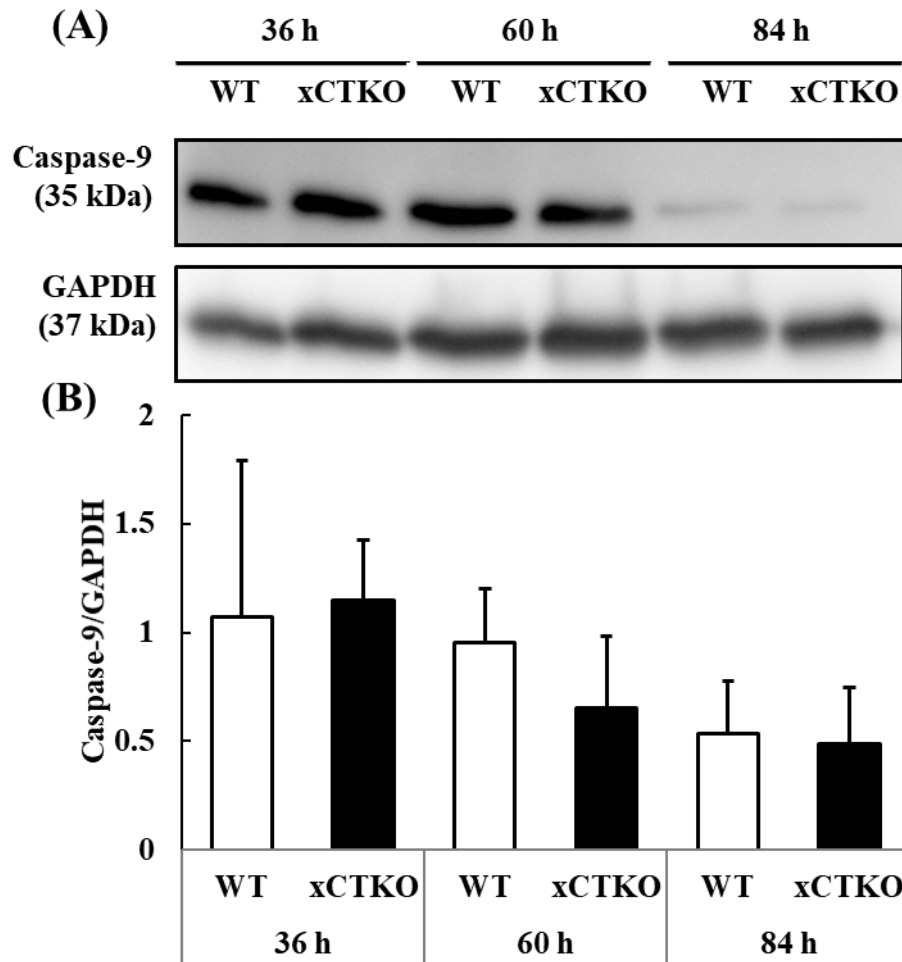


Figure 18. Protein expression of the apoptosis marker Caspase-9 in ovaries from WT and xCTKO groups at 36-84 h after birth. (A) Immunoblotting bands pattern of Caspase-9. (B) Relative expression levels of Caspase-9 are shown in bar graphs. GAPDH was used as an internal control. Each bar is expressed as the mean \pm SE ($n = 3$). The Caspase-9 expression level was tended to be lower in the xCTKO group compared with the WT group at 60 h.

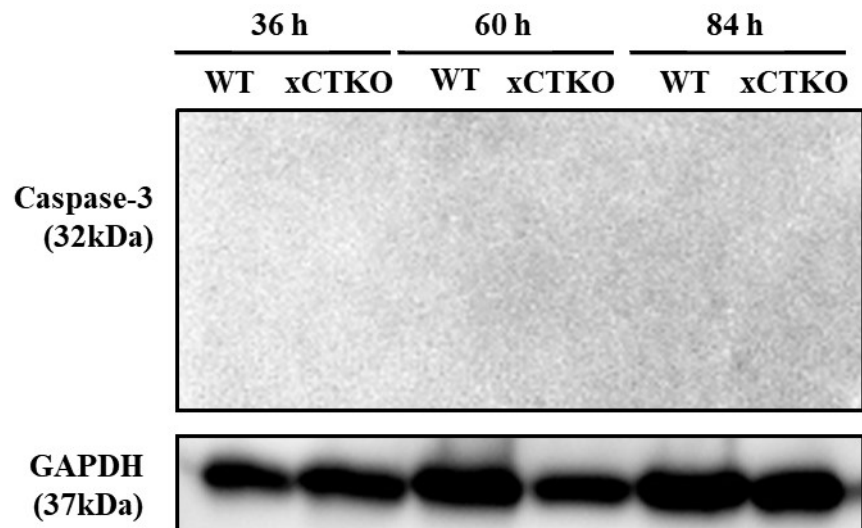


Figure 19. Protein expression of the apoptosis marker Caspase-3 in ovaries from WT and xCTKO groups at 36-84 h after birth. GAPDH was used as an internal control. Caspase-3 was not detected in any group.

第 3 節

原始卵胞形成期でのシスチン・グルタミン酸
トランスポーター阻害剤投与による原始卵胞数
上方制御の検討

【目的】

第2章の第1節および第2節の結果から、xCTKO マウスでは、WT に比べ定常的にオートファジー活性が高く、原始卵胞形成の促進と一次卵胞への移行の抑制により原始卵胞数が高まっているものと考えられ、xCT の阻害により新生仔期の卵胞数を制御できる可能性が示唆された。そこで xCT 特異的阻害剤 Sulfasalazine(SSZ)の投与が、新生仔期の原始卵胞数や一次卵胞数に影響を及ぼすのか検討した。

【材料および方法】

供試動物

第1章第1節【材料および方法】供試動物に示したように使用した。

xCT 阻害剤の腹腔内投与

xCT 特異的阻害剤 SSZ は、古くから炎症性腸疾患および関節リウマチの臨床治療に用いられている。この薬剤は、リンパ腫、前立腺癌および乳癌細胞株を含む、種々の癌細胞においてシスチン枯渇をもたらし、*in vitro* および *in vivo* の両方で、それらの細胞増殖停止をもたらすことが実証されている[96]。また、癌細胞への 100-400 μM の SSZ の添加培養は、オートファジーの誘導効果を示した[96]。

ラットを用いた生殖・発生毒性試験における母親への経口投与での無毒性投与量[135]および、Dang ら[136, 137]の方法を参考に、SSZ の投与量を設定した。

SSZ(東京化成工業)を 0.09 mg/g を 24 時間おきに 3 回腹腔内投与した。具体的には、生後 6、30、54 時間で 1 ml の生理食塩水で希釈した 4.5 mg の SSZ を実体顕微鏡下でキャピラリーを用い 20 $\mu\text{l/g}$ 腹腔内投与した。対照区には、同量の生理食塩水を投与した同腹仔の雌マウスを用い、識別のため尾をわずかに切断した。

卵巣の回収

第1章第1節【材料および方法】卵巣の回収に示したように行い、生後 60 時間で少なくとも 2 匹以上の母親由来の同腹仔から 5 匹以上の個体の卵巣を回収した。

卵巣組織固定および包埋

第1章第2節【材料および方法】卵巣組織固定および包埋に示したように行った。

連続切片の作製

第 1 章第 2 節【材料および方法】連続切片の作製に示したように行った。

連続切片の HE 染色

第 1 章第 2 節【材料および方法】連続切片の HE 染色に示したように行った。

原始卵胞数の評価

第 1 章第 2 節【材料および方法】原始卵胞数の評価に示したように行った。

統計分析

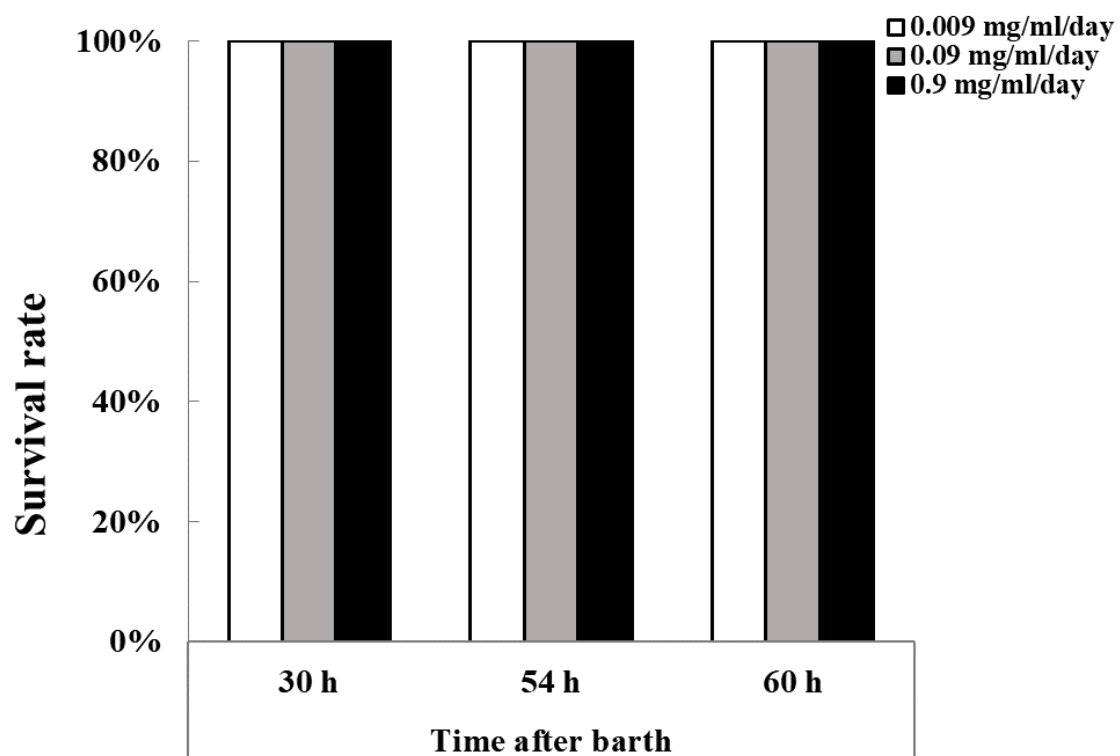
第 1 章第 2 節【材料および方法】統計分析に示したように行った。

【結果】

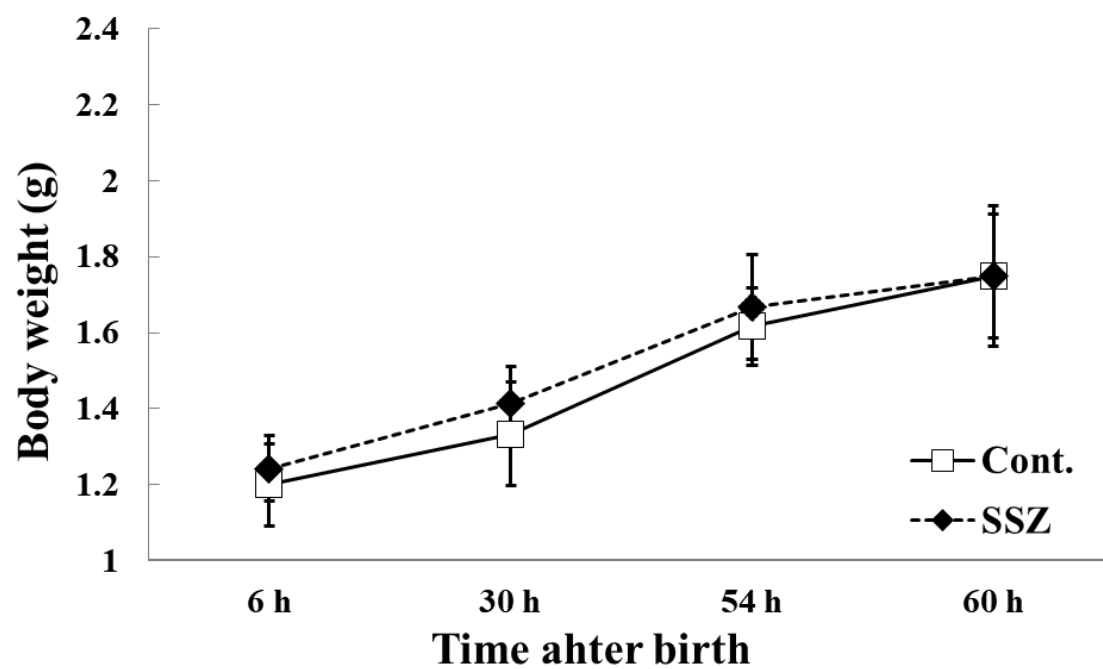
雌雄の新生仔マウスへの SSZ の投与は、投与濃度に設定した 0.09 mg/g の 10 倍の濃度で投与した場合でも 60 時間までの生存率に影響を与えなかったことから十分に許容されるものと考えられた(Supplementary Figure 4)。SSZ 投与区では SSZ 懸濁液と同色の褐色尿が確認されており、SSZ は血中に取り込まれていることが推測された。

平均体重は、両区間で有意な差はみられなかった(Supplementary Figure 5)。

平均原始卵胞数は、SSZ 区では、Cont.区に比べて増加する傾向がみられた(SSZ 5939 ± 416.8 vs. Cont. 5797 ± 1196.2 ; Figure 20, A)。一次卵胞数は、SSZ 区では、Cont. に比べ低下する傾向がみられた(SSZ 176 ± 75.6 vs. Cont. 204 ± 42.3 ; Figure 20, B)。



Supplementary Figure 4. Survival rates of neonatal mice treated with SSZ (n = 2-3). All treated mice survived.



Supplementary Figure 5. The mean body weight of cont. and SSZ mice at 6-60 h after birth. Each value is expressed as mean \pm SD ($n = 6-7$). The mean body weight of each group was not different.

Figure 20.

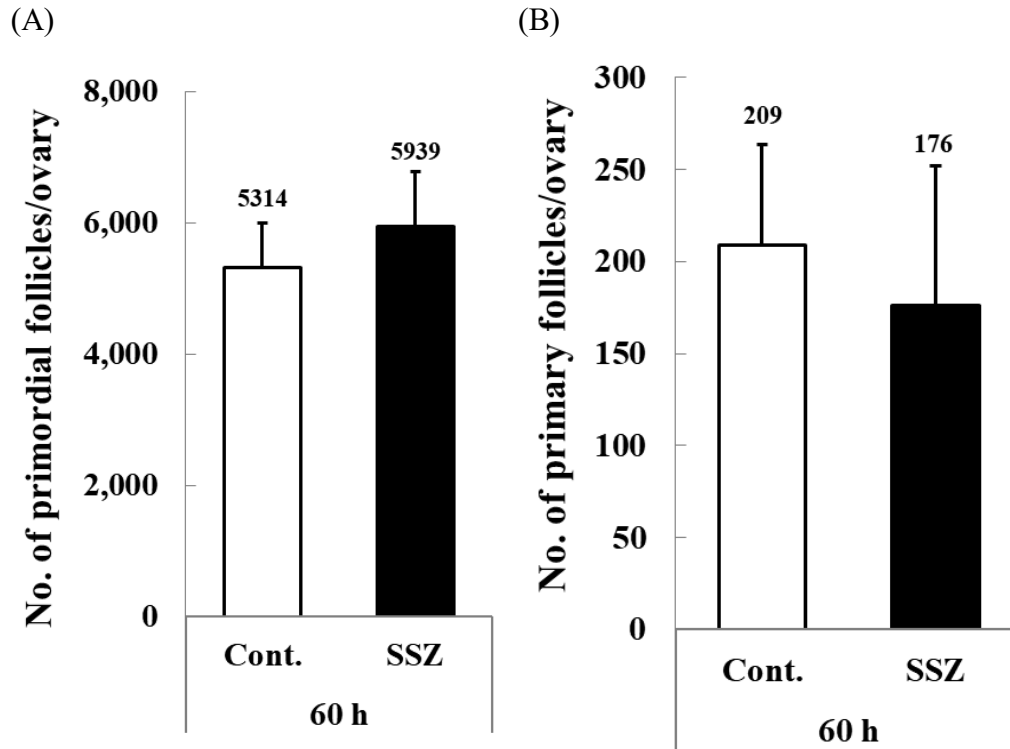


Figure 20. The numbers of primordial follicles (A) and primary follicles (B) per ovary from Cont. and SSZ mice at 60 h after birth. Each bar is expressed as the mean \pm SD ($n = 4-8$). There were no significant differences between Cont. and SSZ group in the numbers of primordial follicles and primary follicles.

