

博士論文

卵巣の病態における小胞体ストレス応答の  
意義の解明

高橋 望

## 目次

目次	2
要旨	3
序文	4
方法	12
結果	29
考察	39
まとめ	52
おわりに	53
謝辞	55
引用文献	56
図・表	66

## 要旨

本研究では、卵巣の病態における小胞体ストレスの意義を調べた。多嚢胞性卵巣症候群の顆粒膜細胞で小胞体ストレスが活性化し、小胞体ストレスにより TGF- $\beta$ 1 の発現が誘導され卵巣線維化をきたすことが示された。卵巣過剰刺激症候群を発症した患者の卵丘細胞で小胞体ストレスの活性化を認め、小胞体ストレスにより VEGFA が過剰発現し、血管透過性を亢進させ、卵巣過剰刺激症候群の病態への関与が示された。また、小胞体ストレスにより、黄体化顆粒膜細胞の hCG 誘導下における StAR と 3 $\beta$ -HSD の発現が低下し、progesterone 分泌が抑制された。本研究により、小胞体ストレスの卵巣の各種病態における重要性が示された。

## 序文

不妊症とは 1 年間性生活を行っているにも関わらず妊娠に至らない状況である。

不妊症は一般の病気と異なり、検査で異常が認めないケースが多く、原因の特定が困難である。その一因として、妊娠成立までの機序が完全に明らかとなっていないことが考えられる。卵巣における卵胞発育・排卵・黄体機能の活性化、受精、着床の妊娠に至る過程において異常を認める場合に不妊となる。不妊症の主な原因として、卵巣因子・卵管因子・子宮因子・男性因子などがあるが、中でも卵巣は妊娠成立における最も重要な臓器の一つである。視床下部から分泌される性腺刺激ホルモン

(Gonadotropin releasing hormone; GnRH)のパルス状分泌により、下垂体ホルモンである卵胞刺激ホルモン(follicle stimulating hormone; FSH)、黄体形成ホルモン

(luteinizing hormone; LH)が分泌され、卵巣における estrogen・progesterone 分泌を調節している(図 1)。卵胞発育は、原始卵胞から一次卵胞、二次卵胞とゴナドトロピン非依存的に顆粒膜細胞の増殖・分化をきたす。その後、ゴナドトロピン依存的に発育を認め、莢膜細胞層が出現し、胞状腔を伴った胞状卵胞から成熟卵胞へと発育する。

卵胞の成熟に伴い、顆粒膜細胞からの estrogen 分泌が著明に増加し、正のフィードバック作用によって LH surge がおき、炎症カスケードの活性化により選択された成熟卵胞で排卵が誘発される(図 2)。排卵後の卵巣では、顆粒膜細胞が黄体化細胞となり黄体が形成され、progesterone を分泌し、着床・妊娠を維持する。近年、これらの過程

において卵巣における局所因子の重要性が注目されている。排卵過程において、顆粒膜細胞で、LH の作用によって epiregulin、amphiregulin などの epidermal growth factor (EGF)関連因子が誘導され、卵胞核融解や卵丘拡張を引き起こす(1)。また卵巣内の局所因子として、卵細胞由来の growth differential factor-9 (GDF-9)や bone morphogenic protein (BMP) family が顆粒膜細胞の増殖・分化に関与していることが明らかとなってきた(2-4)。一方で卵巣の病態における局所因子の役割については、明らかとなっていないことが多い。

#### 小胞体ストレス

近年、小胞体ストレス応答が種々の臓器における細胞の恒常性維持ならびに病態に深くかかわることが明らかとなってきた。小胞体はタンパク質合成・成熟を行う細胞内器官であるが、様々な因子や環境要因などのストレス負荷により、折りたたみ不全なタンパク質が蓄積される。小胞体の処理能力を超えて、異常タンパク質が蓄積した状態を小胞体ストレスと呼ぶ(5, 6)(図 3)。その状況を小胞体膜に存在するセンサータンパク質が察知し、小胞体から核へのシグナル経路が活性化される。長期間に及び負荷がかかる場合には、細胞死が誘導される。これらの適応反応を小胞体ストレス応答と呼ぶ。図 4 に小胞体ストレス応答のシグナル伝達経路を示す。insitol-requiring enzyme 1 (IRE1)、activating transcription factor 6 (ATF6)、double-stranded RNA-

activated protein kinase-like ER kinase (PERK)と呼ばれる3つの主要なセンサータンパク質が存在する。IRE1 は自己リン酸化により活性化し、X-box-binding protein 1 (XBP1) mRNA がスプライシングされ、XBP1 タンパク質が合成される。ATF6 はタンパク質切断により活性化され、Heat shock protein 5 (HSPA5)などのケミカルシャペロンを誘導する。PERK は自己リン酸化により活性化し、eukaryotic Initiation Factor 2 alpha (eIF2 $\alpha$ )がリン酸化し、転写因子である ATF4 を誘導する。これら小胞体ストレス応答因子は様々な標的遺伝子の発現を調節している。細胞の恒常性が維持できない場合、C/EBP homologous protein (CHOP)などの発現によって、アポトーシスを介した細胞死が誘導される(5, 6)。

糖尿病において小胞体ストレスが活性化し、耐糖能障害の原因となっていることが示された(7)。以降、神経変性疾患、癌、胎盤機能など様々な病態に関与していることが明らかとなった(8)。一方で、卵巣における小胞体ストレスの役割はほとんど示されていない。我々の研究室で、マウスの卵巣において、二次卵胞以降の顆粒膜細胞に活性化された小胞体ストレスセンサータンパク質(phospho-IRE1, phospho-PERK)、小胞体ストレス応答因子である spliced-form of XBP1 (XBP1(S)), HSPA5 mRNA の発現を認めることが示された(9)。しかし、その細胞機能に与える影響は不明である。本研究では、卵巣での各種病態における小胞体ストレスの意義を明らかにすることを目的とした。中でも、卵巣内の微小環境や局所因子と関連を認める、多嚢胞性卵巣症候群、

卵巣過剰刺激症候群、黄体ホルモン分泌不全の各病態に着目したため、次項で述べる。

#### 多嚢胞性卵巣症候群における卵巣線維化

多嚢胞性卵巣症候群 (polycystic ovarian syndrome; PCOS) は生殖可能年齢の 6-10% に認め、排卵障害をきたす不妊の主な原因となっている(10)。PCOS の診断は Rotterdam criteria に基づくと、排卵障害、高アンドロゲン血症、多嚢胞性卵巣の 3 つのうち 2 つを満たすものとされている(11)。PCOS は複合的な病態を示し、ゴナドトロピン分泌異常、高アンドロゲン、インスリン抵抗性、卵巣機能障害、卵胞発育停止などの様々な因子の相互作用によって起きている(12)。近年、炎症や酸化ストレスなどの卵巣内の局所因子が PCOS の病態に関与していることが明らかとなってきた(12-19)。

PCOS の卵巣では、コラーゲン沈着と線維組織の沈着により、卵巣被膜の肥厚化を認める(20)。しかし、PCOS における線維化の機序は明らかとなっていない。近年の研究で、顆粒膜細胞における Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 とその下流で作用する connective tissue growth factor (CTGF) が卵巣における細胞外マトリックスのリモデリングに関与していることが示されてきた(21-24)。また、PCOS 患者の血清中並びに卵巣における TGF- $\beta$ 1 の発現が増加している(24, 25)ことから、TGF- $\beta$ 1 が PCOS の病態に関与している可能性が示唆されている。

一方で小胞体ストレスは組織の線維化を誘導することが知られている(26, 27)。

HCV 肝炎や $\alpha$ -1 antitrypsin 欠損症において小胞体ストレスが活性化し、肝細胞から TGF- $\beta$ 1 の分泌が促進し、肝線維化を誘導する(28, 29)。また、angiotensin II 誘導高血圧モデルにおいて、小胞体ストレスの活性化によって大動脈と心臓における TGF- $\beta$ 1 の発現が上昇し、血管内皮細胞の障害と心筋障害をきたす(30)。

本研究では卵巣の線維化に着目し、小胞体ストレスが PCOS の卵巣で活性化し、TGF- $\beta$ 1 を介して卵巣線維化を誘導しているかどうかを検討した。さらにヒトで安全性が確かめられている小胞体ストレス阻害剤の PCOS 卵巣における卵巣線維化改善効果を検討した。

#### 卵巣過剰刺激症候群

不妊治療、とりわけ体外受精の発展に伴い、不妊患者における妊娠率の向上を認めたが、一方で医原性の合併症が問題となっている。多胎と卵巣過剰刺激症候群 (ovarian hyperstimulation syndrome; OHSS) があげられるが、多胎に関しては、日本生殖医学会の勧告により、胚移植数の制限が行われ、体外受精における多胎率は減少を認めた。一方で、OHSS は、排卵誘発が誘因となり血管透過性が亢進し、血管内脱水を来とし、腹水・胸水貯留、血栓症を引き起こし、適切な治療を施さなければ、致死的となりうる重篤な合併症の一つである。human chorionic gonadotropin(hCG)刺激がト



リガーとなり、黄体化顆粒膜細胞(granulosa-lutein cells; GLCs)において、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor A; VEGFA)の発現が亢進することが原因と考えられている(31)。OHSS の病態において hCG 刺激による VEGFA の産生増加が重要であり、VEGFA の阻害剤によって血管透過性の上昇を抑制することが知られている(32)。しかし、VEGFA の過剰発現の詳細なメカニズムは不明である。VEGFA は卵巣の血管新生において重要な役割を担っているが(33)、卵巣における VEGFA の調節機序は明らかとなっていない。LH/hCG が VEGFA の主要な制御因子と考えられているが(34-36)、卵巣における局所因子も VEGFA 発現を制御しているといわれている(37)。低酸素や insulin growth factor、BMP-7、osteopontin などが VEGFA の発現調節に関与している(35, 38-40)。卵巣において VEGFA の発現はゴナドトロピンと卵巣の局所環境によって時間的・空間的に制御されていると考えられる。近年、様々な臓器において小胞体ストレス応答因子が VEGFA の発現調節に関与し、中でも、IRE1/XBP1(S)の経路が重要な役割を担っている。(41-45)。しかし、卵巣における小胞体ストレスの VEGFA 発現調節における役割は明らかとなっていない。

本研究では、OHSS を引き起こした患者の卵巣において小胞体ストレスが活性化し、VEGFA の過剰発現を来し、OHSS の病態に関与しているかどうかを検討した。さらにヒトで安全性が確かめられている小胞体ストレス阻害剤の OHSS 治療薬としての有効性を検討した。

## 黄体ホルモン分泌不全

排卵後、顆粒膜細胞が黄体化し、progesterone を分泌し、着床・妊娠を維持する。卵巣におけるステロイドホルモン合成経路を図 5 に示す。卵巣における estrogen 合成は、FSH、LH の作用下で莢膜細胞と顆粒膜細胞の相互作用によって合成される。一方、progesterone は、排卵後 GLCs において主に産生される。Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)によってコレステロールが細胞膜からミトコンドリア内へ移行し、P450scc によって pregnenolone へ、さらに pregnenolone は 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase ( $3\beta$ -HSD)によって progesterone へと変換される。黄体機能不全の患者では適切な progesterone 分泌が保たれず、不妊・流産の原因となるが、その原因・機序については明らかとなっていない。近年の肥満人口の増加に伴い、肥満と黄体ホルモン分泌不全との関連が示されてきた(46, 47)。その機序として肥満患者では、LH のパルス分泌が乱れ、progesterone が適切に分泌されないことがあげられる(46, 47)。また、leptin などの adipokine が GLCs の機能に影響を与えているといわれ(48-50)、卵巣における微小環境が GLCs の黄体機能に関与していることが示唆される。BMI の増加は、卵胞液中の中性脂肪や脂肪酸濃度の増加と関連があり(51-53)、卵胞内における脂質の蓄積が小胞体ストレスを活性化しているという報告がある(53, 54)。したがって、肥満患者で認める黄体ホルモン分泌不全に小胞体ストレス

応答が関与している可能性があるが、小胞体ストレスが progesterone に与える影響については詳細に明らかとなっていない。そこで、本研究では、肥満状態の卵巢で小胞体ストレスが活性化しているかどうか、また小胞体ストレスが progesterone 産生に与える影響について検討した。

## 方法

### 研究 1. 多嚢胞性卵巣症候群の卵巣線維化における小胞体ストレスの役割

#### ヒト検体

患者からの文書による同意の下、東京大学医学部附属病院と松本レディースクリニックで施行した体外受精患者の採卵時に、卵胞液を回収し、GLCs を使用した。小胞体ストレス応答因子と TGF- $\beta$ 1、CTGF の mRNA の発現を比較するため、11 人の PCOS 患者と 10 人の Control 患者の GLCs を使用した。PCOS の診断基準は、Rotterdam Criteria に沿って行われた(11)。LH、FSH、estradiol、prolactin (PRL)濃度は月経周期 3-5 日目に測定し、anti-Müllerian hormone (AMH)濃度も測定した。Control 患者は、1)正常月経周期、2)内分泌異常を伴わない、3)超音波で正常卵巣所見であることを選択基準とした。

PCOS 患者と Control 患者それぞれ 3 名の卵巣検体を用いて、免疫染色を施行した。Control 卵巣は、正常月経周期で、ホルモン治療をうけていない子宮体癌・子宮頸癌患者の子宮全摘時に摘出した卵巣を用いた。PCOS 卵巣は、無排卵または稀発月経、かつ病理所見で多嚢胞性卵巣を認める患者の卵巣を使用した。

なお研究 1.~3.の実験全般に関し、東京大学倫理委員会の承認(0325-(6))を受け、ヘルシンキ宣言に基づき施行した。

## PCOS モデルマウス

PCOS モデルマウスは先行研究で確立された dehydroepiandrosterone (DHEA) 投与モデルを用いた(55-57)。3 週齢の Balb/C 雌マウス (Japan SLC)を使用した。小胞体ストレスの活性化を調べるため、Control 群、PCOS 群の 2 群に分けた。Control 群(n=5)では、sesami oil を 20 日間皮下投与した。PCOS 群(n=5)では、DHEA (6mg/100g body weight/day, Sigma-Aldrich)を 20 日間皮下投与した。

小胞体ストレス阻害剤の卵巣線維化への効果を調べるため、Control 群、PCOS 群、PCOS + tauroursodeoxycholic acid (TUDCA)群、PCOS+BGP-15 群の 4 群に分けた。Control 群 (n=5)は sesami oil を皮下投与し、生理食塩水を 20 日間経口投与した。PCOS 群 (n=5)では、DHEA (6mg/100g body weight/day)を皮下投与し、生理食塩水を 20 日間経口投与した。PCOS + TUDCA 群 (n=5)では、DHEA を皮下投与し、TUDCA (50mg/100g body weight/day, Wako)を 20 日間経口投与した。PCOS + BGP-15 群 (n=5)では、DHEA を皮下投与し、BGP-15 (3mg/100g body weight/day, Sigma-Aldrich)を 20 日間経口投与した。TUDCA と BGP-15 の投与量は先行研究を参考にした(58-60)。Day15 から Day21 の間、経膣細胞診を施行し、性周期を評価した。性周期は膣垢をスポイトにて採取し、ギムザ染色で評価を行った。有核細胞を占める場合は発情前期、角化細胞を認める場合は発情期、死滅した有核細胞と白血球

を認める場合は発情後期、白血球を多数占める場合は発情休止期とし、性周期の判定を行った(57)。Day21 に血清・卵巣を採取した。

なお、研究 1.～3.の動物実験に関し東京大学医学系研究科動物実験委員会の承認を受けており、承認番号は医-P-16-001 である。

### ヒト GLCs の分離及び培養

ヒト GLCs の分離、培養は、以前に当研究室で報告した方法を用いた(61, 62)。

GLCs を含んだ卵胞液を採卵時に回収し、1500 m/s で 10 分間遠心した後、0.2 % hyaluronidase を含んだ PBS で懸濁し、37 °C で 30 分間インキュベートした。その後、懸濁液を Ficoll-Paque 液に加え、700 g で 30 分間遠心し、中間層を回収した。PBS で洗浄し、チャコール処理仔ウシ血清(10 %)・抗生剤(ペニシリン 100 U/ml、ストレプトマイシン 0.1 mg/ml、アンフォテリシン 250 ng/ml) を含んだ DMEM/F-12 に懸濁し、 $2 \times 10^5$  cells/ml の濃度で 6 穴、12 穴、48 穴培養プレートにまいた後、5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件で培養した。すべての GLCs は 3-5 日間の培養ののちに刺激を行った。

### ヒト GLCs の刺激方法

小胞体ストレスの TGF- $\beta$ 1 の発現への影響を調べるため、小胞体ストレス阻害剤として 1 mg/ml TUDCA を 24 時間投与後、小胞体ストレス刺激剤として 2.5  $\mu$ g/ml

tunicamycin(Wako)または 0.5  $\mu$ M thapsigargin(Sigma-Alrich)を 24 時間投与した。

XBP1(S)をノックダウンするため、Dharmacon 社の On-TARGET plus SMART pool human XBP-1 siRNA (L-009552-00-020)を使用した。Negative control として、ON-TARGET plus non-targeting pool (D-001810-20)を使用した。Opti-MEM (Invitrogen) に 50 nM siRNA と Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)を加え、GLCs に 24 時間投与した。トランスフェクション後、培養液を除去し、GLCs に 2.5  $\mu$ g/ml tunicamycin を 24 時間投与した。

