

論文の内容の要旨

論文題目 マウス卵巣における Ad4BP/SF-1 および Dax-1 の発現と
卵胞発育・閉鎖における役割

指導教官 堤 治 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 難波 聡

近年、生殖医療の進歩とともに排卵誘発や体外受精が有用な治療手段として一般的に行われるようになり、わが国でも年間約 1 万人以上が体外受精によって誕生するに至っている。一方で早発卵巣機能不全の患者や多嚢胞性卵巣症候群 (polycystic ovary syndrome: PCOS) の患者のように現在でも治療に苦慮する症例がまれならず存在する。したがって生殖医療に携わるものにとっては、より有効な排卵誘発を行うために、卵胞発育・卵胞閉鎖のメカニズムを知ることが重要となる。

ヒトの卵巣内には、原始卵胞、二次卵胞、さらに FSH(Follicle stimulating hormone)の作用を受けて成熟した排卵前の antral follicle などがあり、これらが成人女性では卵巣内に混在する。最終的に下垂体から分泌される LH(Lutenizing hormone)の作用を受けて排卵がおこるが、実際に順調に成熟発育し排卵に至るものはごくわずか、ほとんどの卵胞は発育の過程でアポトーシスによって消滅する。

さて本研究において着目した転写因子は、Ad4BP/SF-1 と Dax-1 の 2 つである。これらはもともと性腺の発生・分化において重要な役割を果たしていると考えられている転写因子であった。

Ad4BP/SF-1 はステロイドホルモン産生組織に特異的な P450 遺伝子の転写を制御する転写因子として同定

された。Ad4BP/SF-1により、P450 遺伝子のみならず 3β HSD, StAR, LH β , MIS, FSH 受容体などの遺伝子が制御されることが明らかになっている。また Ad4BP/SF-1 は性腺、副腎といったステロイド産生組織だけでなく下垂体や視床下部にも発現しており、中枢及び末梢臓器においてステロイド産生系の機能維持に重要な役割を果たしていると考えられている。また、Ad4BP/SF-1 遺伝子のノックアウトマウスが性腺及び副腎の発生を欠いたことから Ad4BP/SF-1 は性腺と副腎の発生・分化に重要な役割を果たしていることが判明した。Ad4BP/SF-1 は卵巣においては莢膜細胞と顆粒膜細胞、黄体に発現することが明らかになっているが、性周期のなかでどのように発現が変化し、卵巣においていかなる役割を果たしているのかについての報告はない。

一方、Dax-1 はヒトの疾患から見いだされた転写因子である。X染色体上の Xp21 領域が重複するような XY 女性の症例が知られており、この現象は DSS (Dosage-sensitive sex reversal) と呼ばれ、Xp21 に存在する遺伝子が卵巣の分化に重要な働きをしていることを示唆している。一方、X連鎖遺伝形式をとり低ゴナドトロピン性性腺機能低下症を伴う先天性副腎低形成の解析により、Xp21 領域から単一の原因遺伝子が同定され Dax-1 と名付けられた。Dax-1 遺伝子を強制発現させたトランスジェニックマウスでは Dax-1 遺伝子の量依存的に精巣形成が遅延したことから、Dax-1 は DSS の原因遺伝子であると考えられている。Dax-1 の機能については、*in vitro* で Ad4BP/SF-1 による転写活性を抑制することが報告されている。実際 Dax-1 は Ad4BP/SF-1 と同様、性腺、副腎、下垂体、視床下部に発現が認められるが、卵巣での局在や役割に関する報告はない。

本研究では、性腺の発生・分化に重要な役割を演じるとされていた Ad4BP/SF-1、Dax-1 に着目し、卵巣における発現様式を卵胞発育との関連で観察することで卵胞発育・閉鎖におけるこれらの役割を明らかにすることを試みた。

<方法>

21 日齢雌 ICR マウスに PMSG 5IU を腹腔内注射し、注射後 0、12、24、36、48 時間後に卵巣を摘出した。Ad4BP/SF-1 と Dax-1 の発現パターンを定量的 RT-PCR を用いて mRNA レベルで測定し、また免疫組織染色により蛋白レベルで局在の解析を行った。さらに両者の発現と卵胞におけるアポトーシスを比較検討するため

に隣接切片で TUNEL 染色を行い、また各ポイントで卵巣から抽出した DNA の低分子領域のバンド強度をグラフ化した (DNA ラダー法)。最後に 21 日齢の Dax-1 遺伝子欠失変異マウスの卵巣についても免疫組織染色、TUNEL 法を行った。

<結果>

Ad4BP/SF-1 の mRNA 発現量は、PMSG 投与後 36、48 時間後に 0 時間の約 2 倍に上昇した。それに対し Dax-1 の mRNA 発現量は PMSG 投与後ただちに減少し 24 時間後には 0 時間の約 1/3 となった。48 時間後には再び 0 時間のレベルまで戻った。また DNA ラダーの解析の結果、PMSG 投与後の DNA 断片化の変動パターンは Dax-1 mRNA の変動パターンときわめて類似していた。