考 察

本章では、性成熟後において WT に比べて高い原始卵胞数を示す xCTKO マウスは、新生仔期での原始卵胞形成数が高いのかを確認した。原始卵胞数の解析から、xCTKO マウスの原始卵胞数は、原始卵胞数のピークである 60 時間およびその前後 36、84 時間において、有意ではないものの同時間の WT に比べて高い傾向が確認された。また、一次卵胞数は同時間の 60 時間で有意に低く、他の時間でも低い傾向がみられた。また、オートファジー関連タンパク質では、xCTKO の LC3II/I 比は、各時間において同時間の WT に比べて定常的に高く維持されていた。xCTKO の p62 発現は、60 時間で高まり同時間の WT と比べて高い傾向であったが、36、84 時間では、同時間の WT に比べて低い傾向がみられた。xCTKO では、Caspase-9 の発現は、60 時間で 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 に比べ定常的に高く、それはアポトーシスの誘導には作用するのではなく、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、xCT 欠損により原始卵胞形成は促進される傾向があることが明らかとなった。また、xCT 欠損により、オートファジー活性も WT に比べ、定常的に高いことが明らかとなった。しかし、60 時間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維持には、原始卵胞形成の促進だけでなく、一次卵胞への移行あるいは、すべてが卵母細胞死すると考えられている最初の卵胞リクルートに向かう原始卵胞集団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、飢餓による原始卵胞数の増加機構と同様ではないと考えられた。また、xCT 欠損マウスでの一次卵胞への移行の有意な抑制は、以前の排卵卵子の結果と同様に、mTOR 活性の低下により引き起こされている可能性が高いと考えられた。xCT の欠損は、グルタチオン含量の低下による酸化ストレスの増大や、mTOR 経路を介して[133]、細胞にオートファジーを誘導すると報告されている。xCT がシスチンを取り込む代わりに、細胞外に排出しているグルタミン酸は[138]、主に中性アミノ酸トランスポーターの LAT1 などによりロイシンと交換輸送される。このロイシンは mTORC1 を強く活性化するため、タンパク質合成を促し、一方でオートファジーの抑制に働くと考えられる。xCT が直接ロイシンの取り込みを制御はしないが、ロイシンの交換基質であるグルタミン酸の供給バランスを変更することで、原始卵胞の発育あるいは、卵胞上皮細胞の増殖能を変化させている可能性がある。

最後に、xCT の特異的阻害剤である SSZ を新生仔 WT マウスに投与することで原始卵胞数を上方制御できるかを検討した。60 時間における SSZ の原始卵胞

数は対照区に比べ増加する傾向がみられた。一方、一次卵胞数は、SSZ 区で減少する傾向がみられた。WT マウスへの SSZ の投与により、xCTKO マウスに類似した原始卵胞数と一次卵胞数の傾向が確認された。

老齢 xCTKO マウスでみられた原始卵胞数の維持には、新生仔期の比較的高い原始卵胞数の寄与に加え、原始卵胞から一次卵胞へのリクルートの抑制など生殖寿命の過程において原始卵胞の消費を抑えるメカニズムが存在しているものと考えられた。

本章から、xCT の欠損や阻害により原始卵胞形成やオートファジー誘導の促進がみられた。ここまです踏まえ、第 3 章ではオートファジー特異的誘導剤を用いて原始卵胞形成とオートファジー機構の直接的な関与を証明し、原始卵胞の上方制御を検討した。加えて、性成熟後の生殖機能もまた調査した。

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

緒 論

第 1 章では、生後 36 時間までの授乳制限が、少なくとも 36 時間での原始卵胞数を増加させることを明らかにした。しかし、ほとんどの授乳制限マウスは 36 時間以降に死亡するため、その後の卵巣機能の解析が困難であった。一方、第 2 章では原始卵胞数が最も高くなる 60 時間において xCTKO マウスは野生型に比べて高い原始卵胞数を持つことを明らかにした。さらに、双方のマウスでは、卵巣内のオートファジー機構の活性化が確認された。これらのことから、原始卵胞形成期のオートファジーの誘導が、原始卵胞数を高める可能性が考えられた。そこで、原始卵胞形成期において、1) 薬剤等を用いた積極的なオートファジーの誘導により、原始卵胞形成が促進され原始卵胞数は上方制御されるのか、2) 新生仔期の薬剤誘導による原始卵細胞数の制御が、その後の個体の生殖能にどのような影響をあたえるのかを明らかにすることを本章の目的とした。

これまでにオートファジーの誘導系には、1 章での飢餓条件、あるいは酸化ストレスや小胞体ストレスなどのストレス誘導によるもの、またはラパマイシンなどの mTORC1 阻害剤が一般的に用いられてきた。しかしながらこれらの系はオートファジーに対する特異性に乏しく、オートファジー以外の多数の生物学的プロセスを調節するため、直接的にオートファジーの影響を評価することは難しい。

本章では、Shoji-Kawata ら[139]によって同定されたオートファジー特異的誘導ペプチド Tat-Beclin 1 の改良型である Tat-Beclin 1 D-11 を用いた。Beclin 1 はオートファジー小胞の核形成に関与し[140]、いくつかの補因子を用いて、脂質キナーゼ Vps-34 タンパク質を調節し、Beclin 1-Vps34-Vps15 コア複合体の形成を促進し、それによってオートファジーを誘導する蛋白質である。Tat-Beclin 1 は、生体に存在する Beclin 1 のオートファジー誘導領域と、HIV-Tat タンパク質の融合ペプチドであり、*in vitro* および *in vivo* の両方でオートファジーを誘導オートファゴソームおよびオートリソソームの数を増加させることが示されており、他の細胞内経路に影響することのないオートファジー誘導剤である。Tat-beclin 1 ペプチドの毎日の投与は、新生仔および成体マウスの両方において十分許容され、2 週間投与された新生仔マウスは、正常な体重増加、運動活性、腎機能および臨床状態、ならびに心臓、腎臓、脳、肝臓の正常な組織像を有していた[139]。Tat-beclin 1 ペプチド処理された 3 ヶ月齢のマウスでもそれらは正常であった。また、5 日齢の授乳期マウスの脳では、Tat-beclin 1 の投与により p62 レベルの減少が報告されていた[139]。したがって、Tat-beclin 1 の投与は、新生仔マウスの末梢組織において、生体機能に害を及ぼすことなく、オートファジーが誘導されていることが推測される。

すべての哺乳類において、胎生期あるいは新生仔期のごく初期に確立された原始卵胞プールは、その個体の二次性徴の形成、さらに性成熟後の排卵のための卵胞発育へのリクルートのポテンシャルを決定づけているものと考えられている[10, 11]。原始卵胞プールの早期枯渇は、妊孕能の低下または不妊をもたらすことはよく知られており、この卵巣予備能(卵巣の健康な卵胞および卵母細胞の総数)を高める、あるいは維持する試みは雌の生殖の成功とその寿命に重要と考えられている。しかしながら、実際に卵巣予備能の変動が、マウスやウシやヒトなどで、その後の生殖機能やその寿命を制御するかは明確に知られていない。特に、原始卵胞形成期での原始卵胞プールの制御が与える影響についての報告は少ない。

本章では、新生仔マウスへのオートファジー誘導剤の投与により、原始卵胞数が上方制御されるのかを検証するために、出生直後から 60 時間までの原始卵胞数の増加期に新生仔マウスへオートファジー誘導剤 **Tat-beclin 1-D-11** の腹腔内投与を行い、原始卵胞数の評価ならびにオートファジー関連タンパク質の発現量を解析した。さらに、性成熟後の生殖能を評価するために、投与マウスを飼育し、2 ヶ月齢で各発育ステージの卵胞数を評価し、2 および 6 ヶ月齢で雄と交配し、出産率および産仔数を評価した。

第 1 節

連続切片を用いた卵巣内原始卵胞数 および一次卵胞数の評価

【目的】

飢餓および xCTKO マウスでは、新生仔卵巢では、高い原始卵胞数とオートファジーの誘導が確認され、オートファジーが原始卵胞形成を促進する可能性が示された。本節では、新生仔期のオートファジー特異的誘導により原始卵胞数を上方制御できるのかを、新生仔マウスにオートファジー誘導剤を投与し、その卵巢内卵胞数を解析することで検証した。

【材料および方法】

供試動物

第 1 章第 1 節【材料および方法】供試動物に示したように使用した。

Tat-beclin 1 D-11 ペプチドの腹腔内投与

オートファジーを誘導するために、Shoji-Kawata ら[139]の方法を参考に Tat-beclin1 D-11 ペプチド(NBP2-49888; Novus Biologicals)をマウスの体重 1g 当たり 0.02 mg で 24 時間おきに 3 回腹腔内投与した。具体的には、生後 6、30、54 時間においてミリ Q 水で 500 μ M に希釈した Tat-beclin 1-D11 ペプチドを、実体顕微鏡下でキャピラリーを用いてマウスの体重 1g 当たり 10.69 μ l 腹腔内投与した。Tat-beclin1 D-11 の新生仔期マウスへの腹腔内投与は、対照区と比べ、各時間での平均体重や死亡率(データに示さず)に有意な差はなく、毒性はみられなかった。従って、試薬の投与方法や容量設定は新生仔マウスに十分に許容されるものと考えられた。対照区には、同量の生理食塩水を投与した同腹仔の雌マウスを用い、識別のために尾をわずかに切断した。投与以外の時間は、新生仔期マウスは通常通り、母親マウスと同居させた。

卵巢の回収

第 1 章第 1 節【材料および方法】卵巢の回収に示したように行い、生後 36、60、84 時間で卵巢を回収した。

卵巢組織固定および包埋

第 1 章第 2 節【材料および方法】卵巢組織固定および包埋に示したように行った。

連続切片の作製

第 1 章第 2 節【材料および方法】連続切片の作製に示したように行った。

連続切片の HE 染色

第 1 章第 2 節【材料および方法】連続切片の HE 染色に示したように行った。

原始卵胞数の評価

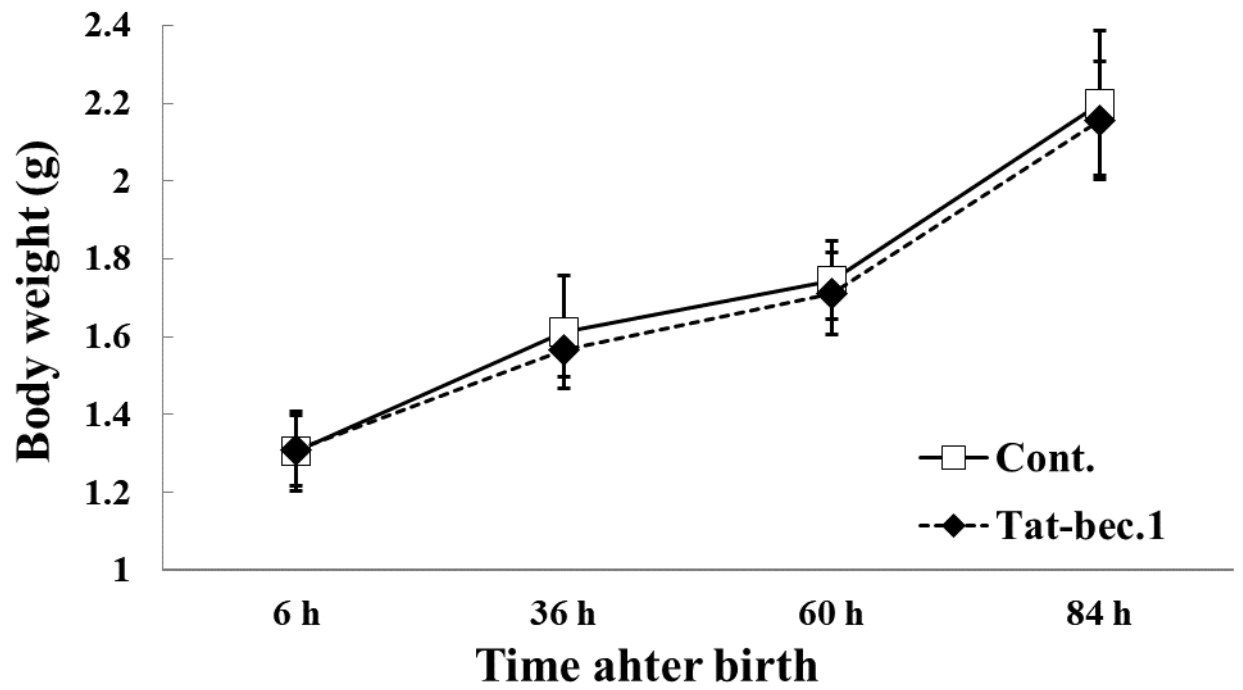
第 1 章第 2 節【材料および方法】原始卵胞数の評価に示したように行った。

統計分析

第 1 章第 2 節【材料および方法】統計分析に示したように行った。

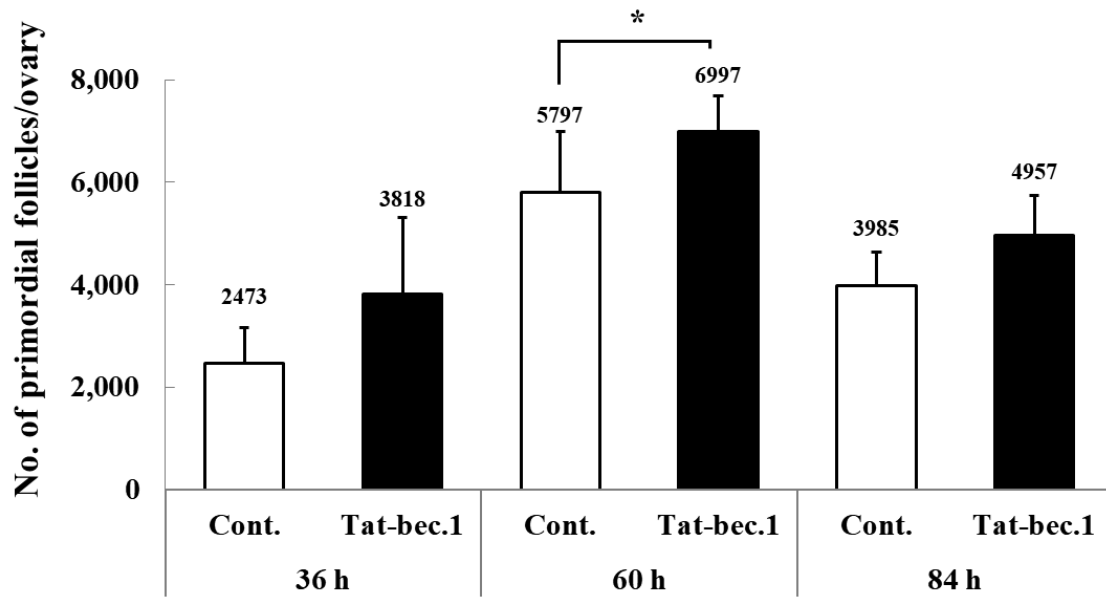
【結果】

体重は、両区に有意な差はみられなかった(Supplementary figure 6)。Tat-bec.1 区の平均原始卵胞数は、全ての時間で、同時間の対照区に比べ高い傾向がみられ、特に 60 時間では約 1.2 倍と有意に高くなった(Tat-bec.1 $6,997 \pm 684.0$ vs. cont. $5,797 \pm 1196.2$; Figure 21, A)。また統計学的に有意ではないが、36 時間で約 1.5 倍、84 時間で約 1.2 倍と対照区に比べ高い傾向がみられた(36 h; Tat-bec.1 $3,818 \pm 1,483.7$ vs. cont. $2,473 \pm 686.3$, 84 h; Tat-bec.1 $4,957 \pm 788.5$ vs. cont. $3,985 \pm 656.4$)。一方、Tat-bec.1 区の平均一次卵胞数は、36 時間では同等だったが(Tat-bec.1 31 ± 8.7 vs. cont. 30 ± 14.4 ; Figure 21, B)、60 時間と 84 時間では、対照区に比べ低い傾向がみられた(60 h; Tat-bec.1 152 ± 56.2 vs. cont. 204 ± 42.3 , 84 h; Tat-bec.1 161 ± 50.0 vs. cont. 186 ± 66.2)。



Supplementary Figure 6. The mean body weight of Cont. and Tat-bec.1 mice at 6-84 h after birth. Each value is expressed as mean \pm SD ($n = 8-54$). The mean body weight of each group was not different.