#### **RNA 抽出、RT 及び定量的 PCR**

マウスの卵巣から ISOGEN(Nippon Gene)を用いて total RNA を抽出した。1  $\mu$ g の total RNA を Rever Tra Ace qPCR RT Master Mix with genomic DNA remover (TOYOBO)を用いて RT し、cDNA を得た。ヒト GLCs は SuperPrep Cell Lysis & RT Kit for qPCR (TOYOBO)を用いて、cDNA を得た。この cDNA を用いて、定量的 PCR を LightCycler (Roche)により行った。GAPDH を internal standard として標準化し、ヒト XBP1(S)、ヒト HSPA5、ヒト ATF4、ヒト ATF6、ヒト CHOP、ヒト TGF- $\beta$ 1、ヒト CTGF、マウス XBP1(S)、マウス TGF- $\beta$ 1、マウス CTGF の発現を評価した。プライマー配列を表 1 に示す。

PCR の条件は、ヒト XBP1(S)では denaturing 98°C, 10 秒、annealing 66°C, 10 秒、extension 60°C, 30 秒とし、それ以外では、denaturing 98°C, 10 秒、annealing 60°C, 10 秒、extension 66°C, 30 秒とし、40 サイクルとした。全ての PCR は melting curve を確認した。

### 卵巣組織

ヒトとマウスの卵巣を 10 % 中性緩衝ホルマリンで固定し、エタノールで脱水し、パラフィン包埋し、3  $\mu\text{m}$  の切片を作成した。各卵巣中央部の切片を Hematoxilin-Eosin 染色または Masson's trichrome 染色を行った。

### 免疫染色

3  $\mu\text{m}$  の卵巣切片を脱パラフィン後、Target retrieval solution を用いて抗原賦活化し、Envision + Dual Link System/HRP (DAB) kit (Dako)を用いて免疫染色を行った。1 次抗体として、anti-DDIT3(9C8)抗体(1:200, Abcam)、anti-IRE1(phospho S724)抗体(1:500, Abcam)、anti-PERK (phospho T980 または phospho T982)抗体(1:500, Abcam)、anti-TGF- $\beta$ 1 抗体(1:1000, Abcam)、anti-collagen type I 抗体(Abcam)、anti-collagen type IV 抗体(Abcam)を用いた。Negative control として Isotype-specific IgG を使用した。



### ***In situ* hybridization**

既存の報告に沿って、ISHR Starting Kit (Nippon Gene)を用いて施行した(9)。

XBP1(S)と HSPA5 の sense・antisense の DIG 標識 RNA probe はマウス cDNA

template を PCR-2 TOPO vector(Invitrogen)にサブクローニングし、合成した。RT-PCR

に用いたプライマーは以下に記載するものを用いた。

XBP1(S) sense. 5'-GCTGAGTCCGCAGCAGGTGC-3'

XBP1(S) antisense, 5'-CATGACAGGGTCCAACCTTGTCCAG-3'

HSPA5 sense, 5'-GACATTTGCCCCAGAAGAAA-3'

HSPA5 antisense, 5'-CTCATGACATTCAGTCCAGCA-3'

制限酵素で切断した直線化した vector を鋳型として、SP6 または T7 RNA

polymerase を用いて RNA probe を作成した。Negative control として sense probe を

hybridization した。

### **免疫染色・*In situ* hybridization の定量化**

定量的評価のため、画像を Image J software (National Institute of Health)に取り

込み、解析を行った(63)。phospho-PERK、phospho-IRE1、CHOP、TGF-β1、

XBP1(S)、HSPA5 では、3 名の患者または 5 匹の異なるマウスより、無作為に選択し

た 5 つ以上の卵胞内における顆粒膜細胞の陽性細胞数を計測した。Masson's trichrome 染色、collagen type I、collagen type IV の免疫染色では、3 名の患者または 5 匹の異なるマウスより無作為に選択した 5 ヶ所の領域において、染色された面積を計測した。

### **TGF- $\beta$ 1 濃度測定**

細胞上清中のヒト TGF- $\beta$ 1 濃度測定は、Quantikine ELISA kit (R&D Systems)を用いて測定した。TGF- $\beta$ 1 を活性化させるため、細胞上清を 1 M HCL で酸性化し、10 分間室温でインキュベートした後、0.5 M HEPES/1.2 M NaOH で中性化した。Epoch Multi-Volume Spectrophotometer (Bio Tek)を用いて、450 nm 吸光度を測定した。測定した TGF- $\beta$ 1 濃度は、1 穴当たりの GLC 数により補正した。

### **Testosterone 濃度測定**

マウス血清 testosterone 濃度は Testosterone ELISA kit (Enzo Life Sciences)を用いて測定した。

### **統計学的解析**

統計学的解析は JMP Pro 11 software(SAS Institute Inc.)を用いて行った。2 群比較は Wicoxon rank sum test で、多重比較は Tukey-Kramer HSD test にて解析を行い、 $P<0.05$  を有意とした。

## 研究 2. 卵巣過剰刺激症候群における小胞体ストレスの役割

### ヒト卵丘細胞、GLCs

東京大学医学部附属病院で施行した体外受精患者より採卵時に採取した卵子卵丘細胞複合体並びに、ヒト GLCs を含んだ卵胞液を使用した。

### ヒト卵丘細胞の分離

男性因子のため顕微授精を施行した患者( $35.0 \pm 3.5$  歳、平均  $\pm$  S.D.)の検体を用いた。計 31 名の患者より採卵時に回収した 134 個の卵子卵丘細胞から卵丘細胞をそれぞれ分離し、実験に使用した。分離した卵丘細胞は RLT buffer (Qiagen)で  $80^{\circ}\text{C}$  に保存した。

すべての患者のカルテを後方視的に検討し、採卵後の OHSS 発生を評価した。採卵後、すべての患者は臨床症状並びに経膈超音波検査にてモニターを行った。OHSS の診断は、日本産婦人科学会の OHSS 分類に沿って行った(64)。中等症また

は重症の OHSS を認めた患者を OHSS 患者とした。中等症 OHSS は 8 cm 以上の卵巣腫大と腹水貯留を認める場合、重症 OHSS は腹部膨満感や呼吸苦などの臨床症状、12 cm 以上の卵巣腫大、以下の血液検査所見 1) 白血球数  $\geq 15,000/\text{mm}^3$ ; 2) ヘマトクリット値  $\geq 45\%$ ; 3) 総蛋白  $< 6.0\text{g/dl}$  またはアルブミン  $< 3.5\text{g/dl}$  を認める場合とした。

### ヒト GLCs の分離及び培養

前述した研究 1.の実験と同様に行った。

### ヒト GLCs の刺激方法

小胞体ストレスの VEGFA 発現への影響を調べるため、小胞体ストレス刺激剤として tunicamycin( $0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$  6 時間 or  $2.5\text{ }\mu\text{g/ml}$  3-9 時間)を投与した。次に小胞体ストレスの hCG で誘導される VEGFA 発現への影響を調べるために、 $2.5\text{ }\mu\text{g/ml}$  tunicamycin を 6 時間前投与後、 $10\text{ IU/ml}$  hCG を 6 時間投与した。小胞体ストレス阻害剤の効果を調べるため、 $1.0\text{ mg/ml}$  TUDCA を 12 時間または 24 時間投与後、 $2.5\text{ }\mu\text{g/ml}$  tunicamycin を 6 時間、 $10\text{ IU/ml}$  hCG を 6 時間投与した。XBP1(S)をノックダウンするため、Dharmacon 社の Accell Human XBP1 siRNA SMARTpool (E-009552-00-0020)を使用した。Negative control として、Accell Non-Targeting pool (D-001910-

20)を使用した。1  $\mu$ M siRNA を Accell Delivery Media 下に 72 時間培養し、トランスフェクションを行った。培養液を除去し、GLCs に 2.5  $\mu$ g/ml tunicamycin を 6 時間、10 IU/ml hCG を 6 時間投与した。

## **RNA 抽出、RT 及び定量的 PCR**

ヒト卵丘細胞からは RNeasy Mini Kit(Qiagen)を、ラットの卵巣からは ISOGEN を用いて total RNA を抽出した。1  $\mu$ g の total RNA を Rever Tra Ace qPCR RT Master Mix with genomic DNA remover を用いて RT し、cDNA を得た。ヒト GLCs は SuperPrep Cell Lysis & RT Kit for qPCR を用いて、cDNA を得た。この cDNA を用いて、定量的 PCR を LightCycler により行った。ヒトでは GAPDH を、ラットでは  $\beta$ -actin を internal standard として標準化し、ヒト XBP1(S)、ヒト VEGFA、ラット VEGFA の発現を評価した。プライマー配列を表 1 に示す。

PCR の条件は、各々、ヒト XBP1(S)では denaturing 98°C, 10 秒、annealing 66°C, 10 秒、extension 60°C, 30 秒とし、それ以外では、denaturing 98°C, 10 秒、annealing 60°C, 10 秒、extension 66°C, 30 秒とし、40 サイクルとした。全ての PCR は melting curve を確認した。

## **VEGFA 濃度測定**

細胞上清中のヒト VEGFA 濃度測定は、Quantikine ELISA kit (R&D Systems)を用いて測定した。

## OHSS ラットモデル

OHSS モデルマウスは先行研究で確立されたものを用いた(65, 66)。3 週齢の雌 Wistar ラット (Japan SLC)を使用した。小胞体ストレス阻害剤の OHSS 予防的効果を調べるため、Control 群、OHSS 群、OHSS+TUDCA 群の 3 群に分けた。Control 群 (n=5)は 10 IU pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) (ASKA Pharmaceutical Co.) を day 3 に腹腔内投与後、10 IU hCG を day 5 に腹腔内投与した。OHSS 群 (n=5)では、10 IU PMSG を day1 から day4 まで連日腹腔内投与し、day5 に 50 IU hCG を腹腔内投与した。OHSS + TUDCA 群 (n=5)では、OHSS 群と同様の PMSG-hCG 投与に加えて、day1-day6 まで連日 TUDCA(50mg/100g body weight) を腹腔内投与した。hCG 投与後 48 時間後に血管透過性を測定し、卵巣を摘出した。血管透過性の評価は先行研究の方法を用いて行った(65, 66)。ラットをイソフルラン(DS Pharma Animal Health CO.)で吸入麻酔後、0.2 ml の 5 mM Evans Blue dye (Sigma-Aldrich)を尾静脈より注射した。投与 30 分後に 5 ml の 0.9 %生理食塩水を腹腔内投与し、腹部マッサージで 30 秒間施行後、腹腔内容液を回収し、0.05 ml の 0.1 N NaOH を含ん

だ tube に入れた。900 g で 12 分間攪拌後、Evans Blue 濃度を 610 nm 吸光度で測定した。

### 卵巣組織

ラットの卵巣を 10 % 中性緩衝ホルマリンで固定し、エタノールで脱水し、パラフィン包埋し、3  $\mu\text{m}$  の切片を作成した。各卵巣中央部の切片を用いて、Hematoxylin-Eosin 染色を行い、黄体数を計測した。

### 統計学的解析

統計学的解析は JMP Pro 11 software を用いて行った。2 群比較は Student's t-test で、多重比較は Tukey-Kramer HSD test にて解析を行い、 $P < 0.05$  を有意とした。

## 研究 3. 肥満患者の黄体ホルモン分泌不全における小胞体ストレスの役割

### マウス

肥満環境の卵巣における小胞体ストレスの活性化を調べるため、6 週齢の雌 C57B6 Cg-Lep<sup>ob</sup>/J マウス(Charles river)を使用した。Ob/Ob マウス(Lep<sup>ob</sup> / Lep<sup>ob</sup>; n=5)

の平均体重は  $33.2 \pm 0.36$  g でコントロールマウス(Lep<sup>ob/+</sup>; n=5)は  $18.1 \pm 0.18$  g であった。それぞれ、通常の餌を投与し、day15 に卵巣を摘出した。

小胞体ストレスの卵巣におけるステロイドホルモン産生、黄体形成、卵子の質を評価するため、3 週齢の雌 C57BL6/N マウス(Japan SLC)を用いて、Control 群、tunicamycin 投与群の 2 群に分けた。Control 群 (n=4)は 15 IU PMSG を day 1 に腹腔内投与後、15 IU hCG を day 3 に腹腔内投与した。tunicamycin 投与群 (n=4)では、Control 群と同様の PMSG-hCG 投与に加えて、day2 に 1.0  $\mu$ g tunicamycin を腹腔内投与した。hCG 投与後 12、24、48 時間後に卵巣と血清を回収した。また、卵子の質を評価するため、胚盤胞形成率を評価した。hCG 投与 12 時間後に雄マウスと交配させ、膣栓を認めた日を day1 とし、day4 に子宮内の胚盤胞数を評価した。

## ヒト GLCs の分離及び培養

前述した研究 1.の実験と同様に行った。

## ヒト GLCs の刺激方法

小胞体ストレスの hCG で誘導される progesterone 産生への影響を調べるために、GLCs に 2.5  $\mu$ g/ml tunicamycin または 1  $\mu$ M thapsigargin を 6 時間前投与後、10 IU/ml hCG を 18 時間投与した。tunicamycin の hCG または 3', 5'-cyclic adenosine



monophosphate (cAMP)で誘導されるステロイド合成酵素の mRNA 発現を評価するため、2.5 µg/ml tunicamycin を 6 時間前投与後、10 IU/ml hCG または 1 mM 8-bromo-cAMP(Sigma-Aldrich)を 6 時間投与した。

Tunicamycin の hCG で誘導される StAR タンパク質、3β-HSD 酵素活性を調べるため、GLCs に 2.5 µg/ml tunicamycin を 6 時間前投与後、10 IU/ml hCG を 18 時間投与した。3β-HSD の酵素活性は、GLCs に 5 µg/ml pregnenolone (Sigma Aldrich)を投与後、20 µM aminoglutethimide (Sigma-Aldrich)を投与した後に、tunicamycin と hCG を投与し、細胞上清中の progesterone 濃度を測定した。3β-HSD は P450scc により合成された pregnenolone を基質として progesterone を合成する酵素であるため(図 5)、pregnenolone と P450scc の阻害剤である aminoglutethimide を投与した後に progesterone 産生を測定することで、3β-HSD 酵素活性を評価した(67)。

Tunicamycin の hCG で誘導される細胞内 cAMP 濃度測定と protein kinase A (PKA)のリン酸化を調べるため、GLCs に 2.5 µg/ml tunicamycin を 6 時間前投与後、10 IU/ml hCG を 60 分投与した。Extraceullular signal-regulated kinase (ERK)1/2 のリン酸化を評価するため、GLCs に 2.5 µg/ml tunicamycin を 6 時間前投与後、10 IU/ml hCG を 10 分投与した。

## **RNA 抽出、RT 及び定量的 PCR**

マウスの卵巣から ISOGEN を用いて total RNA を抽出した。1  $\mu$ g の total RNA を Rever Tra Ace qPCR RT Master Mix with genomic DNA remover を用いて RT し、cDNA を得た。ヒト GLCs は SuperPrep Cell Lysis & RT Kit for qPCR を用いて、cDNA を得た。この cDNA を用いて、定量的 PCR を LightCycler により行った。GAPDH を internal standard として標準化し、ヒト XBP1(S)、ヒト StAR、ヒト P450scc、ヒト 3 $\beta$ -HSD、ヒト aromatase、ヒト LH/hCG receptor (LHR)、マウス XBP1(S)、マウス HSPA5、マウス ATF4、マウス ATF6、マウス StAR、マウス P450scc、マウス 3 $\beta$ -HSD、マウス aromatase の発現を評価した。プライマー配列を表 1 に示す。

PCR の条件は、各々、ヒト XBP1(S)とヒト StAR では denaturing 98°C, 10 秒、annealing 66°C, 10 秒、extension 60°C, 30 秒とし、ヒト P450scc とヒト 3 $\beta$ -HSD では、denaturing 98°C, 10 秒、annealing 62°C, 10 秒、extension 60°C, 30 秒とし、それ以外では、denaturing 98°C, 10 秒、annealing 60°C, 10 秒、extension 66°C, 30 秒とし、40 サイクルとした。全ての PCR は melting curve を確認した。

### **progesterone 濃度測定**

細胞上清中並びにマウス血清中の progesterone 濃度測定は、Progesterone enzyme immunoassay (EIA) kit (Cayman Chemical)を用いて測定した。

## Western blot

ヒト GLCs を phosphatase inhibitor (Nacalai Tesque)と protease inhibitor (Roche)を含んだ lysis buffer (Cell Signaling)で溶解した。不溶物質を除去した後、DirectBlot (SHARP)を用いて、10  $\mu$ g 相当量のタンパク質を 10 % SDS-PAGE ゲルに泳動後、PVDF 膜へ転写を行った。転写後、1 次抗体として StAR (Santa Cruz, 1:200)、phospho-PKA substrate (RRXS\*/T\*, Cell Signaling, 1:500)、phospho-ERK1/2, Cell Signaling Technology)、ERK1/2(Cell Signaling Technology, 1:500)、 $\beta$ -Actin (Santa Cruz Biotechnology, 1:200)を使用した。2 次抗体として、HRP 標識抗ウサギまたはヤギ抗体(1:1000, Jackson Immuno Research Laboratories)を用いた。ECL system (Amersham Biosciences)で発光させ、C-digit instrument (LICOR)で画像を検出した。

