

【研究区分：先端的研究】

研究テーマ：低血糖が引き起こす排卵障害メカニズムの解明とその予防法・治療法の開発	
研究代表者：生物資源科学部 生命環境学科 生命科学コース 教授 山下泰尚	連絡先：yamayas@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者：総合学術研究科 生命システム科学専攻 大学院生 市河暖翔	
【研究概要】 これまでの研究において、排卵には卵巣に含有するグルコースを代謝し、この代謝産物からコレステロールの <i>de novo</i> 合成経路が活性化し、これを基質としてプロゲステロン (P4) が合成されることが重要であることを見出した。本研究では、低血糖となると卵巣のグルコース量が低下し、P4 低下を招く結果、排卵不全となると仮説を立て、これを実証した。低糖質飼料で飼育したマウスは、排卵障害となることを見出した。	

【目的】

日本は先進国の中でも痩身願望が突出して高く、女性だけでなく、男性や妊婦の中にも体重や BMI (肥満や低体重の判定に用いる体格指数) が極端に低い人が多く見られる。近年では、炭水化物 (糖質) 量を低下させ、タンパク質を主体とした「糖質制限ダイエット」がテレビなどのメディアで紹介された。しかし、この糖質制限ダイエットは、低血糖を引き起こすリスクが高いことが明らかになり、健康被害も報告され始めている。実際、生殖分野では、糖質制限を行った女性の約 45%が排卵障害となることが示されている。しかし、糖質制限がなぜ排卵障害を引き起こすのか？についての答えは明らかにされていない。

これまでモデルマウスを用いた研究により、排卵は、以下の経路により誘導されることが明らかになっている。

- ✓ 下垂体由来の LH が卵胞を裏打ちする顆粒膜細胞の LH 受容体に結合すると、EGF 様因子の発現が亢進する。
- ✓ EGF 様因子が EGF 受容体 (EGFR) を刺激するとコレステロールから P4 の産生が亢進し、排卵が誘導される。

上記研究では、P4 産生に必須のコレステロールがどのようにして蓄積しているのかは不明であった。しかし、当研究室では、排卵期の顆粒膜細胞において脂質転写因子 (SREBP) が活性化し、肝臓と同様にアセチル CoA からコレステロール合成の *de novo* 経路が活性化することが排卵に重要であることを初めて明らかにした (Nakanishi et al., *Endocrinology*, 2021)。

この研究により排卵期の卵巣ではコレステロールは *de novo* 経路により新規合成されることが明らかになったが、肝臓における研究では *de novo* 経路の基質であるアセチル CoA の獲得にはグルコースの分解が重要であり、これに伴って合成される ATP により不活性化される AMPK (細胞のエネルギーセンサータンパク質) が SREBP の活性化に重要であることが近年明らかになった。そこで本研究では、卵巣におけるグルコースが卵巣機能に及ぼす影響を検討し、低血糖を発端とするこの破綻が卵巣疾患の発生と関係するのかについて検討を行った。

