

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

PTEN 抑制物質投与による霊長類誘起排卵数増加法の基礎的検討

分担研究者：鈴木 治（独）医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 主任研究員

研究要旨

動物資源の計画的な増産・系統保存には効率的な誘起排卵法が必須である。本研究ではこれまでにマウスをモデルとして PTEN 阻害剤投与による誘起排卵数増加の可能性を検討してきた。本年度は、PTEN 阻害時期の検討や卵巣内 PI3 キナーゼ（PI3K）や AKT アイソザイム蛋白質含量と排卵誘起効率との関係、さらに PTEN の卵巣内局在について調べたところ、雌マウス個体への PTEN 阻害剤は時期特異的に性腺刺激ホルモンによる誘起排卵数を増加させ、その作用点は卵胞の顆粒層細胞および莢膜細胞であると考えられた。また、PTEN 阻害剤の反応効率には PI3K 含量や AKT アイソザイム含量への依存性が示唆され、誘起排卵数決定機構における PI3K/Akt シグナル経路の重要性が再確認された。これまでは性周期の影響を避けるため、未成熟マウスで検討してきた。PTEN 阻害剤の効果は時期特異性が強いことから、PTEN 阻害剤による霊長類での誘起排卵数増加が成熟個体でも実践的に期待できるかを検討するには、成熟マウスを用いて性周期の影響を調査する必要がある。

A. 研究目的

霊長類や小型齧歯類等の研究用動物資源の計画的な増産・系統保存には排卵誘起技術が汎用されるが、例えばマウスにおいても誘起排卵卵子数には大きな系統差があり（Suzuki et al. *Reprod. Fert. Dev.* 1996, 8(6):975-980）、低反応マウス系統からの採卵はいまだに深刻な問題である。

本研究では研究用動物の低誘起排卵数の克服法として、卵子採取前に雌個体に各種薬剤を投与する方法を検討している。近年、卵胞発育には PI3K/Akt 経路の関与が注目され、特に Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10 (PTEN) が原始卵胞活性化（Li ら、*Proc Natl Acad Sci USA* 107:10280-10284, 2010）や排卵（Fan ら、*Mol Endocrinol*, 22:2128-2140, 2008）に抑制的に関与することから、本研究では PTEN 阻害剤の一種 Dipotassium bisperoxo (picolinato) oxovanadate (V)（略称：bpV(pic)）と性腺刺激ホルモンを併用するという新規の排卵誘起法によって PTEN 阻害剤の投与時期依存的に誘起排卵数が増加することをマウスで見いだしてきた。

また、投与時期によっては PTEN 阻害剤で誘起排卵数が逆に減少する事例も見いだした。

そこで本年度は、PTEN 阻害時期のさらなる検討や、卵巣内 PI3 キナーゼ（PI3K）や AKT アイソザイム蛋白質含量と排卵誘起効率との関係、さらに PTEN の卵巣内局在についてマウスをモデルとして調べ、PTEN 阻害剤による誘起排卵の向上効果とその機序についてさらに詳しく検討した。

B. 研究方法

1) PTEN 阻害剤と PI3K 阻害剤

PTEN 阻害剤として bpV(pic)（Enzo）をリンゲル液に溶解して用いた。投与量は 1 匹当たり 30 μ g（体重 1kg あたり 2 mg、すなわち 2 mg/kg BW）とした。

PI3K 阻害剤として LY294002（Cayman Chemicals）を DMSO に溶解した後、DMSO の最終濃度が 5%となるようにリンゲル液に加えて用いた。

2) 誘起排卵数に対する PI3K 阻害剤の影響

A/J マウスを用い、PMSG を投与する日を 28

日齢の日とし、24 時間後に LY294002 を腹腔内投与した。2 用量 (0.1 mg/kg BW と 1 mg/kg BW) を設定した。PMSG 投与 48 時間後に hCG を投与し、更に約 16 時間後、パラフィンオイル (Zenith Biotech.) で覆った TYH 培地 (三菱化学メディエンス) 小滴内へ卵管膨大部より卵子卵丘細胞複合体を採取し、ヒアルロニダーゼ処理 (300 iu/mL, Sigma) により卵丘細胞を分散させ、卵子数を記録した。

