

シグナル制御分子PRIPの卵巣における抗老化作用の解析

The involvement of a signaling molecule, PRIP in the regulation of ovarian function and aging.

松田美穂

要約 卵巣は、女性の一生において心身の著しい変化の制御を担う。卵巣は、ホルモン応答を含む複雑な制御機構を備え機能するが、他の組織に比べ機能低下が早い。女性の抗老化を考える上で卵巣機能の分子メカニズムを知る事は必須である。シグナル分子 PRIP は、これまでの研究結果から卵巣の機能制御に関わることが示唆された。そこで今回、PRIP 遺伝子欠損マウス (KO) を用いて解析を行った。KO において排卵数の顕著な低下が幼若齢から現れ、野生型マウスの卵巣で PRIP の発現が経時的に減少した。組織学的解析から卵胞成熟過程の異常が示唆されたので検討したところ、成熟卵胞の顆粒膜細胞に発現する LH 受容体が KO では未成熟卵胞でも見られ、その下流のシグナルが亢進していた。また、KO で血中エストロゲン (E2) の濃度は低下していたが、産生能は野生型と同等であった。これらのことから PRIP は、LH シグナルおよび E2 分泌の制御を介して卵胞成熟に機能し、KO では幼若齢からその機能低下が現れることなどから、これらの機能制御を通して卵巣老化の制御に関わることが示唆された。

Summary

The ovary is the main regulator of female reproduction and also the responsible organ for female whole life. It produces reproductive hormones and organizes homeostasis of female body and mentality with complicated endocrine system. For studying female anti-aging, it's necessary to reveal the molecular mechanism of ovarian function. PRIP (Phospholipase C-related but catalytically inactive protein) was identified as an inositol-1,4,5-trisphosphate binding protein, comprising type1 and 2, whose gene ablation impaired female fertility manifested by decreased number of pups, longer estrous days and increased secretion of gonadotropins. Herein, we investigated the involvement of PRIP in fertility through ovary. Superovulation assay revealed the remarkable decrease of the ovulated oocyte in ovaries of PRIP knockout (KO) mice. Histological analysis of the ovaries revealed more immature follicles and fewer corpus lutea in KO ovaries. The promoted expression of luteinizing hormone receptors (LHR) at early stages of follicle development was observed in KO ovaries. The phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), a downstream target of LH signaling, was enhanced in KO granulosa cells. Serum level of estradiol was lower in DKO mice without affecting the production. These results suggest that PRIP is involved in follicle development at the early stages through the regulation of LH signaling and estradiol secretion, and also in the regulation of ovarian aging.

Key Words: ovary, follicle development, PRIP, LH, aging

Miho Matsuda

九州大学 大学院歯学研究院 口腔細胞工学

Laboratory of Molecular and Cellular Biochemistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University

1. はじめに

我が国は今や超高齢社会であり、女性の平均寿命は87歳を越え世界首位を争う。高齢化が進むほど人口における女性の割合が上がるため、女性の健康維持・抗老化の向上は超高齢社会全体を維持・活性化する上でも欠かせない。そのためには「老化(加齢)」という不可避な生物学的現象とその分子メカニズムの解明そしてそれに基づく「抗老化(予防・治療)」の開発が重要である。女性における老化のメカニズムを探る上で重要な組織として卵巣があげられる。卵巣は、性周期を司る視床下部—下垂体—性腺(雌では卵巣)軸のひとつであり、エストロゲン等性ホルモンを分泌しフィードバックによる精密な制御機構を備えつつ他の組織に比べ機能低下が早く始まることなどから卵巣特異的な老化の仕組みがあると考えられる。この仕組みを明らかにすることは上述の解明・開発において必須である。

我々が独自に発見し機能解析を進めているPRIP [PLC (phospholipase C)-related, but catalytically inactive protein] は、細胞内の特定の情報伝達機構に関与する¹⁾²⁾。本分子の遺伝子欠損マウスにおいて近年、メスに起因する出産仔数の低下・性周期の乱れが観察された。性腺刺激ホルモンであるLH (luteinizing hormone)、FSH (follicle stimulating hormone)の血中濃度が上昇していたため検討したところ、PRIP欠損によりこれらのホルモン分泌に重要なエクソサイトーシスの抑制的制御がうまく機能せず分泌過多になっていることが示唆された⁴⁾⁵⁾。そこで、これら性腺刺激ホルモンの制御を受ける卵巣にも影響があるものと考え、卵巣の機能および老化の制御へのPRIPの関与を明らかにすることを目指し、PRIPの役割を検討した。