【方法】

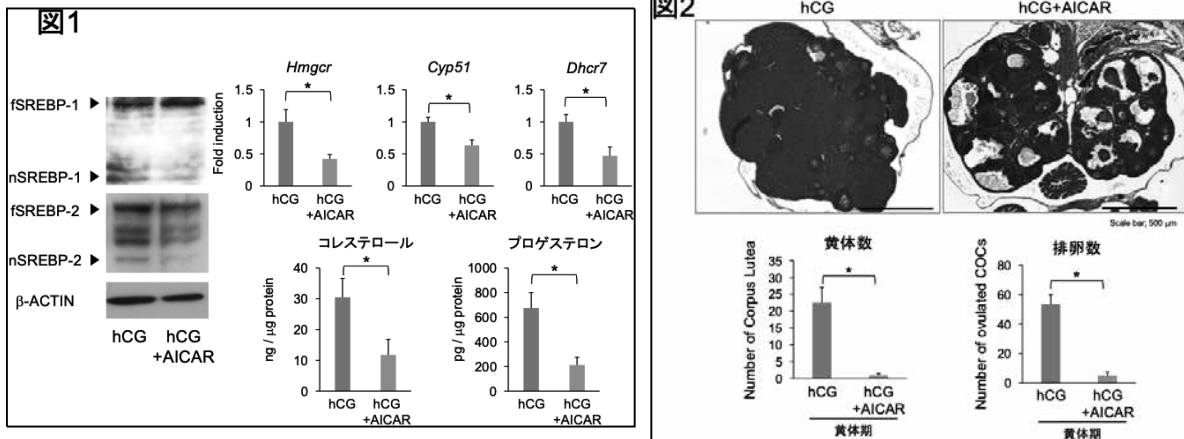
実験 1：3 週齢の C57BL/6 雌マウスに卵胞発育を誘導する eCG を投与し 48 時間後にさらに排卵を誘導する hCG あるいは hCG+AICAR (AMPK 活性化剤)を投与し、顆粒膜細胞、卵巣、卵管を採取した。顆粒膜細胞から mRNA およびタンパク質を採取し、遺伝子発現解析 (q-RT-PCR) とタンパク質解析 (ウェスタンブロッティング) を行った。また卵巣のグルコース量、ATP 量、コレステロール量、P4 量を測定 (ELISA)し、同時に作成した卵巣切片により免疫蛍光染色、HE 染色を行った。さらに卵管から排卵卵子を採取し、排卵数を測定した。

【研究区分：先端的研究】

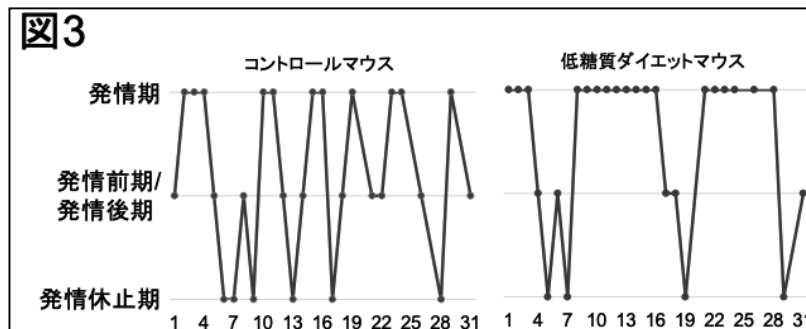
実験 2: 3 週齢の C56BL/6 雌マウスを糖質含量が 10% の通常飼料, および糖質含有量 0% の低糖質飼料で 31 日間飼育し, それぞれコントロールマウスと低糖質ダイエットマウスとして, 継続的に体重を測定した。また性周期に伴って膣に存在する角化上皮細胞と白血球の割合が変化することから, 膣スメアを採取し, ギムザ染色し, 発情休止期, 発情前期, 発情期, 発情後期の出現頻度を 3 週齢を 0 日として 31 日後まで調べた。

【結果】

実験 1: hCG 投与後の顆粒膜細胞において GLUT4 の発現が増加し, これが細胞膜へ移行し, 卵巣におけるグルコース量と ATP 量も増加した。またリン酸化 AMPK の発現も hCG 投与後に著しく減退し, SREBP は活性化していた。hCG+AICAR 処理により, SREBP の活性は低下し, *de novo* 経路の酵素発現 (*Hmgcr*, *Cyp51*, *Dhcr7*), コレステロール量, P4 量も低下し (図 1), 黄体数, 排卵卵子数も低下した (図 2)。



実験 2: 低糖質ダイエットマウスは体重の急激な低下が見られ, 性周期は 12 日目以降に発情期のままとなり (図 3), 排卵期への移行が起らないことが明らかになった。



【考察】

排卵は, 顆粒膜細胞においてグルコース依存的にコレステロールの *de novo* 経路が活性化し誘導されることが明らかになった。さらに, 低糖質ダイエットマウスで生じる排卵期への移行ができない原因は, グルコース不足により P4 産生能が低下した結果生じる排卵障害であると考えられた。