(A)



(B)

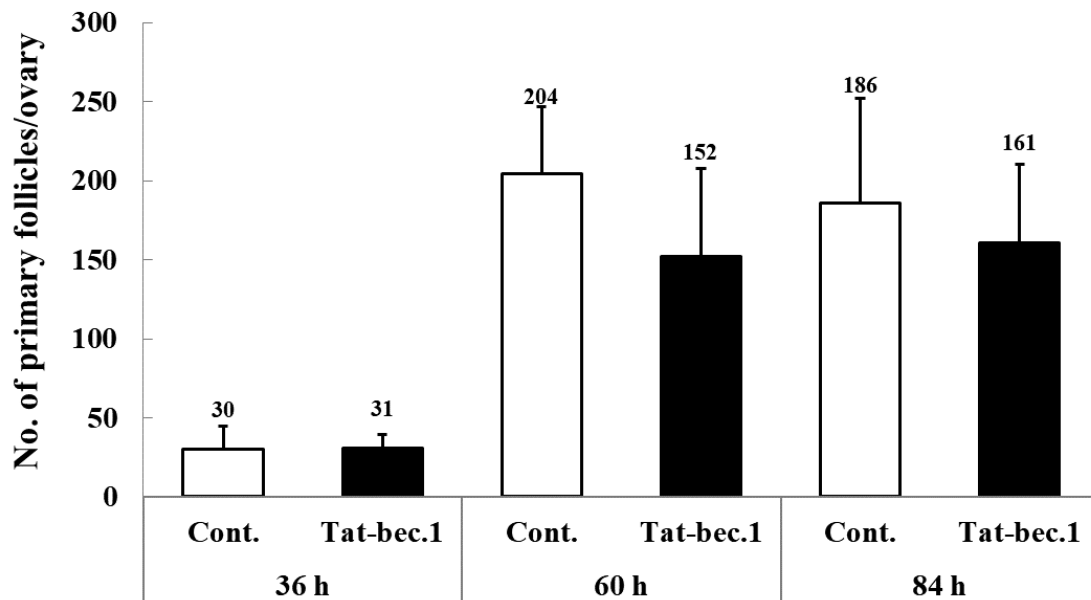


Figure 21. The numbers of primordial follicles (A) and primary follicles (B) per ovary from Cont. and Tat-beclin1 D-11(Tat-bec.1) treated mice at 36-84 h after birth. Each bar is expressed as the mean \pm SD ($n = 5-8$). An asterisk indicates significant difference ($P < 0.05$). The primordial follicle numbers in Tat-bec.1 groups were increased by about 1.5-fold at 36 h and about 1.2-fold at 60 h compared with each control group.

第 2 節

ウエスタンブロッティングによる卵巣内
オートファジー関連タンパク質発現量の解析

【目的】

第3章の第1節から新生仔マウスへのオートファジー誘導剤の投与が、原始卵胞数を高めることが明らかになった。高い原始卵胞数が卵巣へのオートファジー誘導によるものかを明確にするため、投与マウスの卵巣にオートファジーが誘導されているのかオートファジー関連タンパク質の動態を調べることで明らかにした。

【材料および方法】

供試動物

第1章第1節【材料および方法】供試動物に示したように使用した。

Tat-beclin 1 D-11 ペプチドの腹腔内投与

第3章第1節【材料および方法】Tat-beclin 1 D-11 ペプチドの腹腔内投与に示したように行った。

卵巣の回収

第3章第1節【材料および方法】卵巣の回収に示したように行った。

卵巣サンプルの調製

第1章第3節【材料および方法】卵巣サンプルの調製に示したように行った。

ゲルの作成

第1章第3節【材料および方法】ゲルの作成に示したように行った。

ウエスタンブロッティング

第1章第3節【材料および方法】ウエスタンブロッティングに示したように行った。

画像取得および解析

第1章第3節【材料および方法】画像取得および解析に示したように行った。

統計分析

第1章第3節【材料および方法】統計分析に示したように行った。

【結果】

Tat-bec.1 区の LC3-II/LC3-I 比は、全ての時間で、同時間の対照区に比べ有意

に高くなった($P<0.05$, Figure 22, B)。一方、LAMP-1 の発現量は、対照区では各時間で同等に維持されていたが、Tat-bec.1 区では 84 時間で低下した。また Tat-bec.1 区は、同時時間の対照区に比べ、36、60 時間では高く、84 時間では低くなる傾向がみられた(Figure 23, B)。p62 の発現量は、対照区では、各時間で同等に維持されたが、Tat-bec.1 区では時間経過に伴い低下し、60、84 時間では、同時時間の対照区に比べ低い傾向がみられた(Figure 24, B)。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 区では、時間が進むにつれて低下する傾向がみられた(Figure 25, B)。Caspase-3 は、すべての実験区で検出されなかった(Figure 26)。これらの結果から、原始卵胞形成期でのオートファジー誘導剤の投与は、卵巣内にオートファジーを誘導し、その誘導は、アポトーシスを誘起するのではなく、細胞の生存に働いているものと考えられた。

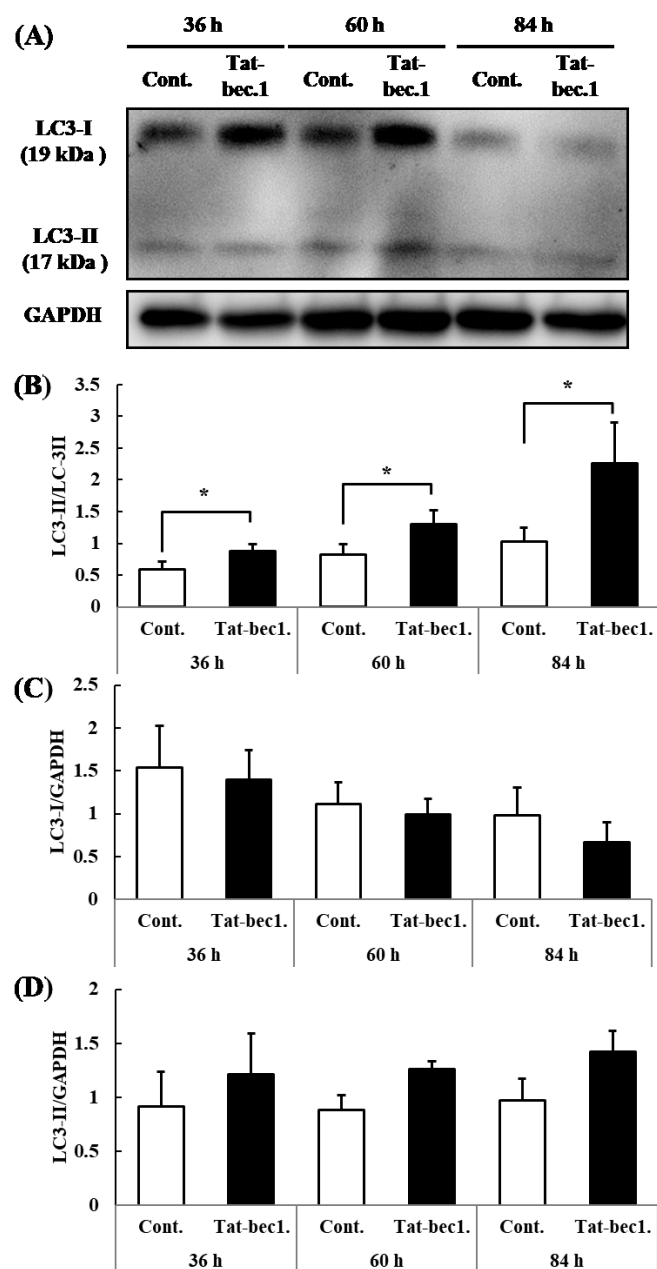


Figure 22. Protein expressions of the autophagy marker LC3B in ovaries from Cont. and Tat-bec.1 groups at 36-84 h after birth. (A) Immunoblotting bands pattern of LC3-I and LC3-II. Relative expression levels of LC3-II/LC3-I (B) and LC3-I/GAPDH (C), and LC3-II/GAPDH ratio (D) are shown in bar graphs. GAPDH was used as an internal control. Each bar is expressed as mean \pm SE ($n = 3$). Asterisks indicates significant differences between two groups ($P < 0.05$). Tat-bec.1 groups showed higher expression ratio of LC3-II/LC3-I than control groups at each time.

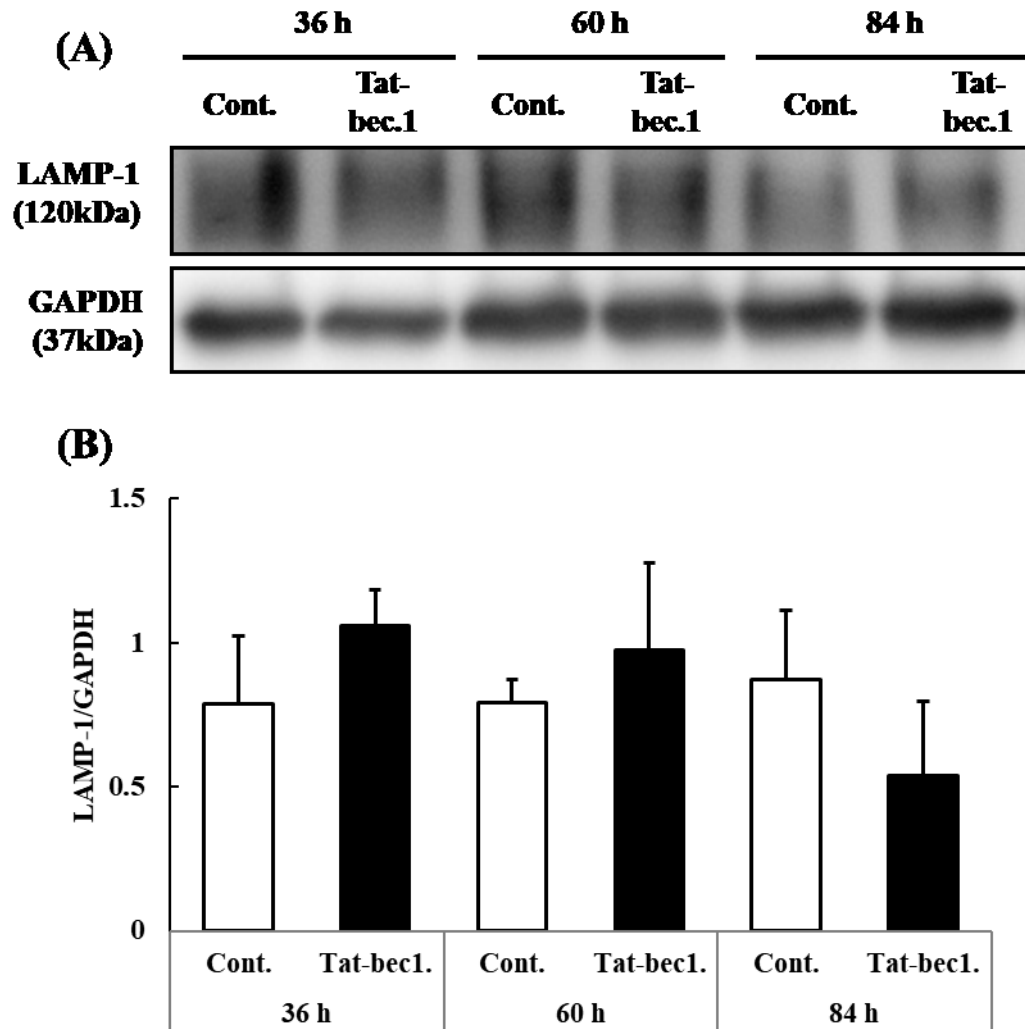


Figure 23. Protein expression of the lysosomal marker LAMP-1 in ovaries from Cont. and Tat-bec.1 groups at 36-84 h after birth. (A) Immunoblotting bands pattern of LAMP-1. (B) Relative expression levels of LAMP-1 are shown in bar graphs. GAPDH was used as an internal control. Each bar is expressed as the mean \pm SE ($n = 3$). The LAMP-1 expression levels were tended to be higher in the Tat-bec.1 groups compared with the Cont. groups at 36 and 60 h.

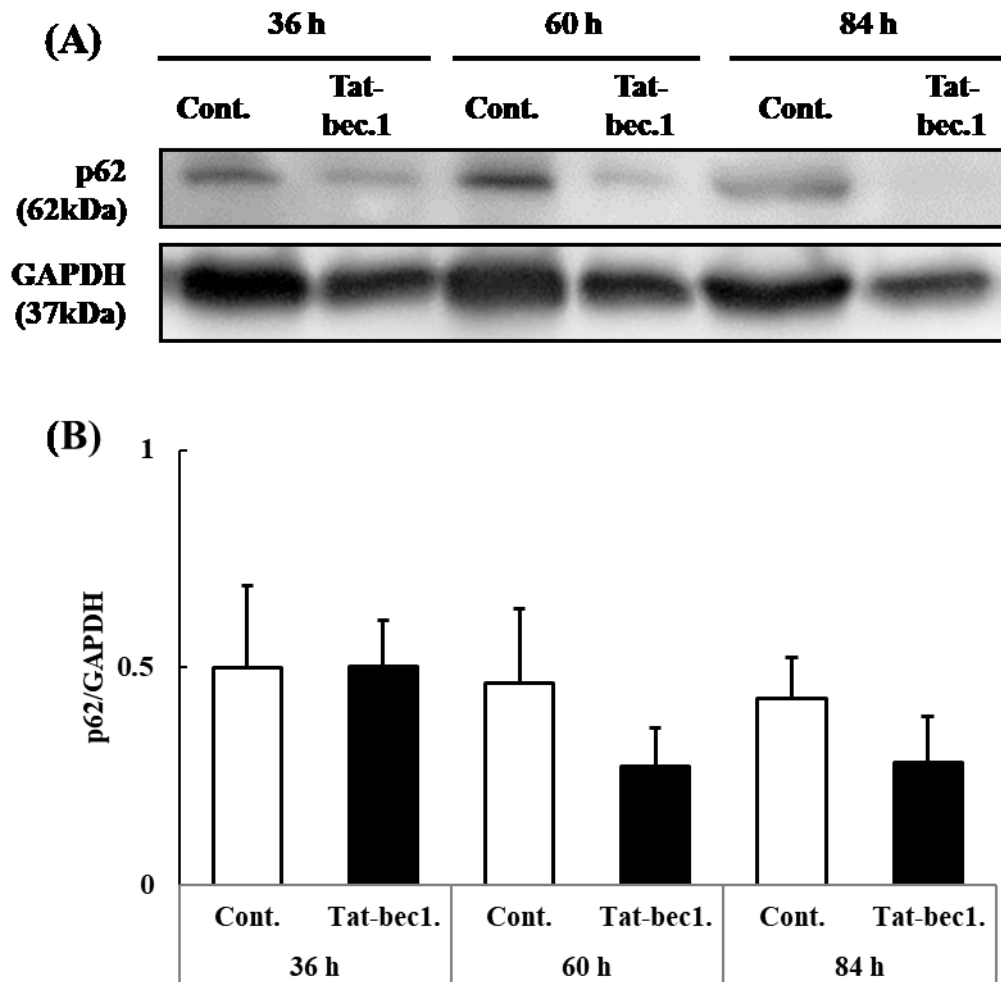


Figure 24. Protein expression of the selective autophagy substrate p62 in ovaries from Cont. and Tat-bec.1 groups at 36-84 h after birth. (A) Immunoblotting bands pattern of p62. (B) Relative expression levels of p62 are shown in bar graphs. GAPDH was used as an internal control. Each bar is expressed as the mean \pm SE (n = 3). The p62 expression levels were tended to be lower in the Tat-bec.1 groups compared with the Cont. groups at 60 and 84 h.

