

—総説—

特集：卵胞発育の新知見—基礎から臨床応用まで

卵胞発育期における顆粒膜細胞の増殖 ～そのメカニズムと卵胞成熟に果たす意義～

The proliferation of granulosa cells during ovarian follicular development: the regulatory mechanisms and the physiological roles in the acquisition of the ability to respond to ovulation stimuli

川合 智子・島田 昌之*

Tomoko Kawai and Masayuki Shimada*

広島大学大学院統合生命科学研究科 〒739-8528 東広島市

Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University, 1-4-4 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima,
Hiroshima 739-8528, Japan

要旨：卵胞発育期に顆粒膜細胞は増殖し、分化することで、卵胞直径は拡大し、排卵刺激に反応する排卵前卵胞へと発達する。細胞増殖の仕組みは、卵胞刺激ホルモン (FSH) により活性化される cAMP 依存的なシグナル伝達系、その標的遺伝子などが詳細に明らかとされているが、細胞分裂に必要なエネルギー生産 (ATP 合成) 機構については不明な点が多い。さらに、なぜ卵胞直径が拡大しなければ排卵刺激への感受性を獲得できないのかは、全くわかっていない。本総説では、顆粒膜細胞はミトコンドリアにおける遺伝子発現とタンパク質合成依存的な呼吸代謝で ATP を合成しているというエネルギー生産機構とそのエネルギー生産依存的な細胞増殖による *Lhcgr* プロモーター領域の DNA 脱メチル化について紹介する。

キーワード：卵巣, 顆粒膜細胞, エピジェネティック制御, ミトコンドリア

Abstract: During the follicular development process, granulosa cells proliferate and then differentiate to acquire the ability to respond to ovulation stimuli. It is known that FSH activates cAMP-dependent signaling pathways which induce target gene expressions in granulosa cells. However, there have been few reports about the ATP production pathways which induce cell proliferation in granulosa cells. Moreover, the reasons why an expansion of the diameter of antral follicles is required for granulosa cell differentiation remain unclear. This review introduces our current research showing that the transcription and translation of mitochondria are activated in FSH-stimulated granulosa cells, and this has an impact on ATP production, which in turn induces cell proliferation. Granulosa cell proliferation is essential for changes in the DNA methylation status, especially in the *Lhcgr* promoter region.

Key words: Ovary, Granulosa cells, Epigenetic regulation, Mitochondria

はじめに

出生前後に成立した原始卵胞は、卵および卵を覆う顆粒膜細胞前駆細胞とともに代謝活性と遺伝子発現活性を低下させ、そのステージで卵胞発育を停止する。卵胞活性化後、卵分泌因子の作用により顆粒膜細胞の細胞増殖が開始され、2層以上の顆粒膜細胞層が卵を覆う二次卵胞へと発育する。二次卵胞は、2層の顆粒膜細胞層は卵胞刺激ホルモン (FSH) への応答性が低いが、多層の顆粒膜細胞層へと発育する過

(受付 2019年11月27日/受理 2019年12月23日)

別刷請求先：〒739-8528 東広島市鏡山1-4-4

広島大学大学院統合生命科学研究科

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: mashimad@hiroshima-u.ac.jp

程でFSHへの反応性を獲得する。これは、卵分泌因子により抑制されていたFSH受容体の発現が、その抑制から解除された外層の顆粒膜細胞で発現することを意味し、卵胞膜に浸潤した血管からFSHが供給され、顆粒膜細胞はFSH依存的に増殖する。

複数層の2次卵胞から初期胞状卵胞への移行期において、顆粒膜細胞は、卵胞膜を裏打ちする壁顆粒膜細胞 (mural granulosa cell) と卵を覆う卵丘細胞 (cumulus cell) へと分化する。前者は、テストステロンをエストラジオール17βへと変換し、排卵前卵胞に発達するとLH受容体を発現する細胞へと機能を変化させる^{1, 2)}。後者は、LH受容体が高発現することはなく、卵へとギャップジャンクションを介して栄養成分(代謝基質)を輸送し、卵の減数分裂を制御する機能を獲得する³⁻⁵⁾。排卵刺激後は、壁顆粒膜細胞は様々な生理活性因子を分泌し、卵胞破裂と卵丘細胞を刺激するだけでなく、壁顆粒膜細胞自身は黄体へと最終分化する。卵丘細胞は、壁顆粒膜細胞の分泌因子の刺激を受けて、細胞間にヒアルロン酸を主成分とする細胞外マトリクスを蓄積し、卵の減数分裂再開と第二減数分裂中期への進行を調節することで、受精能を有する卵を卵胞から受精の場である卵管へと排出させるために重要な役割を果たしている^{6, 7)}。