3) 誘起排卵に対する bpV(pic) と LY294002 の併用効果

PMSG 投与日での PTEN 阻害剤 bpV(pic) の投与 (2 mg/kg BW) の有無と PMSG 投与の翌日での PI3K 阻害剤 LY294002 の投与 (0.1 mg/kg BW) の有無という 2 つの要因を組み合わせた合計 4 つの実験区を設定した (図 2)。採卵は上記 2) と同様に行った。

4) 蛋白質の定量 Western blot 解析

卵巣を測定時まで Allprotect Tissue Reagent (Qiagen) 内で冷蔵保存した。卵巣から個体毎に ReadyPrep™ protein extraction kit (Total Protein 用, Bio-Rad) を用いて蛋白質を抽出し、各種蛋白質の定量 Western blot 解析を行った。抽出した蛋白質 (約 0.3 µg) を 4-12% NuPAGE® Bis-Tris ゲルと NuPAGE® MES SDS ランニングバッファー (Invitrogen) による SDS-PAGE の後、PVDF 膜 (Pall) へ転写し、一次抗体として PI3K の各サブユニットに対する抗体 (4 種類, 1:10,000, Cell Signaling Technology, ウサギ抗体) または AKT アイソザイムに対する抗体 (3 種類, 1:10,000, Cell Signaling Technology, ウサギもしくはマウス抗体) と抗 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 抗体 (1:50,000, Millipore, マウス抗体, もしくは Cell Signaling Technology, ウサギ抗体) を、二次抗体 (Jackson ImmunoResearch) として Peroxidase ラベル抗ウサギ IgG 抗体 (1:20,000) および Peroxidase ラベル抗マウス IgG 軽鎖特異的抗体 (1:50,000) を用いて免疫染色を行った。視覚化には化学

発光 (ECL plus, Pierce) を用い、CCD カメラ (LAS3000-Multi, Fujifilm) にて発光像を記録し、各バンドの発光強度を測定した (Multigauge ソフトウェア, Fujifilm)。全サンプルを等量混合した液を 4 段階の量でアプライして検量線を毎回作成し、目的蛋白質と GAPDH のバンドの発光強度から GAPDH を内部標準として目的蛋白質発現量を「目的蛋白質 / GAPDH 比」として求めた (検量線作成法については Exp Anim 60(2): 193-196, 2011 を参照)。

5) PI3K サブユニットおよび AKT アイソフォームの卵巣内蛋白質含量の系統間比較

4 週齢の雌マウスより得た卵巣の PI3K サブユニット (2 系統) および AKT アイソフォーム (4 系統) の蛋白質含量の定量 Western blot 解析による系統間比較を行った。

6) 卵巣 PTEN の免疫組織染色

28 日齢の A/J マウスの卵巣を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定後、常法により組織切片を作成した。オートクレーブによる抗原賦活化処理の後、一次抗体として PTEN 抗体 (Cell Signaling Technology) を、二次抗体としてビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体、さらに HRP 標識アビジンを反応させた。ジアミノベンジジンで発色させ、核染色 (マイヤーのヘマトキシリン) してから観察した。一次抗体処理を除いた標本を陰性対照とした。

7) 統計処理

数値の有意差については正規性を Shapiro-Wilk 検定で、等分散性を Levene 検定で確認した後、一要因、もしくは二要因分散分析により判定した。相関については線形回帰分散分析 (ピアソン相関検定) を行った。 $p < 0.05$ を有意とした。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験は、(独) 医薬基盤研究所の動物実験規定に従い、実験計画の承認を得て実施した (承認番号: DS25-44R1)。