次に免疫組織染色によれば Ad4BP/SF-1 は顆粒膜細胞と莢膜細胞の核に発現が認められたが、卵胞によって顆粒膜細胞が濃染する卵胞と濃染されない卵胞が存在した。Dax-1 は顆粒膜細胞の核に発現していたが、Dax-1 陽性の顆粒膜細胞はまだら状に散在していた。また、やはり顆粒膜細胞の発現が認められる卵胞と発現に乏しい卵胞が存在した。TUNEL 法による染色も加えた隣接切片の検討により、顆粒膜細胞に Ad4BP/SF-1 の発現が強く認められる卵胞では Dax-1 の発現が認められず TUNEL 陰性、逆に Ad4BP/SF-1 が発現が弱い卵胞では Dax-1 発現が認められ TUNEL 陽性であった。しかしながら、閉鎖卵胞内での Dax-1 陽性細胞と TUNEL 陽性細胞の局在は必ずしも一致しなかった。すなわち卵細胞に近い内側の顆粒膜細胞に TUNEL 陽性細胞が多いのに対して Dax-1 は反対に外側の基底顆粒膜細胞に多く発現していた。

最後に Dax-1 欠失変異マウスの 21 日齢卵巣で同様の解析を行った。Dax-1 欠失マウスにおいても TUNEL 陽性の顆粒膜細胞を有する閉鎖卵胞は同様に存在した。そして顆粒膜細胞に Ad4BP/SF-1 が強く発現する卵胞は TUNEL 陰性であり、逆に Ad4BP/SF-1 の発現が弱い卵胞は TUNEL 陽性であった。Dax-1 の顆粒膜細胞での発現は発育卵胞・閉鎖卵胞を問わず認められなかった。また Dax-1 欠失マウスでも TUNEL 陽性の顆粒膜細胞は、より内側の層に多く認められた。

<考察>

免疫組織染色による結果から、発育卵胞の顆粒膜細胞では Ad4BP/SF-1 が強陽性で Dax-1 は陰性、逆にアポトーシスをおこしつつある閉鎖卵胞の顆粒膜細胞では Ad4BP/SF-1 の発現は弱く Dax-1 が陽性であった。すなわち卵胞発育・閉鎖にこれらの転写因子が関わっている可能性がはじめて示唆された。また PMSG 処理後の卵巣において発育卵胞数の増加に伴って Ad4BP/SF-1 の mRNA 発現量も増加するが、一方 Dax-1 の mRNA 発現量は 12-24 時間後に約 1/3 へと著明に低下し、この変動パターンは DNA ラダー法により得られた卵巣の DNA 断片化の変動と酷似していた。すなわち Ad4BP/SF-1 が卵胞発育に、Dax-1 が卵胞閉鎖に何らかの役割を果たしている可能性をさらに裏付ける知見と考えられた。

Dax-1 の発現が卵胞閉鎖をひきおこす原因であるのか、それとも卵胞閉鎖が生じたための結果であるのかを本研究の実験結果のみから結論づけることは困難である。しかし Dax-1 欠失変異マウスの 21 日齢の卵巣には Dax-1 の発現が認められないにもかかわらず TUNEL 陽性となる閉鎖卵胞が存在したことから、Dax-1 の発現は卵胞閉鎖を生じるのに必須ではないことが示された。TUNEL 法で陽性を示す卵胞はアポトーシスの最終段階に入った卵胞であり、それと Dax-1 の発現卵胞が一致するということは、Dax-1 は卵胞閉鎖の誘導や調節に関わる因子であるというより卵胞閉鎖が不可逆的に進行した結果として発現すると予想される。

また Ad4BP/SF-1 と Dax-1 は発現が卵胞ごとに対照的である所見に加え、比較的発育の進んだ閉鎖卵胞の顆粒膜細胞において発現強度の内外勾配という形でも両者の局在は対照的であった。しかし両転写因子の拮抗する発現機構の解明は今後の検討を待たねばならない。

Ad4BP/SF-1 はステロイド合成に必須な P450 遺伝子群の転写を活性化することから、発育卵胞において Ad4BP/SF-1 はステロイド合成に促進的に働いていると推察される。一方 Dax-1 は Ad4BP/SF-1 の転写活性化能を抑制することから顆粒膜細胞でのステロイド合成に抑止的に作用していると考えられる。すなわち Dax-1 はアポトーシス開始・誘導のシグナルを受けて caspase などのアポトーシス実行装置と同時期に発現し、閉鎖卵胞では不要であるステロイド合成をストップさせることで卵胞を形態学的のみならず機能的にも退行に導いているとの解釈が可能である。