ヒトでは、直径が20 mmを超える胞状卵胞では、上述のとおり壁顆粒膜細胞はLH受容体を発現し、卵丘細胞は卵の減数分裂を制御する排卵準備が完了した排卵前卵胞へと発育している。しかし、直径10 mm以下の卵胞から回収した多層の卵丘細胞に覆われた卵であっても、体外培養により受精能と発生能を有する卵へと成熟することから⁸⁾、なぜ、直径が20 mmを超える卵胞へと発育する意義があるのか、その明確な「解」は不明であった。本総説では、筆者らが最近明らかとした「なぜ、卵胞直径が拡大することが、体内で

の卵成熟に必須であるか」について、顆粒膜細胞の増殖メカニズムと分化機構に分けて概説する。

卵胞発育期における顆粒膜細胞の細胞分裂誘導機構

多層化した二次卵胞以降のステージにおいて、顆粒膜細胞はFSH刺激により増殖する⁹⁾。その分子生物学的なメカニズムは、FSHがFSH受容体に結合するとアデニールサイクラーゼが活性化し、アデノシン3リン酸(ATP)が環状型アデノシン1リン酸(cAMP)へと変換される。cAMPはセカンドメッセンジャーとして知られているが、顆粒膜細胞では、cAMPはcAMP依存性タンパク質リン酸化酵素(PKA)を介して、転写因子であるCREB(cAMP responsible element binding protein)やsp1を活性化し、*Ccnd2*の発現を誘導する¹⁰⁾。*Ccnd2*がコードするサイクリンD2は、他のサイクリンファミリーと同様に細胞分裂を誘導するサイクリン依存性タンパク質リン酸化酵素ファミリー(CDK family)の活性を制御する。したがって、*Ccnd2*の発現誘導は、直接的に細胞分裂を促進する^{11, 12)}。また、cAMPはグアニンヌクレオチド交換因子であるEPAC(exchange protein directly activated by cAMP)を介してRasタンパク質を活性化する作用も有する。これは、Rasタンパク質を不活性化しているグアノシン2リン酸(GDP)を取り除いて、グアノシン3リン酸(GTP)を結合させることでRasを活性化させるメカニズムであり、結果として細胞生存因子(サバイバルファクター)であるPI 3-kinaseを活性化する。PI 3-kinaseはAkt(PKB)を介してアポトーシスを誘導するカスパーゼの活性化(カスパーゼ連鎖)を抑制する働きを有する¹³⁾。すなわち、FSHは、顆粒膜細胞内のcAMP量を増加させることで、「細胞分裂の促進+細胞の生存担保=顆粒膜細胞数の増加」を誘導する(図1)。

