

Thesis

受容体ノックアウトマウスを活用したエストロゲンの
初期卵巣作用に関する検討

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター遺伝子情報制御部門医学研究科

生物・医学研究系専攻 博士課程4年

大羽 沙弥佳

Analysis of Estrogen Signaling on Early Ovarian Function Utilizing ER α and ER β KO Mice

Sayaka Ohba (Division of Gene Regulation and Signal Transduction, Research Center for Genomic Medicine, Saitama Medical University, 1397-1 Yamane, Hidaka, Saitama 350-1241, Japan)

女性ホルモンであるエストロゲンは、幅広い生物種で生殖器の形成過程、二次性徴の成長に不可欠である。その生理機能は、2種類のエストロゲンレセプター (ER α と ER β) を介し下流応答遺伝子群の転写を制御することで引き起こされる。ER α および ER β は、各臓器での発現パターンの違いやノックアウト (KO) マウスにおける卵巣の表現型からも異なる機能を有すると想定されているが、その機能は未だ不明な点が多い。

本研究では、ほ乳類におけるエストロゲンの卵巣作用に関する機能解析を行うために、受容体ノックアウトマウス ER α KO および ER β KO マウスを活用し、特にエストロゲンシグナルと初期卵巣作用に重点を置き研究を行った。ER α KO マウス卵巣では、未成熟3週齢卵巣において、顆粒膜細胞のTUNEL陽性細胞の減少、Caspase-3の発現局在の変化およびcyclin D2の発現減少が観察されたが、生後6日齢 (P6 齢) マウス卵巣ではcyclin D2の発現や局在に変化がなかった。一方、ER β KO マウス卵巣では、生殖細胞増殖因子c-kit抗体による免疫染色を指標とした生殖細胞数の変化を検討した結果、P6 齢卵巣においてc-kit陽性細胞が有意に増加していた。さらに、P6 齢雌マウスにエストロゲン付加した際のc-kit mRNAの発現を検討した結果、エストロゲン投与6時間後に、c-kitのmRNA量が減少していることを確認した。以上の結果から、エストロゲンの初期卵巣作用に関し、ER α は、KO マウス3週齢卵巣におけるアポトーシスの抑制と細胞増殖の減少に、直接または間接的に関与していることが示唆された。ER β は、出生前後の時期に原始生殖細胞の増殖を抑制する方向で、生殖細胞数を制御している可能性が示唆された。

Keywords: エストロゲン, ER α , ER β , 卵巣機能, アポトーシス, 細胞増殖

緒 言

エストロゲンは、多様な臓器で様々な機能を有し、生殖機能においても重要なステロイドホルモンであり、女性・男性ともに生殖器官や配偶子の分化、形成および二次性徴に関与すると考えられている¹⁾。その生理作用は、エストロゲンレセプター (ER) を介して下流応答遺伝子群の転写を制御するgenomicな作用とERを介さないnon-genomicな作用が存在する²⁾。ヒト

やマウスなど哺乳類のERには、遺伝子配列、タンパク質の構造およびリガンド結合能などが異なるER α とER β の2種類があり、転写制御機構、各臓器における発現パターンの比較からER α および ER β で独立の機能があることが想定される³⁾。

雌性生殖器である卵巣の主な働きは、エストロゲンの産生と分泌、ならびに、卵子の形成と成熟である。その双方に関わる卵胞は、生殖細胞である卵子を体細胞である顆粒膜細胞と莢膜細胞が取り囲む構造で、自らの発育とともに卵子を成熟させ、性ステロイドホル

モンの産生を行うと考えられている^{4,5)}。マウスの始原生殖細胞 (PGC) は、交尾後 7.0 日になると体細胞から分化し、交尾後 11.0 から 11.5 日まで増殖を繰り返しながら卵巣原基に移動し、交尾後 13.5 日には減数分裂を開始して卵母細胞となる⁶⁾。生殖細胞を欠く自然発症の変異マウスの解析により、*Steel (Sl)* に位置する幹細胞因子 (SCF)^{7,8)}、および *White Spotting (W)* に位置する SCF 受容体 (c-kit)⁹⁾ が PGC の生存および増殖に必須であることが示されている^{10,11)}。

卵胞発育段階と組織構造変化における定義について、以下に説明する。原始卵胞では、卵母細胞が平坦な一層の上皮細胞で囲まれている。この上皮細胞が立方化し顆粒膜細胞になると一次卵胞、顆粒膜細胞が数層になりその外側に基底膜を介して間葉系細胞から分化した莢膜細胞が形成されると二次卵胞、その顆粒膜細胞層に卵胞腔が形成されると胞状卵胞、さらに卵丘が形成されると成熟卵胞となる。原始卵胞から二次卵胞までは性腺刺激ホルモン非依存的に発育し、胞状卵胞以降は性腺刺激ホルモン依存的に発育すると考えられている。マウスでは交尾後 11 日 (胎生 10 日) には ER の転写が確認され¹²⁾、ラットでは生後 12 日以降にエストロゲンの産生が増加し始めるため、生後 12 日以前には胞状卵胞が確認されない¹³⁾。

エストロゲンは、古くから細胞増殖に関与していることが知られている。ER α を発現するヒト乳癌ガン細胞株 MCF7^{14,15)} ではエストロゲンを添加することにより細胞増殖が促進する¹⁶⁾。この細胞においてエストロゲンは、ER α を介して cyclin D1 の発現を亢進し細胞周期を進め¹⁷⁾、最近では、ER α の下流応答遺伝子である Efp が細胞周期進行の抑制因子である 14-3-3 σ を標的とするユビキチンリガーゼとして作用し¹⁸⁾、乳癌細胞の増殖を制御していることが報告されている。生体においても、Efp ノックアウト (KO) マウスで、子宮内膜上皮組織におけるエストロゲンへの応答性および細胞増殖能の低下が示されており¹⁹⁾、ER α を介するシグナルがガン細胞株でも生体でも細胞増殖と密接に関与していることが考えられる。また、細胞増殖の観点から成長因子とエストロゲン作用に関しては、生体の子宮上皮組織において、インスリン様成長因子 1 (IGF-1) の発現がエストロゲンにより調節を受けることが報告されている²⁰⁾。