C. 研究結果

1) PI3K 阻害剤 LY294002 の排卵数への影響

PMSG 投与後の PTEN 阻害剤投与は排卵数を抑制する傾向があることから（図 1A, 昨年度実績の再掲）, PMSG 投与後, 翌日に PI3K 阻害剤である LY294002 を投与したところ, 高用量（1 mg/kg BW）では抑制傾向だが, 低用量（0.1 mg/kg BW）では排卵数が増加する傾向が見られた（図 1B）。PMSG 投与後では PI3K 活性が適度に抑制されると, つまり, PTEN 活性が適度に保たれていると排卵数が増える可能性が示唆された。

2) 誘起排卵数への PTEN 阻害剤と PI3K 阻害剤の併用効果

阻害剤を全く投与しなかった対照群に比べ, bpV(pic)のみを投与した群は有意に誘起排卵数が多く, また, LY294002 のみを投与した群よりも有意に多かった。LY294002 のみを投与した群は対照群に比べ排卵数が若干多く, 両阻害剤併用群もさらに排卵数は上昇したものの, 両者とも対照群との間で有意差はなかった（図 2）。この結果は, PI3K 阻害剤の有効性は低く, PTEN 阻害剤こそが誘起排卵数の増加に有効であることを示している。

3) PI3K サブユニットの卵巣内含量の系統差

PI3K の各サブユニット蛋白質の卵巣内含量は, p85 と p110 α , Class III については C3H/HeJ に比べ A/J の方が有意に高かったが, p110 γ については 2 系統間に有意差はなかった（図 3）。本研究でこれまでに C3H/HeJ より A/J で PTEN 阻害剤による排卵数増加率が高いことが判明しているが, その理由が PI3 キナーゼによる PIP3 の産生能の高さである可能性を示している。

4) AKT アイソザイムの卵巣内含量の系統差

4 系統の卵巣内 AKT アイソザイムの各蛋白質含量には系統差が見られた（図 4）。各系統の卵巣内 AKT 含量と誘起排卵効率との間に関連はないが, bpV(pic)による排卵数増加効果と

の相関から, PTEN 阻害剤の効果と卵巣内 AKT1 含量との関連が示唆された（詳しくは図 4 の説明文を参照）。

5) 卵巣 PTEN の免疫組織染色

抗体との反応から PTEN は主に顆粒層細胞や莢膜細胞に存在し, PTEN 阻害剤はこれら顆粒層細胞や莢膜細胞に主に作用すると考えられた（図 5）。

D. 考察

PTEN 阻害剤による誘起排卵の向上効果とその機序を明らかにするため, 本年度は PTEN 阻害の時期の影響, 卵巣内 PI3K サブユニットや AKT アイソザイム蛋白質含量, さらに PTEN の卵巣内局在についてマウスをモデルとして調べた。

昨年度の結果から排卵数の上昇には PMSG 投与後の PTEN 阻害はむしろ抑制的であることが示唆され（図 1A）, 本年度の結果で PTEN 阻害剤の逆作用をもたらす PI3K 阻害剤が排卵数上昇傾向をもたらしたことから（図 1B）, 両阻害剤の併用効果が期待されたが, 相乗効果は見られず, PTEN 阻害剤単独投与こそが有効であることがわかった（図 2）。このことは, PTEN 阻害によって PI3K/Akt 経路の活性化が誘起された場合は, そのまま活性化状態を維持した方が排卵数上昇に有効であることを示唆している。

A/J は他系統に比べ PTEN 阻害剤による誘起排卵数上昇率が高いが（昨年度実績）, PI3K/Akt 経路を担うリン酸化酵素の PI3K（図 3）と AKT（図 4）の卵巣内含量と誘起排卵の相関性を調べたところ, A/J では PI3K 量や AKT 量が他系統に比べ多い傾向にあり, PTEN による PI3K/Akt 経路の抑制が PTEN 阻害剤により解除されると, 他系統に比べ効率良く PI3K/Akt 経路が活性化され, それが PTEN 抑制への反応性の良さをもたらすものと思われた。