## 細胞内 cAMP 濃度測定

ヒト GLCs 内の cAMP 濃度測定は、cAMP Select ELISA kit (Cayman Chemical)を用いて測定した。

## Estradiol 濃度測定

マウス血清中の estradiol 濃度測定は、Rodent Estradiol ELISA kit (Endocrine Technologies)を用いて測定した。

## 卵巣組織

マウスの卵巣を 10 % 中性緩衝ホルマリンで固定し、エタノールで脱水し、パラフィン包埋し、3  $\mu\text{m}$  の切片を作成した。各卵巣中央部の切片を用いて、Hematoxylin-Eosin 染色を行い、黄体数を計測した。

## 統計学的解析

統計学的解析は JMP Pro 11 software を用いて行った。2 群比較は Student's t-test で、多重比較は Tukey-Kramer HSD test にて解析を行い、 $P < 0.05$  を有意とした。

## 結果

### 研究 1. 多嚢胞性卵巣症候群の卵巣線維化における小胞体ストレスの役割

**PCOS 患者の顆粒膜細胞で小胞体ストレスは活性化し、TGF- $\beta$ 1 の発現が増加している**

PCOS で小胞体ストレスの活性化を認めるかどうかを調べるため、PCOS 患者 (n=11) と Control 患者 (n=10) の GLCs における小胞体ストレス応答因子の mRNA 発現を調べた。年齢、BMI、採卵数、排卵誘発方法、血清の FSH・estradiol・PRL 濃度に差を認めなかったが、LH・LH/FSH 比・AMH 値は Control 患者に比べて、PCOS 患者で有意に上昇を認めた(表 2)。XBP1(S)、HSPA5、ATF4、ATF6、CHOP の mRNA 発現は、Control 患者に比べて PCOS 患者の GLCs で、有意に発現が上昇していた(図 6A-E)。また、線維化誘導因子である TGF- $\beta$ 1、CTGF の mRNA 発現も、PCOS 患者の GLCs で有意に増加していた(図 6F,G)。

ヒト卵巣の免疫染色において、phospho-IRE1 と phospho-PERK、CHOP、TGF- $\beta$ 1 のタンパク発現を調べた。小胞体ストレスが活性化すると IRE1 と PERK はリン酸化を認め、小胞体ストレス応答因子を誘導する。図 7A-D に示すように、PCOS 卵巣の顆粒膜細胞において、phospho-IRE1、phospho-PERK、CHOP の発現は有意に増加し、TGF- $\beta$ 1 の発現も増加を認めた。また、Masson's trichrome 染色において、PCOS 患者では卵巣間質における線維組織の増生を認めた(Figure 7E)。

## PCOS モデルマウスにおいて小胞体ストレスは顆粒膜細胞で活性化し、TGF- $\beta$ 1 の発現上昇を認める

PCOS モデルマウスにおける小胞体ストレスの活性化と TGF- $\beta$ 1 の発現を調べた。PCOS モデルマウスでは Control マウスに比べて、血清 testosterone 濃度は上昇し、囊胞状卵胞数の増加を認めた(図 8A-C)。また、PCOS モデルマウスでは性周期の不順を認めた(図 8D)。In situ hybridization の結果により、XBP1(S)と HSPA5 の発現は PCOS マウスの顆粒膜細胞で上昇を認めた(図 9A,B)。免疫染色の結果より、CHOP、phospho-IRE1、phospho-PERK のタンパク発現は PCOS マウスの顆粒膜細胞で増加を認めた(図 9C-E)。また TGF- $\beta$ 1 の発現も PCOS マウスの顆粒膜細胞において増加を認めた(図 9F)。PCOS モデルマウスにおいても、ヒト卵巣と同様の結果が得られた。

## ヒト顆粒膜培養細胞において小胞体ストレスは TGF- $\beta$ 1 と CTGF の発現を誘導する

顆粒膜細胞における小胞体ストレスの TGF- $\beta$ 1 発現への影響を調べるため、ヒト GLCs に小胞体ストレス刺激剤である tunicamycin を投与した。図 10A,B で示す通り、tunicamycin 投与により TGF- $\beta$ 1 と CTGF の mRNA 発現の増加を認め、小胞体ストレス応答因子である XBP1(S)、HSPA5、CHOP も同様に増加を認めた(図 10C-E)。小胞

体ストレス阻害剤の TUDCA 投与により、tunicamycin によって誘導される TGF- $\beta$ 1 と CTGF の発現の抑制を認めた(図 11A,B)。また、XBP1(S)、HSPA5、CHOP も同様に減少を認めた(図 11D-F)。ELISA の結果より、tunicamycin で活性型 TGF- $\beta$ 1 タンパクの分泌が上昇し、TUDCA によって抑制を認めた(図 11C)。小胞体ストレスによる影響を確認するため、異なる小胞体ストレス刺激剤として thapsigargin を用いて同様の実験を行った。Thapsigargin 投与でも tunicamycin と同様に TGF- $\beta$ 1 の発現上昇を認め、TUDCA によって抑制された(図 12)。

小胞体ストレスによる TGF- $\beta$ 1 の発現上昇の分子学的機序を調べるため、XBP1(S)を siRNA でノックダウンした。XBP1(S)の mRNA 発現は siRNA により 41% の減少を認め、TGF- $\beta$ 1 mRNA の発現は 36% の減少を認めた(図 13)。

小胞体ストレス阻害剤は、PCOS モデルマウスの卵巣における線維化誘導因子の発現を低下し、卵巣線維化を改善する

小胞体ストレス阻害剤の生体内における卵巣線維化への効果を調べるため、PCOS モデルマウスに TUDCA と BGP-15 の 2 種類の小胞体ストレス阻害剤を投与した。図 14A に示す通り、Masson's trichrome 染色で PCOS モデルマウスの卵巣間質では線維組織の増加を認めた。また、PCOS マウスの卵巣では間質部分における collagen type I、基底膜における collagen type IV の発現増加を認めた(図 14B,C)。

TUDCA または BGP-15 の経口投与により、線維組織・collagen type I と type IV 発現の低下を認めた(図 14A-C)。さらに、TGF- $\beta$ 1 発現は、PCOS マウスの顆粒膜細胞で発現上昇を認め、TUDCA または BGP-15 投与により、減少を認めた(図 14D)。また、PCOS の顆粒膜細胞で増加していた phospho-IRE1・phospho-PERK のタンパク発現、XBP1(S)の mRNA 発現は、TUDCA・BGP-15 投与により抑制を認めた(図 14E-G)。定量的 PCR の結果により、XBP1(S)・TGF- $\beta$ 1・CTGF の卵巣全体における mRNA 発現は、PCOS マウスで上昇し、TUDCA・BGP-15 投与によって減少を認めた(図 15)。一方、PCOS マウスの性周期・嚢胞状の卵胞数の改善は認めなかった(図 16)。

## 研究 2. 卵巣過剰刺激症候群における小胞体ストレスの役割

### OHSS 患者の卵丘細胞では XBP1(S)と VEGFA の mRNA 発現が上昇している

31 名の患者から採取した 134 個の卵丘細胞を本実験で用いた。31 名のうち、9 名の患者が中等症または重症の OHSS を発症した。OHSS を発症した患者では、発症していない患者と比べて採卵数は有意に多かった( $15.7 \pm 5.0$  vs  $12.4 \pm 3.8$ ,  $p=0.028$ )。OHSS 発症患者の 43 個の卵丘細胞検体と OHSS 非発症患者の 91 個の卵丘細胞検体における XBP1(S)と VEGFA の mRNA 発現を比較した。図 17 に示す通り、XBP1(S)と VEGFA mRNA の発現は OHSS 発症患者で有意に上昇していた。



また、XBP1(S)と VEGFA の発現に正の相関を認めた( $r=0.40$ ,  $p<0.0001$ )(図 18A)。さらに、採卵数と XBP1(S) mRNA の発現にも正の相関を認めた( $r=0.36$ ,  $p<0.0001$ )(図 18B)。

#### ヒト GLCs において小胞体ストレスは VEGFA mRNA の発現を増加させる

ヒト GLCs に小胞体ストレス刺激剤である tunicamycin を投与すると、濃度依存的に VEGFA と XBP1(S)の mRNA 発現の増加を認めた(図 19A,B)。また、タイムコースにおいて、tunicamycin 投与後 3 時間より XBP1(S)の発現上昇を認め、VEGFA は 6 時間で発現上昇を認めた(図 19C,D)。

#### ヒト GLCsにおいて小胞体ストレスは hCG で誘導される VEGFA 発現を増加させる

OHSS 発症患者では小胞体ストレスが活性化されていることから、hCG 投与前に小胞体ストレス刺激剤を投与し、ヒト GLCs における VEGFA の発現を評価した。

tunicamycin 前投与後 hCG を投与すると、VEGFA mRNA の発現は hCG 単独投与時に比べ 1.8 倍増加を認め、また XBP1(S)の発現も hCG 単独と比較して増加を認めた(図 20A,B)。また、tunicamycin と hCG の併用投与により、hCG 単独と比較して、1.3 倍の VEGFA タンパク分泌の増加を認めた(図 20C)。tunicamycin と hCG によって誘導された VEGFA の発現調節における XBP1(S)の役割を調べるため、siRNA で

XBP1(S)をノックダウンした。siRNA により XBP1(S) mRNA は 60%減少し、VEGFA mRNA の発現は 20%の低下を認めた(図 21)。

**ヒト GLCs において TUDCA は tunicamycin と hCG 投与による VEGFA 発現上昇を抑制する**

続いて、*in vitro* における小胞体ストレス阻害剤の VEGFA 抑制効果を検討した。小胞体ストレス阻害剤である TUDCA を前投与すると、tunicamycin と hCG 投与によって上昇した VEGFA mRNA の発現は hCG 単独投与のレベルまで抑制された(図 22A)。XBP1(S) mRNA の発現も TUDCA 投与により抑制を認めた(図 22B)。また、VEGFA のタンパク分泌も TUDCA の前投与により抑制された(図 22C)。

**OHSS ラットモデルにおいて TUDCA の投与は血管透過性の亢進を抑制し、卵巣の VEGFA 発現を低下させる**

OHSS ラットモデルを用いて、生体内における小胞体ストレス抑制剤(TUDCA)の OHSS に対する抑制効果を検討した。卵巣重量、黄体数、血管透過性は Control 群に比べて OHSS 群では優位に増加していた(図 23A-C)。TUDCA の投与により、血管透過性は抑制されたが(図 23C)、卵巣重量・黄体数は変化を認めなかった(図

23A,B)。また、VEGFA mRNA の発現は、OHSS 群で有意に増加を認め、TUDCA 投与によって抑制された(図 23D)。

### 研究 3. 肥満患者の黄体ホルモン分泌不全における小胞体ストレスの役割

#### 肥満マウスの卵巣で小胞体ストレスの活性化を認める

肥満状態の卵巣における小胞体ストレスの活性化を調べるため、Control マウスと肥満マウス(Ob/Ob マウス)の小胞体ストレス応答因子の発現を比較した。XBP1(S)、ATF4、ATF6、HSPA5 はすべて肥満マウスの卵巣において発現が増加していた(図 24)。

#### ヒト GLCsにおいて小胞体ストレスは hCG 誘導下の progesterone 分泌を抑制する

肥満患者において黄体ホルモン分泌不全を認めること(46, 47)、肥満状態で小胞体ストレスが活性化していることから、肥満状態において活性化した小胞体ストレスが progesterone 分泌低下をきたしているかを調べるため、*in vitro* における小胞体ストレスの hCG 誘導下の progesterone 分泌に与える影響を検討した。小胞体ストレス刺激剤である tunicamycin 投与により、hCG で誘導された progesterone 分泌は低下を認めた(図 25A)。また、異なる小胞体ストレス刺激剤である thapsigargin でも同様の結果が得

られた(図 25B)。以降の実験では tunicamycin を用いて、小胞体ストレスによる progesterone 分泌低下の機序について検討した。

ヒト GLCs において、小胞体ストレスは hCG 誘導下の StAR と 3 $\beta$ -HSD の発現を低下させる

小胞体ストレスの progesterone 分泌に与える影響のメカニズムを調べるため、tunicamycin 投与による hCG 誘導下でのステロイド合成関連遺伝子の発現変化を調べた。hCG 投与により、StAR、P450scc、3 $\beta$ -HSD、aromatase の mRNA 発現が増加し、tunicamycin の前投与により、StAR と 3 $\beta$ -HSD の発現抑制を認めたが、P450scc と aromatase 発現には影響を与えなかった(図 26A-D)。さらに、tunicamycin 前投与で hCG 誘導下の LHR の mRNA 発現にも影響を与えなかった(図 26E)。また、XBP1(S) mRNA は tunicamycin 投与により上昇を認め、また hCG 単独でも Control に比べて 2.3 倍の上昇を認めた(図 26F)。

Western blot により StAR タンパク発現を調べると、tunicamycin 投与により hCG によって誘導される StAR のタンパク発現は抑制を認めた(図 27A)。3 $\beta$ -HSD 酵素活性も同様に検討した。3 $\beta$ -HSD は P450scc により合成された pregnenolone を基質として progesterone を合成する酵素である(図 5)。したがって、pregnenolone と P450scc の阻害剤である aminoglutethimide を投与した後に、progesterone 産生を測定することで

3 $\beta$ -HSD 酵素活性を推定した(67)。hCG で誘導された 3 $\beta$ -HSD の酵素活性は tunicamycin 前投与により抑制された(図 27B)。

ヒト GLCsにおいて、小胞体ストレスは **PKA** と **ERK** の活性を阻害する

続いて、小胞体ストレスが hCG 誘導下のシグナル伝達経路に与える影響について調べた。LH/hCG が GLCs の LHR に結合すると、adenylyl cyclase が活性化され、細胞内 cAMP 濃度の上昇を認め、PKA と ERK1/2 が活性化され、下流であるステロイド合成経路を誘導する。

まず細胞内 cAMP 濃度に与える影響を調べた。図 28 に示す通り、hCG 投与で上昇した細胞内 cAMP 濃度は、tunicamycin 前投与によって変化を認めなかった。次に、tunicamycin の cAMP 誘導下でのステロイド関連遺伝子の発現に与える影響を調べた。hCG 投与下と同様に StAR と 3 $\beta$ -HSD の発現は tunicamycin により抑制されたが、P450scc と aromatase には影響を与えなかった(図 29A-D)。また、XBP1(S)は tunicamycin と cAMP の併用投与により増加を認めた(図 29E)。

Tunicamycin は細胞内 cAMP 濃度に影響を与えず、hCG と cAMP 誘導下における progesterone 合成遺伝子に同様の影響を与えていることから、adenylyl cyclase の下流で抑制的効果を認めていると考えられた。そこで、adenylyl cyclase の下流に位置する PKA と ERK1/2 の活性化を Western blot で評価した。

hCG 投与 60 分後、tunicamycin 投与により PKA のリン酸化の抑制を認めた(図 30A)。一方、ERK1/2 のリン酸化は、hCG 投与 10 分後に tunicamycin により抑制を認めた(図 30B)。

小胞体ストレスはマウスにおける hCG 誘導下の **progesterone** 産生、卵巣における **StAR** と **3 $\beta$ -HSD** の mRNA 発現を抑制する

次に、小胞体ストレスの生体内における **progesterone** 産生への影響を調べた。tunicamycin 投与によって、hCG 投与 12 時間後に卵巣における XBP1(S)mRNA の発現上昇を認め、小胞体ストレスが活性化していることが示された(図 31A)。血清 **progesterone** 濃度は hCG 投与後 48 時間で最大値まで上昇を認めるが、tunicamycin 投与により抑制を認めた(図 31B)。また、tunicamycin 投与は黄体数や estradiol 産生には影響を与えなかった(図 31C,D)。卵巣におけるステロイド合成酵素の mRNA 発現を調べると、ヒト GLCs と同様に **StAR** と **3 $\beta$ -HSD** の発現は抑制され、P450<sub>scc</sub> と **aromatase** の発現には影響を与えなかった(図 31E-H)。また、卵子の質を評価するため、胚盤胞発生率を調べたところ、tunicamycin 投与により変化はみられなかった(図 32)。

## 考察

### 研究 1. 多嚢胞性卵巣症候群の卵巣線維化における小胞体ストレスの役割

本研究において、PCOS 患者ならびに PCOS モデルマウスの顆粒膜細胞で小胞体ストレスは活性化し、卵巣の線維化、TGF- $\beta$ 1 の発現が上昇した。小胞体ストレス刺激により、顆粒膜細胞において線維化誘導因子(TGF- $\beta$ 1・CTGF)の発現を誘導した。PCOS マウスモデルにおいて、小胞体ストレス阻害剤投与により、卵巣の線維化を軽減し、顆粒膜細胞における TGF- $\beta$ 1 の発現抑制を認めた。