一方、エストロゲンとアポトーシスとの関与について、卵巣摘除 E2 処理ラットでは、脳下垂体前葉細胞でのアポトーシスの増加²¹⁾、心筋組織でのアポトーシス関連遺伝子 Caspase-3 の抑制が報告されている²²⁾。また、培養系においても、ラット胎児心筋由来細胞株 H9c2 で、エストロゲンが Akt を介して酸化ストレスに誘導されるアポトーシスを抑制することが示唆されている²³⁾。このように、エストロゲンは、アポトーシス増進にも抑制にも関与することが想定されている。

ER α を介するエストロゲンシグナルと卵巣作用に関連して、1993 年に Lubahn らにより ER α KO マウスが作製され、その卵巣には黄体が存在せず、血胞や囊胞が存在し不妊であった²⁴⁾。さらに解析が進展し ER α KO マウスは、排卵に障害を持ち²⁵⁾、血中のエストロゲン濃度²⁶⁾、血中における黄体形成ホルモン (LH) 濃度が上昇していることがわかった²⁷⁾。加えて、ER α KO 雌マウスにおいて、腹腔内注射による性腺刺激ホルモン刺激ホルモンアンタゴニストである Antide 処理を行い、血中の LH 濃度を野生型レベルまで低下させると、卵巣で確認された血胞や囊胞が減少することが示され²⁷⁾、その表現型は卵巣よりむしろ視床下部脳下垂体での ER α 欠損に起因する LH の慢性刺激による可能性も示唆されている²⁸⁾。

ER β を介するエストロゲンシグナルと卵巣作用に関連して、1998 年に Krege らにより ER β KO マウスが作製され、その卵巣において成熟卵胞数が減少し、排卵数および産仔数が顕著に減少すると報告されている²⁹⁾。ER β KO マウス卵巣において確認される成熟卵胞の減少は、アンドロゲンレセプター (AR) アンタゴニストである Fultamide 処理により部分的に改善されるため、ER β が卵巣および卵胞における AR の発現を制御する可能性が示唆されている³⁰⁾。

これまでに、哺乳類の卵子および卵巣において ER α は、卵胞形成、排卵、および黄体形成²⁵⁾、他方 ER β は、顆粒膜細胞分化、正常な卵胞形成および性腺刺激ホルモンへの排卵応答に重要であると報告されているが³¹⁾、これらは性周期獲得後の成熟マウスでの作用である。

本研究では、未知のエストロゲンシグナルの初期卵巣作用を検討するため、生後 6 日齢 (P6 齢)、3 週齢および 6 週齢の ER α および ER β KO マウスを用い、卵巣における形態的变化が起きる前、または起き始める時期にさかのぼり、特に細胞増殖とアポトーシスの観点から、ER α および ER β の機能を検討した。

材料と方法

動物

遺伝子改変マウスの使用および管理に関しては、遺伝子組換え生物等の規則による生物多様性の確保に関する法律の基づき、埼玉医科大学組換え DNA 委員会および実験動物使用に関する指針に従って審査され、承認を受けて施行した。ER α KO、ER β KO マウス (Taconic, USA) は実験動物施設 津久井講師より供与いただき、C57BL/6N は日本クレアより購入し、生後 6 日齢 (P6 齢)、3 週齢および 6 週齢で卵巣を採取した。また、偽妊娠マウスには ICR マウス (日本クレア) を使用した。P6 齢の野生型マウスを得るために体外受精および胚移植を行った。9 週齢以上の雌 C57BL/6N マウスに 7.5 IU の妊馬血清性性腺刺激ホル

モン (PMSG: セロトロピン: 帝国臓器) を投与し, 48 時間後, 7.5 IU のヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG: ゴナトロピン: 帝国臓器) を投与した. hCG 投与 12 時間後, 雄 C57BL/6N マウスの精巣上体尾部から精子を採取し体外受精用培地 TYH³²⁾ にて, インキュベーター (二酸化炭素 5%, 37°C) で 1 時間半培養した. hCG 投与 13.5~15 時間後, C57BL/6N 雌マウスの卵管膨大部より卵子を採取し TYH にて媒精後, インキュベーターで培養した. 媒精 4~6 時間後, 受精卵に付着している卵丘細胞を除去するため 0.3 mg/ml のヒアルロニダーゼ (SIGMA, USA) で処理後, 胚培養用培地 kSOM³³⁾ にてインキュベーターで 2 細胞期から 4 細胞期まで培養した. 次に, 精管結紮した雄 ICR マウスと発情期の雌 ICR マウスを自然交配させ, 翌日に膣栓を確認し偽妊娠マウスを用意し, 偽妊娠マウスの卵管膨大部に 2 細胞期から 4 細胞期の胚を 20~24 個移植した. さらに, 体外受精および胚移植により得た雌産仔に 2 µg/g 体重または 20 µg/g 体重となるように 17β-estradiol (E2: SIGMA, USA) をオリーブオイルで希釈して, P6 齢雌マウスの背側に皮下注射し, 6 時間後に卵巣を採取した.