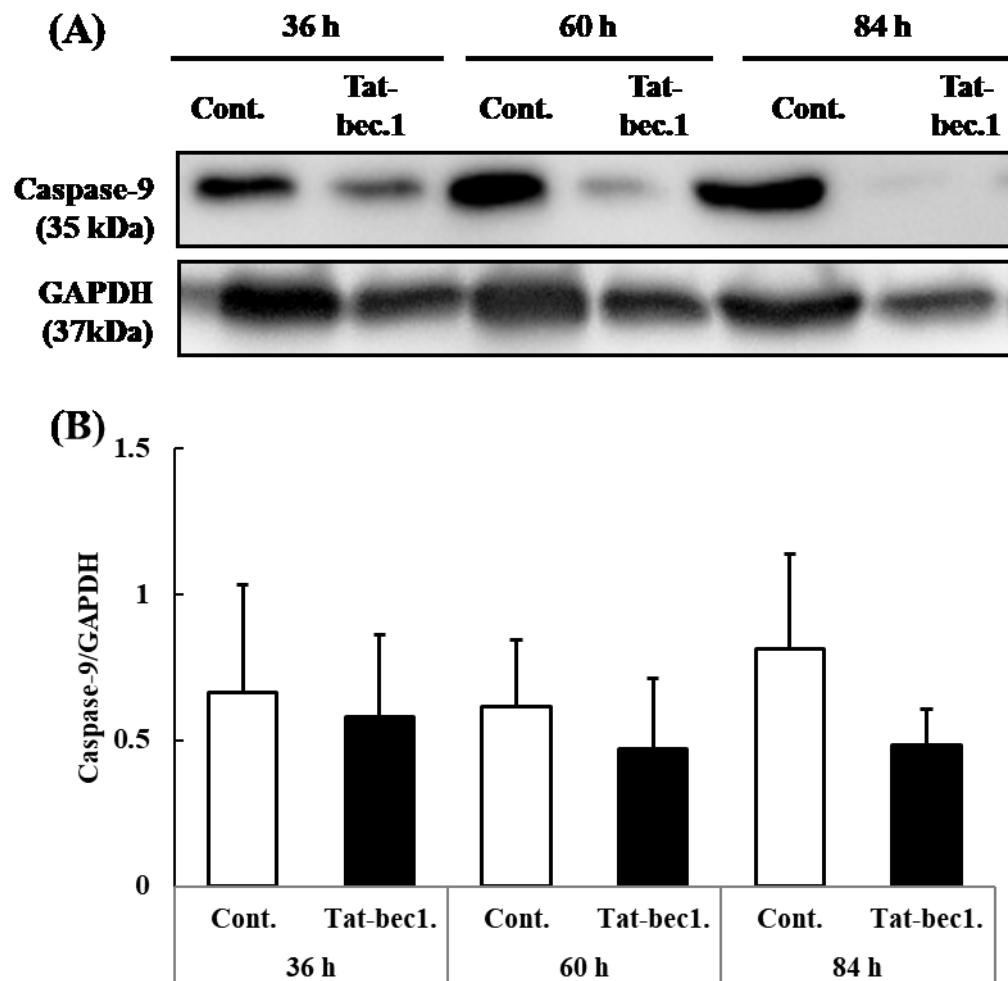


Figure 25. Protein expression of the apoptosis marker Caspase-9 in ovaries from Cont. and Tat-bec.1 groups at 36-84 h after birth. (A) Immunoblotting bands pattern of Caspase-9. (B) Relative expression levels of Caspase-9 are shown in bar graphs. GAPDH was used as an internal control. Each bar is expressed as the mean \pm SE ($n = 3$). The Caspase-9 expression levels were tended to be lower in the Tat-bec.1 groups compared with the Cont. groups at each time.

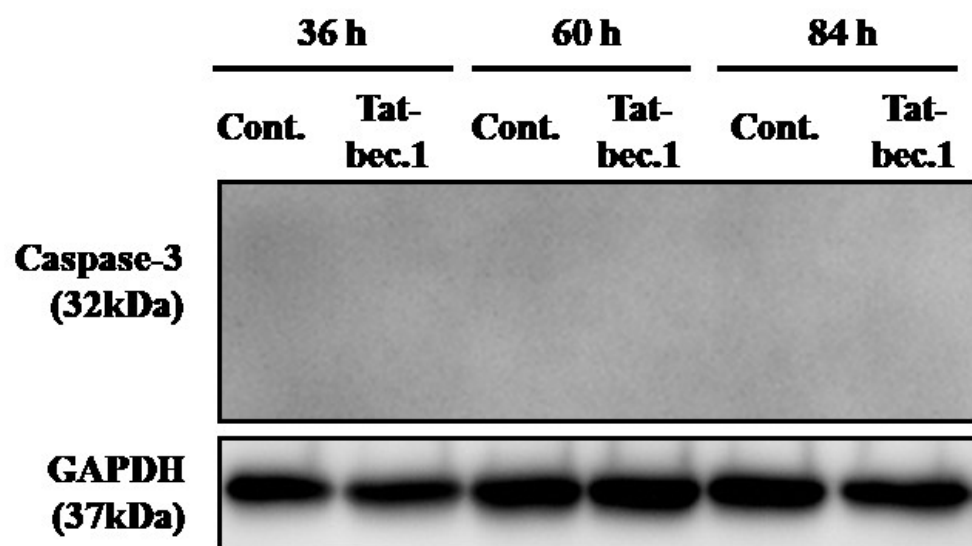


Figure 26. Protein expression of the apoptosis marker Caspase-3 in ovaries from Cont. and Tat-bec.1 groups at 36-84 h after birth. GAPDH was used as an internal control. Caspase-3 was not detected in any group.

第 3 節

性成熟後の生殖能の評価

【目的】

第3章の第1章および第2章から、新生仔マウスへのオートファジー誘導剤の投与は、卵巣へのオートファジー誘導を介し原始卵胞数を上方制御することが検証された。そこで、高められた原始卵胞数が、その個体の生殖能に影響を及ぼすのかを明らかにするために、2ヶ月齢と6ヶ月齢においてその生殖能を評価した。

【材料および方法】

供試動物

第1章第1節【材料および方法】供試動物に示したように使用した。

Tat-beclin 1 D-11 ペプチドの腹腔内投与

第3章第1節【材料および方法】Tat-beclin 1 D-11 ペプチドの腹腔内投与に示したように行った。

投与後の飼育

投与後のマウスは、1ヶ月齢で離乳された後、明期12時間(6:00-18:00)、暗期12時間(18:00-翌6:00)の明暗サイクル、室温 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ で飼育した。食餌(マウス・ラット・ハムスター飼育用飼料 MF、オリエンタル酵母工業株式会社)および飲料水を自由摂取とした。

交配試験

各区の雌マウス1匹ずつを、3-6ヶ月齢の2匹の雄と14日間ペアリングした。その後、雌個体を取り出し、雌の産仔数および性比を評価した。交配試験は、同一雌個体で、2および6ヶ月齢において行なった。

生殖能の評価

各月齢での、妊娠率、得られた産仔数の平均値および性比を調べた。これらを生殖能として評価した。

21日齢での産仔の体重評価

得られた産仔は21日齢で離乳し、母親マウス当たりの総産仔数に対しての生育率および平均体重を評価した。

統計分析

母親の産仔数および体重、21 日齢での産仔の体重は、平均値 \pm SD で示した。データは、エクセル統計ソフトを用いて Tukey の一元配置分散分析により、同一時間の実験区間で平均値の差を検定した。有意水準 $P<0.05$ で統計的に有意とした。

【結果】

2 および 6 ヶ月齢での母親マウスの平均体重は、同月齢において、実験区間に有意な差はみられなかった(Table 1)。妊娠率は、各実験区ともに、同月齢間で有意な差はみられず、ほとんどのマウスが出産した(93.3%-100%; Table 1)。Tat-bec.1 区の平均産仔数は、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(2-month; Tat-bec.1 6.7 ± 0.3 vs. cont. 5.4 ± 0.6 , 6-month; Tat-bec.1 8.4 ± 0.4 vs. cont. 6.8 ± 0.8 ; Table 1)。Tat-bec.1 区の産仔の生育率は、同月齢の対照区に比べ低くなる傾向がみられた(2-month; Tat-bec.1 70.4% vs. cont. 77.3%, Tat-bec.1 78.0% vs. cont. 85.3%; Table 1)。産仔の性比は、実験区間に有意な差はみられなかった(Figure 27)。産仔の 21 日齢での体重は、2 ヶ月齢の Tat-bec.1 区で、対照区に比べ、雌雄で低い傾向がみられ(Male; Tat-bec.1 11.9 ± 3.8 vs. cont. 9.5 ± 3.2 , Female; Tat-bec.1 0.7 ± 3.1 vs. cont. 9.9 ± 2.8 ; Figure 28)、全体の体重は有意に低くなった(Tat-bec.1 11.4 ± 3.5 vs. cont. 9.7 ± 2.9 , $P<0.05$)。一方、6 ヶ月齢においては、Tat-bec.1 区で対照区に比べ、雄の体重は有意に低いものの(Tat-bec.1 8.7 ± 2.0 vs. cont. 9.1 ± 1.0 , $P<0.05$)、雌の体重は高い傾向がみられ(Tat-bec.1 9.1 ± 1.4 vs. cont. 7.6 ± 1.6)、全体の体重は同等になった(Tat-bec.1 8.9 ± 1.7 vs. cont. 8.4 ± 1.5 , $P<0.05$)。

Table 1. Fertility in 2-month and 6-month of age after sexual maturity from Cont. and Tat-bec.1 mice.

Experimental group n=			Body weight (mean±SD)	Fertility index (%)	No. of offspring (mean±SD)	Lactation index (pups/Day21)
2-month	Control	19	19.8 ± 0.3	94.7(18/19)	5.4 ± 0.6 ^a	77.3%
	Tat-bec.1	23	20.1 ± 0.3	94.1(22/23)	6.7 ± 0.3 ^b	70.4%
6-month	Control	15	26.7 ± 0.3	100(15/15)	6.8 ± 0.8	85.3%
	Tat-bec.1	15	26.1 ± 0.4	93.3(14/15)	8.4 ± 0.4	78%

a, b : Values with difference superscript letters are significantly different at the same age ($P < 0.05$).

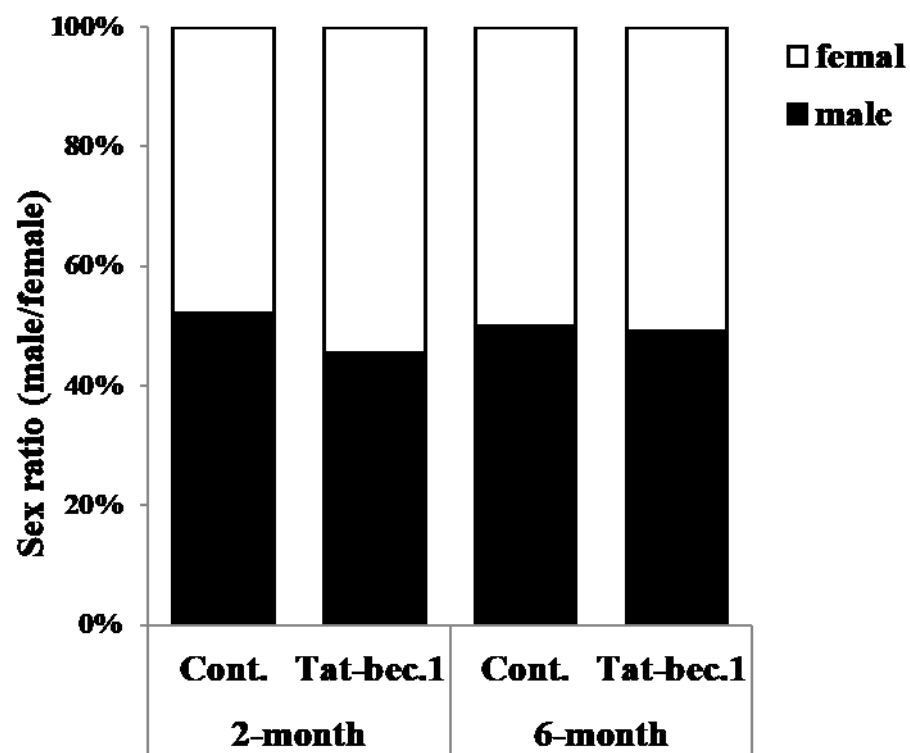


Figure 27. Sex ratios of offspring from Cont. and Tat-bec.1 mice.

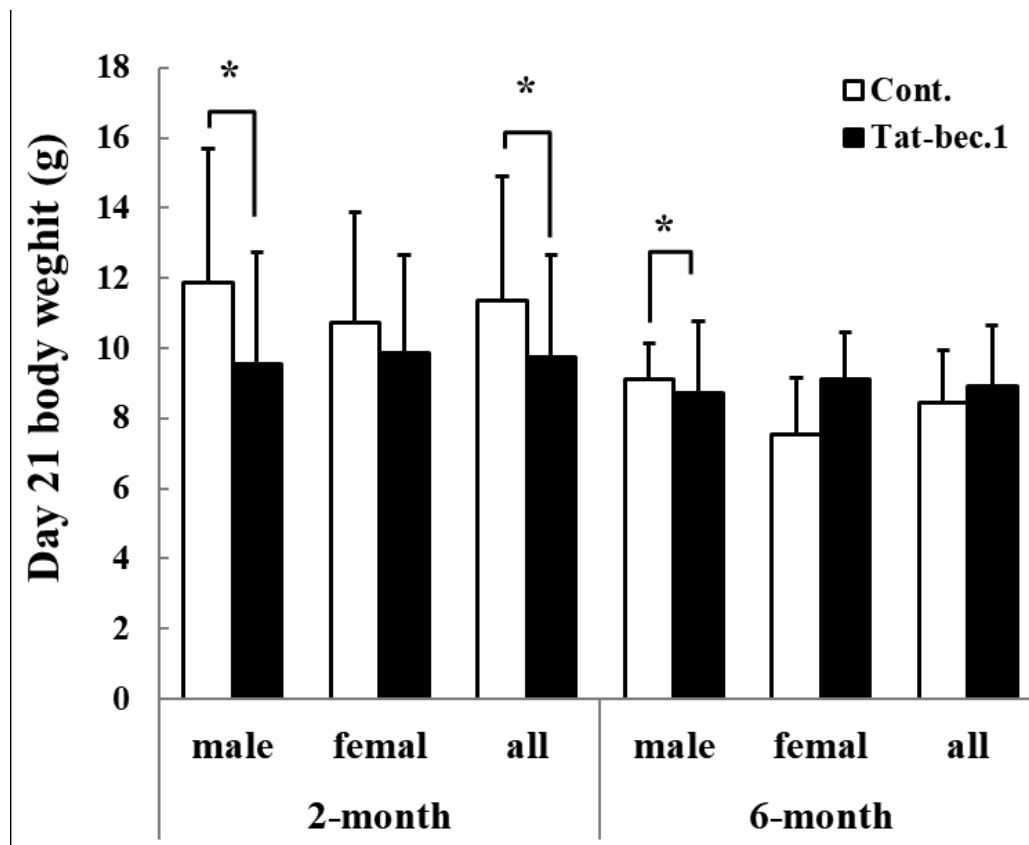


Figure 28. Twenty-one-day-old body weights of the offspring from Cont. and Tat-bec.1 mice.