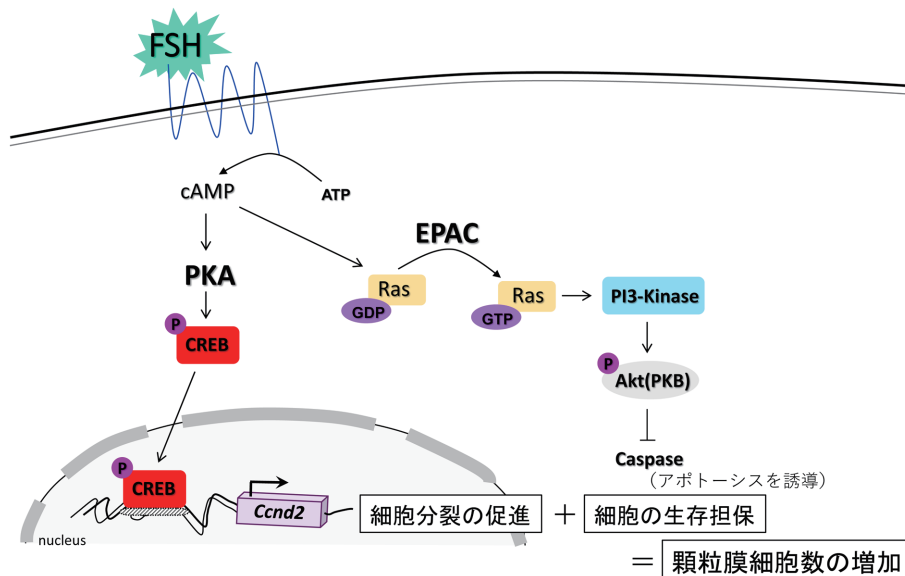


図1 卵胞発育期の顆粒膜細胞におけるFSH依存的シグナル伝達系

顆粒膜細胞におけるエネルギー要求性

FSHは、ATPをcAMPに変換する。それによって、複数のタンパク質リン酸化酵素が活性化すると、その触媒作用によって基質となるタンパク質にリン酸基が付与される（リン酸化される）¹⁴⁾。このリン酸基は、ATPがADPに変換される過程で放出されるリン酸である。さらに、細胞分裂時にはアクチン繊維からなる細胞骨格の大規模なリモデリングが引き起こされるが、この運動にもATPからADPに変換される際に放出されるリン酸が必要であり、ナトリウム/カリウムイオンなどの細胞膜の通過、その量の制御もATP依存性ポンプが関わっている^{15, 16)}。すなわち、FSHによる顆粒膜細胞の増殖には、多数のATPが必要であることがわかる。

グルコースがヘキソキナーゼによりグルコース6リン酸へと変換され、それが嫌氣的解糖系により2分子のピルビン酸へと変換される過程で2分子のATPが合成される（4分子のATPが合成されるが、2分子が使われるので、差し引きで2分子増加する）。ピルビン酸は、ピルビン酸輸送体によりミトコンドリアに運ばれ、そこでピルビン酸デヒドロゲナーゼによってアセチルCoAに変換され、TCAサイクル（クエン酸回路）でNAD⁺からNADHを合成する。このNADHが、電子伝達系でATP合成に直接的に関わる因子であり、1分子のアセチルCoA（=1分子のピルビン酸）から18分子のATPが合成される。このようにATP産生に必要な因子は、グルコース、ピルビン酸のみでなく、NAD⁺や電子伝達系で副産物として形成される活性酸素を除去するグルタチオン、その還元反応に利用されるNADPHなど多岐にわたっている。

顆粒膜細胞におけるATP合成機構

壁顆粒膜細胞において、嫌氣的解糖系の酵素群をコードする遺伝子発現量が、卵丘細胞のそれに比較して低いことが知られている¹⁷⁾。すなわち、顆粒膜細胞は嫌氣的解糖系の活性は低く、ミトコンドリアにおけるATP産生機構が主であることを示唆している。そこで我々は、マウスの初期胞状卵胞から回収した顆粒膜細胞を、グルコース無添加培養液、生理的濃度（卵胞液中濃度）のグルコース添加培養液、あるいは高濃度のグルコースを添加した培養液を用いてFSH存在下で培養し、そのATP合成量、ミトコンドリア活性および細胞増殖への影響を検討した。その結果、いずれの培養液で培養した顆粒膜細胞は、同様の高いミトコンドリア活性、ATP量および細胞増殖能を示したことから、卵胞発育期の顆粒膜細胞はアミノ酸類やピルビン酸を取り込むことで、ミトコンドリア代謝でATPを合成することが明確化された¹⁸⁾。

ミトコンドリアでのTCAサイクルや電子伝達系には様々な酵素が関与している。そのほとんどは核ゲノムにコードされ、通常の遺伝子発現と翻訳機構により作られているが、電子伝達系に関与する13種類は、ミトコンドリアDNAにコードされている¹⁹⁾。ミトコンドリアDNAは、環状の二本鎖DNAで、核DNAとは異なりヒストンなどのタンパク質と結合していない。また、ミトコンドリアのみで働く特異的な転写因子とRNA合成酵素によりミトコンドリアDNAの遺伝子発現が誘導される²⁰⁾（図2）。私達がミトコンドリアにおける遺伝子発現制御機構の解析モデルとしている精子では、