卵巣内の PTEN は, 卵子自体よりも卵子発育を支持し, 排卵現象にも直接関与する顆粒層細胞や莢膜細胞に主に存在することから

(図5), PTEN 阻害剤により排卵数上昇が生じるのは妥当な現象だと言える。

成熟個体では生殖に関するホルモンの影響により周期的な卵胞発育が見られる(性周期; 齧歯類や家畜では発情周期, サル・ヒトでは月経周期と呼ばれる)。これまで本研究では, 性周期の影響を避け, 卵巣自体の反応を明確に見極めるために, 未成熟マウスを用いてきた。しかし, 霊長類やヒト, さらには家畜等への実践的な応用を考える場合は成熟個体での効果を検討する必要がある。PTEN 阻害剤の効果は時期特異性が高いことから, 次のステップとして PTEN 阻害剤の性周期での各段階での影響を検討し, 成熟個体への適用条件を決めることが重要だと思われる。

E. 結論

雌マウス個体への PTEN 阻害剤投与は時期特異的に性腺刺激ホルモンによる誘起排卵数を増加させ, その作用点は卵胞の顆粒層細胞および莢膜細胞であることが明らかとなった。PTEN 阻害剤投与の効果は時期特異性が強いことから, PTEN 阻害剤による霊長類での誘起排卵数増加が期待できるかを推定するには, 性周期(月経周期)の影響を調査する必要があるだろう。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Kumagai, A., Fujita, A., Yokoyama, T., Nonobe, Y., Hasaba, Y., Sasaki, T., Itoh, Y., Koura, M., Suzuki, O., Adachi, S., Ryo, H., Kohara, A., Tripathi, L., Sanosaka, M., Fukushima, T., Takahashi, H., Kitagawa, K., Nagaoka, Y., Kawahara, H., Mizuguchi, K., Nomura, T., Matsuda, J., Tabata, T., and Takemori, H. (2014) Altered Actions of Memantine and NMDA-Induced Currents in a New Grid2-Deleted Mouse Line. *Genes*

5(4): 1095-1114.

2. 鈴木治, 松田潤一郎 (2015) 心筋症のマウスモデル: 拡張型心筋症マウスモデルの心機能解析と遺伝子解析, *医学のあゆみ* 252(10):1027-1031.

2) 学会発表

1. Suzuki, O. Chromosomal Mapping and Zygosity Check PCR of transgenes in a GFP Mouse Line (C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)C14-Y01-FM131-Osb) Determined by Genomic Walking. *Experimental Biology* 2014. 平成 26 年 4 月 26 日 ~ 30 日. San Diego, CA, USA.
2. 小浦美奈子, 河相晶子, 中野正文, 鈴木治, 松田潤一郎。医薬基盤研究所 実験動物研究資源バンクにおいて扱った, 凍結胚・凍結精子の復元率について。第 61 回日本実験動物学会総会。平成 26 年 5 月 15 日 ~ 17 日。札幌。
3. 小浦美奈子, 河相晶子, 中野正文, 野口洋子, 鈴木治, 松田潤一郎。医薬基盤研究所「実験動物研究資源バンク」創薬・難病研究への貢献。第 61 回日本実験動物学会総会。平成 26 年 5 月 15 日 ~ 17 日。札幌。
4. 鈴木治, 小浦美奈子, 内尾(山田)こずえ, 松田潤一郎。マウス 5 系統における bpV(pic)併用による誘起排卵向上効果。第 61 回日本実験動物学会総会。平成 26 年 5 月 15 日 ~ 17 日。札幌。
5. 鈴木治。マウス誘起排卵に対する PTEN 阻害剤の投与時期の影響。第 55 回日本卵子学会。平成 26 年 5 月 17 日 ~ 18 日。神戸。
6. Suzuki, O. Strain Difference in Superovulation with a PTEN Inhibitor in Mice. *ICE / ENDO* 2014. 平成 26 年 6 月 21 日 ~ 24 日. Chicago, IL, USA.
7. 鈴木治。卵巣内 PI3 キナーゼサブユニット蛋白質含量のマウス系統間比較。第 107 回日本繁殖生物学会大会。平成 26 年 8 月