第 4 節

連続切片による性成熟後の各発育ステージ の卵胞数の評価

【目的】

ここまでの結果から、新生仔期のオートファジー誘導剤の投与により生殖能を向上させることが示された。新生仔期に上方制御された原始卵胞数が性成熟後も維持されることにより、これらの生殖能の向上がみられたのかを確かめるために、2ヶ月齢における各ステージの卵巣内卵胞数を評価した。

【材料および方法】

供試動物

第1章第1節【材料および方法】供試動物に示したように使用した。

Tat-beclin 1 D-11 ペプチドの腹腔内投与

第3章第1節【材料および方法】Tat-beclin 1 D-11 ペプチドの腹腔内投与に示したように行った。

投与後の飼育

第3章第3節【材料および方法】投与後の飼育に示したように行った。

ホルモンによる卵胞発育処理

FSH様作用を示す妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG、日本全薬工業株式会社)を用いた。ホルモンは使用時に0.1 ml中に5 IUになるように生理食塩水を加えた。また、卵胞発育処理のために2ヶ月齢の雌マウスにPMSG(5 IU/匹)を卵巣回収の48時間前に腹腔内注射した。

卵巣の回収

卵胞発育処理後の雌マウスを頸椎脱臼後に、速やかに開腹し、左右の卵巣を回収した。ろ紙の上で脂肪を除去し、卵巣重量を測定した。

卵巣組織固定および包埋

第1章第2節【材料および方法】卵巣組織固定および包埋に示したように行ったが、ブアン固定液および、メタノール、キシレン系列は1.5ml エッペンチューブに1 ml ずつ分注して用いた。

連続切片の作製

第1章第2節【材料および方法】連続切片の作製に示したように行った。

連続切片のHE染色

第1章第2節【材料および方法】連続切片のHE染色に示したように行った。

各発育ステージの卵胞数の評価

光学顕微鏡(原始および一次卵胞 10×10 倍, 二次卵胞からグラーフ卵胞 10×20 倍)を用いて卵胞数の評価を行った。卵胞は、原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞、グラーフ卵胞に分類した。卵胞上皮細胞、顆粒膜細胞と卵母細胞の形態、顆粒層の厚さ、卵胞腔の大きさをもとに以下のように分類を行った [108](Supplementary figure 8)。

- ① 原始卵胞：ほぼ卵母細胞のみ。一層で少数の平たい卵胞上皮細胞のみに囲まれている直径 20 μm 以下のもの(Supplementary figure 7, A)。
- ② 一次卵胞：一層の立方状の卵胞上皮細胞のみに囲まれているもの(Supplementary figure 7, A)。
- ③ 二次卵胞：2 層以上の顆粒層細胞に囲まれ、腔がないもの(Supplementary figure 7, A)。
- ④ 初期胞状卵胞：腔が存在し、直径が 221-330 μm のもの(Supplementary figure 7, B)。
- ⑤ 胞状卵胞：腔が存在し、直径が 331-370 μm のもの(Supplementary figure 7, C)。
- ⑥ グラーフ卵胞：顆粒層細胞から卵丘-卵母細胞複合体が完全に分離しているもの(Supplementary figure 7, D)。

計測は原始および一次卵胞を 20 倍の対物レンズで、二次からグラーフ卵胞は 10 倍の対物レンズを用いて行った。重複を避けるために卵核が一番大きく見えた時点でカウントし、核がみられないものは、卵胞の直径が一番大きいものをカウントした。

統計分析

すべてのデータは平均 \pm SE として表した。データは、エクセル統計ソフトを用いて Tukey の一元配置分散分析により、同一時間の実験区間で平均値の差を検定した。有意水準 $P<0.05$ で統計的に有意とした。

【結果】

ホルモン注射による卵胞発育処理後の卵巣重量に有意な差はみられなかった (Table 2)。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 倍高かった (Figure 29; Primordial follicles; Tat-bec.1 1444.2 ± 83.0 vs. cont. 987.2 ± 59.7 , Primary follicles; Tat-bec.1 350.3 ± 17.6 vs. cont. 234.2 ± 19.5)。また二次卵胞数と胞状卵胞数は、対照区に比べ高い傾向がみられた (Secondary follicles; Tat-bec.1 99.6 ± 8.5 vs. cont. 86.3 ± 12.9 , Antral follicles;

Tat-bec.1 21.8 ± 2.9 vs. cont. 16.7 ± 3.7)。一方グラフ卵胞は、対照区と有意な差はみられなかった(Tat-bec.1 2.5 ± 0.5 vs. cont. 2.9 ± 0.6)。Tat-bec1.1 区の総卵胞数は、対照区に比べ有意に高くなった(Tat-bec.1 1918.3 ± 89.8 vs. cont. 1307.3 ± 82.5)。

Table 2. The ovarian weights after superovulation treatments from Cont. and Tat-bec.1 mice.

Experimental group		Body weight (mean±SD)	Ovarian weight (mean±SD)
2-month	Control	20.0 ± 0.7	4.5 ± 0.1
	Tat-bec1	19.7 ± 0.7	4.8 ± 0.6

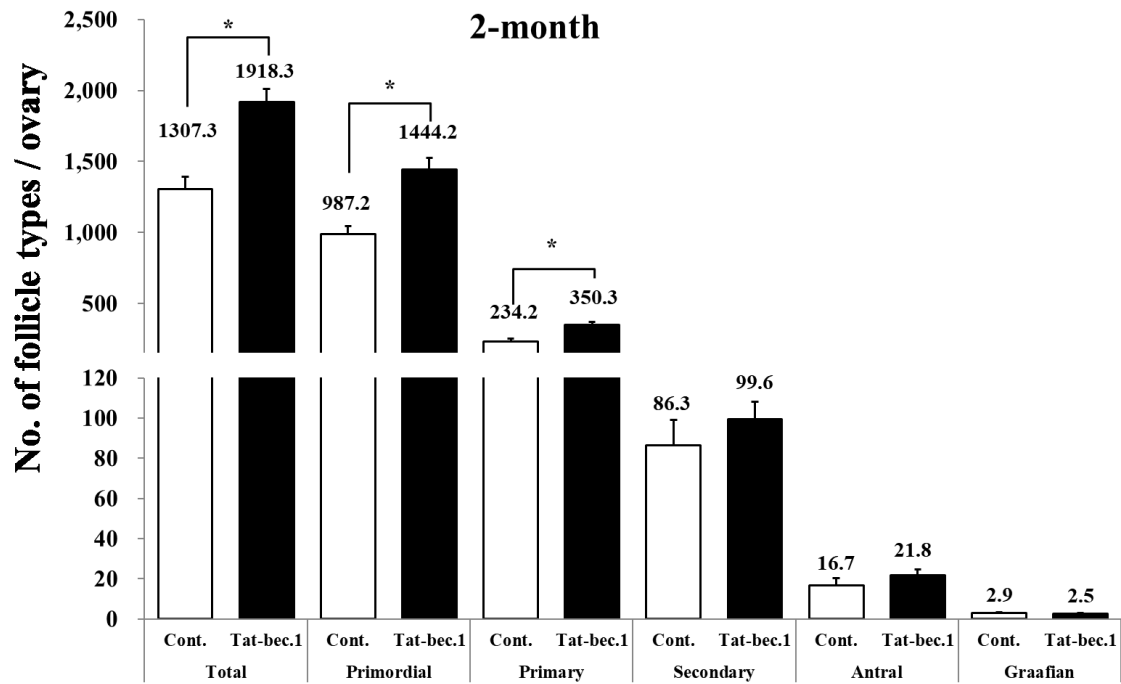
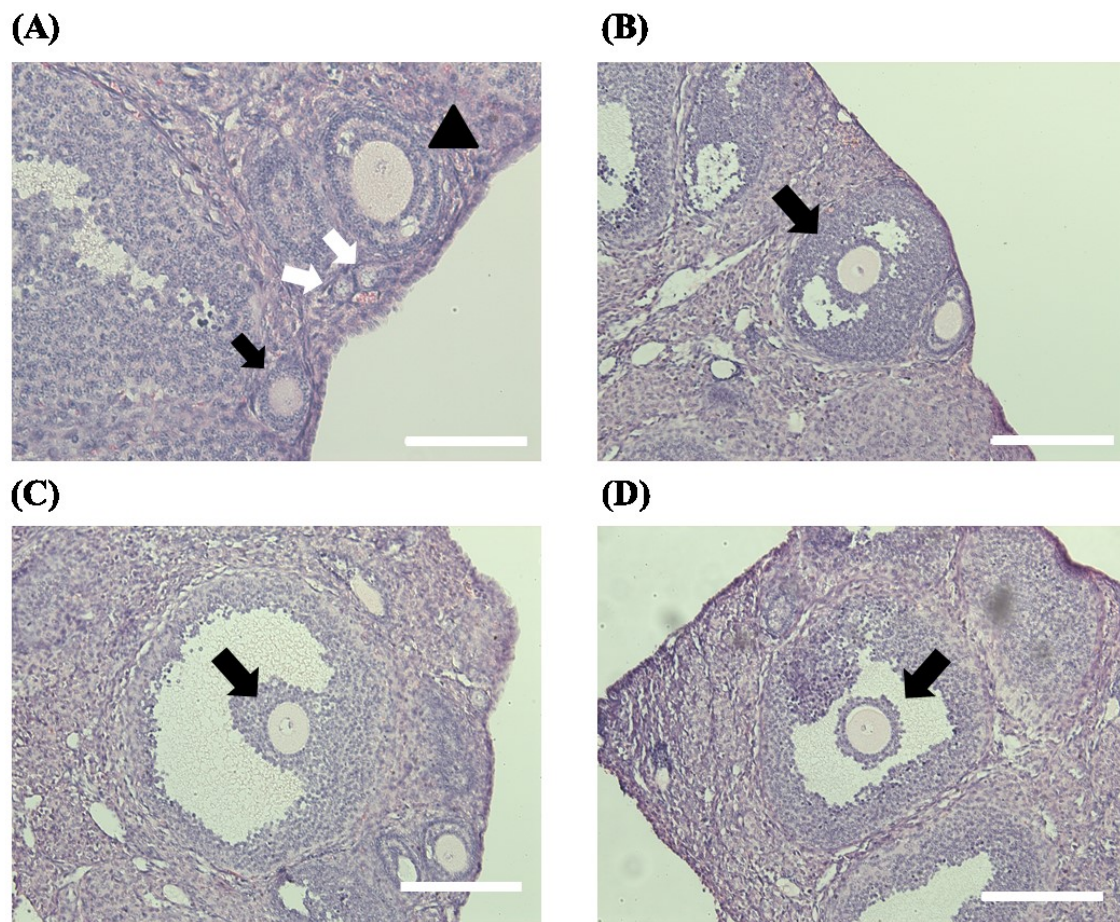


Figure 29. The number of follicles at each developmental stage from Cont. and Tat-bec.1 group 2-month-old mice. Asterisks indicate significant differences between two groups ($P < 0.05$). Each bar is expressed as mean \pm SD ($n = 10-12$). The primordial follicles number in the Tat-beclin1 group was about 1.5 times higher than that of the Cont. group. The total follicles number in the Tat-bec. 1 group was higher than that of the Cont. group.



Supplementary figure 7. The classification of follicular stages used for analysis. (A) Primordial follicles were defined as an oocyte surrounded by a layer of squamous flattened follicular epithelial cells (white arrows). Primary follicles possessed an oocyte surrounded by a single layer of cuboidal follicular epithelial cells (black arrow). Secondary follicles were surrounded by more than one layer of cuboidal granulosa cells, with no visible antrum (black arrowhead). Bar = 50 μ m. (B) Early antral follicles have emerging antral spaces (arrow), whilst antral follicles (C) possessed a clearly defined antral space (arrow). (D) Graafian follicles were the largest of the follicular types and possessed a defined cumulus granulosa cell layer (arrow). Bar = 100 μ m.

考 察

本章の結果から、Tat-beclin1 D-11 の投与は、原始卵胞数のピークである 60 時間とその前後 36 時間と 84 時間で原始卵胞数を対照区に比べ高めた。特に原始卵胞数のピークである 60 時間では有意に高くなった。一方、Tat-bec.1 区の一次卵胞数は、有意ではないものの 60、84 時間で、対照区に比べ低い傾向がみられた。

オートファジー関連タンパク質に関しては、Tat-beclin1 D-11 の投与は、全ての時間で LC3-II/LC3-I 比を有意に高め、卵巣にオートファジーを誘導した。また、それを反映するように p62 の発現量が Tat-bec.1 区では、時間経過に伴い低下し、60、84 時間では、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。また、第 1 章の第 3 節の局在解析の結果も合わせると、卵巣内の卵胞上皮細胞および卵母細胞でもアポトーシスが抑制されていると考えられた。しかしながら、アポトーシス実行因子である Caspase-3 は投与の有無にかかわらず検出されておらず、原始卵胞数を有意に制御しているのはアポトーシスの抑制ではなくオートファジーの誘導によるものと考えられた。

これらのことは、1 章の飢餓区でみられた原始卵胞数の増加とオートファジーの誘導と同様のことがおきており、原始卵胞の形成が促進されているものと考えられた。また、卵母細胞でのアポトーシス抑制傾向がみられたことから、オートファジーの誘導は細胞の生存に働いているものと考えられる。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。

そこで、原始卵胞数の上方制御が、性成熟後の生殖能に影響を与えるのか、上方制御され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、各実験区ともに、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、同月齢に比べ 2 ヶ月齢で有意に高く、6 ヶ月齢では高い傾向がみられた。産仔の 21 日齢体重は、対照区に比べ低い傾向がみられ、これは産仔数が高いために、個々の仔マウスに行きわたる授乳量が減るためと予想された。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高める傾向にあ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発育処理後の

卵巣重量および卵胞数の評価を行った。卵巣重量に有意な差はみられなかったものの、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。新生仔期の原始卵胞数の上方制御とその後の生殖寿命についての限られた報告が存在する。報告では、*c-kit/bcl-2* を過剰発現させたマウスは、出生 8 日齢で野生型に比べ有意に高い原始卵胞を持つが、出生後 30-60 日までに、卵胞数の有意な差は失われる。*Bcl-2* の過剰発現では出生時に原始卵胞の数を増加させるが、上方制御された原始卵胞数がその後の生殖寿命で維持されないことが示されている[141]。この報告は、高い原始卵胞数が維持された我々の結果とは異なるが、誘導系やその期間の違いが、結果に影響している可能性がある。過剰発現マウスでは、その影響が生殖寿命の全期間を通して継続されてしまうが、我々の行った投与系では原始卵胞形成期のごく限られた期間にのみに制御が行われている。オートファジーの誘導は一時的なものであるため、この短期間の制御によって、上方制御された原始卵胞数が維持される可能性がある。

以上、本章から、出生直後に一定期間のオートファジー誘導剤の投与により、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った。これらの結果から、原始卵胞形成期の Tat-beclin1 D-11 ペプチド投与により、原始卵胞数の上方制御が可能であることが示された。また、新生仔期の高い原始卵胞数は、性成熟後も維持されており、個体の生殖能の向上や、生殖寿命の延長の可能性が示唆された。

総合考察

本研究は、原始卵胞形成期の卵巣において細胞内タンパク質リサイクル機構オートファジーが果たす役割を明らかにし、その機構を制御することで、どのように原始卵胞数が変化するかを検証したものである。

第1章では、新生仔期マウスへのオートファジー誘導が原始卵胞の形成を促進するとの仮説を立て、新生仔マウスへの授乳制限による飢餓が、卵巣にオートファジーを誘導し、新生仔初期の原始卵胞数を高めることを明らかにした。

第2章では、以前に1年齢以上に加齢しているにも関わらず原始卵胞数が比較的高く維持され、オートファジー活性が高い可能性があることを明らかにしている xCTKO マウスを用い、飢餓とは異なるオートファジーの誘導系により、第1章で確認できなかった原始卵胞形成のピーク時への影響とオートファジー関連タンパク質の発現動態を明らかにした。さらに、xCT 阻害剤投与による卵胞数の上方制御についても検討した。