切片

3 週齢および 6 週齢卵巣はパラフィン, P6 齢卵巣は OTC コンパウンド (サクラファインテックジャパン) で包埋処理した. パラフィン切片の固定は, リン酸緩衝溶液 (PBS) 調整した 4°C の 4% パラフォルムアルデヒド/PBS (PFA: Sigma, USA) で採取した卵巣を一晩固定, PBS で 3 回すすぎ 50%~100% (無水) エタノールで各 6 時間以上ずつ浸して脱水した. パラフィン処理は, キシレンに浸し 30 分間透徹, キシレンパラフィン混合液 (1:1) 1 回, パラフィン 2 回, 65°C にて各 1 時間ずつ浸し, パラフィンで包埋した. パラフィンプロックをミクロトーム (大和光機) で 10 µm に薄切りし, 滅菌水を滴下した顕微鏡用スライドガラス (Fisher scientific, USA) に乗せ, 伸展器 (42°C) でパラフィンを伸展後, 37°C で一晩乾燥させた. 凍結切片は, 採取した卵巣を 4°C の 4% PFA/PBS で 30 分間固定, 4°C の 25% スクロース/PBS に 1 時間浸し, OTC コンパウンド内で凍させ, クリオスタット (LEICA, Germany) で 10 µm に薄切りし, 顕微鏡用スライドガラスに貼り付けた.

ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色

パラフィン切片は, キシレンを用いてパラフィンを除去し, 100~50% エタノールおよび PBS で水和させた. 次に, ヘマトキシリン溶液 (マイヤーヘマトキシリン溶液 (×2): 和光純薬) に数分間浸して水洗と色出しを行い, 0.25% エオジン溶液 (エオジン Y: 和光純薬) に数分間浸して水洗, 80~100% エタノールで脱水, 透徹し封入した.

TUNEL 染色

パラフィン切片の前処理は, キシレンを用いてパラ

フィンを除去し, 100~50% エタノールおよび PBS で水和させ, 37°C の 20 µg/ml protenase K/PBS (SIGMA, USA) で 30 分間処理して組織を浸透化, 0.3% 過酸化水素メタノールに 30 分間浸して内在性ペルオキシダーゼを不活化した. TUNEL 染色は, *In Situ* Cell Death Detection Kit, AP (Roche, Switzerland) を使用し, 50 µl の TUNEL 反応液で 37°C にて 1 時間反応, 10% 正常ヒツジ血清/PBS でブロッキング, 50 µl のコンバーター AP (アルカリフォスファターゼ) で 37°C にて 30 分間反応させたのち, 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸/ニトロブルーテトラゾリウム塩発色基質液 (NBT/BCIP: Roche, Switzerland) で発色させた.

免疫染色

パラフィン切片の前処理は, キシレンを用いてパラフィンを除去し, 100~50% エタノールおよび PBS で水和させ, 0.03% トリプシン/PBS で 30 分間, 100°C の 0.1 M クエン酸緩衝液 (SSC: pH 6) で 5 分間浸透化処理を行い, 0.3% 過酸化水素メタノールに 30 分間浸し内在性ペルオキシダーゼを不活化したのち, 10% 正常ヤギ血清/PBS で 60 分間ブロッキングした. Caspase-3 および cyclin D2 の免疫染色は, 一次抗体として Caspase-3 (Asp175: Cell Signaling, USA) を 200:1, cyclin D2 (M-20: Santa Cruz, USA) を 500:1 で 1 時間反応させ, 二次抗体として VECTASTAIN ABC kit (VECTOR, USA) を使用してビオチン標識抗ウサギ抗体で 30 分間反応させ, ABC 試薬で 30 分間アビジンシグナルを増幅し, ジアミノベンチジン (DAB: KPL, USA) で染色した.

凍結切片の前処理は, PBS に 10 分間浸して水和させ, 4% PFA/PBS で 10 分間固定したのち, 0.1 M SSC (pH 6) 100°C で 5 分間浸透化処理を行い, 0.3% 過酸化水素メタノールに 30 分間浸し内在性ペルオキシダーゼを不活化し, cyclin D2 は 10% 正常ヤギ血清/PBS, c-kit (M-14: Santa Cruz, USA) は 10% 正常ウサギ血清/PBS で 60 分間ブロッキングした. cyclin D2 および c-kit の免疫染色は, 一次抗体として cyclin D2 を 500:1, c-kit を 800:1 で 1 時間反応させ, 二次抗体として VECTASTAIN ABC kit を使用して cyclin D2 はビオチン標識抗ウサギ抗体, c-kit はビオチン標識抗ヤギ抗体で 30 分間反応させ, ABC 試薬で 30 分間アビジンシグナルを増強し, DAB で染色した.

In Situ Hybridization (ISH)

ジゴキシゲニン (Dig) 抗体を使用し, 常法であるノン RI *in situ* ハイブリダイゼーションマニュアルに従って行った (Roche, Switzerland). ハイブリダイゼーションの前処理は, 凍結切片を PBS に 10 分間浸して水和させ, 4% PFA/PBS で 10 分間固定後, 0.1% Tween20 を含む PBS (PBT) で調整した 1 µg/ml protenase K で 10 分間浸透化, 2 mg/ml グリシン/PBT 1 回, PBT 2 回で反応を止め洗浄, 4% PFA/PBT で再び固定, 65°C で 1

時間プレハイブリした。ハイブリダイゼーションは、マウス *c-kit*: (GeneBank accession #; NM_0210099.2) の1051から1511 bpの領域をプローブとし、65°Cで一晩行った。洗浄および *c-kit* の検出は、洗浄溶液1 (50% フォルムアミド, 2.5×SSC, 1% SDS), 洗浄溶液3 (50% フォルムアミド, 1×SSC), 65°Cでスライドを洗浄, 0.1% Tween20を含むトリス塩酸緩衝液 (TBST) に30分間浸漬し、10% 正常ヒツジ血清/TBSTで1時間ブロッキングしたのち、アルカリフォスファターゼ (AP)-抗Dig抗体で一晩反応させた。さらに、TBSTでスライドを洗浄、NBT/BCIPで発色させた。