2. 方法

本実験に用いたマウスは九州大学医学研究院附属ヒト疾患モデル研究センター動物実験施設にて飼育管理され、動物実験委員会の承認のもと実験を行った。使用したPRIP遺伝子欠損マウス(KO)は、PRIP1およびPRIP2の両遺伝子を欠損したマウスである。雌の野生型マウス(WT)およびKOに、妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG、5 IU)を投与した48時間後にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG、5 IU)を投与し、過排卵を誘発した。その16時間後に、排卵された卵子を卵管膨大部より採取しカウントした。また、卵子採取後摘出した卵巣のパラフィン切片を作製しHematoxylin-Eosin (HE)染色を行った。

WT(3、12、26週齢)の卵巣より組織抽出液を調製し、PRIP遺伝子の発現変化について抗PRIP1およびPRIP2抗体を用いてウェスタンブロッティング(WB)解析を行った。結果は、検出されたバンドの強度を測定した値を相対的にグラフで示す(PRIP1、PRIP2とも同様の結果を得たので図2AではPRIP1の結果を示す)。

マウス卵巣より顆粒膜細胞を調製し培養を行い、hCG刺激後経時的に細胞を回収し、抗ERK、抗pERKおよび抗 β -actin抗体を用いてWB解析を行った。

マウスにPMSG(5 IU)を投与した24時間後および48時間後に採血し調製した血清、および各時間での採血後のマウスから摘出した卵巣の組織抽出液を用いて、エストロゲン(E2)量をEnzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)法にて測定した。また、ホルモン投与していないマウスより採血し、血中の抗ミューラー管ホルモン(AMH)をELISA法にて測定した。

3. 結果

これまでの解析から、KO マウスにおいてメスに起因する出産仔数の低下が観察されたため、その原因を検討するため過排卵実験を行った。WT に比べ KO では、3 週齢で約 4 分の 1、12 週齢では約半分に減少していた (図 1)。また、排卵後の卵巣における組織学的解析から、WT では黄体が複数見られるのに対し KO では未成熟卵胞が多く黄体数は少ないことが観察された。これらのことから、KO での出産仔数低下は少なくとも排

卵数の低下によるものであることが判明した。

PMSG、hCG 投与後にも関わらず未成熟卵胞が多いことなどから KO における卵胞成熟過程の異常が示唆された。そこでまず PRIP の発現を確認したところ、卵巣での発現を認めた (図 2 A)。卵胞由来の顆粒膜細胞においても発現が確認された。次に、卵巣における免疫組織学的解析により KO 卵巣の未成熟卵胞において LH 受容体 (LHR) の高発現が認められたことから、卵胞成熟に重要なシグナルの一つである LH シグナリングについて検討した。シグナル経路の下流に位置

