

氏名	たんばしげろう 丹波茂郎
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第617号
学位授与の日付	平成19年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	Molecular mechanism of prostaglandin E <sub>2</sub> -EP <sub>2</sub> signaling in ovulation and fertilization (プロスタグランジン E <sub>2</sub> -EP <sub>2</sub> シグナルによる排卵受精促進の分子機構に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 中山和久 教授 伊藤信行 教授 竹島浩

### 論文内容の要旨

排卵と受精は哺乳動物の雌性生殖の中心であり、これらは2種類の性腺刺激ホルモン(ゴナドトロピン)、卵胞刺激ホルモン(FSH)と黄体化ホルモン(LH)によって中枢性に支配される。すなわち、FSHは卵胞を発達させ、LHは卵胞内圧を高め、排卵を引き起こす。排卵された卵は、卵丘細胞と細胞外マトリクスに被われた形で卵管に捕捉・誘引され、卵管膨大部に滞留して受精に至る。卵丘細胞は卵を取り囲む顆粒膜細胞であり、ゴナドトロピン刺激を受けるとヒアルロン酸などの細胞外マトリクスを分泌して卵・卵丘複合体の容積を増大させ、排卵に寄与する。また卵丘の産生する細胞外マトリクスは、排卵後の卵管が複合体を捕捉・誘引する際にも重要な役割を果たし、さらに卵・卵丘相互作用は卵成熟に必須の役割を果たす。近年、ゴナドトロピンは卵胞内の様々な局所メデイエーター産生を促し、これらが協調的に働くことで初めて排卵・受精が遂行されることが明らかとなってきた。著者の所属する研究室ではこれまでに、(1)プロスタグランジン(PG) E<sub>2</sub>受容体EP<sub>2</sub>は、LH刺激で卵丘細胞に発現誘導されること、(2)EP<sub>2</sub>欠損の雌マウスが排卵と受精の障害を示すこと、(3)EP<sub>2</sub>欠損の受精率の低下は体外受精でも再現されるが、卵丘を除去すると見られないことを見だし、卵丘のPGE<sub>2</sub>-EP<sub>2</sub>シグナルがLH刺激によって引き起こされる排卵・受精の遂行に必須の役割を果たすことを示した。しかしながら、排卵にともない卵丘でどのような遺伝子発現が変動するのか、またEP<sub>2</sub>シグナルがどのような機序で排卵・受精を促進するのかは不明であった。そこで著者は、LH刺激で引き起こされる卵丘細胞での遺伝子発現変動を捉え、EP<sub>2</sub>欠損の効果を調べることで、排卵・受精における卵丘細胞の機能とPGE<sub>2</sub>-EP<sub>2</sub>シグナルの分子機構の解明を試みた。

#### 第一章 排卵時の卵丘細胞の遺伝子発現変化とPGE<sub>2</sub>-EP<sub>2</sub>シグナルの役割

著者はまず、卵丘細胞がLH刺激によってどのような遺伝子発現変動を示すのか調べるため、過排卵モデルを用い、LHアナログ(hCG)投与後0, 3, 9, 14時間後(H0, H3, H9, H14)の野生型卵丘の遺伝子発現プロファイル調べた。またEP<sub>2</sub>欠損卵丘についても同様に解析し、野生型と比較した。野生型のH0/H3を比較すると、LH刺激により*ptgs2*(シクロオキシゲナーゼ-2)、*has2*(ヒアルロン酸合成酵素)や上皮増殖因子(EGF)様増殖因子(*ereg*, *areg*, *btc*)など多くの遺伝子の発現が誘導されたが、その誘導がH9では減弱する傾向を示した。一方、H14/H0で亢進した遺伝子の多くはH9までの変動が小さいことから、卵丘は卵管に移行すると卵胞内とは異なる新たな機能を獲得する可能性が示唆された。野生型とEP<sub>2</sub>欠損を比較して発現差のある遺伝子は、H3とH14に多く見られ、H3で差のある遺伝子の多くは、野生型卵丘でLHにより誘導されたものであり、これがEP<sub>2</sub>欠損で低下していた。実際、この中にはcAMP応答性の遺伝子群が含まれており、卵丘細胞ではPGE<sub>2</sub>-EP<sub>2</sub>シグナルがcAMP依存性の応答を担うことを裏付けるものである。一方、H14で発現差を示した遺伝子のうち、排卵前から同様の差を示すものはほとんどないことから、PGE<sub>2</sub>-EP<sub>2</sub>シグナルは卵管内に移行した卵丘に対して新たな作用を発揮すると考えられた。

#### 第二章 ケモカインの卵丘細胞骨格と受精に対する作用

卵管内(H14)の卵丘細胞では、EP<sub>2</sub>欠損でケモカイン遺伝子群(MCP-1, MIP-1 $\gamma$ , MCP-3, CCR1, CCR5)の発