結 果

ER α KOおよびER β KOマウスの卵巣における形態的变化

卵巣におけるエストロゲンシグナルの作用を解析するため、Lubahnらにより1993年に作製されたER α KO²⁴⁾ および Kregeらにより1998年に作製されたER β KO²⁹⁾ を使用した。6週齢卵巣のHE染色により、Lubahn, Kregeらの報告と同様にER α KO, ER β KOともに野生型マウスと異なった形態を示していることが確認できた。野生型マウス卵巣では、原始卵胞から成熟卵胞まで様々な段階の卵胞が存在し、排卵後に形成される黄体も確認できた (Fig. 1A)。ER α KOマウス卵巣では、黄体が存在せず血胞 (矢印) や囊胞 (アスタリスク) が存在し、顆粒膜細胞の層が薄く、顆粒膜細胞間の接着性が弱まっていることを観察した (Fig. 1B)。ER β KOマウス卵巣では、卵胞数が増加傾向にあるが、成熟卵胞がほとんど確認できなかった (Fig. 1C)。ER α KOおよびER β KOで異なる表現型を示すことから、卵巣におけるER α およびER β の機能も異なっている可能性があり、形態的变化が起こり始める時期にさかのぼって卵巣における遺伝子発現の変化を検討した。

ER α KOマウス卵巣における顆粒膜細胞の減少

Fig. 1Bの結果を受け、顆粒膜細胞の層が薄く、細胞接着性が弱まっている原因として、1) アポトーシスを起こし顆粒膜細胞数が減少し、質的に変化した、または2) 細胞増殖が阻害され顆粒膜細胞数が減少し、細胞増殖に障害を生じた可能性が考えられた。そこで、顆粒膜細胞の減少を検討するため、卵巣中に卵胞が多数存在し、顆粒膜細胞が観察しやすい3週齢マウスの卵巣において、アポトーシス検出と細胞増殖マーカーによる免疫染色を行った。

アポトーシスを検出するため、TUNEL染色およびCaspase-3免疫染色を行った。TUNEL染色の結果、野生型マウス卵巣ではアポトーシス陽性細胞が検出されたが (Fig. 2A), ER α KOマウス卵巣では検出されなかった (Fig. 2B)。Caspase-3での免疫染色の結果、野生型マウス卵巣では卵胞ごとに発現の有無がはっきり

分かれていたが (Fig. 2C), ER α KOマウス卵巣では局在がなくなりほとんどの卵胞で弱い発現が確認できた (Fig. 2D)。

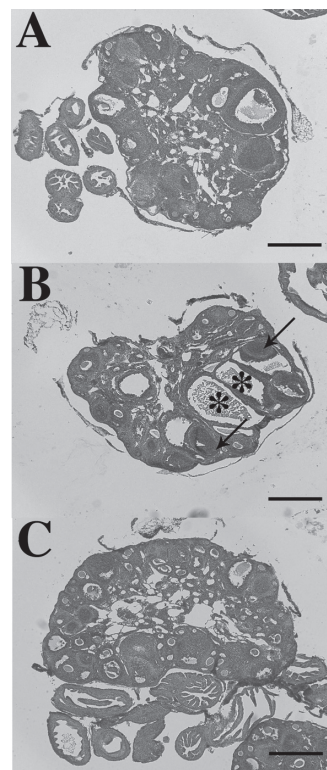


Fig. 1. 野生型, ER α KOおよびER β KOマウス卵巣の形態。ヘマトキシリンとエオシンで染色した成熟6週齢卵巣の野生型 (A), ER α KO (B) およびER β KO (C)。矢印は血胞, アスタリスクは囊胞。スケールバー = 400 μ m。

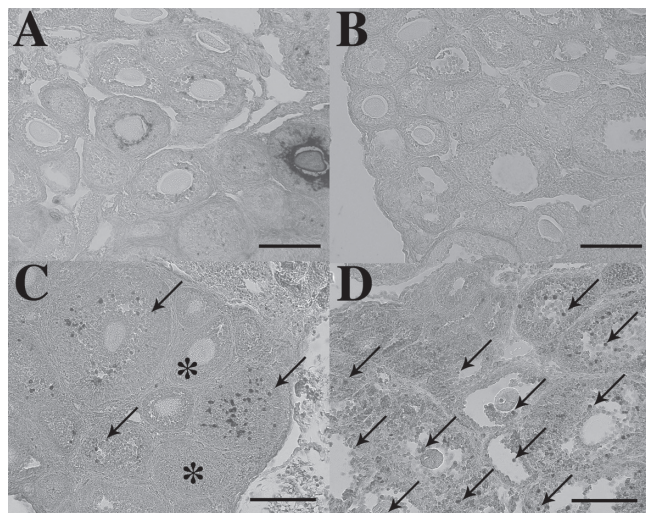


Fig. 2. 野生型およびER α KOマウス卵巣における、アポトーシス細胞の検出。TUNEL染色を行った3週齢マウス卵巣の野生型 (A) およびER α KO (B)。Caspase-3抗体による免疫染色を行った3週齢マウス卵巣の野生型 (C) およびER α KO (D)。矢印はアポトーシス陽性卵胞, アスタリスクはアポトーシス陰性卵胞を示す。スケールバー = 100 μ m。