小胞体ストレス応答は、小胞体ストレスによって惹起されるシグナル伝達経路である(6, 68)。また、小胞体ストレスの活性化は、小胞体ストレスセンサータンパク質である IRE1 や PERK によって感知され、自己リン酸化し、下流の小胞体ストレス応答因子(XBP1(S)・ATF4・ATF6・CHOP・HSPA5)を誘導する。XBP1(S)は IRE1 の活性化により誘導、ATF4、CHOP は PERK の活性化により誘導され、一方、HSPA5 は IRE1・PERK 及び ATF6 の下流に位置するシャペロンタンパク質である(5, 6)。PCOS 患者の卵胞液中の顆粒膜細胞において、XBP1(S)、HSPA5、ATF4、ATF6、CHOP の mRNA 発現の増加を認めた。またヒト卵巣の免疫染色の結果より、phospho-IRE1、phospho-PERK、CHOP の発現が PCOS の顆粒膜細胞で上昇しており、*in situ* hybridization においても、XBP1(S)と HSPA5 の mRNA 発現の増加を認めた。小胞体ストレスセンサータンパク質のリン酸化並びに小胞体ストレス応答因子の発現が増加し

ていることから、PCOS 患者の顆粒膜細胞で小胞体ストレスが活性化していることが示唆される。小胞体ストレスは、様々な生理的因子や酸化ストレス及び炎症などの病的因子により惹起され、変性タンパク質の蓄積または小胞体処理能力の低下をきたす(6, 68-71)。一方で小胞体ストレスは酸化ストレス・炎症を誘導する因子でもある。また、酸化ストレスは炎症を誘導する(70, 72-74)。したがって、小胞体ストレス・酸化ストレス・炎症は互いに密接に影響していると考えられる。近年の研究で、全身の軽度炎症状態および顆粒膜細胞における局所の炎症状態が、PCOS の病態に関与していることが示されてきた(12-16)。さらに、PCOS で認める過剰アンドロゲン状態も局所炎症との関連を認める。炎症刺激は莢膜細胞よりのアンドロゲン産生を刺激し、また高アンドロゲン状態は顆粒膜細胞で炎症性サイトカインの産生を誘導する(16, 75)。PCOS の卵胞液中や顆粒膜細胞において酸化ストレスマーカーの上昇を認め、酸化ストレスが PCOS の病態に関与していることが示唆される(15-19)。これらの知見より、小胞体ストレス・酸化ストレス・炎症が、PCOS の卵巣における卵胞内の微小環境に悪影響を与えていると考えられる。また、PCOS の特徴であるインスリン抵抗性が、直接的または間接的に小胞体ストレスの活性化に寄与する可能性が考えられる。脂肪細胞において、糖毒性は小胞体ストレスを活性化していることから、インスリン抵抗性が顆粒膜細胞における小胞体ストレスを直接惹起している可能性、また、インスリン抵抗性が脂肪細胞を介して全身の炎症状態を引き起こす、あるいは局所のアンドロゲン産生を亢進すること



により小胞体ストレスが間接的に惹起される可能性などが考えられる。以上のように、PCOS の病態でみられる酸化ストレス・炎症・高アンドロゲン血症・インスリン抵抗性などの様々な微小環境によって、卵巣で小胞体ストレスが惹起されているものと考えられる。

PCOS 患者の卵胞液中の顆粒膜細胞において、線維化誘導因子である TGF- $\beta$ 1 と CTGF の mRNA 発現が増加し、卵巣の免疫染色においても、PCOS 患者の顆粒膜細胞で TGF- $\beta$ 1 の発現が増加していた。また、PCOS モデルマウスの顆粒膜細胞においても TGF- $\beta$ 1 の発現は増加していた。これらの結果は先行研究と矛盾しない結果であった(15, 76-78)。しかし、PCOS 患者の卵巣における TGF- $\beta$ 1 発現の調節メカニズムは明らかとされていない。本研究結果では、小胞体ストレス刺激剤である tunicamycin と thapsigargin 投与によって、顆粒膜細胞における TGF- $\beta$ 1 と CTGF の発現増加を認めた。小胞体ストレス阻害剤である TUDCA 投与によって、小胞体ストレス刺激による TGF- $\beta$ 1 と CTGF 発現の抑制を認めた。また、siRNA の実験結果により、小胞体ストレス応答因子の一つである XBP1(S)が小胞体ストレス誘導下の TGF- $\beta$ 1 の発現調節に関与していることが示唆された。近年、肝細胞や線維芽細胞において、小胞体ストレスで TGF- $\beta$ 1 の発現を誘導することが報告されている(28, 29, 79, 80)。我々の研究結果より、顆粒膜細胞で活性化した小胞体ストレスが、TGF- $\beta$ 1 の発現を増加している可能

性が示唆されたが、小胞体ストレスが TGF- $\beta$ 1 を誘導する詳細な分子メカニズムの解明にはさらなる研究が必要と考えられる。

続いて、小胞体ストレス阻害剤の PCOS モデルマウスの卵巣線維化における体内の効果を調べた。TUDCA は熊の胆汁酸として漢方治療として何千年も使用されている薬剤であり、またイタリアでは Taurolite として肝障害、胆石症の治療に用いられている。近年、TUDCA はケミカルシャペロンとして、変性タンパク質の蓄積を是正し、小胞体ストレスを抑制する作用が明らかとなり、2 型糖尿病などの小胞体ストレス関連疾患の治療薬として注目されている(7, 8, 81, 82)。また、BGP-15 は、糖尿病の治療薬として第 2 相臨床試験が済んでおり、HSP72 の発現を誘導し、近年小胞体ストレス阻害剤として注目されている(58)。本研究においてはヒトへの臨床応用を想定し、TUDCA と BGP-15 を経口投与し、卵巣線維化の抑制効果を評価した。線維化誘導因子である TGF- $\beta$ 1 と CTGF は卵巣における細胞外マトリックスのリモデリングを調節している(21-24)。さらに、PCOS の卵巣において、細胞外マトリックスのリモデリングの異常を認めることが知られている(20)。本研究結果では、PCOS 患者と PCOS モデルマウスの卵巣において、線維組織の増生を認めた。また PCOS モデルマウスで卵巣間質部に collagen type I、基底膜に collagen type IV の沈着を認め、先行研究と同様の結果であった(10, 20, 83)。小胞体ストレス阻害剤である TUDCA と BGP-15 の投与によって、線維組織・コラーゲン沈着の抑制を認め、顆粒膜細胞における TGF- $\beta$ 1 の

発現低下を認めた。*In vitro* の結果と合わせると、小胞体ストレスにより、顆粒膜細胞における TGF- $\beta$ 1 の発現が誘導され、卵巣の線維化を引き起こしている可能性が示唆された。C 型肝炎や遺伝性肝疾患においては、小胞体ストレスにより肝細胞からの TGF- $\beta$ 1 が誘導され、肝線維化をきたしており、本研究と同様のメカニズムと考えられる(28, 29)。またそれ以外のメカニズムとして下記の 3 つが考えられる。1 つ目として、小胞体ストレスが線維芽細胞に直接作用し TGF- $\beta$ 1 の産生を促す機序が挙げられる(79, 80)。2 つ目に、肺や腎臓の線維化及び炎症性腸疾患で認めるもので、小胞体ストレスが炎症や上皮細胞のアポトーシスを誘導し、上皮細胞消失や線維芽細胞の活性化を誘導し、組織の線維化をきたす機序がある(84-86)。3 つ目は、小胞体ストレスが上皮間質転換を誘導するもので、肺胞上皮細胞や腎尿細管細胞において認められる(87, 88)。

TUDCA と BGP-15 の投与により PCOS 動物の性周期異常及び囊胞状卵胞の形成は改善されなかった。これはげっ歯類のモデルを用いた本研究の弱点と考えられる。PCOS の病態を完全に再現するモデルはなく、多くはアンドロゲンによって誘導されたモデルである。本研究で用いた DHEA で誘導した PCOS モデルは、卵巣の病態については PCOS の病態をよく再現するが、全身の代謝異常は十分に再現するモデルではない。他の報告において、DHEA 誘導下の PCOS モデルマウスにすでに臨床で有効性が示されているメトホルミンを経口投与しても、性周期異常や囊胞状卵胞形

成に対する改善効果は認めなかった(89)。TUDCA や BGP-15 が卵巣の線維化だけでなく、ゴナドトロピン分泌異常・アンドロゲン過剰・インスリン抵抗性・卵巣機能異常・卵胞発育停止などの PCOS の他の病態の改善に効果を認めるかは現時点で定かではない。TUDCA や BGP-15 はヒトへの投与に対する安全性は担保されており(58, 81)、今後の臨床研究によって、その有効性を評価していく必要があると考えられる。

## 研究 2. 卵巣過剰刺激症候群における小胞体ストレスの役割

本研究において、OHSS 発症患者の卵丘細胞において XBP1(S)の発現が増加しており、OHSS 患者の卵胞において小胞体ストレスが活性化していると考えられた。ヒト GLCs において、小胞体ストレス刺激で hCG 誘導下での VEGFA 発現が増加し、XBP1(S)がその発現調節に関与していることが示唆された。また、小胞体ストレス阻害剤投与によって卵巣局所での VEGFA 発現が減少し、OHSS で認める血管透過性の亢進が抑制された。

OHSS 発症患者の卵丘細胞では、XBP1(S)の mRNA 発現が増加していた。様々な要因によって小胞体ストレスは惹起される。OHSS の病態において、局所の炎症が関与しているという報告がある(90, 91)。前述したとおり、炎症状態において小胞体ストレスが惹起されるため(70)、OHSS における小胞体ストレスの活性化に局所炎症が関与している可能性が考えられる。また、もう一つの機序として酸化ストレスが挙げら

れる。本研究において、OHSS 発症患者では Control 患者に比較して採卵数が増加しており、また卵丘細胞における XBP1(S) mRNA の発現と採卵数に正の相関を認めた。先行研究において、卵巢の血流量と採卵数に正の相関を認めることが示されている(92, 93)。また、卵巢血流量の増加により活性酸素の産生亢進を認めることが知られている(94, 95)。採卵数の増加に伴い、酸化ストレスを介して XBP1(S)の発現増加に寄与している可能性が考えられる。OHSS で認める卵巢局所における酸化ストレスや炎症が小胞体ストレスを惹起し、XBP1(S)の発現増加を誘導していると考えられる。

小胞体ストレス刺激剤である tunicamycin の投与によって XBP1(S)mRNA の発現が上昇し、続いて VEGFA mRNA の発現が増加する。これは、他の腫瘍細胞における報告と同様の結果であった(42, 43)。VEGFA のプロモーター領域に XBP1(S)の結合部位が存在するため、ヒト GLCs において VEGFA の発現が XBP1(S)によって転写調節されているものと考えられる(43)。

OHSS の病態生理において、hCG がトリガーとなって VEGFA 産生を誘導する。そこで、OHSS 発症患者では GLCs において小胞体ストレスが活性化していることが明らかとなったため、小胞体ストレス刺激剤による前処理有無によって、hCG で誘導される VEGFA の発現変化を比較した。tunicamycin の前投与によって、hCG に対する反応性が増加し、VEGFA の mRNA とタンパク発現が増加を認めた。siRNA によって XBP1(S)を 60%ノックダウンすると、VEGFA の mRNA 発現は 20%低下した。これは、

VEGFA の発現調節において XBP1(S)のノックダウンが 60%では不十分であった可能性が考えられる。また、その他の可能性としては、小胞体ストレスの他の経路、PERK/ATF4 経路の関与が考えられる。ATF4 は転写因子として VEGFA のプロモーター領域に結合するが、その発現制御については一定の見解は得られていない(45, 96, 97)。

小胞体ストレス阻害剤の OHSS に対する予防的効果を調べるため、まず *in vitro* でヒト GLCs における TUDCA の VEGFA 産生に対する影響を調べた。TUDCA の前投与によって、tunicamycin と hCG によって誘導される VEGFA の発現上昇が抑制された。続いて、小胞体ストレス阻害剤の OHSS ラットにおける *in vivo* での効果を調べたところ、卵巣における VEGFA の mRNA 発現の低下と、血管透過性亢進の抑制がみられた。本研究においては、卵巣へ直接作用させるため TUDCA を経口投与ではなく、腹腔内投与にて治療を行った。ヒトへの臨床応用を考慮した場合、経口投与の方が望ましいが、研究 1 で経口投与においても卵巣における小胞体ストレスの抑制を認めるため、本モデルにおいても経口投与で血管透過性の亢進が抑えられる可能性があり、今後検討していく必要があると考えられる。本研究の結果より、TUDCA は OHSS の予防的治療薬になりうる可能性が示唆された。

### 研究 3. 肥満患者の黄体ホルモン分泌不全における小胞体ストレスの役割

小胞体ストレスは肥満マウスの卵巣で活性化を認め、小胞体ストレス刺激によって、hCG 誘導下の progesterone 分泌が阻害された。また、小胞体ストレスは PKA と ERK の活性化を阻害し、StAR と 3 $\beta$ -HSD の発現を低下させた。

肥満患者において黄体ホルモン分泌不全を認めることから、まず、肥満状態において小胞体ストレスが活性化しているかどうかを検討した。研究 1, 2 で示した通り、PCOS 患者・OHSS 患者において小胞体ストレスの活性化を認めたが、患者背景として肥満患者は含まれておらず、本研究では肥満マウスを用いて実験を行った。肥満マウスの卵巣では、小胞体ストレス応答因子である XBP1(S)、ATF4、ATF6、HSPA5 の発現上昇を認めていた。これは先行研究に矛盾しない結果であり(54)、小胞体ストレスが PCOS・OHSS とは独立して肥満状態のみで惹起されていることが示唆された。

小胞体ストレス刺激によって、ヒト GLCs とマウスにおいて hCG 誘導下の progesterone 産生が阻害された。マウスモデルでは、小胞体ストレス刺激剤を hCG 投与前に投与し、肥満状態における小胞体ストレスが活性化した状態をモデル化した。小胞体ストレス刺激剤の投与で、estradiol 濃度、黄体数の変化は認めず、本モデルにおいては卵胞発育、排卵、黄体形成には影響を与えないと考えられた。小胞体ストレスは、hCG 刺激下での卵巣におけるステロイド合成に作用していると考えられる。

小胞体ストレスは、hCG によって誘導される StAR の mRNA とタンパク発現及び 3 $\beta$ -HSD の mRNA と酵素活性を阻害した。マウスモデルにおいても、同様の結果であ

った。*in vivo* のタイムコースの実験において、tunicamycin 投与により、hCG 投与後 12 時間で XBP1(S) mRNA の発現は有意に増加した。一方、StAR mRNA 発現は hCG 投与後 12 時間でピークを認め、48 時間後に 3 $\beta$ -HSD mRNA が上昇し、血清 progesterone 値もピークとなった。StAR は progesterone 合成の律速酵素である。3 $\beta$ -HSD は pregnenolone を基質として progesterone を合成する小胞体関連酵素である。XBP1(S)は転写因子として、様々な遺伝子の発現を調節し、細胞が小胞体ストレスに適応し、恒常性を維持するために働く(98)。したがって、XBP1(S)の活性化によって StAR と 3 $\beta$ -HSD の mRNA 発現を抑制し、progesterone 分泌を抑制している可能性が考えられる。

先行研究において、げっ歯類の性腺での小胞体ストレスとステロイド合成関連遺伝子との関連が報告されている。卵巣では、マウスの顆粒膜培養細胞で小胞体ストレスの活性化によって、FSH 刺激による aromatase mRNA 発現が抑制され、estrogen 産生が減少する(99)。また、ラットに小胞体ストレス刺激剤を投与すると、黄体期における血清 progesterone 濃度が減少し、黄体における StAR 及び 3 $\beta$ -HSD のタンパク発現が減少する(100)。精巣では、マウスの Leydig tumor 細胞で、小胞体ストレス刺激により、hCG 誘導下の StAR、P450<sub>scc</sub>、3 $\beta$ -HSD の mRNA 発現が低下し、progesterone 産生が抑制される(101, 102)。また、2 型糖尿病モデルラットの精巣で小胞体ストレスが活性化し、StAR mRNA 発現を抑制するという報告がある(103)。低酸素や高体温におい



て、小胞体ストレスが活性化し、精巣における StAR と 3 $\beta$ -HSD の発現が減少し、血清 testosterone 濃度が減少する(102, 104, 105)。性腺におけるステロイド合成は、局所の小胞体ストレスによって影響を受けていることが示唆される。さらに、本研究において、hCG 自体で XBP1(S) mRNA の発現が増加しており、hCG と tunicamycin の併用により、*in vivo*・*in vitro* の両者の実験系において、XBP1(S)の発現が相乗的に増加を認めている。一方で FSH は XBP1(S)に対して抑制的な効果を示す報告もあり(99)、小胞体ストレスとゴナドトロピンは多面的な相互作用を示し、小胞体ストレスはステロイド合成において重要な因子であると考えられる。