- 20日～24日。帯広。
8. Suzuki, O. Effects of PTEN and PI3 Kinase Inhibitors on Superovulation in A/J Mice. 65th AALAS National Meeting. 平成 26 年 10 月 19 日～23 日. San Antonio, TX, USA.
 9. 塩田節子, 鈴木治, 小澤みどり, 平山知子, 湯華民, 森康子, 渡邊健, 清水則夫, 亀岡洋祐, 笠井文生, 小原有弘. 正常ヒト臍帯静脈内皮細胞株 HUV-EC-C のゲノムに組み込まれた HHV-6 の存在様式。第 62 回日本ウイルス学会学術集会。平成 26 年 11 月 10 日～12 日。横浜。
 10. Matsuda, J., Koura, M., Kawai, A., Nakano, M., Moriishi, E., Noguchi, Y., Sasaki, M., and Suzuki, O. 2014. Aiming to promote innovative drug discovery: Laboratory Animal Resource Bank at the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), Japan. AFLAS Congress 2014. 平成 26 年 11 月 11 日～12 日. Kuala Lumpur, Malaysia.
 11. 鈴木治。マウス卵巣内 AKT アイソフォーム蛋白質含量の系統差。第 37 回日本分子生物学会年会。平成 26 年 11 月 25 日～27 日。横浜。
 12. Suzuki, O. Effect of a combination of PTEN and PI3K inhibitors on superovulation in A/J mice. 2014 ascb/ifcb Meeting. 平成 26 年 12 月 6 日～10 日. Philadelphia, PA, USA.
 13. Suzuki, O. Comparison of ovarian contents of AKT isoforms among four strains of mice. 41st IETS Annual Conference. 平成 27 年 1 月 10 日～13 日. Versailles, France.
 14. Suzuki, O. Strain Difference in Protein Contents of Tachykinin Receptors in Mouse Ovaries. ENDO 2015. 平成 27 年 3 月 5 日～8 日. San Diego, CA, USA.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし。

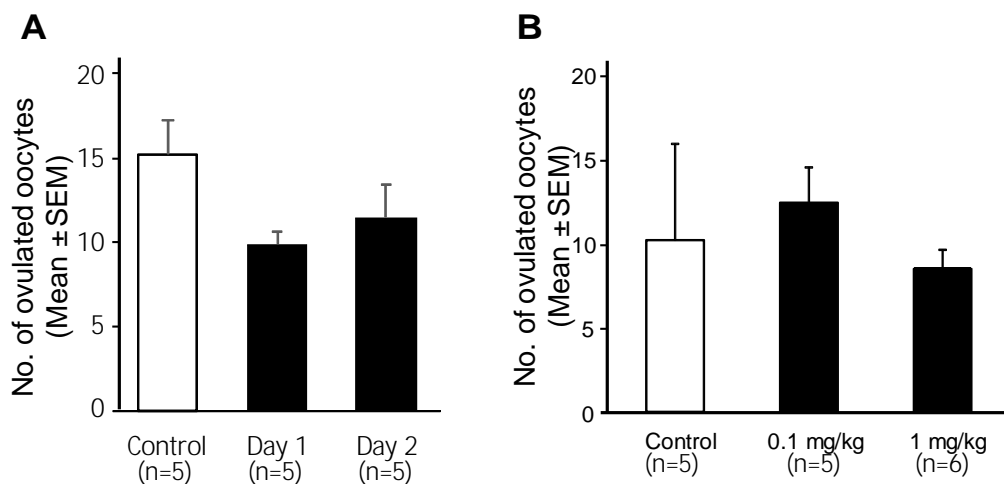
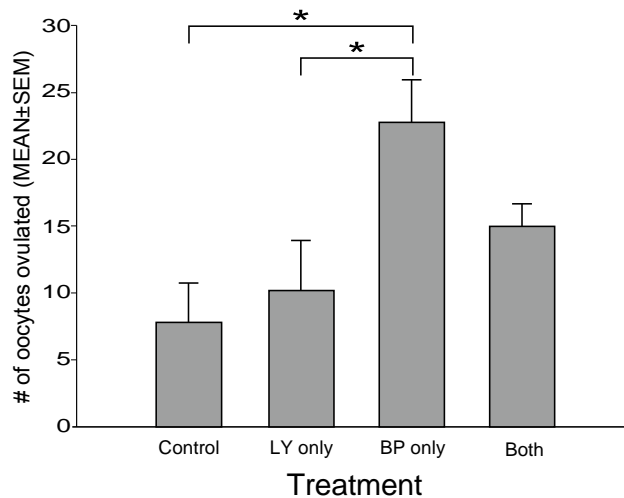