また、細胞増殖の増減を検討するため、ERを発現するガン細胞（卵巣・子宮癌）で発現が報告される cyclin D2 を指標とし、免疫染色を行った。cyclin D2 の免疫染色の結果、野生型マウス卵巣では、卵巣全体、特に顆粒膜細胞で強く発現していたが (Fig. 3A), ER α KO マウス卵巣では顆粒膜細胞での発現が顕著に減少した (Fig. 3B). しかし、顆粒膜細胞がほとんど存在しない P6 齢マウス卵巣においては、野生型と比較して発現に変化がなかった (Fig. 3C, D). ER β KO マウス卵巣では野生型マウス卵巣と比較して変化は確認できず (データ示さず), これらの結果は、ER α KO マウス卵巣に特異的であった。

ER β KO マウス卵巣における卵胞数の増加

Fig. 1Cの結果を受け、卵胞数の増加を検討するため、生殖細胞を確認しやすいP6 齢卵巣において、0.1 mm²あたりの生殖細胞数を野生型マウス卵巣と比較した。P6 齢卵巣では卵祖細胞、卵母細胞および卵子に発現する生殖細胞増殖因子 c-kit を指標として免疫染色を行い (Fig. 4A, B), 0.1 mm²あたりに存在する生殖細胞数を野生型, ER β KO マウス卵巣で比較した (Fig. 4C). 野生型マウス卵巣と比較して, ER α KO 卵巣では c-kit を発現する生殖細胞数に変化がなかったのに対し (データ示さず), ER β KO 卵巣では有意 (**P < 0.01) に増加していた。

エストロゲン処理野生型マウス卵巣における c-kit 転写量変化

Fig. 4の結果を受け、エストロゲンシグナルと c-kit の発現制御の関連について明確にするため、ER α および ER β が発現し内在性エストロゲンの影響が少ないと考えられる P6 齢卵巣において、エストロゲン添加による c-kit mRNA の転写量の変化からエストロゲン応答性を検討した。体外受精および胚移植により同時期に得た産仔を用い、皮下に 2 μ g/g または 20 μ g/g の E2 を投与し、6 時間後採取した卵巣と無処理の卵巣で、マウス c-kit プローブを用いて ISH を行い、エストロゲンに対する c-kit の短時間での発現量変化を観察した。オリブオイルのみを投与した対照区卵巣では、原始卵胞 (矢頭) および一次卵胞 (矢印) で c-kit の転写を確認できるが (Fig. 5A), 濃度に係わらず E2 を投与した卵巣では、原始卵胞、一次卵胞ともに c-kit の mRNA が減少していることが観察された (Fig. 5B, C)。

考 察

ER α KO マウス卵巣では、3 週齢卵巣において、顆粒膜細胞の TUNEL 陽性細胞の減少、Caspase-3 の発現局在の変化が観察された (Fig. 2). 卵巣においては、Caspase-3 の上流にある細胞膜結合性の受容体 Fas が、Fas-ligand と結合して顆粒膜細胞をアポトーシスに導くことが報告されている³⁴⁾。また、卵巣摘除 E2 処理ラットにおいて、脳下垂体前葉では lipopolysaccharide

によるアポトーシス誘導に対し TUNEL 陽性細胞が有意に増加したことが報告され²¹⁾、心筋では、アポトーシス制御 MAPK の p38 およびアポトーシス関連遺伝子の Caspase-3 の活性化が低下していることが報告されている²²⁾。また、ラット胎児心筋由来細胞株 H9c2 に

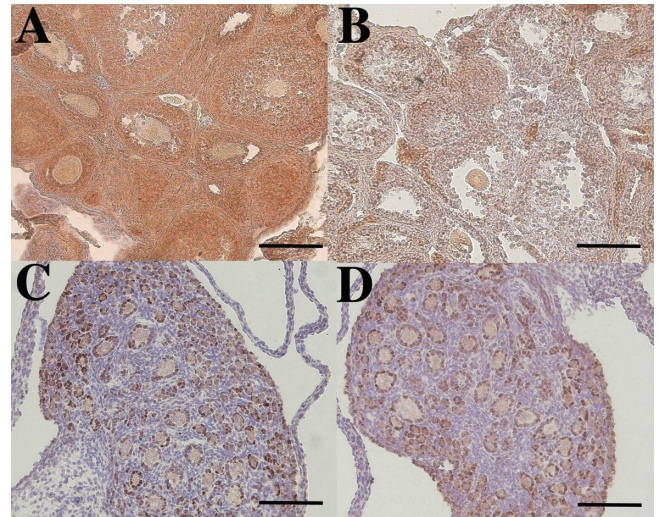


Fig. 3. 野生型および ER α KO マウス卵巣における cyclin D2 の局在. cyclin D2 抗体による免疫染色を行った3 週齢マウス卵巣の野生型 (A) および ER α KO (B), P6 齢マウス卵巣の野生型 (C) および ER α KO (D). スケールバー = 100 μ m.

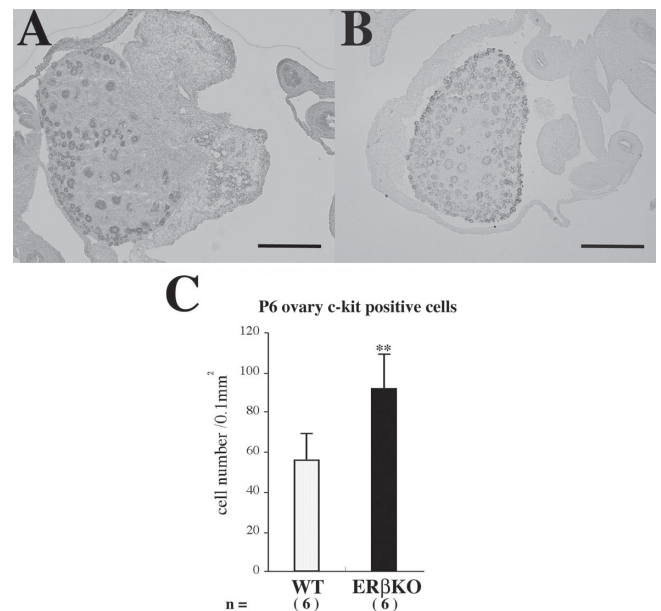


Fig. 4. 野生型および ER β KO マウス卵巣間の生殖細胞数の比較. c-kit 抗体による免疫染色をおこなった P6 齢マウス卵巣の野生型 (A) および ER β KO (B). (C) 野生型と ER β KO マウス卵巣間の c-kit 陽性細胞数の変化. 6 個体から各 1 切片を選択し、0.1 mm² あたりの c-kit 陽性細胞数を数えた. **野生型と比較して有意に増加 (P < 0.01: Excel T 検定). スケールバー = 200 μ m.