本研究において、小胞体ストレスは hCG 及び cAMP 投与下における progesterone 関連遺伝子に同様の影響を与え、hCG 刺激による細胞内 cAMP 濃度の上昇には変化を認めなかった。また、hCG による PKA のリン酸化を阻害したことから、小胞体ストレスは cAMP/PKA によるステロイド合成経路に影響を与え、adenylate cyclase の下流で作用していると考えられる。また、ERK や Epidermal growth factor の受容体シグナルも progesterone 産生遺伝子の発現を誘導する(106, 107)。本研究においても小胞体ストレスは ERK のリン酸化を阻害した。ERK の活性化は PKA 依存的経路・PKA 非依存的経路の両者が存在する(108)。本研究において、ERK の活性化の抑制は hCG 投与後 10 分で起きており、一方で PKA 活性の抑制は hCG 投与

後 60 分で起きている。これらの結果から、小胞体ストレスは PKA 非依存的な ERK の活性化に影響を与えている可能性が示唆された。

小胞体ストレスは、progesterone 関連酵素に抑制的に働く一方で、前述の 2.の研究においては、hCG 誘導下の VEGF 発現に対しては hCG と相乗的な増加を認めた。小胞体ストレスは hCG の下流で相反する効果を認めている。VEGFA の発現調節ならびに progesterone 関連遺伝子の発現調節の詳細な機序は依然不明である。しかし、本研究結果より、VEGFA の発現調節とは異なる機序で progesterone 関連遺伝子に影響を与えていることが推察される。ひとつの仮説として、VEGFA のプロモーター領域には XBP1(S)の結合部位が存在しており、その発現調節には転写因子による直接的な作用が考えられる。一方で StAR、3 $\beta$ -HSD、P450<sub>scc</sub> のプロモーター領域には XBP1(S)の結合部位は存在しない。実際、本研究において、小胞体ストレス単独で VEGFA 発現は増加を認めるが、StAR、3 $\beta$ -HSD の発現抑制は hCG 非存在下では認めなかった。また、その他の可能性としては、hCG は progesterone 分泌を直接的に制御する一方で、VEGFA の発現調節には insulin-like growth factor や低酸素などの他の局所因子を介して行われている可能性も考えられる(36)。

肥満患者では卵子の質が低下しているという報告がある(109)。肥満状態では小胞体ストレスが惹起されているため、小胞体ストレスが卵子の質に与える影響について検討した。マウスに小胞体ストレス刺激剤を投与し、胚盤胞形成率を調べた。本研究

のマウスモデルでは、小胞体ストレス刺激により、胚盤胞率に変化は認めなかった。しかし、先行研究において小胞体ストレス抑制剤の投与により、肥満マウスにおける卵子の質の低下が改善されるという報告がある(59)。投与時期や投与タイミングにより、結果が異なる可能性があり、小胞体ストレスの卵子の質的影響については更なる研究が必要と考えられる。

## まとめ

1. PCOS 患者ならびに PCOS モデルマウスの顆粒膜細胞で小胞体ストレスは活性化し、卵巣の線維化、TGF- $\beta$ 1 の発現が上昇した。小胞体ストレス刺激により、顆粒膜細胞において線維化誘導因子(TGF- $\beta$ 1・CTGF)の発現上昇を誘導した。PCOS マウスモデルにおいて、小胞体ストレス阻害剤投与により、卵巣の線維化を軽減し、顆粒膜細胞における TGF- $\beta$ 1 の発現抑制を認めた。図 33 にまとめのシェーマを示す。小胞体ストレスは PCOS の病態に関与し、小胞体ストレス阻害剤は卵巣線維化を改善し、PCOS の治療薬になりうる可能性が示唆された。

2. OHSS 発症患者の卵丘細胞において XBP1(S)の発現が増加しており、OHSS 患者の卵胞において小胞体ストレスが活性化していると考えられた。ヒト GLCs において、小胞体ストレス刺激で hCG 誘導下での VEGFA 発現が増加し、XBP1(S)が発現調節に関与していることが示唆された。また、小胞体ストレス阻害剤投与によって卵巣局所での VEGFA 発現が減少し、OHSS で認める血管透過性の亢進が抑制された。図 34 にまとめのシェーマを示す。小胞体ストレスは、OHSS の病態に関与し、小胞体ストレス阻害剤は予防的治療薬になりうる可能性が示唆された。

3. 小胞体ストレスは肥満マウスの卵巣で活性化を認めた。小胞体ストレス刺激によって、hCG 誘導下の progesterone 分泌が阻害された。また、小胞体ストレスは PKA と ERK の活性化を阻害し、StAR と 3 $\beta$ -HSD の発現を低下させた。図 35 にまとめのシェ

一マを示す。小胞体ストレスは肥満患者における黄体ホルモン分泌不全の病態に関与している可能性が示唆された。

各病態において、小胞体ストレスがどのような因子によって惹起されているかは不明であるが、PCOS においては、高アンドロゲン血症・高 LH 血症、OHSS においては排卵誘発による顆粒膜細胞の過剰な増殖、肥満患者においては脂質の蓄積などが小胞体ストレス活性化の誘因として考えられる。一方で PCOS は OHSS のリスク因子であり、また PCOS 患者では肥満患者が多く、プロゲステロン分泌不全を認めることが知られており、それぞれの病態は互いに関連している。したがって、各病態に共通する因子である慢性炎症・酸化ストレス状態などが小胞体ストレスを惹起している可能性がある。小胞体ストレス応答因子の発現調節機序はまだ完全に解明されておらず、今後の更なる研究において、病態特異的な小胞体ストレスの活性化機序を明らかとしていく必要がある。

## おわりに

小胞体ストレスは、卵巣、特に顆粒膜細胞において活性化を認め、PCOS、OHSS や黄体ホルモン分泌不全の病態に関与している可能性が示唆された(図 36)。小胞体ストレスを惹起する因子として、卵巣の炎症状態や酸化ストレスが誘因となっていると

考えられるが、さらなる研究による解明が必要である。卵巣病態における小胞体ストレス応答の役割を明らかとすることで、従来これらの疾患に対し用いられてきたホルモン製剤とは異なる、ホルモン非依存的な新たな治療戦略の開発に寄与すると考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導いただきました原田美由紀講師、廣田泰講師、平池修准教授、大須賀穰教授、藤井知行教授に心よりお礼を申し上げます。

## 引用文献

1. Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science (New York, NY)*. 2004;303(5658):682-4.
2. Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 2006;132(2):191-206.
3. Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev*. 2004;25(1):72-101.
4. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*. 1996;383(6600):531-5.
5. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(7):519-29.
6. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science (New York, NY)*. 2011;334(6059):1081-6.
7. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science (New York, NY)*. 2006;313(5790):1137-40.
8. Hetz C, Chevet E, Harding HP. Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(9):703-19.
9. Harada M, Nose E, Takahashi N, Hirota Y, Hirata T, Yoshino O, et al. Evidence of the activation of unfolded protein response in granulosa and cumulus cells during follicular growth and maturation. *Gynecol Endocrinol*. 2015;31(10):783-7.
10. Bozdag G, Mumusoglu S, Zengin D, Karabulut E, Yildiz BO. The prevalence and phenotypic features of polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2016;31(12):2841-55.
11. Rotterdam EA-SPCWG. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2004;81(1):19-25.
12. Dumesic DA, Oberfield SE, Stener-Victorin E, Marshall JC, Laven JS, Legro RS. Scientific Statement on the Diagnostic Criteria, Epidemiology, Pathophysiology, and Molecular Genetics of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocr Rev*. 2015;36(5):487-525.
13. Ma X, Fan L, Meng Y, Hou Z, Mao YD, Wang W, et al. Proteomic analysis of human ovaries from normal and polycystic ovarian syndrome. *Mol Hum Reprod*. 2007;13(8):527-35.



14. Schmidt J, Weijdegard B, Mikkelsen AL, Lindenberg S, Nilsson L, Brannstrom M. Differential expression of inflammation-related genes in the ovarian stroma and granulosa cells of PCOS women. *Mol Hum Reprod.* 2014;20(1):49-58.
15. Zhao Y, Zhang C, Huang Y, Yu Y, Li R, Li M, et al. Up-regulated expression of WNT5a increases inflammation and oxidative stress via PI3K/AKT/NF-kappaB signaling in the granulosa cells of PCOS patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(1):201-11.
16. Adams J, Liu Z, Ren YA, Wun WS, Zhou W, Kenigsberg S, et al. Enhanced Inflammatory Transcriptome in the Granulosa Cells of Women With Polycystic Ovarian Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(9):3459-68.
17. Chattopadhyay R, Ganesh A, Samanta J, Jana SK, Chakravarty BN, Chaudhury K. Effect of follicular fluid oxidative stress on meiotic spindle formation in infertile women with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Obstet Invest.* 2010;69(3):197-202.
18. Karuputhula NB, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Oxidative status in granulosa cells of infertile women undergoing IVF. *Syst Biol Reprod Med.* 2013;59(2):91-8.
19. Gonzalez F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(1):336-40.
20. Hughesdon PE. Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called "hyperthecosis". *Obstet Gynecol Surv.* 1982;37(2):59-77.
21. Chang HM, Cheng JC, Liu Y, Klausen C, Xu C, Leung PC. Activin A-induced increase in LOX activity in human granulosa-lutein cells is mediated by CTGF. *Reproduction.* 2016;152(4):293-301.
22. Chang HM, Fang Y, Liu PP, Cheng JC, Yang X, Leung PC. Connective tissue growth factor mediates growth differentiation factor 8-induced increase of lysyl oxidase activity in human granulosa-lutein cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;434:186-98.
23. Cheng JC, Chang HM, Fang L, Sun YP, Leung PC. TGF-beta1 Up-Regulates Connective Tissue Growth Factor Expression in Human Granulosa Cells through Smad and ERK1/2 Signaling Pathways. *PLoS One.* 2015;10(5):e0126532.
24. Fang Y, Chang HM, Cheng JC, Klausen C, Leung PC, Yang X. Transforming growth factor-beta1 increases lysyl oxidase expression by downregulating MIR29A in human granulosa lutein cells. *Reproduction.* 2016;152(3):205-13.
25. Raja-Khan N, Urbanek M, Rodgers RJ, Legro RS. The role of TGF-beta in polycystic ovary syndrome. *Reprod Sci.* 2014;21(1):20-31.

26. Lenna S, Trojanowska M. The role of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in fibrosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2012;24(6):663-8.
27. Tanjore H, Lawson WE, Blackwell TS. Endoplasmic reticulum stress as a pro-fibrotic stimulus. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(7):940-7.
28. Chusri P, Kumthip K, Hong J, Zhu C, Duan X, Jilg N, et al. HCV induces transforming growth factor beta1 through activation of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Sci Rep*. 2016;6:22487.
29. Mencin A, Seki E, Osawa Y, Kodama Y, De Minicis S, Knowles M, et al. Alpha-1 antitrypsin Z protein (PiZ) increases hepatic fibrosis in a murine model of cholestasis. *Hepatology*. 2007;46(5):1443-52.
30. Kassan M, Galan M, Partyka M, Saifudeen Z, Henrion D, Trebak M, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in cardiac damage and vascular endothelial dysfunction in hypertensive mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(7):1652-61.
31. Gomez R, Soares SR, Busso C, Garcia-Velasco JA, Simon C, Pellicer A. Physiology and pathology of ovarian hyperstimulation syndrome. *Seminars in reproductive medicine*. 2010;28(6):448-57.
32. Gomez R, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Vascular endothelial growth factor receptor-2 activation induces vascular permeability in hyperstimulated rats, and this effect is prevented by receptor blockade. *Endocrinology*. 2002;143(11):4339-48.
33. Robinson RS, Woad KJ, Hammond AJ, Laird M, Hunter MG, Mann GE. Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction*. 2009;138(6):869-81.
34. Neulen J, Yan Z, Raczek S, Weindel K, Keck C, Weich HA, et al. Human chorionic gonadotropin-dependent expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human granulosa cells: importance in ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(6):1967-71.
35. Schams D, Kosmann M, Berisha B, Amselgruber WM, Miyamoto A. Stimulatory and synergistic effects of luteinising hormone and insulin like growth factor 1 on the secretion of vascular endothelial growth factor and progesterone of cultured bovine granulosa cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001;109(3):155-62.
36. Harada M, Peegel H, Menon KM. Expression of vascular endothelial growth factor A during ligand-induced down-regulation of luteinizing hormone receptor in the ovary. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;328(1-2):28-33.
37. Stouffer RL, Martinez-Chequer JC, Molskness TA, Xu F, Hazzard TM. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch Med Res*. 2001;32(6):567-75.
38. van den Driesche S, Myers M, Gay E, Thong KJ, Duncan WC. HCG up-regulates hypoxia inducible factor-1 alpha in luteinized granulosa cells: implications for

the hormonal regulation of vascular endothelial growth factor A in the human corpus luteum. *Mol Hum Reprod*. 2008;14(8):455-64.

39. Akiyama I, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Harada M, Koga K, et al. Bone morphogenetic protein 7 increased vascular endothelial growth factor (VEGF)-a expression in human granulosa cells and VEGF receptor expression in endothelial cells. *Reprod Sci*. 2014;21(4):477-82.

40. Kuwabara Y, Katayama A, Tomiyama R, Piao H, Kurihara S, Ono S, et al. Gonadotropin regulation and role of ovarian osteopontin in the periovulatory period. *J Endocrinol*. 2015;224(1):49-59.

41. Drogat B, Auguste P, Nguyen DT, Bouche-careilh M, Pineau R, Nalbantoglu J, et al. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. *Cancer Res*. 2007;67(14):6700-7.

42. Ghosh R, Lipson KL, Sargent KE, Mercurio AM, Hunt JS, Ron D, et al. Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PLoS One*. 2010;5(3):e9575.

43. Pereira ER, Liao N, Neale GA, Hendershot LM. Transcriptional and post-transcriptional regulation of proangiogenic factors by the unfolded protein response. *PLoS One*. 2010;5(9).

44. Liu L, Qi X, Chen Z, Shaw L, Cai J, Smith LH, et al. Targeting the IRE1alpha/XBP1 and ATF6 arms of the unfolded protein response enhances VEGF blockade to prevent retinal and choroidal neovascularization. *Am J Pathol*. 2013;182(4):1412-24.

45. Paridaens A, Laukens D, Vandewynckel YP, Coulon S, Van Vlierberghe H, Geerts A, et al. Endoplasmic reticulum stress and angiogenesis: is there an interaction between them? *Liver Int*. 2014;34(6):e10-8.

46. Jain A, Polotsky AJ, Rochester D, Berga SL, Loucks T, Zeitlian G, et al. Pulsatile luteinizing hormone amplitude and progesterone metabolite excretion are reduced in obese women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(7):2468-73.

47. Santoro N, Lasley B, McConnell D, Allsworth J, Crawford S, Gold EB, et al. Body size and ethnicity are associated with menstrual cycle alterations in women in the early menopausal transition: The Study of Women's Health across the Nation (SWAN) Daily Hormone Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2622-31.

48. Agarwal SK, Vogel K, Weitsman SR, Magoffin DA. Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(3):1072-6.

49. Brannian JD, Zhao Y, McElroy M. Leptin inhibits gonadotrophin-stimulated granulosa cell progesterone production by antagonizing insulin action. *Hum Reprod.* 1999;14(6):1445-8.
50. Lin Q, Poon SL, Chen J, Cheng L, HoYuen B, Leung PC. Leptin interferes with 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling to inhibit steroidogenesis in human granulosa cells. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E.* 2009;7:115.
51. Pantasri T, Wu LL, Hull ML, Sullivan TR, Barry M, Norman RJ, et al. Distinct localisation of lipids in the ovarian follicular environment. *Reproduction, fertility, and development.* 2015;27(4):593-601.
52. Robker RL, Akison LK, Bennett BD, Thrupp PN, Chura LR, Russell DL, et al. Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(5):1533-40.
53. Yang X, Wu LL, Chura LR, Liang X, Lane M, Norman RJ, et al. Exposure to lipid-rich follicular fluid is associated with endoplasmic reticulum stress and impaired oocyte maturation in cumulus-oocyte complexes. *Fertil Steril.* 2012;97(6):1438-43.
54. Wu LL, Dunning KR, Yang X, Russell DL, Lane M, Norman RJ, et al. High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus-oocyte complexes and decreased fertilization rates. *Endocrinology.* 2010;151(11):5438-45.
55. Elia E, Sander V, Luchetti CG, Solano ME, Di Girolamo G, Gonzalez C, et al. The mechanisms involved in the action of metformin in regulating ovarian function in hyperandrogenized mice. *Mol Hum Reprod.* 2006;12(8):475-81.
56. Solano ME, Elia E, Luchetti CG, Sander V, Di Girolamo G, Gonzalez C, et al. Metformin prevents embryonic resorption induced by hyperandrogenisation with dehydroepiandrosterone in mice. *Reproduction, fertility, and development.* 2006;18(5):533-44.
57. Lai H, Jia X, Yu Q, Zhang C, Qiao J, Guan Y, et al. High-fat diet induces significant metabolic disorders in a mouse model of polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod.* 2014;91(5):127.
58. Kennedy TL, Swiderski K, Murphy KT, Gehrig SM, Curl CL, Chandramouli C, et al. BGP-15 Improves Aspects of the Dystrophic Pathology in mdx and dko Mice with Differing Efficacies in Heart and Skeletal Muscle. *Am J Pathol.* 2016;186(12):3246-60.
59. Wu LL, Russell DL, Wong SL, Chen M, Tsai TS, St John JC, et al. Mitochondrial dysfunction in oocytes of obese mothers: transmission to offspring and

- reversal by pharmacological endoplasmic reticulum stress inhibitors. *Development*. 2015;142(4):681-91.
60. Dong Y, Zhang M, Liang B, Xie Z, Zhao Z, Asfa S, et al. Reduction of AMP-activated protein kinase  $\alpha 2$  increases endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis in vivo. *Circulation*. 2010;121(6):792-803.
  61. Akiyama I, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Takamura M, Harada M, et al. The role of bone morphogenetic protein 6 in accumulation and regulation of neutrophils in the human ovary. *Reprod Sci*. 2014;21(6):772-7.
  62. Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Yano T, Tsutsumi O, et al. Upregulation of interleukin-8 by hypoxia in human ovaries. *Am J Reprod Immunol*. 2003;50(4):286-90.
  63. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671-5.
  64. JSOG. The management and prevention for OHSS. *Acta Obstet Gynaecol*. 2009;1138-45.
  65. Gomez R, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Administration of moderate and high doses of gonadotropins to female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 expression that is associated to vascular hyperpermeability. *Biol Reprod*. 2003;68(6):2164-71.
  66. Ujioka T, Matsuura K, Kawano T, Okamura H. Role of progesterone in capillary permeability in hyperstimulated rats. *Hum Reprod*. 1997;12(8):1629-34.
  67. Kawai M, Swan KF, Green AE, Edwards DE, Anderson MB, Henson MC. Placental endocrine disruption induced by cadmium: effects on P450 cholesterol side-chain cleavage and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in cultured human trophoblasts. *Biol Reprod*. 2002;67(1):178-83.
  68. Ozcan L, Tabas I. Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annu Rev Med*. 2012;63:317-28.
  69. Grootjans J, Kaser A, Kaufman RJ, Blumberg RS. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(8):469-84.
  70. Hasnain SZ, Lourie R, Das I, Chen AC, McGuckin MA. The interplay between endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Immunol Cell Biol*. 2012;90(3):260-70.
  71. Navid F, Colbert RA. Causes and consequences of endoplasmic reticulum stress in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(1):25-40.
  72. Hasnain SZ, Prins JB, McGuckin MA. Oxidative and endoplasmic reticulum stress in beta-cell dysfunction in diabetes. *J Mol Endocrinol*. 2016;56(2):R33-54.