第3章では、原始卵胞形成期でのオートファジー特異的誘導剤 Tat-beclin1 D-11 の投与により、新生仔マウスの卵巣内原始卵胞数の上方制御が可能であることを示した。さらに、これらのマウスは性成熟後も備蓄卵胞数が高く維持され、産仔数も高いことを示した。

本研究から、新生仔初期におけるオートファジーの積極的な誘導が、原始卵胞形成の促進、一次卵胞への移行の抑制、アポトーシスの抑制を介し、原始卵胞プールを拡大させることが示された。

哺乳類の原始卵胞形成は、卵母細胞の有糸分裂、生殖細胞シストの形成、減数分裂開始、CBD および卵胞構造の構築を含む一連の細胞イベントからなり、全過程には、シスト内の生殖細胞(卵母細胞)と周囲の卵胞上皮細胞の少なくとも2つの細胞型が関与している[40]。本研究での出生直後からのオートファジーの誘導は、特に、マウスにおいて出生後におきる CBD および卵胞構造の構築の段階に、作用しているものと考えられる。

CBD や原始卵胞形成の過程は、卵母細胞数の著しい減少を伴う。オートファジーは細胞生存機構としての役割を持つため、その誘導が、卵母細胞や卵胞上皮細胞の生存性を高め、その残存数を単純に増やしていることが考えられる。マウスでは、卵母細胞の死は出生時に最も顕著であり、P4 までに、それぞれのシストにおいて最初の約30個の生殖細胞が平均約6.4個(20%)の一次卵母細胞として生存する[21, 37, 69, 70, 72]。この卵母細胞の生存はアポトーシスとの微妙なバランスによって決定されるという報告がある[142, 143]。オートファジーは、損傷したミトコンドリアや Caspase family を積極的に分解する。損傷したミトコンドリアから流出した Cytochrome c や Apaf1 と結合し複合体を形成することによりプロペプチドが切り出され Caspase-9 は活性化され、Caspase-3 および Caspase-7 の活性化を引き起こす。本研究では、オートファジーの誘導で

Caspase-9 の発現が低下している傾向がみられ、オートファジーの誘導がアポトーシスを抑制することで卵母細胞や、卵胞上皮細胞の数を高め、原始卵胞の形成数を増加させた可能性も考えられた。しかしながら、本研究では Caspase-3 の発現はすべての実験区で検出されておらず、他のアポトーシス実行型 Caspase の発現や TUNEL 法を用い直接アポトーシスを検出する必要があるものと考えられた。

一方、オートファジーは細胞の分化において、細胞内再構築に働くことも知られている。原始卵胞形成には、複糸期で停止した卵母細胞および、FOXL2 タンパク質を発現する十分な卵胞上皮細胞数の 2 つの条件が必要である[45-51]。LGR5 陽性細胞から分化した、FOXL2 陽性卵胞上皮細胞がシスト内に侵入し、卵母細胞を取り囲み原始卵胞構造を形成することが知られている[25]。Feng ら[57]は、リクルートされた卵胞上皮細胞数とそのリクルートのスピードが、備蓄卵胞プールのサイズを決定する可能性があることを報告している。オートファジーの誘導が、卵巣内の卵胞上皮細胞の分化増殖を活発化し、原始卵胞形成を促進した可能性も考えられた。ゆえに今後の研究として、前顆粒層細胞の分化マーカーである、FOXL2 や LGR5 のタンパク質発現動態を調査することは、原始卵胞形成の促進メカニズムを解明するために有益と考えられる。また原始卵胞形成期において、皮質側に位置する原始卵胞と、髄質側に位置する卵胞の運命は大きく異なると考えられており、皮質側の原始卵胞は将来の卵胞プールとして維持され、髄質側の卵胞はリクルートされ卵胞発育に入るが、思春期前にリクルートされた原始卵胞は、卵胞発育の途中で、細胞死すると考えられている。この時期にリクルートされた卵胞がたどる運命に着目した報告は少なく、性成熟後の高い原始卵胞プールの維持に関与している可能性が考えられ、Tat-bec.1 投与区などの 108 時間以降の卵巣において、一次卵胞の数や形態評価、原始卵胞数の評価を行うこともまた重要と考えられた。

他に新生仔期の卵巣においてオートファジーが影響を与えるものとして、卵巣での性ホルモン産生能があげられる。Gawriluk ら[144]は、成体雌マウスにおいて、*Becn1* の欠損により、プロゲステロン循環の減少による産仔数の減少と、早産出生の表現型を持ち、オートファジーの損失が、ステロイドホルモン産生のための脂質供給の低下させることがその要因であると報告している。エストロジェン、プロゲステロン[26, 58, 59, 60, 62]などのステロイドホルモンやフィトエストロジェン[58]で処理した新生仔マウスは、CBD の障害により成獣期卵巣で MOF 発生率が有意に高くなることが報告されている。オートファジーの誘導による、ステロイドホルモン産生量の変化もまた、CBD や原始卵胞形成の促進に影響する可能性が考えられた。

シストの規模や、崩壊過程もまた、原始卵胞形成の制御に関わるものと考え

られており、MVH とシストを取り囲む前卵胞上皮細胞のマーカートンパク質との共免疫を用いたシストの評価も重要と考えられた。

本研究では、全ての実験において出生から 60 時間までの原始卵胞増加期にオートファジーの誘導を行っており、原始卵胞の形成の促進には、原始卵胞増加時期でのオートファジーの誘導が重要と考えられたが、他の出生前後の期間でのオートファジーの誘導もまた、原始卵胞プールに影響を与える可能性がある [89, 113, 123, 145]。本研究では、オートファジーの誘導により一次卵胞への移行やアポトーシスが抑制されている可能性が示された。対照区での 60 時間から 108 時間にかけての原始卵胞数の減少が、一次卵胞への移行とその過程での卵胞閉鎖に起因しているならば、60 時間以降の原始卵胞減少期でのオートファジーの誘導により原始卵胞数の維持に繋がる可能性が考えられた。

また、卵祖細胞から一次卵母細胞への移行における卵母細胞の減少期でのオートファジー誘導の影響の検討も重要と考えられる。飢餓区や Tat-bec.1 区ではアポトーシス誘導の抑制傾向が示されている。アポトーシスは胎生期の卵母細胞死の主要なメカニズムと考えられており、オートファジー誘導は、卵祖細胞から卵母細胞への移行の過程でアポトーシスから生殖細胞を保護し、原始卵胞プールの拡大につながる可能性がある。一方で、ネガティブな影響を与える可能性も示唆されている。Chan ら [145] は、母体の栄養制限が産仔での早発卵巣老化を導くメカニズムを調査しており、妊娠中の母親に CR 食を与えた場合、産仔の性成熟後の備蓄卵胞数の減少を報告しているが、胎仔に直接処理したのではなく、胎仔卵巣の解析や仔の周産期における卵胞数やオートファジー機構の解析は行われていない。

原始卵胞数が上方制御された個体の性成熟以降の生殖機能に関しては、さらに長期の調査が必要と考えられる。本研究では授乳制限は原始卵胞数を一時的に高めたが、その性成熟後の生殖機能は評価できていない。最も有意な増加がみられた 36 時間の飢餓を受けたマウスは、母親に戻しても授乳を再開できないためである。上記の Chan ら [145] は、妊娠中だけでなく授乳中または授乳中の母体への CR も行っており、これらの条件でも産仔の性成熟後の原始卵胞プールの低下を報告している。また、Song ら [89] は、新生仔に 20 時間の授乳制限し、回復後、3 日齢での原始卵胞数の低下を報告している。これらの報告は、マウスの系統や飢餓の時期とその期間、回復の有無および原始卵胞数の評価法が本研究とは違うため同列に論じることができないが、飢餓マウスの高い原始卵胞数は一時的なものである可能性は考えられる。また、飢餓により増加した原始卵胞が健常であるかは、その後の個体の生育が困難であるため体外培養系を用いた成熟卵のクオリティを確認する必要性があるものと考えられた。一方で、xCTKO マウスや Tat-bec.1 区に関しては、成熟後の生殖機能の向上に寄与できる可能性

は高いものと考えられた。xCTKO に関しては、すでに WT と比べての加齢後の原始卵胞プールや生殖機能の維持が確認されている[97, 130, 131]。また Tat-bec.1 区に関しては、本研究結果から、対照区に比べて 2 ヶ月齢での高い原始卵胞数と総卵胞数が確認された。さらに 6 ヶ月齢までの生殖能についても対照区に産仔数が高いことを確認している。今後は、6 ヶ月齢以降の卵胞数や生殖能を確認し、それらが生殖寿命の延長につながるのかを調査し続ける必要があると考えられる。

今後の展望として、個体生殖寿命の延長の検討のほかに、本研究で得られた原始卵胞数の上方制御法を産業動物に応用展開するために、他の動物種、例えばウシやヒツジやブタなどへのオートファジー誘導法の検討が必要である。序論で述べたように、哺乳類の原始卵胞の形成期は、種に依存して異なっており。マウスでは新生仔期がそれにあたるが、ウシ[3, 4]、ヒツジ[5, 6]、ヒトでは胎仔期に[7, 8]、ブタでは出生後も卵祖細胞が存在している。これらの動物で新生仔期のオートファジー誘導を行った場合、ブタのような出生後に原始卵胞形成が行われる種であれば、マウスでみられたものと比較的近い結果が得られることが予想される。オートファジー誘導による原始卵胞の上方制御が種に依存するかどうかを確認できる。しかし、ウシやヒツジの場合は、原始卵胞形成期が胎仔期にあたるため、胎仔への直接投与あるいは母親への投与を想定しなければならない。それゆえ、本研究の効果を再現するためには、導入方法に工夫が必要と考えられる。現在、妊娠後期の母親マウスへのオートファジー誘導剤投与が、その胎仔卵巣にオートファジーを誘導できるかを検討している。

以上、本研究をまとめると、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は、原始卵胞形成の促進、一次卵胞への移行の抑制ならびにアポトーシスの抑制を介し、原始卵胞数が高めることが明らかとなった。また、オートファジー誘導剤により増加した原始卵胞数は、性成熟後も維持され、個体生殖能の向上や、生殖寿命延長の可能性が示された。以上から、新生仔期にオートファジー機構を積極的に誘導することで、生体レベルの原始卵胞数の上方制御法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。

要 約

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 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。

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、それらは胎仔期および新生仔期に確立される。そのため原始卵胞数を上方制御することで、生殖機能を向上させられる可能性が考えられる。しかしながら、周産期前後の仔で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。

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 *Atg7* や *Becn1* 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。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を欠損(xCTKO)した 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。

本研究では、新生仔マウスへの授乳制限や xCTKO マウスを用いた卵巣内原始卵胞数やオートファジー関連タンパク質の動態解析を通じ、原始卵胞形成期におけるオートファジーの生理的役割を解明し、さらに薬剤投与によってオートファジー機構を制御し、原始卵胞数の上方制御を試みた。

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 36h まで授乳制限したマウス(授乳制限区)から生後 12～108 時間(h)で卵巣を回収した。また生後 6、30、54h でオートファジー誘導剤 Tat-beclin1 D-11 peptide(0.02 mg/g)あるいは xCT 阻害剤 Sulfasalazine(0.09 mg/g)を腹腔内投与した雌マウス(Tat-becl.1 区、SSZ 区)と、同腹仔の非投与マウス(非投与区)あるいは xCTKO 雌マウスから、生後 36、60、84h 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

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 Tat-bec.1 区では、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 ヶ月齢で交配試験により生殖能を評価した。

対照区の原始卵胞数は生後 60h で約 6,000 個まで増加した後減少した。また 60h 以降から一次卵胞が多数確認された。これらのことから 60h までを原始卵胞形成期とし、この期間に授乳制限や ATG 誘導剤の投与を行った。授乳制限区の原始卵胞数は、12、36h で対照区に比べ有意に高く、24h でも高い傾向がみられた。一方 xCTKO の原始卵胞数は、同時間の野生型に比べ高い傾向がみられたが、SSZ 区の原始卵胞数は、非投与区に比べわずかに高い傾向がみられた。これらに比較し Tat-bec.1 区の原始卵胞数は、非投与区に比べ 36h で約 1.5 倍高く、60h では約 1.2 倍有意に高くなった。

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 36h で対照区に比べ有意に高く、xCTKO では野生型に比べ高い傾向が、Tat-bec.1 区では、全ての時間で非投与区に比べ有意に高くなった。一方、アポトーシス誘導因子の Caspase-9 は授乳制限区と Tat-bec.1 区で低くなる傾向がみられたが、実行因子の Caspase-3 は、全ての実験区で検出されなかった。

Tat-bec.1 区の 2 ヶ月齢の原始卵胞数および一次卵胞数、総卵胞数は対照区に比べて有意に高く特に原始卵胞数は約 1.5 倍高くなった。これらは新生仔期の卵胞数の増加が、性成熟後も維持されていることを示していた。2 および 6 ヶ月齢での妊娠率に、各実験区間で有意な差はみられなかったが、Tat-bec.1 区の平均産仔数は、同月齢の対照区に比べ高い傾向がみられた。

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り、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。オートファジー誘導剤により増加した原始卵胞数は、性成熟後も維持され、個体生殖能の向上や、生殖寿命延長の可能性が示された。

以上、本研究では、新生仔期にオートファジー機構を積極的に誘導することで、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。

引用文献

1. 家畜改良事業団. 平成 27 年度乳用牛群能力検定成績のまとめ. 2015.
<http://liaj.lin.gr.jp/japanese/newmilk/index.html>
2. Rosenthal MS. The Fertility Sourcebook. *Lowell House*, 1995.
3. Sakai T. Studies on the development of the embryonic ovary in swine, cattle and horse. *Jap J Vet Res*. 1955;3: 183-194.
4. Tanaka Y, Nakada K, Moriyoshi M, Sawamukai Y. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. *Reproduction*. 2001;121: 777-782.
5. Mauleon P. The establishment of the primordial follicle reserve in the sheep embryo studied by labelling of oocytes with tritiated thymidine. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1974;4: S133-139.
6. Sawyer HR, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ, Mc Natty KP. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol Reprod*. 2002;66: 1134-1150.
7. Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond Ser B*. 1963;158: 417-433.
8. Pepling ME. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis*. 2006;44: 622-632.
9. Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update*. 2005;11: 461-471.
10. Kerr JB, Myers M, Anderson RA. The dynamics of the primordial follicle reserve. *Reproduction*. 2013;146: R205-215.
11. Sánchez F, Smits J. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822: 1896-1912.
12. Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev*. 2009;30: 624-712.
13. McLaren A, Chuva de Sousa Lopes SM. Primordial Germ Cells in Mouse and Human. *Essentials of Stem Cell Biology*. 2009: 131-136.
14. Saitou M. Germ cell specification in mice. *Curr Opin Genet Dev*. 2009;19: 386-395.
15. De Sousa Lopes SMC, Hayashi K, Surani MA. Proximal visceral endoderm and

- extraembryonic ectoderm regulate the formation of primordial germ cell precursors. *BMC Dev Biol.* 2007;7: 140.
16. Sekl Y, Yamaji M, Yabuta Y, Sano M, Shigeta M, Matsui Y, Saga Y, Tachibana M, Shinkai Y, Saitou M. Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development.* 2007;134: 2627–2638.
 17. Molyneaux KA, Zinszner H, Kunwar PS, Schaible K, Stebler J, Sunshine MJ, O'Brien W, Raz E, Littman D, Wylie C, Lehmann R. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development.* 2003;130: 4279-4286.
 18. Runyan C, Schaible K, Molyneaux K, Wang Z, Levin L, Wylie C. Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. *Development.* 2006;133: 4861-4869.
 19. Motta PM, Makabe S, Nottola SA. The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Hum Reprod Update.* 2000;3: 281-295.
 20. Jung D, Kee K. Insights into female germ cell biology: from in vivo development to in vitro derivations. *Asian J Androl.* 2015;17: 415-420.
 21. Lei L, Spradling AC. Mouse primordial germ cells produce cysts that partially fragment prior to meiosis. *Development.* 2013;140: 2075-2081.
 22. Haglund K, Nezis IP, Stenmark H. Structure and functions of stable intercellular bridges formed by incomplete cytokinesis during development. *Commun Integr Biol.* 2011;4: 1-9.
 23. De Felici M, Klinger FG, Farini D, Scaldaferrri ML, Iona S, Lobascio M. Establishment of oocyte population in the fetal ovary: primordial germ cell proliferation and oocyte programmed cell death. *Reprod Biomed Online.* 2005;10: 182-191.
 24. Mazaud S, Guyot R, Guigon CJ, Coudouel N, Le Magueresse-Battistoni B, Magre S. Basal membrane remodeling during follicle histogenesis in the rat ovary: contribution of proteinases of the MMP and PA families. *Dev Biol.* 2005;277: 403-416.