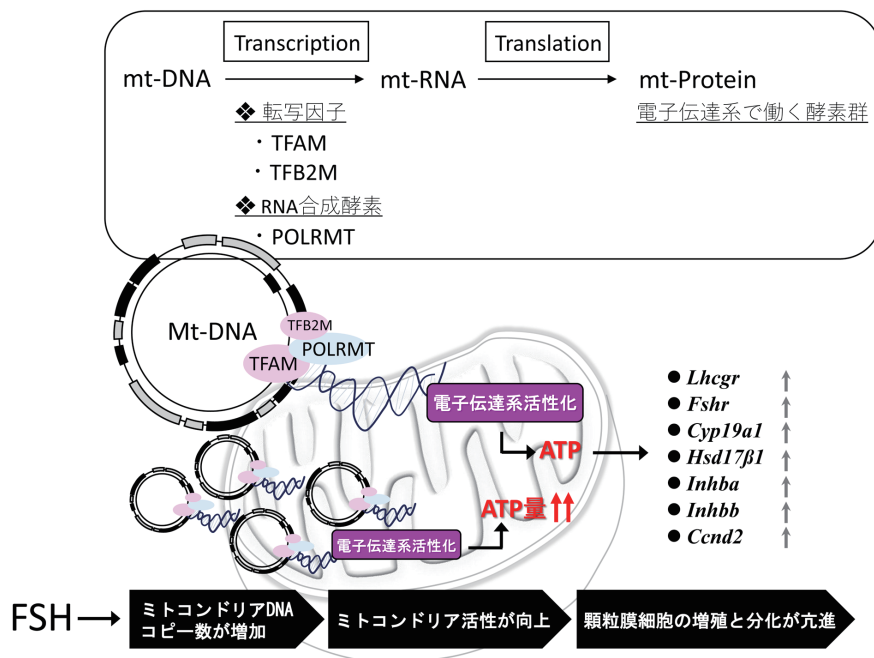


図2 卵胞発育期の顆粒膜細胞におけるミトコンドリアでの遺伝子発現・翻訳機構、それが細胞分裂及び分化に及ぼす影響

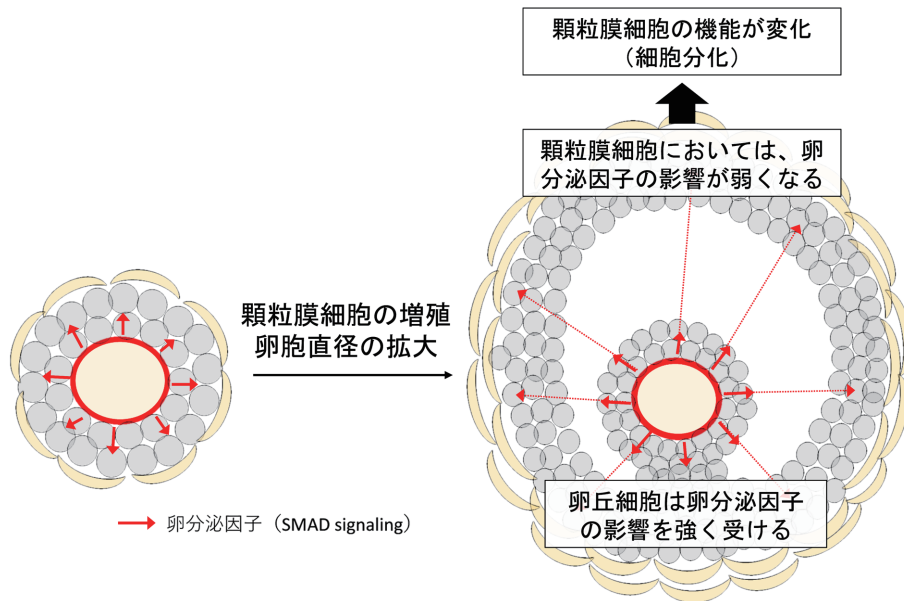


図3 卵胞直径の拡大が卵分泌因子の顆粒膜細胞への影響力を減弱化する

ミトコンドリアDNAにコードされる酵素群は、核ゲノムにコードされるそれらと比較して酸化ストレスへの感受性が高く、分解・合成（ターンオーバー）の回転が速いという特徴を持っている²¹⁾。そこで、顆粒膜細胞においても、ミトコンドリアでの遺伝子発現とタンパク質合成がATP合成および細胞分裂に果たす役割を検討した。その結果、ミトコンドリア特異的転写因子である *Tfam* や *Tfb2m* および特異的RNA合成酵素である *Polrmt* の発現が、FSH依存的に増加することが示された¹⁸⁾。さらに、ミトコンドリアDNAのコピー数も増加し（1つのミトコンドリアには、複数コピーの環状型DNAが存在する）、電子伝達系で働く酵素群のタンパク質量、それらをコードするmRNAコピー数が卵胞発育期に増加することが明らかとなった¹⁸⁾。すなわち、卵胞発育期の顆粒膜細胞では、ミトコンドリアが機能を最大限発揮できる状態になっていると考えられた（図2）。

次に、ミトコンドリアにおけるタンパク質合成を特異的に抑制した結果（細胞質における通常のタンパク質合成は抑制されない条件）、ミトコンドリアの電子伝達系活性は抑制され、ATP合成量も低下し、顆粒膜細胞数の増加が認められなくなった。さらに興味深いことに、この細胞分裂が抑制されたとき、FSH+テストステロン存在下で培養したにもかかわらず、LH受容体形成などの顆粒膜細胞の分化（排卵刺激への感受性獲得）も完全に抑制された¹⁸⁾。

卵胞直径の拡大と顆粒膜細胞の分化