73. Meyerovich K, Ortis F, Allagnat F, Cardozo AK. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. *J Mol Endocrinol*. 2016;57(1):R1-R17.
74. Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UC. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci*. 2016;148:183-93.
75. Gonzalez F. Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome: underpinning of insulin resistance and ovarian dysfunction. *Steroids*. 2012;77(4):300-5.
76. Hatzirodos N, Bayne RA, Irving-Rodgers HF, Hummitzsch K, Sabatier L, Lee S, et al. Linkage of regulators of TGF-beta activity in the fetal ovary to polycystic ovary syndrome. *FASEB J*. 2011;25(7):2256-65.
77. Tal R, Seifer DB, Shohat-Tal A, Grazi RV, Malter HE. Transforming growth factor-beta1 and its receptor soluble endoglin are altered in polycystic ovary syndrome during controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril*. 2013;100(2):538-43.
78. Miao ZL, Guo L, Wang YX, Cui R, Yang N, Huang MQ, et al. The intervention effect of Rosiglitazone in ovarian fibrosis of PCOS rats. *Biomed Environ Sci*. 2012;25(1):46-52.
79. Matsuzaki S, Hiratsuka T, Taniguchi M, Shingaki K, Kubo T, Kiya K, et al. Physiological ER Stress Mediates the Differentiation of Fibroblasts. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123578.
80. Ranga Rao S, Subbarayan R, Ajitkumar S, Murugan Girija D. 4PBA strongly attenuates endoplasmic reticulum stress, fibrosis, and mitochondrial apoptosis markers in cyclosporine treated human gingival fibroblasts. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(1):60-6.
81. Boatright JH, Nickerson JM, Moring AG, Pardue MT. Bile acids in treatment of ocular disease. *J Ocul Biol Dis Infor*. 2009;2(3):149-59.
82. Vang S, Longley K, Steer CJ, Low WC. The Unexpected Uses of Urso- and Tauroursodeoxycholic Acid in the Treatment of Non-liver Diseases. *Glob Adv Health Med*. 2014;3(3):58-69.
83. Zhang X, Zhang C, Shen S, Xia Y, Yi L, Gao Q, et al. Dehydroepiandrosterone induces ovarian and uterine hyperfibrosis in female rats. *Hum Reprod*. 2013;28(11):3074-85.
84. Tanjore H, Blackwell TS, Lawson WE. Emerging evidence for endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;302(8):L721-9.
85. Chiang CK, Hsu SP, Wu CT, Huang JW, Cheng HT, Chang YW, et al. Endoplasmic reticulum stress implicated in the development of renal fibrosis. *Mol Med*. 2011;17(11-12):1295-305.

86. Heazlewood CK, Cook MC, Eri R, Price GR, Tauro SB, Taupin D, et al. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med.* 2008;5(3):e54.
87. Tanjore H, Cheng DS, Degryse AL, Zoz DF, Abdolrasulnia R, Lawson WE, et al. Alveolar epithelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition in response to endoplasmic reticulum stress. *The Journal of biological chemistry.* 2011;286(35):30972-80.
88. Pallet N, Bouvier N, Bendjallabah A, Rabant M, Flinois JP, Hertig A, et al. Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am J Transplant.* 2008;8(11):2283-96.
89. Huang Y, Yu Y, Gao J, Li R, Zhang C, Zhao H, et al. Impaired oocyte quality induced by dehydroepiandrosterone is partially rescued by metformin treatment. *PLoS One.* 2015;10(3):e0122370.
90. Chen CD, Chen HF, Lu HF, Chen SU, Ho HN, Yang YS. Value of serum and follicular fluid cytokine profile in the prediction of moderate to severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* 2000;15(5):1037-42.
91. Wei LH, Chou CH, Chen MW, Rose-John S, Kuo ML, Chen SU, et al. The role of IL-6 trans-signaling in vascular leakage: implications for ovarian hyperstimulation syndrome in a murine model. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(3):E472-84.
92. Merce LT, Barco MJ, Bau S, Troyano JM. Prediction of ovarian response and IVF/ICSI outcome by three-dimensional ultrasonography and power Doppler angiography. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007;132(1):93-100.
93. Jadaon JE, Ben-Ami M, Haddad S, Radin O, Bar-Ami S, Younis JS. Prospective evaluation of early follicular ovarian stromal blood flow in infertile women undergoing IVF-ET treatment. *Gynecol Endocrinol.* 2012;28(5):356-9.
94. Henrotin Y, Kurz B, Aigner T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13(8):643-54.
95. Yamasaki N, Tsuboi H, Hirao M, Nampei A, Yoshikawa H, Hashimoto J. High oxygen tension prolongs the survival of osteoclast precursors via macrophage colony-stimulating factor. *Bone.* 2009;44(1):71-9.
96. Abcouwer SF, Marjon PL, Loper RK, Vander Jagt DL. Response of VEGF expression to amino acid deprivation and inducers of endoplasmic reticulum stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(8):2791-8.
97. Wang Y, Alam GN, Ning Y, Visioli F, Dong Z, Nor JE, et al. The unfolded protein response induces the angiogenic switch in human tumor cells through the PERK/ATF4 pathway. *Cancer Res.* 2012;72(20):5396-406.

98. Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* 2004;14(1):20-8.
99. Babayev E, Lalioti MD, Favero F, Seli E. Cross-Talk Between FSH and Endoplasmic Reticulum Stress: A Mutually Suppressive Relationship. *Reprod Sci.* 2016;23(3):352-64.
100. Park HJ, Park SJ, Koo DB, Lee SR, Kong IK, Ryoo JW, et al. Progesterone production is affected by unfolded protein response (UPR) signaling during the luteal phase in mice. *Life Sci.* 2014;113(1-2):60-7.
101. Park SJ, Kim TS, Park CK, Lee SH, Kim JM, Lee KS, et al. hCG-induced endoplasmic reticulum stress triggers apoptosis and reduces steroidogenic enzyme expression through activating transcription factor 6 in Leydig cells of the testis. *J Mol Endocrinol.* 2013;50(2):151-66.
102. Kim JH, Park SJ, Kim TS, Kim JM, Lee DS. Testosterone production by a Leydig tumor cell line is suppressed by hyperthermia-induced endoplasmic reticulum stress in mice. *Life Sci.* 2016;146:184-91.
103. Liu GL, Zhang YM, Dai DZ, Ding MJ, Cong XD, Dai Y. Male hypogonadism induced by high fat diet and low dose streptozotocin is mediated by activated endoplasmic reticulum stress and IkappaBbeta and attenuated by argirein and valsartan. *Eur J Pharmacol.* 2013;713(1-3):78-88.
104. Liu GL, Yu F, Dai DZ, Zhang GL, Zhang C, Dai Y. Endoplasmic reticulum stress mediating downregulated StAR and 3-beta-HSD and low plasma testosterone caused by hypoxia is attenuated by CPU86017-RS and nifedipine. *J Biomed Sci.* 2012;19:4.
105. Zhang GL, Dai DZ, Zhang C, Dai Y. Apocynin and raisanberine alleviate intermittent hypoxia induced abnormal StAR and 3beta-HSD and low testosterone by suppressing endoplasmic reticulum stress and activated p66Shc in rat testes. *Reprod Toxicol.* 2013;36:60-70.
106. Fan HY, Liu Z, Johnson PF, Richards JS. CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP)-alpha and -beta are essential for ovulation, luteinization, and the expression of key target genes. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md).* 2011;25(2):253-68.
107. Fan HY, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, et al. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science (New York, NY).* 2009;324(5929):938-41.
108. Paul S, Kundu S, Pramanick K, Bandyopadhyay A, Mukherjee D. Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by gonadotropin in common carp *Cyprinus carpio*: interaction between calcium- and adenylate cyclase-dependent pathways and involvement of ERK signaling cascade. *J Mol Endocrinol.* 2010;45(4):207-18.



109. Practice Committee of the American Society for Reproductive M. Obesity and reproduction: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2015;104(5):1116-26.

図 1

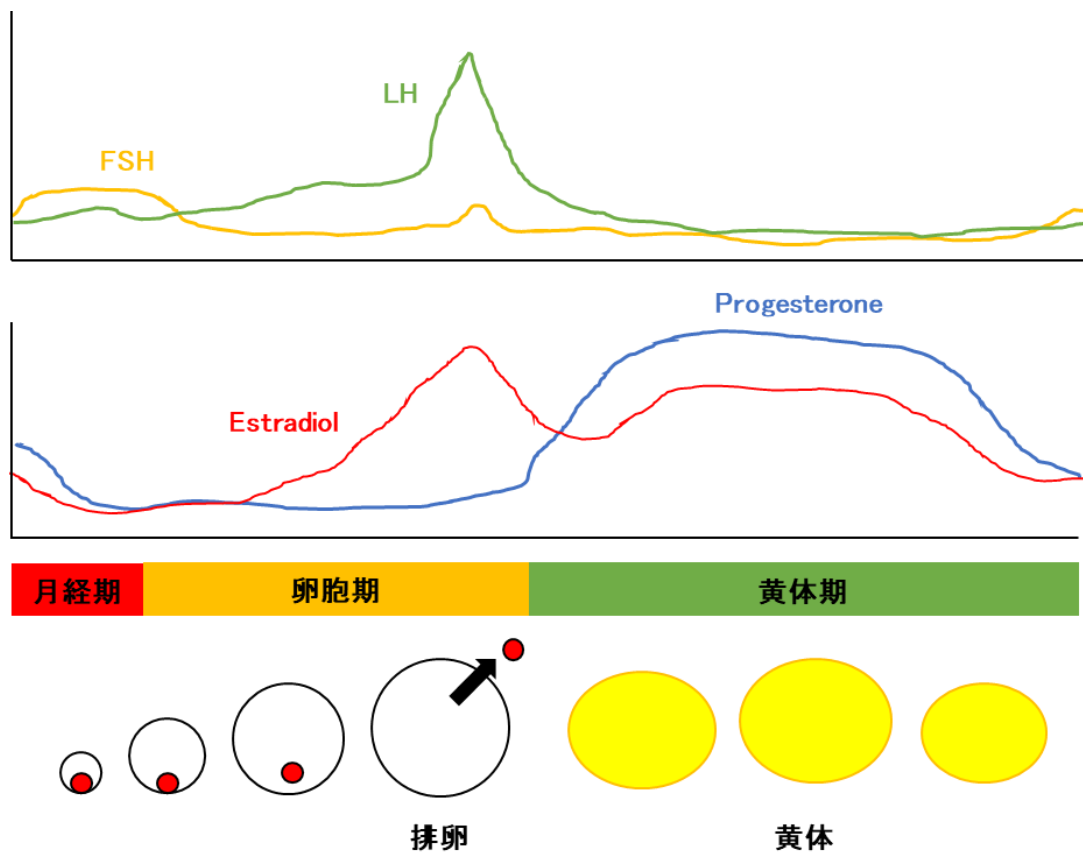


図 1. ヒト月経周期におけるホルモン分泌の変化

ヒトの月経周期は 28 日前後でおき、月経期、卵胞期、黄体期に分けられる。視床下部より分泌される GnRH のパルス状分泌により、下垂体から LH、FSH が分泌され、卵巣における estradiol、progesterone が分泌される。卵胞期には FSH 刺激により卵巣顆粒膜細胞の増殖・分化に伴い、estradiol の分泌が増加する。estradiol による正のフィードバック作用によって、LH surge がおき、排卵が誘発される。排卵後の卵巣では黄体が形成され、着床・妊娠の維持に必要な progesterone が分泌される。

図 2

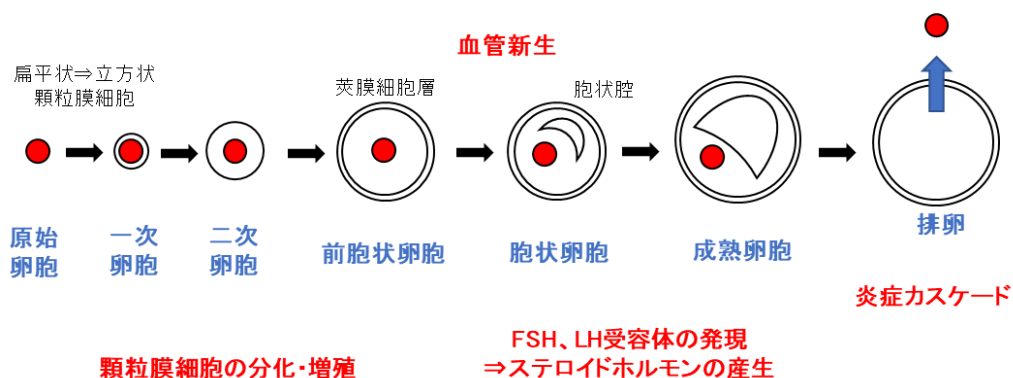


図 2. ヒトの正常卵胞発育

原始卵胞では、1 層の扁平状顆粒膜細胞を有し、顆粒膜細胞が立方状に分化し、一次卵胞へと成長する。ゴナドトロピン非依存的に顆粒膜細胞の増殖・分化をきたす。その後、ゴナドトロピン依存的に発育を認め、莢膜細胞層が出現し、胞状腔を伴った胞状卵胞から成熟卵胞へと発育する。卵胞の成熟に伴い、FSH、LH 受容体を発現し、顆粒膜細胞からの *estrogen* 分泌が著明に増加する。LH surge によって炎症カスケードが活性化し、選択された成熟卵胞で排卵が誘発される。

図 3

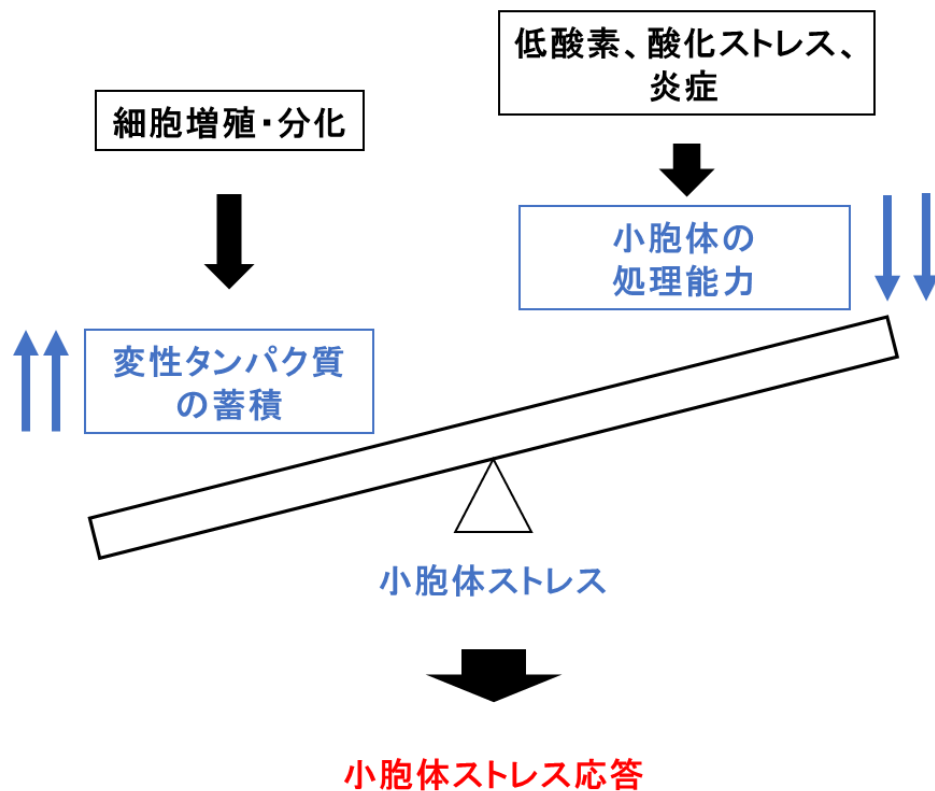


図 3. 小胞体ストレスと小胞体ストレス応答

様々な因子や環境要因などのストレス負荷により、折りたたみ不全なタンパク質が蓄積され、小胞体の処理能力を超えて、異常タンパク質が蓄積した状態を小胞体ストレスと呼ぶ。それに対して細胞は小胞体ストレス応答とよばれる適応反応を示し、細胞の恒常性を維持する。