現が亢進していた。これまでに卵巣や卵管でケモカインが発現するという知見はほとんど見られなかったことから、卵丘における MCP-1, MIP-1 $\gamma$ , MCP-3 の各ケモカイン発現の経時変化を調べた。野生型卵丘における各ケモカインの発現は、排卵前には低いのが排卵後に上昇した。EP2 欠損でも排卵前には野生型と同様に低かったが、排卵後には野生型以上に亢進していた。野生型の卵丘に PGE<sub>2</sub> を添加すると MIP-1 $\gamma$  遺伝子の発現は低下し、インドメタシンを添加すると発現は上昇したが、EP2 欠損ではこれらの効果が見られなかった。一方、膜透過性 cAMP アナログは、野生型・EP2 欠損いずれにおいても MIP-1 $\gamma$  発現を低下させた。従って、内因性の PGE<sub>2</sub>-EP2 は cAMP 産生を介して卵丘ケモカインの発現を抑制していることが判った。体外受精におけるケモカインの影響を調べると、MCP-3 は野生型の受精率を低下させ、ケモカイン受容体遮断薬 vMIP- II は MCP-3 の作用を阻害した。さらに vMIP- II は野生型マウスの受精率には影響しないが、EP2 欠損マウスや hCG 注射時にインドメタシンを投与した野生型マウス (Indo 処理マウス) の受精率を有意に回復させた。以上の結果から、EP2 欠損マウスの受精障害は、ケモカイン産生亢進に起因すると考えられる。ケモカインは、7 回膜貫通型受容体を介して Rho 関連 G タンパク質を活性化し、細胞骨格再構成により細胞形態に劇的な変化をもたらす、運動亢進や遊走活性を発揮する。著者は、ケモカインの発現亢進が卵丘の細胞骨格に影響を与える可能性を考え、EP2 欠損卵丘の形態を調べた。その結果、EP2 欠損や Indo 処理マウスの卵丘は野生型卵丘よりも円形化し、細胞径が縮小していた。実際、野生型卵丘に MCP-3 を添加すると、細胞径縮小とともに RhoA 活性化が見られた。MCP-3 による卵丘径縮小は、ケモカイン受容体遮断薬 vMIP- II, Rho キナーゼ阻害剤 Y27632, ミオシン II ATPase 阻害剤 blebbistatin のいずれでも阻害された。また Indo 処理マウスの卵丘では対照群に比べ活性化 RhoA 量が増大していた。さらに野生型卵丘では F-アクチン (アクチン多量体) が細胞の一部にのみ限局したのに対して、EP2 欠損卵丘では円形化した細胞の細胞膜直下で F-アクチンの過形成がみられた。卵丘細胞でのアクチン再構成は、細胞外マトリクスや接着タンパク質の分泌に重要な役割を果たすと考えられており、EP2 欠損卵丘ではアクチン骨格形成異常により細胞外マトリクスを介した卵・卵丘相互作用、さらには卵の最終成熟に影響を受けるものと考えられた。

以上、著者は、PGE<sub>2</sub>-EP2 による受精促進の分子機構を明らかにするとともに、ケモカインが卵丘形態と受精に影響しうることを初めて明らかにした。これらの結果は、アスピリン様抗炎症薬の副作用の分子機構を明らかにするとともに、新たな避妊薬や不妊治療薬の標的因子を探索する上で重要な基礎的知見である。

### 論文審査の結果の要旨

プロスタグランジン (PG) 受容体を介して発揮される様々な病態・生理作用の分子メカニズムを理解することは、これを標的とする薬剤開発に必須の基本事項であり、重要な課題である。これまでに、PGE<sub>2</sub> は排卵と受精に不可欠な役割を果たすこと、またその作用は EP2 受容体を介して発揮されることが明らかとなっていたが、この作用が具体的にどのような分子機構によって引き起こされるのかは不明であった。そこで著者は、EP2 受容体がゴナドトロピン刺激によって卵を取り巻く卵丘細胞に発現誘導されることに着目し、卵丘細胞における遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析することにより、排卵・受精期における卵丘細胞自身の機能変化を捉え、その変化した機能のどの部分に PGE<sub>2</sub>-EP2 シグナルが寄与するのかを同定しようと試み、以下の知見を得た。

著者はまず、卵丘細胞の機能が、ゴナドトロピン刺激を受けて排卵し、卵管に移行するまでの間にどのように変化するか、その遺伝子発現の切り口から調べた。その結果、著者は、①卵丘細胞では、ゴナドトロピン刺激後 3 時間で様々な遺伝子発現が誘導され、これにより細胞増殖や細胞外マトリクス分泌が開始されて排卵に備えること、②卵丘細胞では、排卵により発現する遺伝子群の構成が変化し、卵巣内から卵管への環境変化に適応していること、③ EP2 受容体の欠損は、排卵前では cAMP 依存性遺伝子応答を減弱させるとともに、排卵後では免疫や細胞外マトリクスに関わる遺伝子群の発現を亢進させることを見出した。これらの成果は、EP2 受容体の欠如が影響する遺伝子を同定したのみならず、卵丘細胞が排卵と受精に向けてその機能をどのように変化させるのかを初めて明らかにしたものであり、排卵・受精における卵丘細胞の役割を理解する上で貴重な発見である。

続いて著者は、EP2 シグナルの欠如が排卵後の卵丘ケモカイン (MCP-1, MCP-3, MIP-1 $\gamma$ ) の発現を亢進させることに注目し、ケモカインの発現様式とそのシグナル伝達機構、受精への影響について調べた。その結果、①ケモカインは野生

型卵丘でも排卵後に発現誘導され、卵-卵丘複合体の卵管への接着に寄与すること、②ケモカインが卵丘に作用すると RhoA の活性化が引き起こされ、この作用が持続するとアクチン細胞骨格の再構成亢進、細胞縮小、さらには受精率の低下を引き起こされること、③ PGE<sub>2</sub> は、野生型卵丘でのケモカイン発現を抑制し、過剰なシグナルを回避することにより受精を促進することを明らかにした。これらの成果は、PG による受精促進機構を明らかにしただけでなく、ケモカインが卵-卵丘複合体の卵管への接着・移行に寄与する可能性を初めて示唆したものである。

以上の成果は、PGE<sub>2</sub>-EP2 シグナルによる受精促進の作用機構を分子レベルで明らかにしたものであり、受精における卵丘細胞の役割、さらには不妊治療や避妊を目的とした新たな創薬を考える上で重要な基礎知見となるものである。

よって本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成19年2月20日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。