顆粒膜細胞は、FSH刺激により活性化されるミトコンドリア依存的ATP合成により、細胞分裂が担保されている。この顆粒膜細胞の分裂により、卵胞直径の拡大が誘起されるわけだが、この拡大が顆粒膜細胞の分化（排卵刺激への感受

性獲得）を引き起こすメカニズムは全く解明されていない。しかし、それを解き明かすヒントとして、卵分泌因子が卵丘細胞のLH受容体発現を抑制しているという報告がある²²⁾。これは、卵丘細胞にはほとんどLH受容体は発現せず、FSH刺激を体外で行っても（顆粒膜細胞にLH受容体を発現誘導する培養系）LH受容体は発現誘導されない。しかし、卵・卵丘細胞複合体から卵細胞質を吸引した後、FSH添加培養地で培養したとき、LH受容体が発現するという報告である。つまり、「卵胞直径の拡大＝卵胞液の増加による卵分泌因子の希薄化」と置き換えることができ、卵分泌因子の濃度低下が、顆粒膜細胞のLH受容体発現を含む排卵準備を可能とするのではないかと考えられる。

顆粒膜細胞を卵と共培養したとき、FSHにより誘導されるLH受容体発現は共培養する卵の数依存的に減少した。この抑制は、卵と顆粒膜細胞の直接的接触によるものでないことを非接触培養系により明らかとした²³⁾。卵胞直径の拡大にともなって、卵からの分泌因子放出量の低下の可能性もあるが、卵胞発達は卵分泌因子の濃度が低下することで顆粒膜細胞の分化を誘導するとの仮説が立証された（図3）。

顆粒膜細胞の増殖、卵胞直径の拡大と顆粒膜細胞の分化を誘導するメカニズム

卵による顆粒膜細胞の分化抑制機構は、初期卵胞から回収した顆粒膜細胞のLH受容体発現に要する時間からも説明することができる。それは、LH受容体をコードする *Lhcgr* のプロモーター活性試験において、FSH刺激により直ちにプロモーター活性は上昇するが（24）、実際の *Lhcgr* 遺伝子発現は、培養24時間以降で上昇するとの結果である²³⁾（図4）。FSHは添加直後にcAMP量を上昇させ、PKAを介して転写