図 4

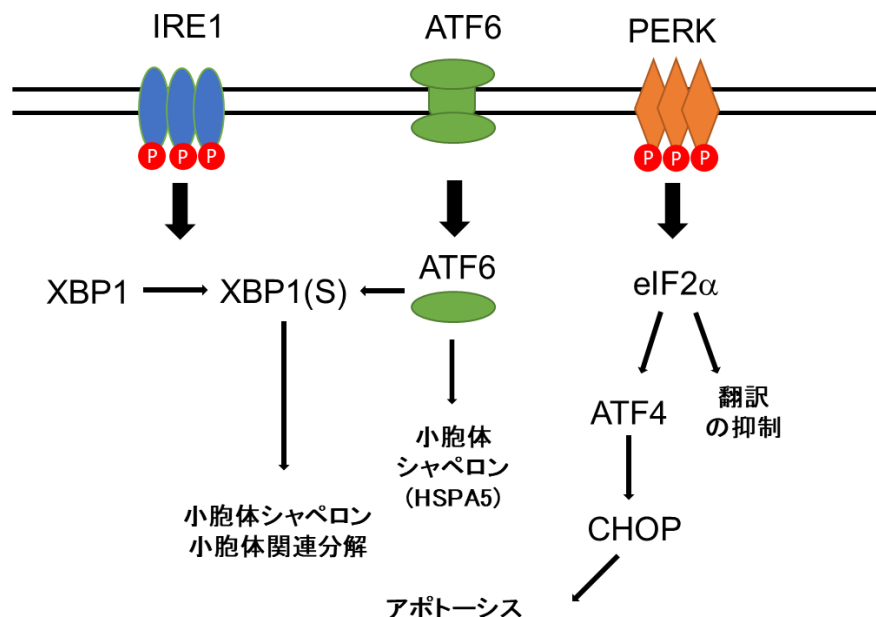


図 4. 小胞体ストレス応答のシグナル伝達経路

IRE1、ATF6、PERK と呼ばれる 3 つの主要なセンサータンパク質が存在する。IRE1 は自己リン酸化により活性化し、XBP1 mRNA がスプライシングされ、XBP1 タンパク質が合成される。ATF6 はタンパク質切断により活性化され、HSPA5 などのケミカルシャペロンを誘導する。PERK は自己リン酸化により活性化し、eIF2α がリン酸化し、転写因子である ATF4 を誘導する。細胞の恒常性が維持できない場合、CHOP などの発現によって、アポトーシスを介した細胞死が誘導される。ATF, activating transcription factor; C/EBP homologous protein; eIF2α; eukaryotic Initiation Factor 2 alpha; HSPA5, Heat shock protein 5; IRE1, insitol-requiring enzyme 1; PERK, double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase; XBP1(S), spliced-form of X-box-binding protein1。

図 5

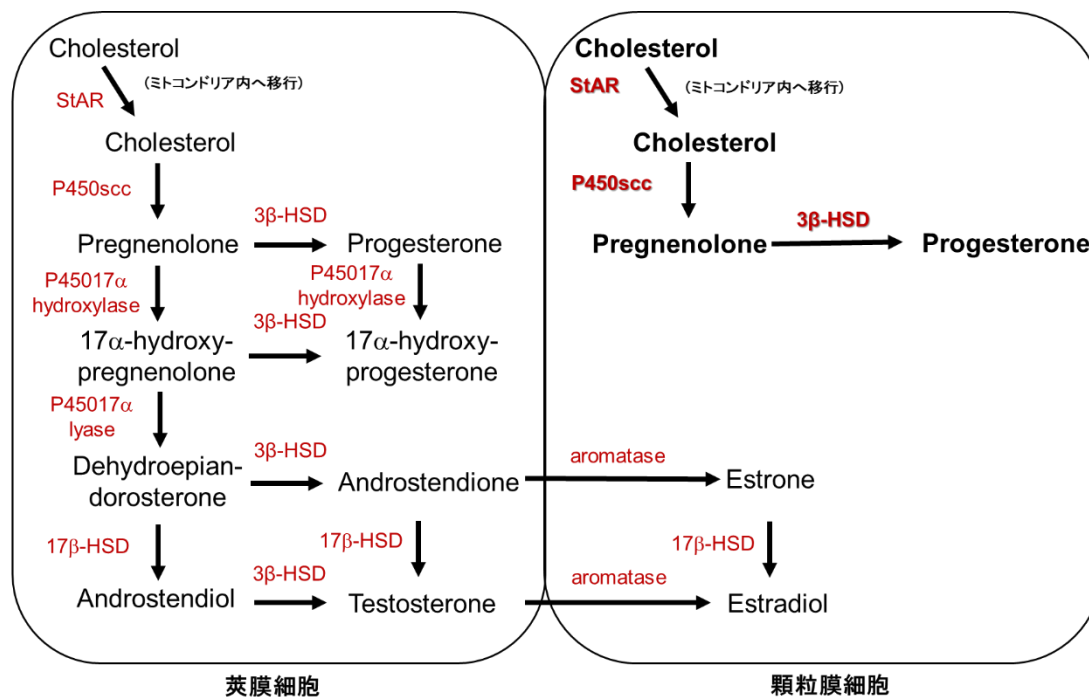


図 5. 卵巣におけるステロイドホルモン合成経路

卵巣における estrogen 合成は、FSH、LH の作用下で莢膜細胞と顆粒膜細胞の相互作用によって合成される。一方、progesterone は、排卵後、黄体化した顆粒膜細胞において主に産生される。黄体化顆粒膜細胞における progesterone 合成経路を太字で示す。StAR によってコレステロールが細胞膜からミトコンドリア内へ移行し、P450scc によって pregnenolone へ、さらに pregnenolone は 3β-HSD によって progesterone へと変換される。

HSD, hydroxysteroid dehydrogenase; StAR, steroidogenic acute regulatory protein。

図 6.

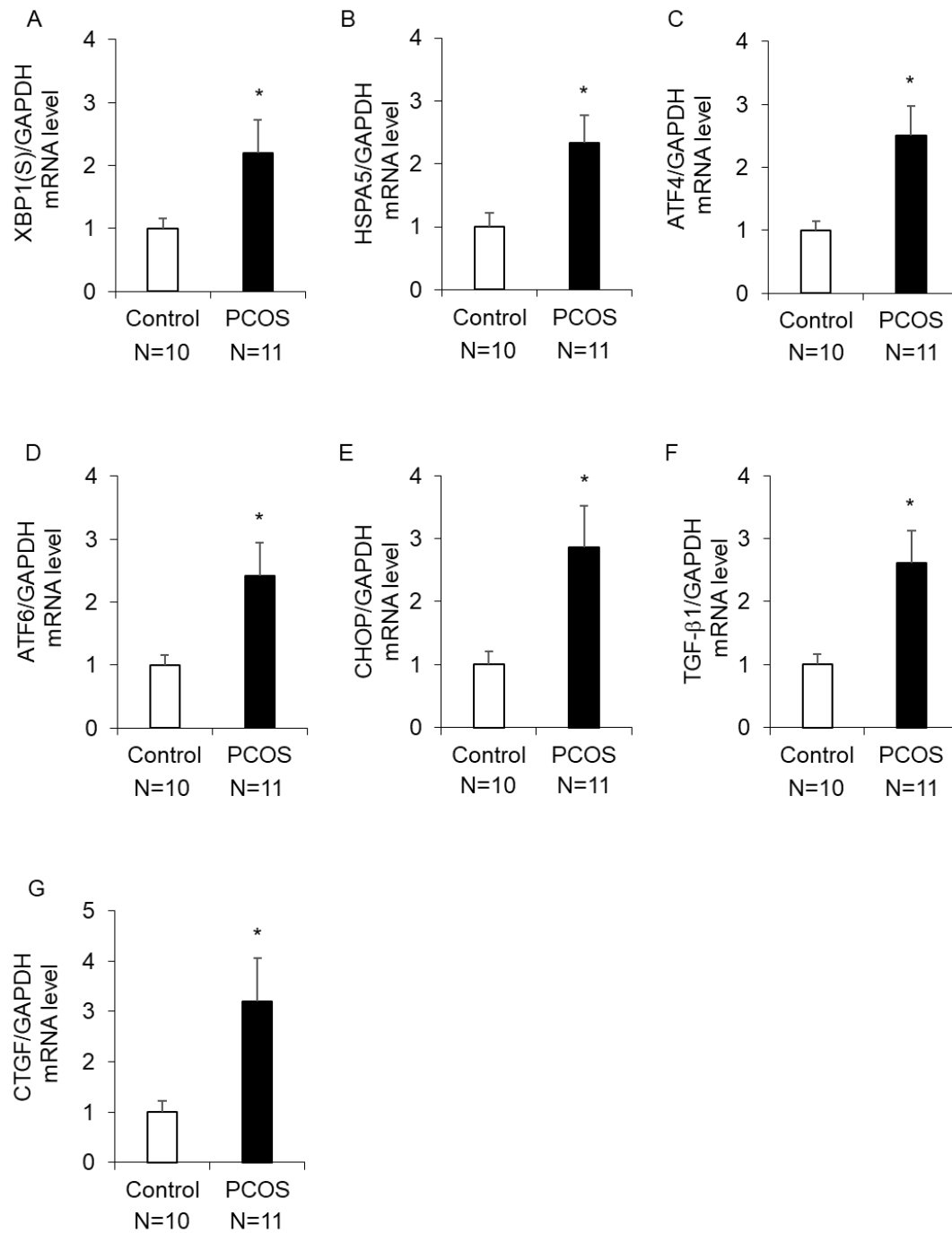
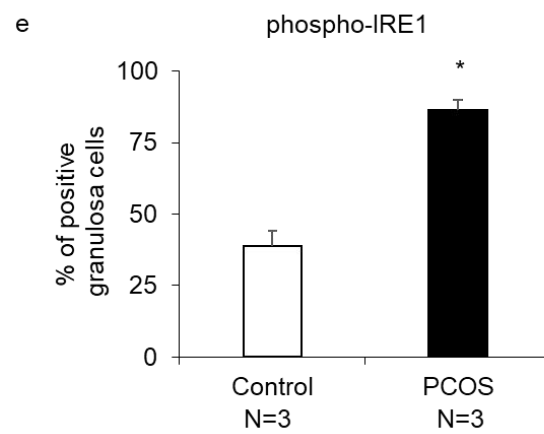
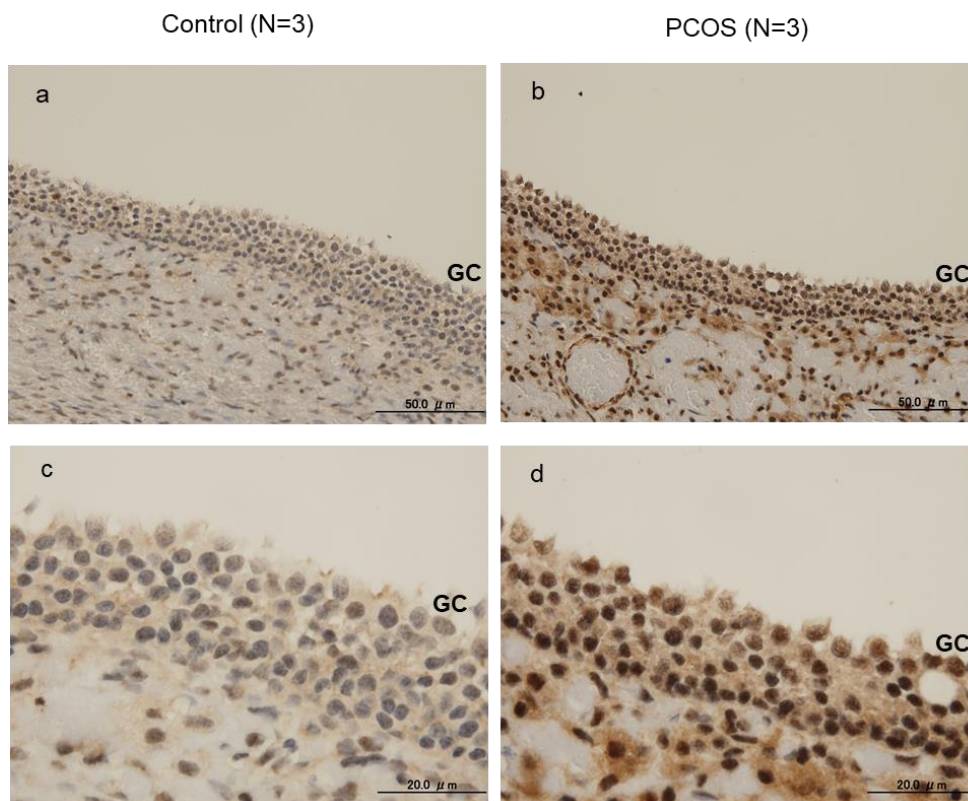


図 6. Control 患者と PCOS 患者における小胞体ストレス応答因子と線維化誘導因子の mRNA 発現

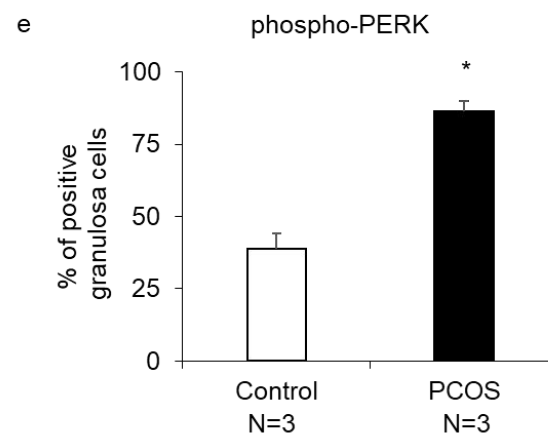
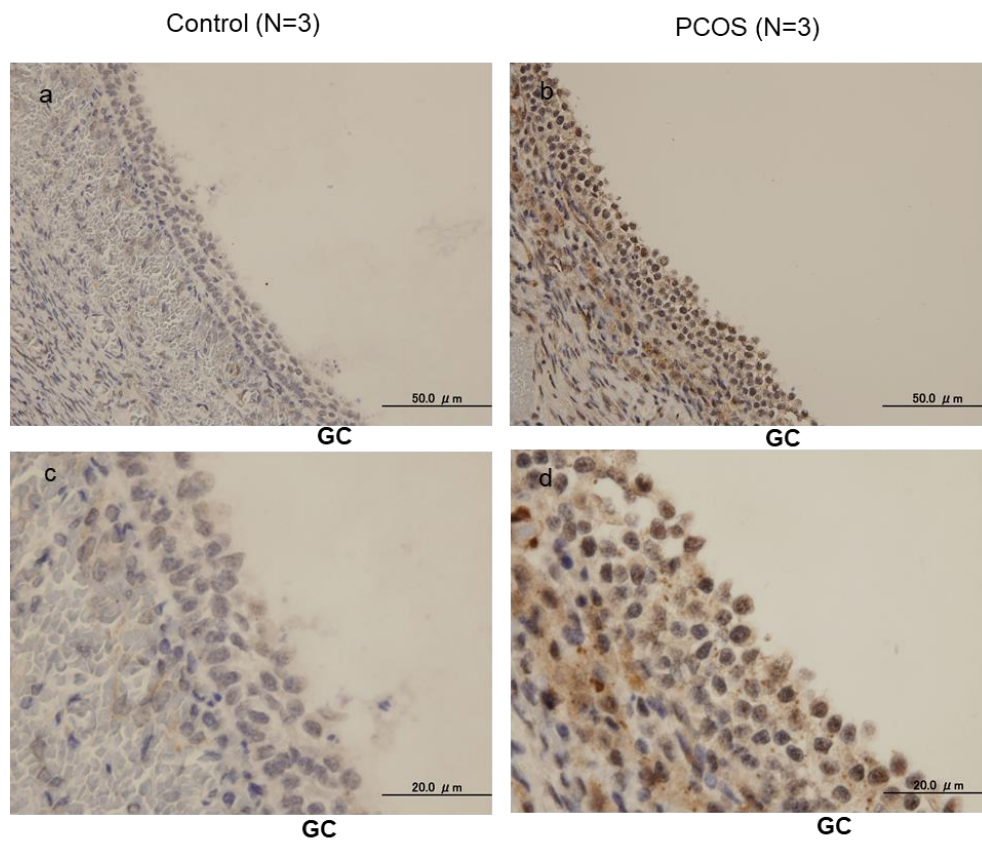
Control 患者と PCOS 患者のヒト黄体化顆粒膜細胞(GLCs)における小胞体ストレス応答因子(A-E)と線維化誘導因子(F,G)の mRNA 発現を定量的 PCR を用いて評価した。Internal control として GAPDH を用いた。\*, P<0.05。