において、エストロゲンがAktを介して酸化ストレスに誘導されるアポトーシスを抑制すると報告されていることから²³⁾、臓器によってエストロゲンによるアポトーシス作用の制御が異なることが考えられる。ER α KOマウス卵巣では、アポトーシスが抑制されていたことから、卵巣においてはER α を介したシグナルが顆粒膜細胞のアポトーシス促進に関与している可能性が考えられる。

一方、ヒト卵巣上皮ガン由来細胞株 HEYにおいて、Fasに誘導されるアポトーシスがLHにより抑制されることを示唆されており³⁵⁾、ER α KOマウスでは、血中LHが上昇していることから²⁷⁾、ER α の卵巣における間接的な作用として、過剰なLHがFasに誘導されるアポトーシスを抑制した可能性も考えられる。

ER α KOマウス3週齢卵巣では、顆粒膜細胞におけるcyclin D2の発現の低下が観察された (Fig. 3A, B)。また、ER α KOマウスP6 齢卵巣では、cyclin D2の発現に関しては、変化が確認できなかった (Fig. 3C, D)。ER α KOマウス卵巣では、P6から3週齢までの期間で、顆粒膜細胞におけるcyclin D2の発現が低下したことが考えられ、ER α を介するシグナルは、初期卵巣に

において細胞増殖に関与することが示唆された。ER α 陽性である乳ガン細胞MCF7において、エストロゲンを添加するとcyclin D1の発現量が増加し、エストロゲンおよびERアンタゴニストICI 182,780を添加するとcyclin D1の発現量増加が阻害されると報告されており¹⁷⁾、MCF7ではER α を介しcyclin D1の発現および細胞増殖を制御していると考えられる。また、Dタイプのcyclinは3種類存在し、臓器ごとに発現分布が異なり³⁶⁾、cyclin D2 KOマウス卵巣においてFSH刺激への応答が低下し、顆粒膜細胞の増殖が減少し不妊になると報告されていることから³⁷⁾、顆粒膜細胞におけるcyclin D2の役割が注目される。ER α KOマウス卵巣では、cyclin D2の発現の減少が見られたことから、卵巣においてはER α を介したシグナルがcyclin D2のタンパク質合成を促進し、顆粒膜細胞の細胞増殖に関与している可能性が考えられる。P6 齢卵巣では、エストロゲンの産生が開始されていないため¹³⁾、ER α シグナルの欠如によるcyclin D2発現の低下がなかったのかもしれない。

一方、卵巣においてcyclin D2は、LH刺激によりタンパク質量が減少すると報告されており³⁸⁾、ER α KOマウスでは、血中のLHが上昇していることから²⁷⁾、ER α の卵巣における間接的な作用として、過剰なLHがcyclin D2の発現を抑制している可能性も否定できない。マウスでは、LHの生産はP5 齢に始まりP10 齢までの期間に成体レベルにまで増加することが示されており³⁹⁾、P6 齢卵巣においては、LHの分泌が微量であるため、cyclin D2の発現が変化しなかったのかもしれない。

ER β KOマウスP6 齢卵巣では、c-kitを指標とする免疫染色により生殖細胞が増加していることが観察され (Fig. 4)、エストロゲンのER β を介する初期卵巣作用として、生殖細胞数の制御に関与していることが示唆された。胎児期の卵巣においてc-kitは、生殖細胞であるPGC、卵祖細胞、卵母細胞および卵子の増殖および生存に必須であることが示されている^{10,11)}。PGCは、SCFが細胞膜上に存在する受容体c-kitに結合すると、Srcを刺激してAktを活性化し、アポトーシス誘導免疫抑制薬rapamycinのターゲットであるmTORを介して増殖すると報告されている⁴⁰⁾。また、c-kitを欠く自然発症の変異を持つW^{fl}ホモマウスは、両性ともに生殖細胞を欠くが、Fasとc-kitをともに欠くFasKO/W^{fl}ホモマウスでは、4週齢で卵子や精子が観察される⁴¹⁾。さらに、W^{fl}ホモマウスの5,6週齢精巣では、野生型マウス精巣と比較してFasの転写量が多く、SCF/c-kitがFasの発現を抑制していることが示唆された⁴¹⁾。それ故、ER β KOマウスにおいてc-kitを発現する生殖細胞数が増加するのは、エストロゲンのER β を介してのシグナルが、アポトーシスにより生殖細胞数の制御に関与しているからかもしれない。