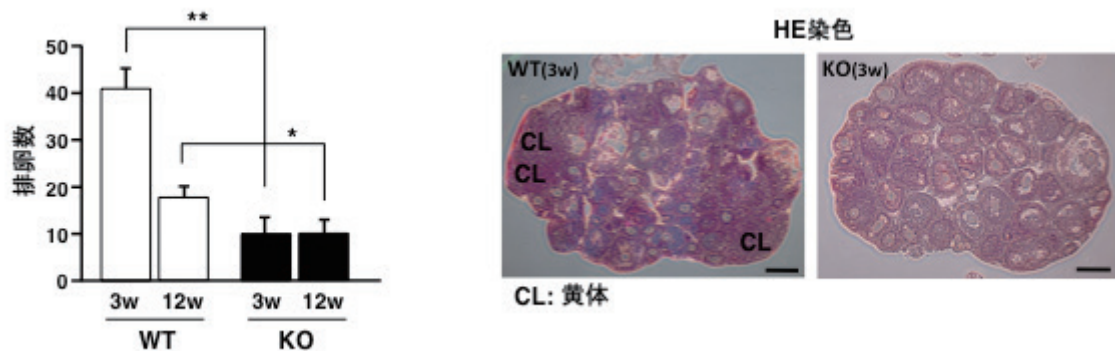


図 1. マウス 1 匹当たりの排卵数および排卵後の卵巣

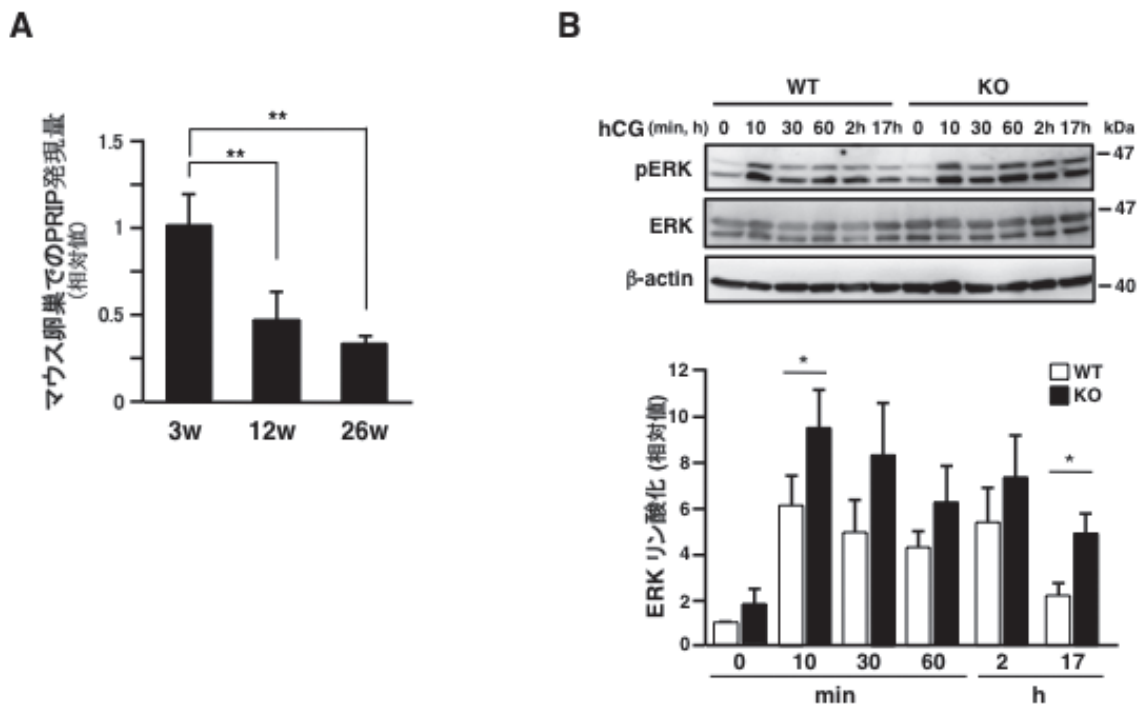


図 2. 卵巣における PRIP の発現量および ERK リン酸化の経時的変化

する ERK(Extracellular signal-related kinase) のリン酸化を、WT および KO 卵巣の顆粒膜細胞を用いて hCG 刺激で経時的に追ったところ、WT に比べ KO では刺激前に既にリン酸化量が多く、またピーク後のリン酸化量の減少が遅延する傾向を示した (図 2B)。

卵胞成熟とともに分泌が増加する血中 E2 は、マウスに PMSG 投与後 24 時間、48 時間ともに KO で低かったが、その後卵巣に残存する E2 量は WT と同等もしくはやや多かった (図 3A)。

4. 考察

KO マウスにおける出産仔数低下の原因として排卵数の低下が明らかとなったが、過排卵実験の結果において、WT では週齢とともに減少するのに対し、KO においては 3 週齢で既に 12 週齢と同程度の低い排卵数であった。また、PRIP は卵巣で発現しているが経時的に減少する。生殖を司る視床下部—下垂体—性腺軸を構成する視床下部での発現は経時的に変わらないことを確認しており、PRIP の発現が加齢とともに減少するのは卵巣特異的であると言える。これらのことから、KO 卵巣では幼若齢で既に週齢の進んだ状態、つまり加齢の状態であると考えられた。このことは、KO における血中 AMH 濃度の低下からも支持される (図 3B)。排卵数低下の原因として、排卵時の異常および排卵可能な成熟卵胞の減少が

考えられたが、ここでは結果を省略するが、卵丘細胞卵子複合体 (cumulus oocyte complex) の膨潤は WT 同様 KO でも適切に生じ、排卵制御に関する種々の遺伝子の発現量も、排卵前後で KO は WT と同様の变化を示した⁶⁾。つまり排卵前後の異常は認められなかった。この結果からも、排卵数の低下は卵胞成熟の異常による排卵可能な成熟卵胞の減少によるものと結論づけられた。加齢とともに卵胞成熟能は低下するが、KO マウスにおいては、下垂体からの LH 分泌量の増加、また未成熟卵胞の卵巣顆粒膜細胞における LHR の高発現により、卵胞が未成熟の段階で LH シグナルが充進し成熟しにくくなっているものと考えられる。また KO では、卵胞成熟能低下のため予想通り血中 E2 量は低下していたが、E2 の産生能は WT マウスと同等であった。このことから PRIP が E2 の分泌制御に関わることが示唆されたが、これは LH シグナルの充進とは別のメカニズムと考えられる。