25. Pepling ME, Sundman EA, Patterson NL, Gephardt GW, Medico L Jr, Wilson KI. Differences in oocyte development and estradiol sensitivity among mouse strains. *Reproduction*. 2010;139: 349-357.
26. Chen Y, Jefferson WN, Newbold RR, Padilla-Banks E, Pepling ME. Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 2007;148: 3580-3590.
27. Tingen CM, Kim A, Woodruff TK. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Mol Hum Reprod*. 2009;15: 795-803.
28. Griffin J, Emery BR, Huang I, Peterson CM, Carrell DT. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *J Exp Clin Assist Reprod*. 2006;3: 2.
29. Peters H. The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinol*. 1969;62: 98-116.
30. Wang Y, Teng Z, Li G, Mu X, Wang Z, Feng L, Niu W, Huang K, Xiang X, Wang C, Zhang H, Xia G. Cyclic AMP in oocytes controls meiotic prophase I and primordial folliculogenesis in the perinatal mouse ovary. *Development*. 2015;142: 343-351.
31. Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*. 1990;110: 521-528.
32. Pepling ME. Follicular assembly: mechanisms of action. *Reproduction*. 2012;143: 139-149.
33. Lei L, Spradling AC. Mouse oocytes differentiate through organelle enrichment from sister cyst germ cells. *Science*. 2016;352: 95-99.
34. Rajah R, Glaser EM, Hirshfield AN. The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Dev Dyn*. 1992;194: 177-192.
35. Gomperts M, Garcia-Castro M, Wylie C, Heasman J. Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development*. 1994;120: 135-141.
36. Bendel-Stenzel MR, Gomperts M, Anderson R, Heasman J, Wylie C. The role of cadherins during primordial germ cell migration and early gonad formation in

- the mouse. *Mech Dev.* 2000;91: 143-152.
37. Grive KJ, Seymour KA, Mehta R, Freiman RN. TAF4b promotes mouse primordial follicle assembly and oocyte survival. *Dev Biol.* 2014;392: 42-51.
 38. Pepling ME, Wilhelm JE, O'Hara AL, Gephardt GW, Spradling AC. Mouse oocytes within germ cell cysts and primordial follicles contain a Balbiani body. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104: 187-192.
 39. Aravin AA, van der Heijden GW, Castañeda J, Vagin VV, Hannon GJ, Bortvin A. Cytoplasmic compartmentalization of the fetal piRNA pathway in mice. *PLOS Genet.* 2009;5: e1000764.
 40. Lei L, Zhang H, Jin SY, Wang FC, Fu MY, Wang HB, Xia GL. Stage-specific germ-somatic cell interaction directs the primordial folliculogenesis in mouse Stage-specific ovarian somatic cells in primordial folliculogenesis fetal ovaries. *J Cell Physi.* 2006;208: 640-647.
 41. Joan SJ. Defining the neighborhoods that escort the oocyte through its early life events and into a functional follicle. *Mol Reprod Dev.* 2013;80: 960-976.
 42. Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-83: 431-446.
 43. Chang CL, Wang HS, Soong YK, Huang SY, Pai SY, Hsu SY. Regulation of oocyte and cumulus cell interactions by intermedin/adrenomedullin 2. *J Biol Chem.* 2011;286: 43193-43203.
 44. Mork L, Maatouk DM, McMahon JA, Guo JJ, Zhang P, McMahon AP, Capel B. Temporal differences in granulosa cell specification in the ovary reflect distinct follicle fates in mice. *Biol Reprod.* 2012;86: 37, 1-9.
 45. Byskov AG, Guoliang X, Andersen CY. The cortex-medulla oocyte growth pattern is organized during fetal life: an in-vitro study of the mouse ovary. *Mol Hum Reprod.* 1997;3: 795-800.
 46. Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G. Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet.* 2004;13: 1171-1181.
 47. Ottolenghi C, Pelosi E, Tran J, Colombino M, Douglass E, Nedorezov T, Cao A,

- Forabosco A, Schlessinger D. Loss of Wnt4 and Foxl2 leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum Mol Genet.* 2007;16: 2795-2804.
48. Qing T, Liu H, Wei W, Ye X, Shen W, Zhang D, Song Z, Yang W, Ding M, Deng H. Mature oocytes derived from purified mouse fetal germ cells. *Hum Reprod.* 2008;23: 54-61.
 49. Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, Treier AC, Klugmann C, Klasen C, Holter NI, Riethmacher D, Schütz G, Cooney AJ, Lovell-Badge R, Treier M. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell.* 2009;139: 1130-1142.
 50. Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Hatzirodos N, Bonner W, Sabatier L, Reinhardt DP, Sado Y, Ninomiya Y, Wilhelm D, Rodgers RJ. A new model of development of the mammalian ovary and follicles. *PLoS One.* 2013;8: e55578.
 51. Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC, Treier M. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development.* 2004;131: 933-942.
 52. Li G, Zhang H, Wang YJ, Wen J, Teng Z, Mao GP, Wang JW, Guo M, Mu XY, Xia GL. Stage-specific mice ovarian somatic cell is involved in primordial folliculogenesis. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011;3: 1025-1033.
 53. Ottolenghi C, Omari S, Garcia-Ortiz JE, Uda M, Crisponi L, Forabosco A, Pilia G, Schlessinger D. Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Hum Mol Genet.* 2005;14: 2053-2062.
 54. Rastetter RH, Bernard P, Palmer JS, Chassot AA, Chen H, Western PS, Ramsay RG, Chaboissier MC, Wilhelm D. Marker genes identify three somatic cell types in the fetal mouse ovary. *Dev Biol.* 2014;394: 242-252.
 55. Hsueh AJ, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BC. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev.* 2015;36: 1-24.
 56. Suzuki H, Kanai-Azuma M, Kanai Y. From sex determination to initial folliculogenesis in mammalian ovaries: morphogenetic waves along the anteroposterior and dorsoventral axes. *Sex Dev.* 2015;9: 190-204.
 57. Feng L, Wang Y, Cai H, Sun G, Niu W, Xin Q, Tang X, Zhang J, Wang C, Zhang H, Xia G. ADAM10-Notch signaling governs the recruitment of ovarian

- pregranulosa cells and controls folliculogenesis in mice. *J Cell Sci.* 2016;129: 2202-2212.
58. Kipp JL, Kilen SM, Bristol-Gould S, Woodruff TK, Mayo KE. Neonatal exposure to estrogens suppresses activin expression and signaling in the mouse ovary. *Endocrinology.* 2007;148: 1968-1976.
 59. Guo M, Zhang H, Bian F, Li G, Mu X, Wen J, Mao G, Teng Z, Xia G, Zhang M. P4 down-regulates Jagged2 and Notch1 expression during primordial folliculogenesis. *Front Biosci (Elite Ed).* 2012;4: 2731-2744.
 60. Guo M, Zhang C, Wang Y, Feng LZ, Wang ZP, Niu WB, Du XY, Tang W, Li Y, Wang C, Chen ZW. Progesterone receptor membrane component 1 mediates progesterone-induced suppression of oocyte meiotic prophase I and primordial folliculogenesis. *Sci Rep.* 2016;6: 36869.
 61. Jefferson WN, Couse JF, Padilla-Banks E, Korach KS, Newbold RR. Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER) α expression and multioocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ER β -mediated and nonestrogenic actions. *Biol Reprod.* 2002;67: 1285-1296.
 62. Dutta S, Mark-Kappeler CJ, Hoyer PB, Pepling ME. The steroid hormone environment during primordial follicle formation in perinatal mouse ovaries. *Biol Reprod.* 2014;91: 68, 1-12.
 63. Morohaku K, Tanimoto R, Sasaki K, Kawahara-Miki R, Kono T, Hayashi K, Hirao Y, Obata Y. Complete in vitro generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113: 9021-9026.
 64. Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G, Obata Y, Hirao Y, Hamada N, Shimamoto S, Imamura T, Nakashima K, Saitou M, Hayashi K. Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature.* 2016;539: 299-303.
 65. Pepling ME, Spradling AC. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev Biol.* 2001;234: 339-351.
 66. Brambell FWR. The Development and Morphology of the Gonads of the Mouse—Part I. The morphogenesis of the indifferent gonad and of the ovary. *Proc R Soc B.* 1927;101: 391-409.

67. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol.* 1991;124: 43-99.
68. Findlay JK, Hutt KJ, Hickey M, Anderson RA. How is the number of primordial follicles in the ovarian reserve established? *Biol Reprod.* 2015;93: 111, 1-7.
69. Motta PM, Nottola SA, Makabe S, Heyn R. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Hum Reprod.* 2000;2: 129-147.
70. Konishi I, Fujii S, Okamura H, Parmley T, Mori T. Development of interstitial cells and ovigerous cords in the human fetal ovary: an ultrastructural study. *J Anat.* 1986;148: 121-135.
71. Jones RL, Pepling ME. KIT signaling regulates primordial follicle formation in the neonatal mouse ovary. *Dev Biol.* 2013;382: 186-197.
72. Pelosi E, Forabosco A, Schlessinger D. Genetics of the ovarian reserve (OR). *Front Genet.* 2015;6: 308.
73. Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl).* 1990;181: 195-213.
74. De Pol A, Vaccina F, Forabosco A, Cavazzuti E, Marzona L. Apoptosis of germ cells during human prenatal oogenesis. *Hum Reprod.* 1997;12: 2235-2241.
75. Coucouvanis EC, Sherwood SW, Carswell-Crumpton C, Spack EG, Jones PP. Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Exp Cell Res.* 1993;209: 238-247.
76. Bergeron JM, Gahr M, Horan K, Wibbels T, Crews D. Cloning and in situ hybridization analysis of estrogen receptor in the developing gonad of the red-eared slider turtle, a species with temperaturedependent sex determination. *Dev Growth Diff.* 1998;40: 243-254.
77. Takai Y, Matikainen T, Jurisicova A, Kim MR, Trbovich AM, Fujita E, Nakagawa T. Caspase-12 compensates for lack of caspase-2 and caspase-3 in female germ cells. *Apoptosis.* 2007;12: 791-800.
78. Xu B, Hua J, Zhang Y, Jiang X, Zhang H, Ma T, Zheng W, Sun R, Shen W, Sha J. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) regulates primordial follicle assembly by promoting apoptosis of oocytes in fetal and neonatal mouse ovaries. *PLoS ONE.* 2011;6: e16046.

79. Morita Y, Maravei DV, Bergeron L, Wang S, Perez GI, Tsutsumi O, Taketani Y, Asano M, Horai R, Korsmeyer SJ. Caspase-2 deficiency prevents programmed germ cell death resulting from cytokine insufficiency but not meiotic defects caused by loss of ataxia telangiectasia mutated (Atm) gene function. *Cell Death Differ.* 2001;8: 614-620.
80. Lobascio AM, Klinger FG, Scaldaferri ML, Farini D, De Felici M. Analysis of programmed cell death in mouse fetal oocytes. *Reproduction.* 2007;134: 241-252.
81. Rodrigues P, Limback D, McGinnis LK, Plancha CE, Albertini DF. Multiple mechanisms of germ cell loss in the perinatal mouse ovary. *Reproduction.* 2009;137: 709-720.
82. Gawriluk TR, Hale AN, Flaws JA, Dillon CP, Green DR, Rucker EB 3rd. Autophagy is a cell survival program for female germ cells in the murine ovary. *Reproduction.* 2011;141: 759-765.
83. Perez GI, Robles R, Knudson CM, Flaws JA, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nat Genet.* 1999;21: 200-203.
84. Alton M, Taketo T. Switch from BAX-dependent to BAX-independent germ cell loss during the development of fetal mouse ovaries. *J Cell Sci.* 2007;120: 417-424.
85. Greenfield CR, Pepling ME, Babus JK, Furth PA, Flaws JA. BAX regulates follicular endowment in mice. *Reproduction.* 2007;133: 865-876.
86. Danial NN. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res.* 2007;13: 7254-7263.
87. Lei L, Jin S, Gonzalez G, Behringer RR, Woodruff TK. The regulatory role of Dicer in folliculogenesis in mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;315: 63-73.
88. Chen Y, Breen K, Pepling ME. Estrogen can signal through multiple pathways to regulate oocyte cyst breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary. *J Endocrinol.* 2009;202: 407-417.
89. Song ZH, Yu HY, Wang P, Mao GK, Liu WX, Li MN, Wang HN, Shang YL, Liu C, Xu ZL, Sun QY, Li W. Germ cell-specific Atg7 knockout results in primary

- ovarian insufficiency in female mice. *Cell Death Dis.* 2015;6: e1589.
90. Seli E, Babayev E, Collins SC, Nemeth G, Horvath TL. Minireview: Metabolism of female reproduction: regulatory mechanisms and clinical implications. *Mol Endocrinol.* 2014;28: 790-804.
 91. Nelson JF, Gosden RG, Felicio LS. Effect of dietary restriction on estrous cyclicity and follicular reserves in aging C57BL/6J mice. *Biol Reprod.* 1985;32: 515-522.
 92. Li L, Fu YC, Xu JJ, Lin XH, Chen XC, Zhang XM, Luo LL. Caloric restriction promotes the reserve of follicle pool in adult female rats by inhibiting the activation of mammalian target of rapamycin signaling. *Reprod Sci.* 2015;22: 60-67.
 93. Wang N, Luo LL, Xu JJ, Xu MY, Zhang XM, Zhou XL, Liu WJ, Fu YC. Obesity accelerates ovarian follicle development and follicle loss in rats. *Metabolism.* 2014;63: 94-103.
 94. Zhang XM, Li L, Xu JJ, Wang N, Liu WJ, Lin XH, Fu YC, Luo LL. Rapamycin preserves the follicle pool reserve and prolongs the ovarian lifespan of female rats via modulating mTOR activation and sirtuin expression. *Gene.* 2013;523: 82-87.
 95. Tong Y, Li F, Lu Y, Cao Y, Gao J, Liu J. Rapamycin-sensitive mTORC1 signaling is involved in physiological primordial follicle activation in mouse ovary. *Mol Reprod Dev.* 2013;80: 1018-1034.
 96. Guo W, Zhao Y, Zhang Z, Tan N, Zhao F, Ge C, Liang L, Jia D, Chen T, Yao M, Li J, He X. Disruption of xCT inhibits cell growth via the ROS/autophagy pathway in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2011;312: 55-61.
 97. Watanabe R, Fujii J, Sato H, Kimura N. Evaluation of oocyte quality and ovarian function in aged female cystine-glutamate transporter gene-deficient mice. *3th World Congress of Reproductive Biology.* 2014.
 98. Hulas-Stasiak M, Gawron A. Follicular atresia in the prepubertal spiny mouse (*Acomys cahirinus*) ovary. *Apoptosis.* 2011;16: 967-975.
 99. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology.* 2004;16: 663-669.