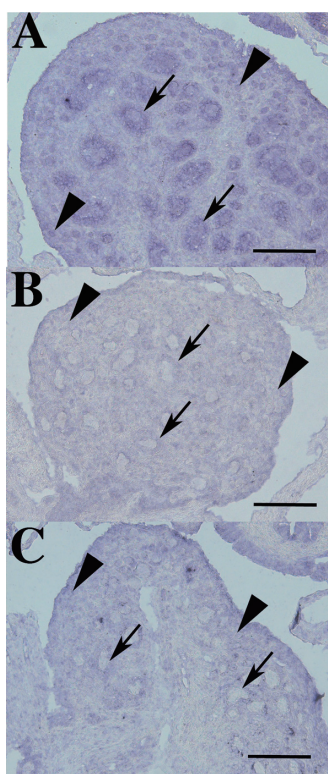


Fig. 5. P6 齢マウスにおけるエストロゲン (E2) 付加による c-kit mRNA への影響。P6 齢マウスに E2 処理後 (2 または 20 $\mu\text{g/g}$ 体重)、6 時間で卵巣を採取した。c-kit アンチセンスプローブによる *In situ* hybridization を行った P6 齢マウス卵巣のコントロール (A)、E2 2 $\mu\text{g/g}$ (B) および E2 20 $\mu\text{g/g}$ (C)。矢頭は原始卵胞、矢印は一次卵胞。スケールバー = 100 μm 。

また、初期卵巣におけるエストロゲンシグナルの作用として、培養系ではマウス交尾後10.5日胚生殖腺由来のPGCと体細胞の共培養系において、エストロゲンが添加されると、生殖腺体細胞でSCFが産生され、PGCでAktおよびPTENが活性化し生殖細胞数が増加するとの報告がある⁴²⁾。しかし、ER β シグナルを欠いているER β KOマウスP6齢卵巣で、生殖細胞数が増加し、上記の培養系の結果とは一致しない (Fig. 4)。ER β KOマウスにおける生殖細胞数の増加の原因として、ER β KOマウス卵巣ではARおよびIGF-1Rの発現が亢進すると報告されており³⁰⁾、これらの因子が生殖細胞増加に関与しているのかもしれない。

野生型マウスP6齢卵巣において、E2処理6時間後のc-kitをプローブとするISHにより、エストロゲンがc-kitの転写を抑制していることが観察され (Fig. 5)、エストロゲンの初期卵巣作用として、c-kitの発現制御に関与していることが示唆された。生殖細胞増殖において重要であるSCFはc-kitのリガンドであり、ステロイドホルモンによりSCF/c-kitの発現制御が存在することが推測される。エストロゲンによるSCFの発現制御に関して、マウス交尾後10.5日胚生殖腺由来のPGCと体細胞の共培養系において、エストロゲンが生殖腺体細胞でSCF転写を増加させ、分泌型タンパク質を増加すると報告されている⁴²⁾。他にSCFの転写を制御するものとして、培養系およびARKOマウスを利用した研究より、アンドロゲンがARを介してSCFの転写を活性化しタンパク質量を増加させることが報告されている⁴³⁾。また、エストロゲンによるc-kitの発現制御に関して、今まで培養系および生体での報告がなく、Fig. 5の結果より新たにエストロゲンが直接c-kitの転写を抑制する可能性が示唆された。生殖細胞増殖に必須であるSCF/c-kitの転写には、少なくともエストロゲンおよびアンドロゲンが関与している可能性があり、エストロゲンによる生殖細胞の増殖機構の解明には、更なる検討が必要と考えられる。

結 論

本研究では、エストロゲンシグナルの初期卵巣における作用を検討した。3週齢卵巣においては、ER α もしくはLHを介したアポトーシスおよび細胞増殖が関与している可能性が考えられた。また、P6から3週齢までの期間に、cyclin D2の発現が減少したことから、正常なER α の発現は成熟後の卵巣のみならず、発育段階にある未成熟な卵巣機能にも重要であることが示唆された。他方、P6齢卵巣においては、ER β を介したエストロゲンの作用として、卵胞発育が開始される以前において、生殖細胞のアポトーシスに関与している可能性が考えられた。ER β は、既知の成熟後の卵胞発育に関与する作用とは別に、出生前後の時期に生殖細胞数を制御する作用を有するかもしれない。

成熟マウスのみならず未成熟マウスの卵巣においても、ER α およびER β は異なる作用を持つことが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導いただいた埼玉医科大学ゲノム医学研究センター 村松正實所長、同センター遺伝子情報制御部門 井上聡部門長に深謝いたします。また、直接ご指導いただいた同センター実験動物施設 津久井通講師に深く感謝致します。

引用文献

- 1) Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 1999;20:358-417.
- 2) Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 2005;19:833-42.
- 3) Muramatsu M, Inoue S. Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:1-10.
- 4) Ryan KJ. Granulosa-thecal cell interaction in ovarian steroidogenesis. *J Steroid Biochem* 1979;11:799-800.
- 5) Parrott JA, Skinner MK. Thecal cell-granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and Kit ligand during ovarian follicular development. *Endocrinology* 1998;139:2240-5.
- 6) Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. *Manipulating the Mouse Embryo A LABORATORY MANUAL*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994. p. 28-31.
- 7) Copeland NG, Gilbert DJ, Cho BC, Donovan PJ, Jenkins NA, Cosman D, et al. Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *Cell* 1990;63:175-83.
- 8) Huang E, Nocka K, Beier DR, Chu TY, Buck J, Lahm HW, et al. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell* 1990;63:225-33.
- 9) Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM, Besmer P, Bernstein A. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 1988;335:88-9.
- 10) Godin I, Deed R, Cooke J, Zsebo K, Dexter M, Wylie CC. Effects of the steel gene product on mouse