図 1. 誘起排卵数に対する PTEN 阻害剤 bpV(pic)と PI3K 阻害剤 LY294002 の効果。各実験群の雌 1 匹あたりの平均誘起排卵数 ± 標準誤差を示す。A) PMSG 投与後, 翌日 (Day 1) と 2 日目 (hCG 投与日と同じ, Day 2) に PTEN 阻害剤である bpV(pic)を 2 mg/kg BW 投与すると (), 未投与群 () に比べ排卵数が少ない傾向が見られた (昨年度実績の再掲)。すなわち, PMSG 投与後の PTEN 阻害剤投与は排卵数を抑制する傾向があることがわかった。B) PMSG 投与後, 翌日に PI3K 阻害剤である LY294002 を 0.1 mg/kg BW, もしくは 1 mg/kg BW 投与したところ (), 未投与群 () に比べ 0.1 mg/kg BW 投与群では排卵数が増加する傾向が見られた。1 mg/kg BW 投与群では減少傾向であった。PMSG 投与後では PI3K 活性が抑制されると, つまり, PTEN 活性が保たれていると排卵数が増える可能性が示唆された。



Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
PTEN-inhibitor	1	511.357	511.357	11.709	0.003 **
PI3K-inhibitor	1	38.035	38.035	0.871	0.364
PTEN-inhibitor x PI3K-inhibitor	1	135.704	135.704	3.107	0.096
Residual	17	742.400	43.671		
Total	20	1400.000	70.000		

図 2. 誘起排卵数に対する PTEN 阻害剤 bpV(pic)と PI3K 阻害剤 LY294002 の併用効果。PMSG 投与日での PTEN 阻害剤 bpV(pic)の投与の有無と PMSG 投与の翌日での PI3K 阻害剤 LY294002 の投与の有無という 2 つの要因を組み合わせ合わせた合計 4 つの実験区を設定し、誘起排卵数に対する PTEN 阻害剤と PI3K 阻害剤の併用効果について調べた。上段に雌 1 匹あたりの平均誘起排卵数 (平均 ± 標準誤差; n=5, 併用群のみ n=6) を示すグラフを (*は $p < 0.05$ で有意差有り), 下段に 2 要因分散分析の結果を示す。全く阻害剤を投与しなかった対照群 (Control) に比べて, bpV(pic)のみを投与した群 (BP only) は有意に排卵数が多く, また, LY294002 のみを投与した群 (LY only) よりも有意に多かった。一方, 併用群 (Both) は対照群と有意差はなく, bpV(pic)の効果が LY294002 によって抑制されていた。2 要因分散分析では変動因として PTEN 阻害剤 (PTEN-inhibitor) の効果のみが有意で (**: $p < 0.01$), PI3K 阻害剤 (PI3K-inhibitor) や両阻害剤の相互作用 (PTEN-inhibitor x PI3K-inhibitor) は有意ではなかったことから, PTEN 阻害剤こそが誘起排卵数の増加に有効であることが確かめられた。