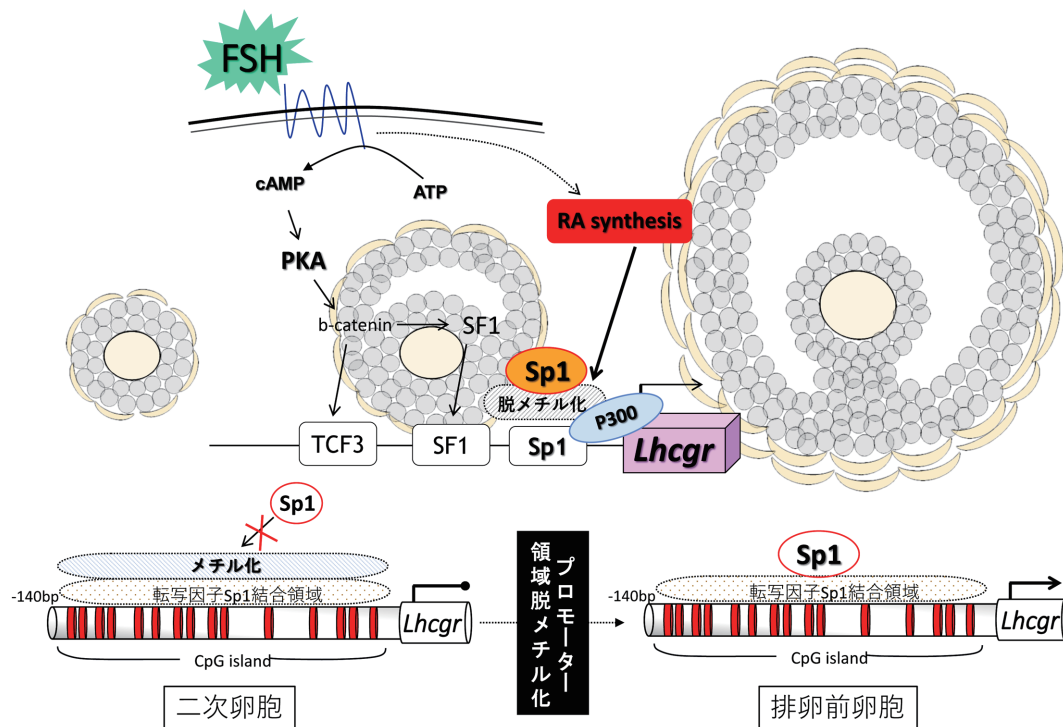


図4 卵胞発育にともなう顆粒膜細胞におけるLH受容体 (*Lhcgr*) の発現制御機構, 直径が拡大した卵胞では, 顆粒膜細胞の*Lhcgr*プロモーター領域が脱メチル化され, 遺伝子発現がONになる

因子を活性化させることで*Lhcgr*のプロモーター活性を上昇させる²⁴⁾. つまり, FSHが直接的に*Lhcgr*を発現させることを意味している. しかし, その発現誘導に時間がかかることは, FSHにより活性化された転写因子が*Lhcgr*プロモーター領域に結合できていないと考えられることから, DNAの構造変換が関与していることを示唆している.

プロモーター領域のDNA構造変換は, DNAメチル化やヒストン修飾により引き起こされ, DNAが脱メチル化状態であり, ヒストンH3がアセチル化しているとき, その構造がオープンクロマチンとなって遺伝子発現が可能となる²⁵⁾. このような遺伝子配列の変化をとまなわなない遺伝子の機能変化は, エピジェネティクス制御と呼ばれている. 顆粒膜細胞において, 排卵刺激後にヒストンアセチル化が生じることで排卵期特異的な遺伝子発現が誘導されることが報告されているが²⁶⁾, DNAメチル化に関する報告はほとんどなかった. そこで, 各卵胞ステージの顆粒膜細胞からDNAを回収し, *Lhcgr*プロモーター領域におけるシトシンのメチル化をバイサルファイトシーケンス法により解析した. その結果, *Lhcgr*プロモーター領域には, 多数のシトシンとグアニンの連続配列 (CpGアイランド) が存在し, 初期胞状卵胞から回収した顆粒膜細胞では, そのシトシンがメチル化されていた (図4). しかし, 排卵前卵胞ではメチル化割合が有意に低下し, 体外培養系においてもFSH刺激によるメチル化割合の低下が検出された (図4). さらに, 卵との共培養

によって脱メチル化は抑制された. また, 卵・卵丘細胞複合体の卵丘細胞において, *Lhcgr*プロモーター領域は高メチル化状態であったが, 卵分泌因子により活性化されるSMADを抑制することで低メチル化へと変化した²³⁾. 以上の結果から, 卵胞発育期における顆粒膜細胞の増殖にともなう卵胞直径の拡大は, 顆粒膜細胞のDNA脱メチル化を引き起こし, その結果, LH受容体が発現する排卵前卵胞となることが明確化された.