100. Kanninen TT, de Andrade Ramos BR, Tomi WSS. The role of autophagy in reproduction from gametogenesis to parturition. *Eur J. Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;171: 3-8.
101. Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, Das DN, Bhutia SK. Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis.* 2014;19: 555-566.
102. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science.* 2000; 290: 1717-1721.
103. Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Structure and Function.* 2002;27: 421-429.
104. Barth JM, Szabad J, Hafen E, Köhler K. Autophagy in Drosophila ovaries is induced by starvation and is required for oogenesis. *Cell Death Differ.* 2011;18: 915-924.
105. Bernal AB, Vickers MH, Hampton MB, Poynton RA, Sloboda DM. Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring. *PLoS One.* 2010;5: e15558.
106. Song K, Ma W, Huang C, Ding J, Cui D, Zhang M. Expression pattern of mouse vasa homologue (MVH) in the ovaries of C57BL/6 female mice. *Med Sci Monit.* 2016;22: 2656-2663.
107. 日本実験動物医学会. げっ歯類の胎仔・新生仔の鎮痛・麻酔および安楽死に関する声明(第2版). 2015.
108. Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J Reprod Fertil.* 1968;17: 555-557.
109. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast ApgSp, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000;19: 5720-5728.
110. Fukuda M. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis and intracellular trafficking. *J Biol Chem.* 1991;266: 21327-21330.
111. Fujiwara Y, Komiya T, Kawabata H, Sato M, Fujimoto H, Furusawa M, Noce T. Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of Drosophila vasa and its specific expression in germ cell lineage. *PNAS.* 1994;91:

12258-12262.

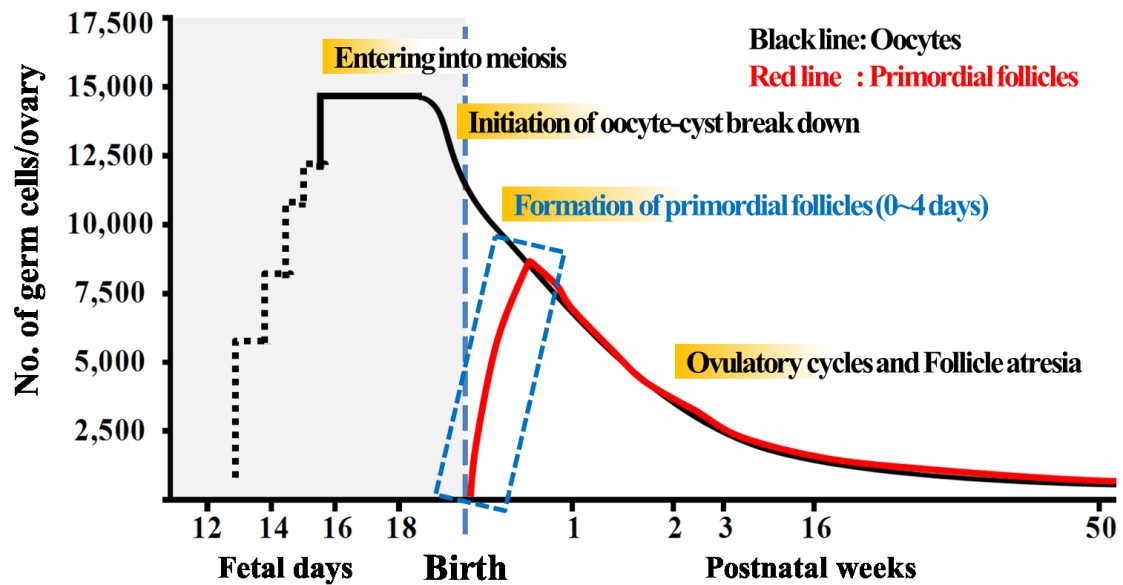
112. Ichimura Y, Kominami E, Tanaka K, Komatsu M. Selective turnover of p62/A170/ SQSTM1 by autophagy. *Autophagy*. 2008;4: 1063-1066.
113. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*. 2005;171: 603-614.
114. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*. 2004;432: 1032-1036.
115. Yu L, Lenardo MJ, Baehrecke EH. Autophagy and caspases: a new cell death program. *Cell Cycle*. 2004;3: 1124-1126.
116. Lum JJ, De Berardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005;6: 439-448.
117. Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature Cell Biology*. 2010;12: 823-830.
118. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011;147: 728-741.
119. Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN et al. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell*. 2007;128: 931-946.
120. Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36: 2445-2462.
121. Wang H, Wan H, Li X, Liu W, Chen Q, Wang Y et al. Atg7 is required for acrosome biogenesis during spermatogenesis in mice. *Cell Res*. 2014;24: 852-869.
122. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol*. 2005;169: 425-434.
123. Wang YY, Sun YC, Sun XF, Cheng SF, Li B, Zhang XF, De Felici M, Shen W.

- Starvation at birth impairs germ cell cyst breakdown and increases autophagy and apoptosis in mouse oocytes. *Cell Death Dis.* 2017;8: e2613.
124. Hurst PR, Mora JM, Fenwick MA. Caspase-3, TUNEL and ultrastructural studies of small follicles in adult human ovarian biopsis. *Hum Reprod.* 2006;21: 1974-1980.
 125. Tingen CM, Bristol-Gould SK, Kiesewetter SE, Wellington JT, Shea L, Woodruff TK. Prepubertal primordial follicle loss in mice is not due to classical apoptotic pathways. *Biol Reprod.* 2009;81: 16-25.
 126. Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hämäläinen T, Peng SL, Lan ZJ, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Liu K. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science.* 2008;319: 611-613.
 127. Adhikari D, Zheng W, Shen Y, Gorre N, Hämäläinen T, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Lan ZJ, Liu K. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Hum Mol Genet.* 2010;19: 397-410.
 128. Takano T, Kubota Y, Sato H, Kimura K. Glutathione contents and expressions of cystine-glutamate transporter and glutathione synthesis- related genes in mouse oocytes and early developmental embryos. *7th Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction.* 2012.
 129. Bannai S, Kitamura E. Role of proton dissociation in the transport of cystine and glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J Biol Chem.* 1981;256: 5770-5772.
 130. 渡辺 連, 松岡 直也, 高野 智枝, 角田 智志, 藤井 順逸, 佐藤 英世, 木村 直子. 老齡シスチン・グルタミン酸トランスポーター遺伝子欠損マウス卵の発生能とクオリティの評価. 第 104 回日本繁殖生物学会大会. 2011
 131. 渡辺 連, 角田 智志, 藤井 順逸, 佐藤 英世, 木村 直子. 老齡シスチン・グルタミン酸トランスポーター遺伝子欠損マウスにおける卵巣機能の解析. 日本畜産学会第 117 回大会. 2013.
 132. 渡辺 連, 李 允熙, 木村 直子. マウス卵における抗酸化機能遺伝子の発現パターンに及ぼす加齢の影響～野生型と xCT 遺伝子欠損型との比較. 第 107 回日本繁殖生物学会大会. 2014.

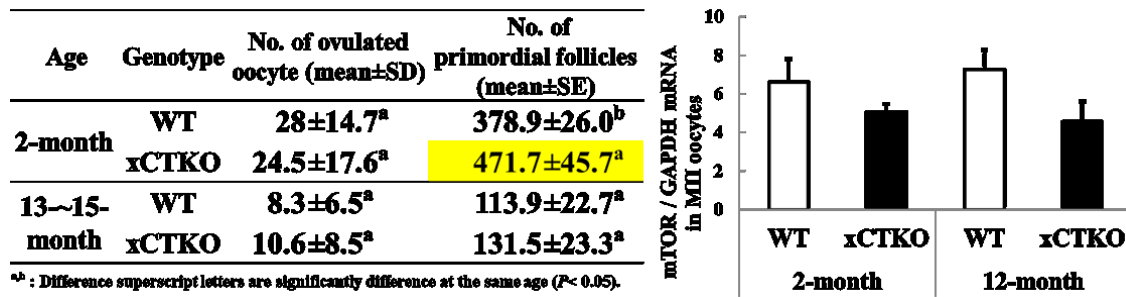
133. Zheng X, Li Y, Zhao R, Yan F, Ma Y, Zhao L, Qiao H. xCT deficiency induces autophagy via endoplasmic reticulum stress activated p38-mitogen-activated protein kinase and mTOR in sut melanocytes. *Eur J Cell Biol.* 2016;95: 175-181.
134. Sato H, Shiiya A, Kimata M, Maebara K, Tamba M, Sakakura Y, Makino N, Sugiyama F, Yagami K, Moriguchi T, Takahashi S, Bannai S. Redox imbalance in Cystine/Glutamate transporter-deficient mice. *J Biol Chem.* 2005;280: 37423-37429.
135. ファイザー株式会社. 医薬品インタビューフォーム サラゾピリン錠 500mg (第 6 版). 2014.
136. Wang YR *et al.* Sulfasalazine inhibits inflammation and fibrogenesis in pancreas via NF- κ B signaling pathway in rats with oxidative stress-induced pancreatic injury. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10: 1743-1751.
137. Dang DK. The role of system Xc- in methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. *Neurochem Int.* 2017;108: 254-265.
138. Habib E, Linher-Melville K, Lin HX, Singh G. Expression of xCT and activity of system xc- are regulated by NRF2 in human breast cancer cells in response to oxidative stress. *Redox Biol.* 2015;5: 33-42.
139. Shoji-Kawata S, Sumpter R, Leveno M, Campbell GR, Zou Z, Kinch L, Wilkins AD, Sun Q, Pallauf K, MacDuff D, Huerta C, Virgin HW, Helms JB, Eerland R, Tooze SA, Xavier R, Lenschow DJ, Yamamoto A, King D, Lichtarge O, Grishin NV, Spector SA, Kaloyanova DV, Levine B. Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature.* 2013;494: 201-206.
140. Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep.* 2001;2: 330-335.
141. Flaws JA, Hirshfield AN, Hewitt JA, Babus JK, Furth PA. Effect of bcl-2 on the primordial follicle endowment in the mouse ovary. *Biol Reprod.* 2001;64: 1153-1159.
142. Findlay JK, Drummond AE, Dyson ML, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;191: 35-43.

143. Peterson JS, Timmons AK, Mondragon AA, McCall K. The end of the beginning: cell death in the germline. *Curr Top Dev Biol.* 2015;114: 93-119.
144. Gawriluk TR, Ko C, Hong X, Christenson LK, Rucker EB 3rd. Beclin-1 deficiency in the murine ovary results in the reduction of progesterone production to promote preterm labor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111: E4194-203.
145. Chan KA, Bernal AB, Vickers MH, Gohir W, Petrik JJ, Sloboda DM. Early life exposure to undernutrition induces ER stress, apoptosis, and reduced vascularization in ovaries of adult rat offspring. *Biol Reprod.*;92: 1-14.

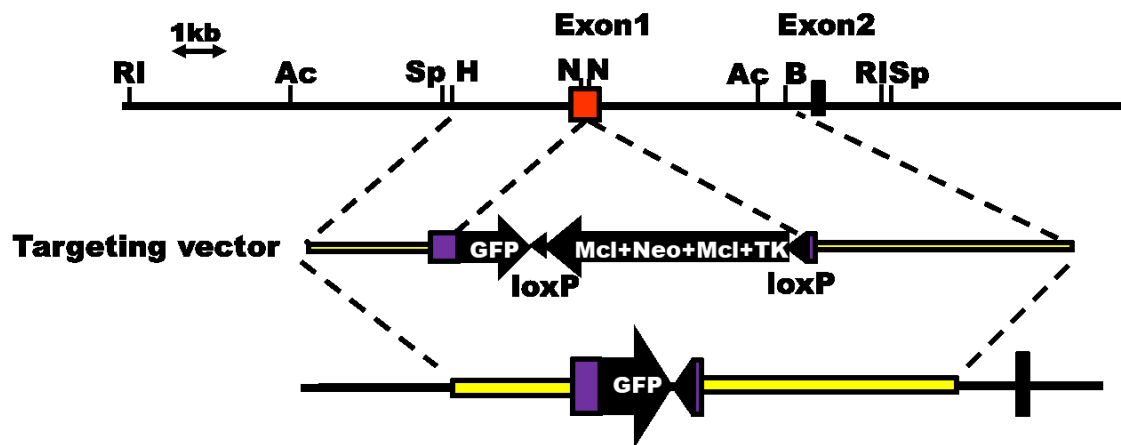
参考図



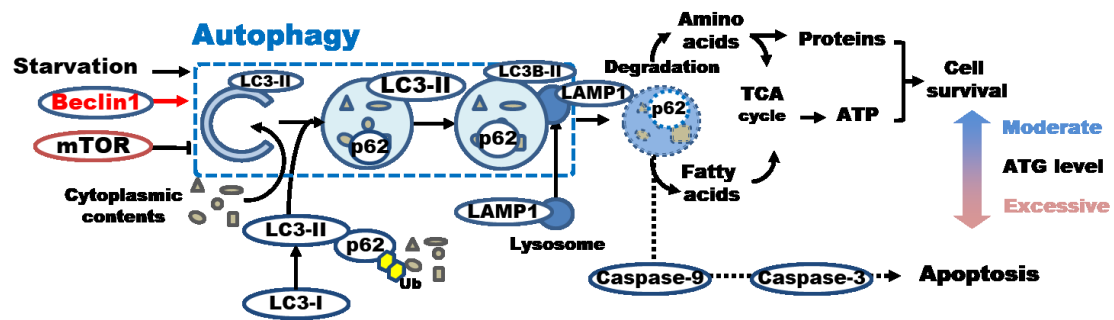
Appendix 1. The trends of germ cell number in mouse ovary over indicated ages (Kerr JB *et al. Reproduction*. 2013). The primordial follicle number and the oocytes quality are important for reproductive performance and lifespan in mammals. The primordial follicles are formed in perinatal period. However, the regulatory mechanism of follicle formation is not well understood.



Appendix 2. The number of primordial follicles and mTOR mRNA expression in oocyte from young and aged cystine-glutamate transporter gene knockout (xCTKO) mice (Watanabe R *et al.* 3th World Congress of Reproductive Biology. 2014, 107th Society for Reproduction and Development Meeting. 2014). The Primordial follicle numbers in xCTKO mice were higher and the mRNA expression of mTOR that suppresses ATG was lower in the oocytes, compared with wild type mice.



Appendix 3. Genetic defect site of xCTKO mice (Sato *et al.*, *J Biol Chem*, 2005).



Appendix 4. Schematic of autophagy mechanism and its related factors. Autophagy which is autolytic degradation and recycle mechanism for intra cellular proteins, is activated by starvation and beclin1. Autophagy plays a role in cell survival, whereas an excessive ATG activation induces apoptosis.

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対する御指導ならびに本論文の御校閲を賜り、主指導教員の岩手大学大学院連合農学研究科生物生産科学専攻(山形大学) 木村直子教授に深く感謝し、御礼申し上げます。

また、日頃より御指導と御助言を頂いた第一副指導教員の岩手大学大学院連合農学研究科寒冷圏生命システム学専攻(山形大学)の三橋渉教授ならびに第二副指導教員の岩手大学大学院連合農学研究科生物生産科学専攻(岩手大学)の松原和衛准教授に深く感謝し、御礼申し上げます。学位論文審査に当たり、副査を引き受けて頂いた岩手大学大学院連合農学研究科生物生産科学専攻(弘前大学)鈴木裕之教授に深く感謝申し上げます。

また、御助言および試薬等を提供してくださいました山形大学大学院医学系研究科生化学・分子生物学講座の藤井順逸教授、xCTKO マウスの提供してくださいました新潟大学医学部保健学科検査技術科学専攻の佐藤英世教授に感謝申し上げます。

そして、日ごろより多岐にわたり支援してくださいました研究室のメンバーの皆様に心より感謝いたします。この場を借りて、皆様に深く御礼を申し上げます。最後に、家族をはじめ、私を支えていただいた方々に心から感謝いたします。

本研究は、日本学術振興会特別研究員(DC2)特別研究員奨励費(JSPS 科研費 17J02206)、文部科学省科学技術人材育成費補助事業「ダイバーシティ研究環境実現イニシアティブ女性研究者研究活動支援事業、日本学術振興会学術研究助成基金助成金(挑戦的研究(萌芽) 17K19316)、平成 28 年度岩手大学大学院連合農学研究科学生研究プロジェクト経費より研究助成のサポートを得て実施いたしました。