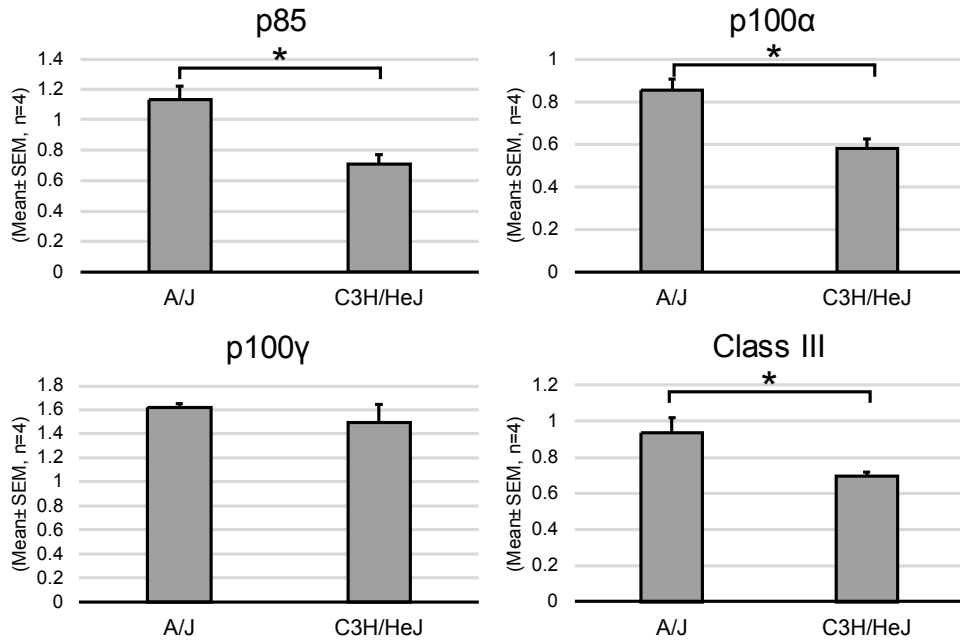


図3. 卵巣内 PI3K サブユニット蛋白質含量 (GAPDH 含量で標準化した含量, 卵巣 1 個あたりの平均 ± 標準誤差, n=4)。PI3 キナーゼの各サブユニット蛋白質の卵巣内含量は, p85 と p110α, Class III については C3H/HeJ に比べ A/J の方が有意に高かったが ($p < 0.05$), p110γ については 2 系統間に有意差はなかった ($p > 0.05$)。C3H/HeJ より A/J で PTEN 阻害剤による排卵数増加率が低いことを昨年度に確認しているが, その理由は PI3 キナーゼによる PIP3 の産生能が C3H/HeJ に比べ A/J で高いことによる可能性を示している。

