
最重要な細胞外分子、コラーゲンの可視化による 加齢性の卵胞形成抑制の機構解明と解除

山口大学共同獣医学部臨床獣医学講座・教授 角川 博哉

■ 目的

雌動物が生涯にわたり妊娠分娩できる子供の数は、卵巣の卵胞形成能力に大きく影響される。一方、我が国では子牛不足のため肥育農家と繁殖農家が経営存続の危機に陥っている。そのため繁殖農家では優良雌牛に反復して分娩させる対策が極めて重要である。しかし加齢後には卵胞形成機能が低下し困難になる。産婦人科領域でも加齢後の卵胞形成能力低下は重要問題である。しかし卵胞形成、特に原始卵胞から一次卵胞や前胞状卵胞の形成過程は未だ不明点が多く、加齢による抑制機構は未解明である。本研究の目的は、これまでになかった、“卵胞形成は最重要な細胞外分子、コラーゲンのスクラップ&ビルドであり、加齢によるバランスの破綻で卵胞形成が抑制される”という発想で、卵胞形成過程を可視化する新手法を利用し、加齢による卵胞形成抑制機構を解明することにした。得られた知見は、解除法を開発する基盤として活用する。

■ 方法

コラーゲンは、卵巣内の細胞外分子中で最多のタンパクである他、正と負、両方の多様な作用を細胞に与える。申請者はこれまで不可能だった変成コラーゲンの可視化法を開発した。またコラーゲン合成部位の可視化も、コラーゲン分子シャペロン、HSP47 に対する蛍光免疫染色で可能にした。さらにこれらの手法をウシの卵管・子宮・子宮頸管に用い、加齢後には変成コラーゲン増加と、過剰コラーゲン合成による硬化と線維症が起きており、新型コロナウイルス性肺炎と酷似していることを発見した。可視化法は他ターゲット分子に対する蛍光免疫染色と組み合わせられる。そこで本年度は、次のことを調べた。

(1)可視化法による加齢後卵巣の変成コラーゲン部位や過剰コラーゲン合成部位

初産牛と加齢後牛の各々(N=6)から卵巣を採取し、ピクロシリウスレッド染色により、コラーゲンの存在部位を明確化することにした。次に変成コラーゲン可視化法を利用して変成コラーゲン部位や過剰コラーゲン合成部位を解明することにした。

(2)変成コラーゲンや過剰コラーゲンに共存する原因分子候補

初産牛と加齢後牛の卵巣各々(N=6)から、変成コラーゲン部位や過剰コラーゲン合成部位を採取した。次にリアルタイム PCR(qPCR)法等を実施し、加齢で発現量が異常になる分子のリストを作成することにした。

(3)原因分子等による HSP47 等の発現に対する効果

微小卵胞等を含有する卵巣切片を培養し、原因分子候補を添加して HSP47 等の発現に対する効果を、ウエスタンブロット法等で評価することにした。

■ 結果および考察

(1)ピクロシリウスレッド染色の結果、初産牛と加齢後牛の両方の卵巣の大部分の領域でコラーゲンを認めた。一方、変成コラーゲン可視化法によって、前胞状卵胞と小胞状卵胞において変性コラーゲンを認めた。さらに蛍光免疫染色を組み合わせた結果、HSP47 の発現向上が認められた。

(2)分析の結果、HSP47 の発現部位において AMH 受容体、ならびに AMH の発現を認めた。

(3)原因分子候補として可能性が高い AMH による HSP47 の発現誘導の効果を認めた。

■ 結語

変成コラーゲンは、前胞状卵胞と小胞状卵胞で増加し、同時に HSP47 が発現向上してコラーゲンが局所的に増加することが解明された。さらにこの機構への AMH の関与が解明された。