まとめ

ARTの卵巣刺激において, 卵胞直径の拡大はFSH刺激を終了し, 排卵刺激へと切り替えるタイミングを決定する基準となっている. 我々の研究成果から, 卵胞直径の拡大は顆粒膜細胞のミトコンドリアの活性化による細胞増殖に依存していること, その増殖がLH受容体発現を引き起こすことが示された. すなわち, 排卵刺激感受性の高い卵胞は, 正常に顆粒膜細胞が増殖して直径が拡大した卵胞と言い換えることができる. もう一つの切り替え基準である「卵胞当たりのエストロゲン合成量 (血中エストロゲン濃度/発達した卵胞数)」は, 顆粒膜細胞のエストロゲン合成量=顆粒膜細胞数+それぞれのアロマトーゼ量となる. すなわち, 血中エストロゲン濃度と卵胞直径の基準と組み合わせることで, 正常な顆粒膜細胞数を算出していたことから, 切り替えタイミングを判断する指標となっているわけである. 重要なポ

イントとして、加齢により卵分泌因子の分泌量が低下するとの報告や、PCOS症例では卵分泌因子をコードする遺伝子の1塩基置換があるとの報告がある。これらは、高年齢患者やPCOS症例では、卵胞直径の拡大を誘導しすぎると過熟となる危険性が高い可能性を示唆している（小さな卵胞でも卵分泌因子の影響が希薄化され、顆粒膜細胞は排卵準備を完了している可能性）ことから、それぞれの症例を考慮した基準としなければいけない。