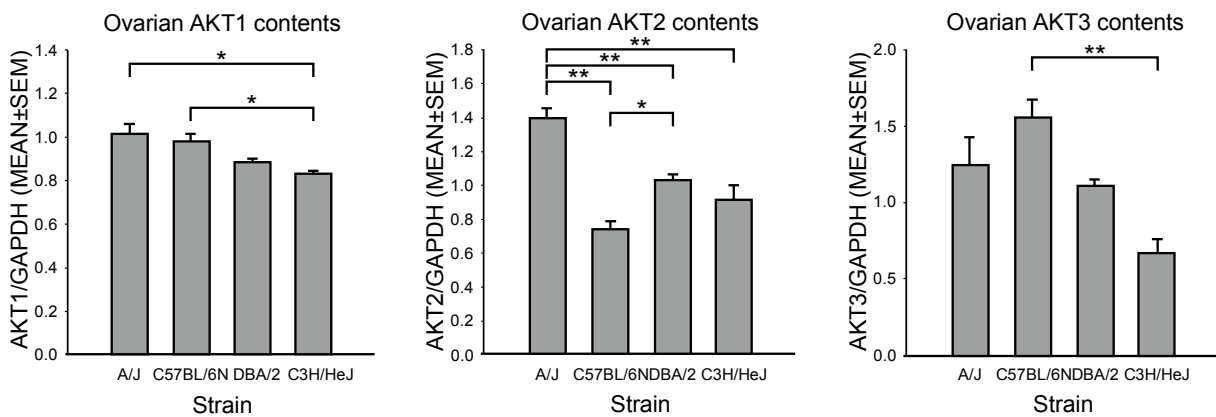


図4. 卵巣内 AKT アイソザイム蛋白質含量 (卵巣 1 個あたりの平均 ± 標準誤差, n=4)。4 系統の卵巣内 AKT アイソザイムの各蛋白質含量には系統差が見られた (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$)。誘起排卵数 (昨年度に調査済み) と AKT アイソフォームの卵巣内含量の間には, どの AKT アイソフォームにおいても有意な相関は無かったことから ($p > 0.05$, ピアソン相関検定), 卵巣内 AKT 含量と誘起排卵効率との間には密接な関連はないと思われた。一方, PTEN 阻害剤 bpV(pic)による排卵数増加効果 ($[\text{bpV(pic)群の平均排卵数}]/[\text{対照群の平均排卵数}]$) と卵巣内 AKT 含量との相関をみると, AKT1 との間でのみ有意な相関が見られたことから ($p = 0.014$, ピアソン相関検定), PTEN 阻害の影響の出方には AKT1 の量が関係することが示唆された。

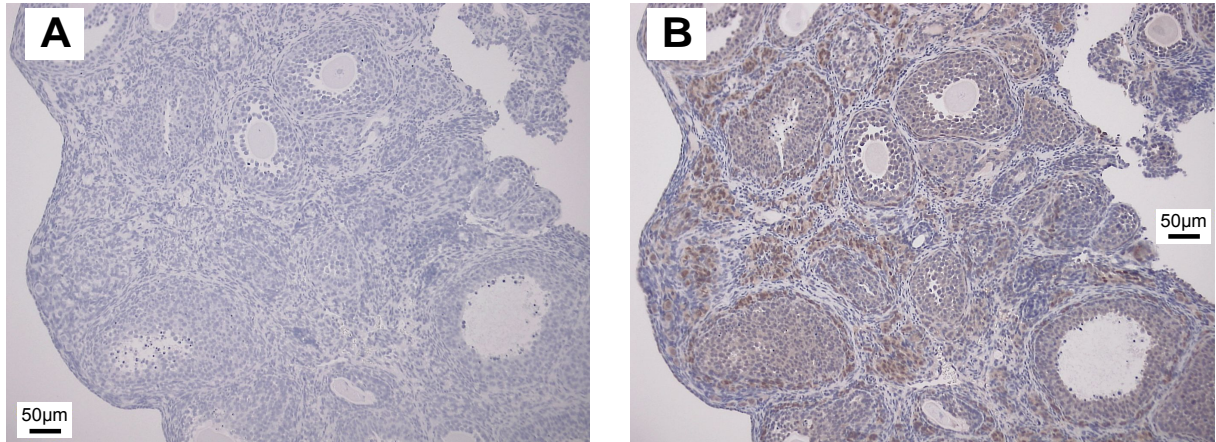


図 5.28 日齢の A/J マウスの卵巣を用いた PTEN の免疫組織染色 (A: 一次抗体未使用の陰性対照 ; B: PTEN 抗体使用)。顆粒層細胞および莢膜細胞に強い染色 (茶色) が見られる。卵子の染色は非常に弱いことから, PTEN は主に顆粒層細胞や莢膜細胞に存在し, PTEN 阻害剤はこれら顆粒層細胞や莢膜細胞に主に作用すると考えられた。