以上より、PRIP は LH シグナルおよび E2 分泌制御を介して卵巣の機能および老化の制御の一端を担っていることが明らかとなった。これらの制御に PRIP が具体的にどのように関わるかは不明であり、さらなる解析が必要である。遺伝子発現情報データベース (GEO) では、PRIP の発現低下が見られる痩せ型の多嚢胞性卵巣症候群患者の報告もあり、PRIP 欠損 (発現低下) により E2 や

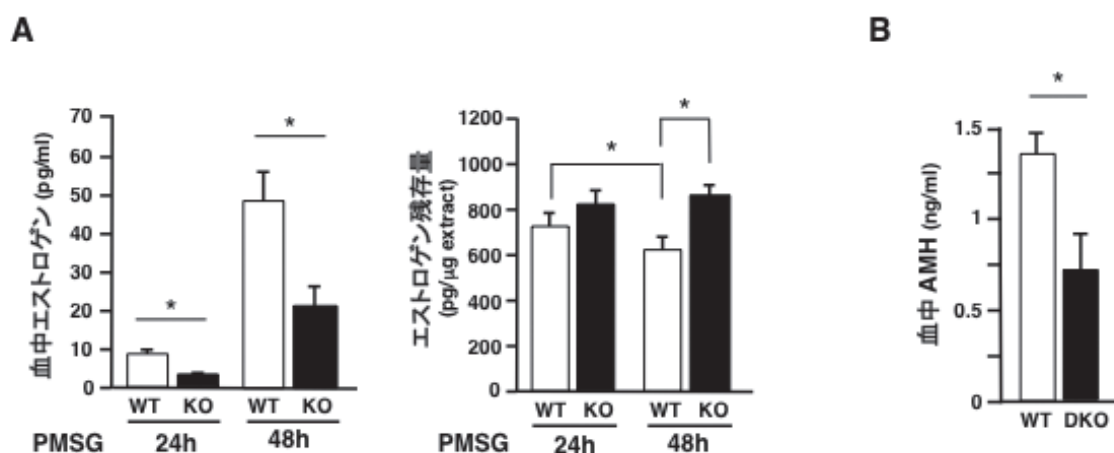


図3. ホルモンの血中濃度および卵巣におけるホルモン量

AMHの血中濃度低下を来すことから、ある種の不妊症や卵巣機能低下のマーカーになる可能性が考えられる。また、PRIP発現の加齢に伴う減少から、卵巣での発現低下を抑えることによる老化の遅延の可能性も考えられ、臨床応用につながる研究に進展させたいと考える。

[文献]

- 1) Kanematsu T, Jang IS, Yamaguchi T, et al: Role of the PLC-related, catalytically inactive protein p130 in GABA_A receptor function. EMBO J. 21: 1004-1011, 2002.
- 2) Tsutsumi K, Matsuda M, Kotani M, et al: Involvement of PRIP, phospholipase C-related, but catalytically inactive protein, in bone formation. J Biol Chem. 286: 31032-31042, 2011.
- 3) Sugiyama G, Takeuchi H, Kanematsu T, Gao J, Matsuda M and Hirata M: Phospholipase C-related but catalytically inactive protein, PRIP as a scaffolding protein for phospho-regulation. Adv Biol Regul. 53: 331-340, 2013.
- 4) Matsuda M, Tsutsumi K, Kanematsu T, et al: Involvement of phospholipase C-related inactive protein in the mouse reproductive system through the regulation of gonadotropin levels. Biol Reprod. 81: 681-689, 2009.
- 5) Zhang Z, Takeuchi H, Gao J, et al: PRIP (phospholipase C-related but catalytically inactive protein) inhibits exocytosis by direct interactions with syntaxin 1 and SNAP-25 through its C2 domain. J Biol Chem. 288: 7769-7780, 2013.
- 6) Matsuda M. and Hirata M.: Phospholipase C-related but catalytically inactive proteins regulate ovarian follicle development. J Biol Chem. 292: 8369-8380, 2017.