文 献

- 1) Fitzpatrick, S.L. and Richards, J.S. (1994): Identification of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-response element in the rat aromatase promoter that is required for transcriptional activation in rat granulosa cells and R2C leydig cells. *Mol. Endocrinol.*, 8, 1309–1319.
- 2) Farookhi, R. and Desjardins, J. (1986): Luteinizing hormone receptor induction in dispersed granulosa cells requires estrogen. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 47, 13–24.
- 3) Jeppesen, J.V., Kristensen, S.G., Nielsen, M.E., Humaidan, P., Dal Canto, M., Fadini, R., Schmidt, K.T., Ernst, E., Yding Andersen, C. (2012): LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 97, 1524–1531.
- 4) Su, Y.Q., Sugiura, K. and Eppig, J.J. (2009): Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Semin. Reprod. Med.*, 27, 32–42.
- 5) Noma, N., Kawashima, I., Fan, H.Y., Fujita, Y., Kawai, T., Tomoda, Y., Mihara, T., Richards, J.S. and Shimada, M. (2011): LH-induced neuregulin 1 (NRG1) type III transcripts control granulosa cell differentiation and oocyte maturation. *Mol. Endocrinol.*, 25, 104–116.
- 6) Kawashima, I., Umehara, T., Noma, N., Kawai, T., Shitanaka, M., Richards, J.S. and Shimada, M. (2014): Targeted disruption of *Nrg1* in granulosa cells alters the temporal progression of oocyte maturation. *Mol. Endocrinol.*, 28, 706–721.
- 7) Kitasaka, H., Kawai, T., Hoque, S.A.M., Umehara, T., Fujita, Y. and Shimada, M. (2018): Inductions of granulosa cell luteinization and cumulus expansion are dependent on the fibronectin-integrin pathway during ovulation process in mice. *PLoS One*, 13, e0192458.
- 8) Fadini, R., Coticchio, G., Brambillasca, F., Mignini Renzini, M., Novara, P.V., Brigante, C., De Ponti, E. and Dal Canto, M. (2015): Clinical outcomes from mature oocytes derived from preovulatory and antral follicles: reflections on follicle physiology and oocyte competence. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 32, 255–261.
- 9) Da Silva-Buttkus, P., Jayasooriya, G.S., Mora, J.M., Mobberley, M., Ryder, T.A., Baithun, M., Stark, J., Franks, S. and Hardy, K. (2008): Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary. *J. Cell Sci.*, 121, 3890–3900.
- 10) Hunzicker-Dunn, M. and Maizels, E.T. (2006): FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cell. Signal.*, 18, 1351–1359.
- 11) Moons, D.S., Jirawatnotai, S., Tsutsui, T., Franks, R., Parlow, A.F., Hales, D.B., Gibori, G., Fazleabas, A.T. and Kiyokawa, H. (2002): Intact follicular maturation and defective luteal function in mice deficient for cyclin-dependent kinase-4. *Endocrinology*, 143, 647–654.
- 12) Moons, D.S., Jirawatnotai, S., Parlow, A.F., Gibori, G., Kineman, R.D. and Kiyokawa, H. (2002): Pituitary hypoplasia and lactotroph dysfunction in mice deficient for cyclin-dependent kinase-4. *Endocrinology*, 143, 3001–3008.
- 13) Gonzalez-Robayna, I.J., Falender, A.E., Ochsner, S., Firestone, G.L. and Richards, J.S. (2000): Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol. Endocrinol.*, 14, 1283–1300.
- 14) Richards, J.S., Sehgal, N. and Tash, J.S. (1983): Changes in content and cAMP-dependent phosphorylation of specific proteins in granulosa cells of preantral and preovulatory ovarian follicles and in corpora lutea. *J. Biol. Chem.*, 258, 5227–5232.
- 15) Reisler, E. (1993): Actin molecular structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5, 41–47.
- 16) Graceffa, P. and Dominguez, R. (2003): Crystal structure of monomeric actin in the ATP state. Structural basis of nucleotide-dependent actin dynamics. *J. Biol. Chem.*, 278, 34172–34180.
- 17) Sugiura, K., Pendola, F.L. and Eppig, J.J. (2005): Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Dev. Biol.*, 279, 20–30.
- 18) Hoque, S.A.M., Kawai, T., Zhu, Z. and Shimada, M. (2018): Mitochondrial Protein Turnover Is Critical for Granulosa Cell Proliferation and Differentiation in Antral Follicles. *J. Endocr. Soc.*, 3, 324–339.
- 19) Antico Arciuch, V.G., Elguero, M.E., Poderoso, J.J., Carreras, M.C. (2012): Antioxid. Redox Signal., 16, 1150–1180.
- 20) Shokolenko, I.N. and Alexeyev, M.F. (2017): Mitochondrial transcription in mammalian cells. *Front. Biosci.*, 22, 835–853.
- 21) Zhu, Z., Kawai, T., Umehara, T., Hoque, S.A.M., Zeng, W. and Shimada, M. (2019): Negative effects of ROS generated during linear sperm motility on gene expression and ATP generation in boar sperm mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.*, 141, 159–171.
- 22) Eppig, J.J., Chesnel, F., Hirao, Y., O'Brien, M.J., Pendola, F.L., Watanabe, S. and Wigglesworth, K. (1997): Oocyte control of granulosa cell development:

- how and why. *Hum. Reprod.*, 12, 127–132.
- 23) Kawai, T., Richards, J.S. and Shimada, M. (2018): The Cell Type-Specific Expression of *Lhcgr* in Mouse Ovarian Cells: Evidence for a DNA-Demethylation-Dependent Mechanism. *Endocrinology*, 159, 2062–2074.
- 24) Law, N.C., Weck, J., Kyriss, B., Nilson, J.H. and Hunzicker-Dunn, M. (2013): *Lhcgr* expression in granulosa cells: roles for PKA-phosphorylated β -catenin, TCF3, and FOXO1. *Mol. Endocrinol.*, 27, 1295–1310.
- 25) Calo, E. and Wysocka, J. (2013): Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? *Mol. Cell*, 49, 825–837.
- 26) Zhang, Y.L., Xia, Y., Yu, C., Richards, J.S., Liu, J. and Fan, H.Y. (2014): CBP-CITED4 is required for luteinizing hormone-triggered target gene expression during ovulation. *Mol. Hum. Reprod.*, 20, 850–860.