- primordial germ cells in culture. *Nature* 1991;352:807-9.
- 11) Dolci S, Williams DE, Ernst MK, Resnick JL, Brannan CI, Lock LF, et al. Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature* 1991;352:809-11.
 - 12) Greco TL, Duello TM, Gorski J. Estrogen receptors, estradiol, and diethylstilbestrol in early development: the mouse as a model for the study of estrogen receptors and estrogen sensitivity in embryonic development of male and female reproductive tracts. *Endocr Rev* 1993;14:59-71.
 - 13) Carson R, Smith J. Development and steroidogenic activity of preantral follicles in the neonatal rat ovary. *J Endocrinol* 1986;110:87-92.
 - 14) Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 1986;231:1150-4.
 - 15) Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 1986;320:134-9.
 - 16) Katzenellenbogen BS, Kendra KL, Norman MJ, Berthois Y. Proliferation, hormonal responsiveness, and estrogen receptor content of MCF-7 human breast cancer cells grown in the short-term and long-term absence of estrogens. *Cancer Res* 1987;47:4355-60.
 - 17) Foster JS, Wimalasena J. Estrogen regulates activity of cyclin Dependent kinases and retinoblastoma protein phosphorylation in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 1996;10:488-98.
 - 18) Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M, et al. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* 2002;417:871-5.
 - 19) Orimo A, Inoue S, Minowa O, Tominaga N, Tomioka Y, Sato M, et al. Underdeveloped uterus and reduced estrogen responsiveness in mice with disruption of the estrogen-responsive finger protein gene, which is a direct target of estrogen receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12027-32.
 - 20) Kapur S, Tamada H, Dey SK, Andrews GK. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its receptor in the peri-implantation mouse uterus, and cell-specific regulation of IGF-I gene expression by estradiol and progesterone. *Biol Reprod* 1992;46:208-19.
 - 21) Pisera D, Candolfi M, Navarra S, Ferraris J, Zaldivar V, Jaita G, et al. Estrogens sensitize anterior pituitary gland to apoptosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287:E767-71.
 - 22) Wang M, Tsai BM, Reiger KM, Brown JW, Meldrum DR. 17-beta-Estradiol decreases p38 MAPK-mediated myocardial inflammation and dysfunction following acute ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 2006;40:205-12.
 - 23) Urata Y, Ihara Y, Murata H, Goto S, Koji T, Yodoi J, et al. 17Beta-estradiol protects against oxidative stress-induced cell death through the glutathione/glutaredoxin-dependent redox regulation of Akt in myocardial H9c2 cells. *J Biol Chem* 2006;281:13092-102.
 - 24) Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11162-6.
 - 25) Rosenfeld CS, Murray AA, Simmer G, Hufford MG, Smith MF, Spears N, et al. Gonadotropin induction of ovulation and corpus luteum formation in young estrogen receptor-alpha knockout mice. *Biol Reprod* 2000;62:599-605.
 - 26) Couse JF, Curtis SW, Washburn TF, Lindzey J, Golding TS, Lubahn DB, et al. Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female mouse after targeted disruption of the estrogen receptor gene. *Mol Endocrinol* 1995;9:1441-54.
 - 27) Couse JF, Bunch DO, Lindzey J, Schomberg DW, Korach KS. Prevention of the polycystic ovarian phenotype and characterization of ovulatory capacity in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Endocrinology* 1999;140:5855-65.
 - 28) Scully KM, Gleiberman AS, Lindzey J, Lubahn DB, Korach KS, Rosenfeld MG. Role of estrogen receptor-alpha in the anterior pituitary gland. *Mol Endocrinol* 1997;11:674-81.
 - 29) Kregge JH, Hodgins JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15677-82.
 - 30) Cheng G, Weihua Z, Mäkinen S, Mäkelä S, Saji S, Warner M, et al. A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary. *Biol Reprod* 2002;66:77-84.
 - 31) Couse JF, Yates MM, Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptor-beta is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to

- gonadotropins. *Endocrinology* 2005;146:3247-62.
- 32) 豊田裕, 横山峯介, 星冬四郎. マウス卵子の体外受精に関する研究. *家畜繁殖誌* 1971;16:147-51.
- 33) Lawitts JA, Biggers JD. Culture of Preimplantation Embryos. *The Methods in Enzymology* 1993;225:153-65.
- 34) Hakuno N, Koji T, Yano T, Kobayashi N, Tsutsumi O, Taketani Y, et al. Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinology* 1996;137:1938-48.
- 35) Slot KA, de Boer-Brouwer M, Houweling M, Vaandrager AB, Dorrington JH, Teerds KJ. Luteinizing hormone inhibits Fas-induced apoptosis in ovarian surface epithelial cell lines. *J Endocrinol* 2006;188:227-39.
- 36) Ciemerych MA, Kenney AM, Sicinska E, Kalaszczyńska I, Bronson RT, Rowitch DH, et al. Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes Dev* 2002;16:3277-89.
- 37) Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, et al. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* 1996;384:470-4.
- 38) Rebecca L. Robker and JoAnne S. Richards. Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: A coordinated balance of the cell cycle regulators Cyclin D2 and p27Kip1. *Mol Endocrinol* 1998;12:924-40.
- 39) Halpin DM, Jones A, Fink G, Charlton HM. Postnatal ovarian follicle development in hypogonadal (hpg) and normal mice and associated changes in the hypothalamic-pituitary ovarian axis. *J Reprod Fertil* 1986;77:287-96.
- 40) De Miguel MP, Cheng L, Holland EC, Federspiel MJ, Donovan PJ. Dissection of the c-Kit signaling pathway in mouse primordial germ cells by retroviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10458-63.
- 41) Sakata S, Sakamaki K, Watanabe K, Nakamura N, Toyokuni S, Nishimune Y, et al. Involvement of death receptor Fas in germ cell degeneration in gonads of Kit-deficient Wv/Wv mutant mice. *Cell Death Differ* 2003;10:676-86.
- 42) Moe-Behrens GH, Klinger FG, Eskild W, Grotmol T, Haugen TB, De Felici M. Akt/PTEN signaling mediates estrogen-dependent proliferation of primordial germ cells in vitro. *Mol Endocrinol* 2003;17:2630-8.
- 43) Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, et al. Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:224-9.