7A

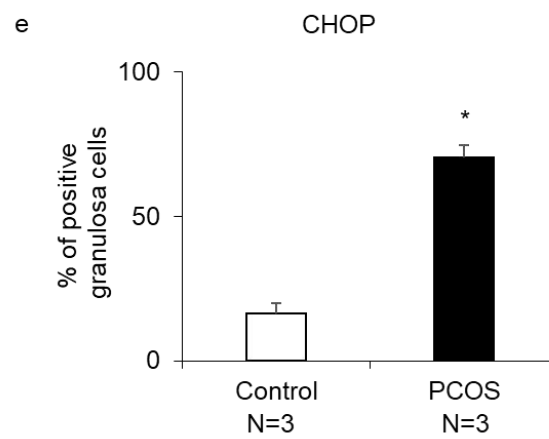
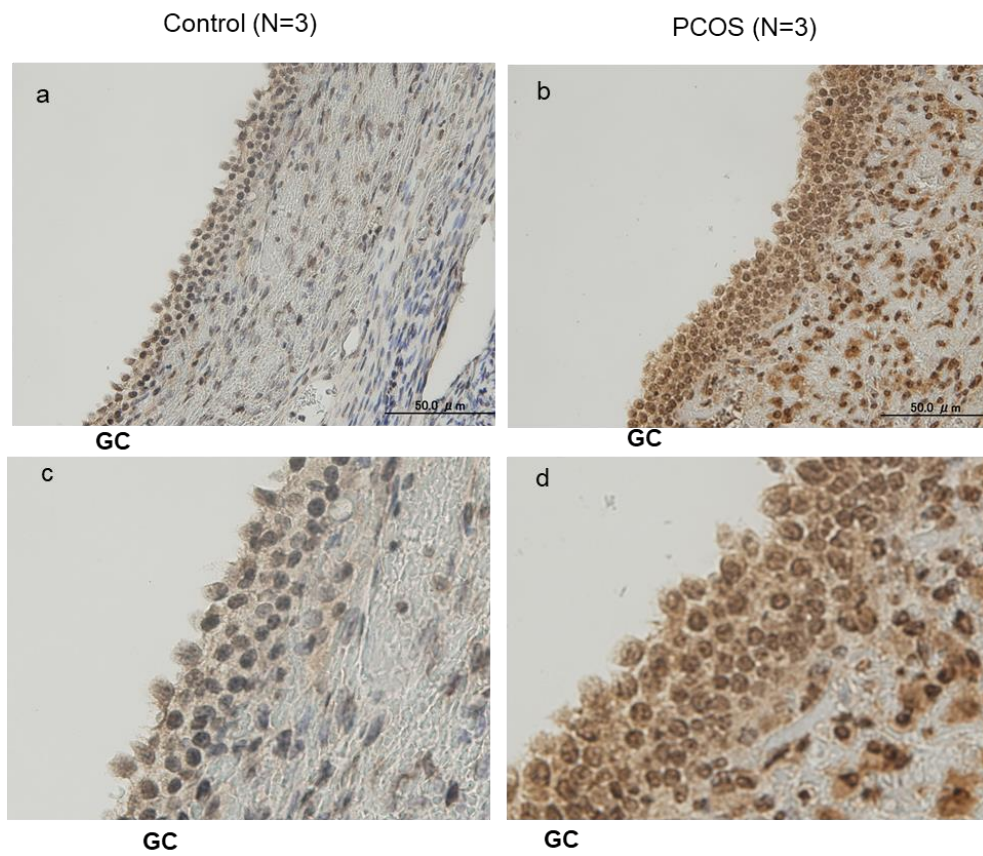




☒ 7B



7C



7D

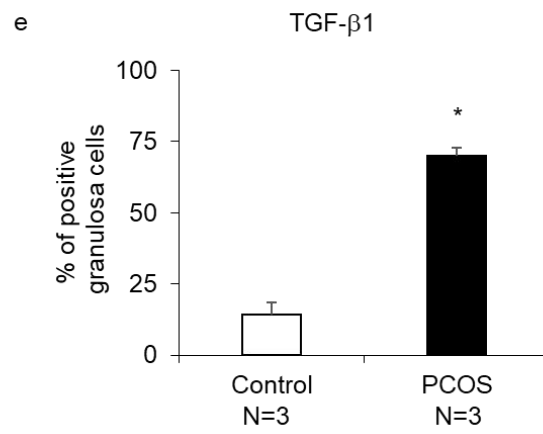
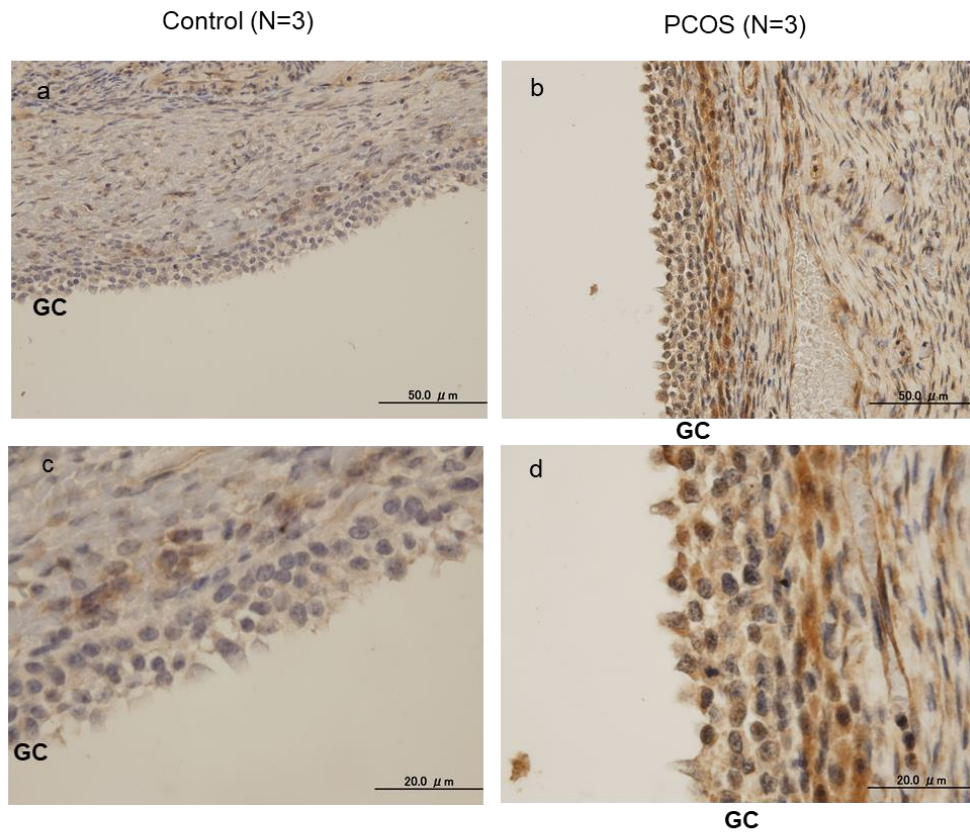


図 7E

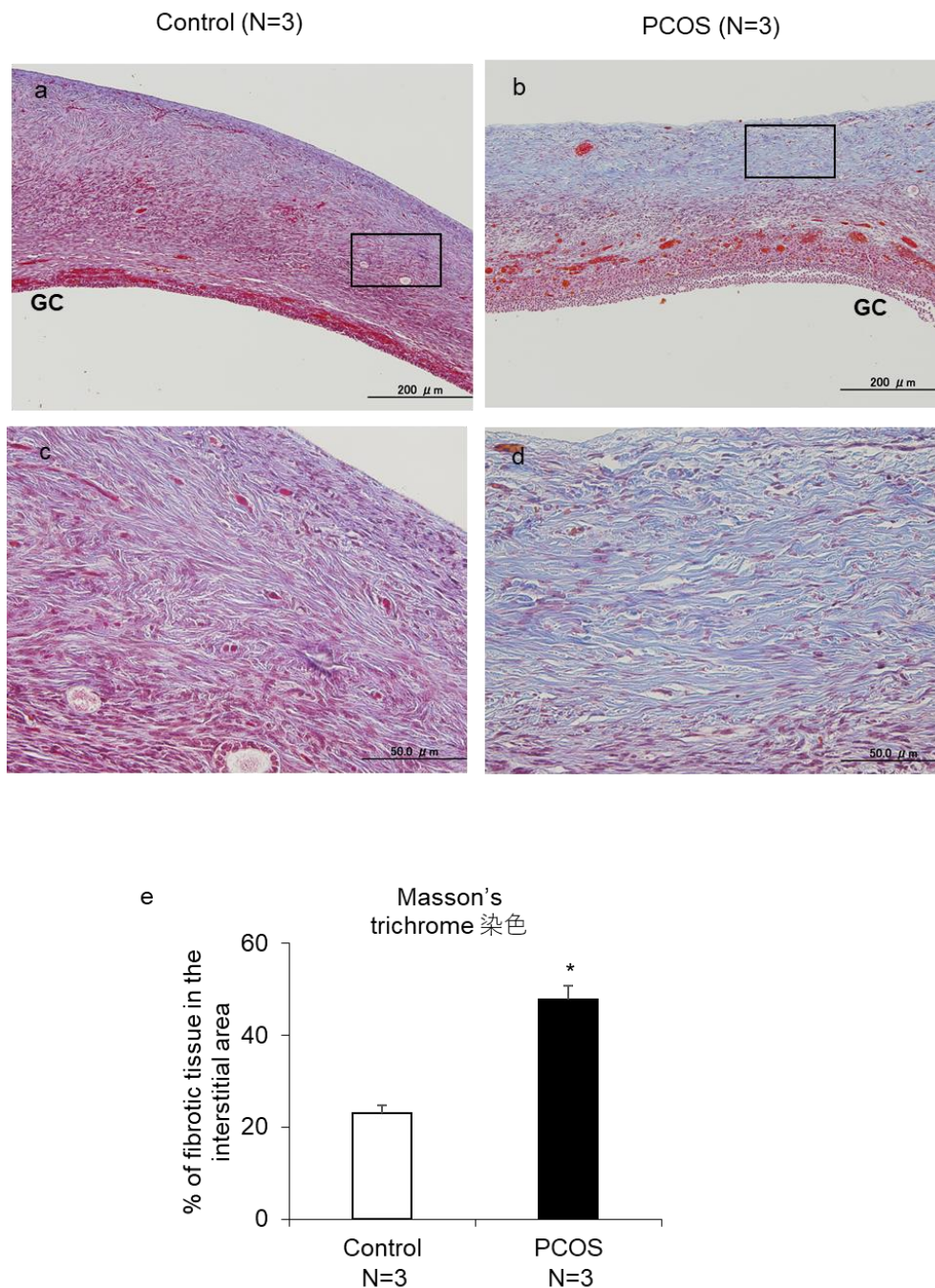


図 7. Control 患者と PCOS 患者の卵巣における小胞体ストレスの活性化(A-C)、TGF- $\beta$ 1 発現(D)及び卵巣線維化(E)の比較

phospho-IRE1、phospho-PERK、CHOP、TGF- $\beta$ 1 のタンパク発現を免疫染色で評価した(A-D)。卵巣の線維化を Masson's trichrome 染色で評価した(F)。a,b は弱拡大、c,d は強拡大、e は定量的評価を示す。\*P<0.05。GC, 顆粒膜細胞層。



図 8

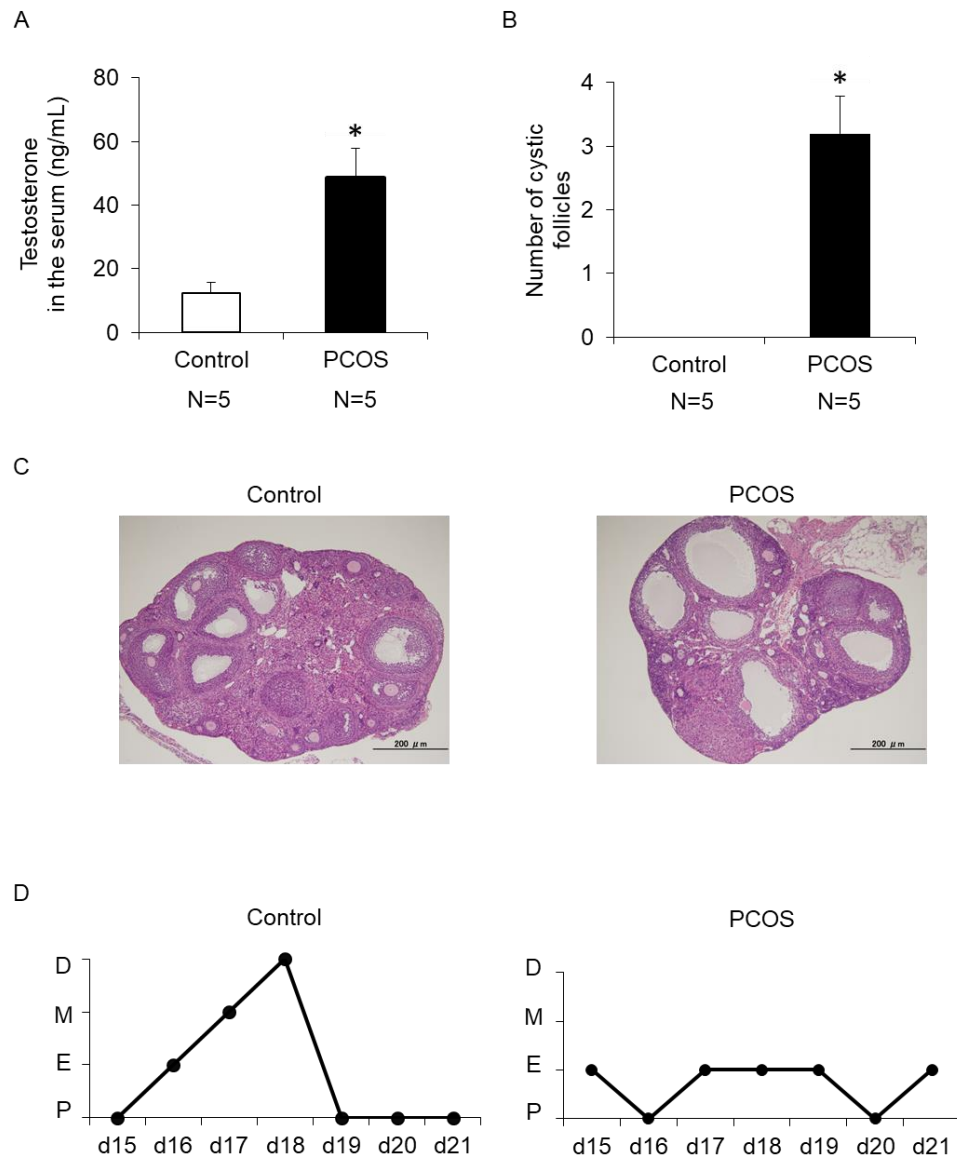


図 8. Control マウスと PCOS マウスの比較

Control マウスは sesami oil を 20 日間皮下投与、PCOS マウスは DHEA を 20 日間皮下投与した。A、血清 testosterone 濃度を ELISA で評価した。B、卵巣最大断面における囊胞状卵胞数を計測した。C、卵巣の典型像 (Hematoxylin-Eosin 染色)を示す。D、薬物投与後 15 日から 21 日まで、性周期を経腔細胞診で評価した。代表的な性周期変化を示す。PCOS では発情期の延長をみとめ、周期的な性周期変化を認めなかった。\* $P < 0.05$ 。P, 発情前期、E, 発情期、M, 発情後期、D, 発情休止期。

9A

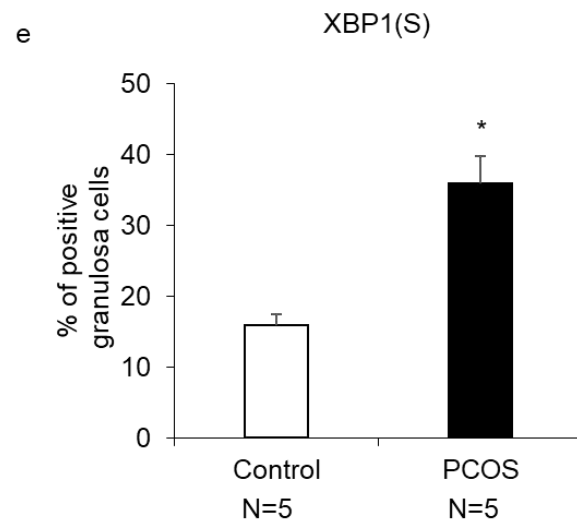
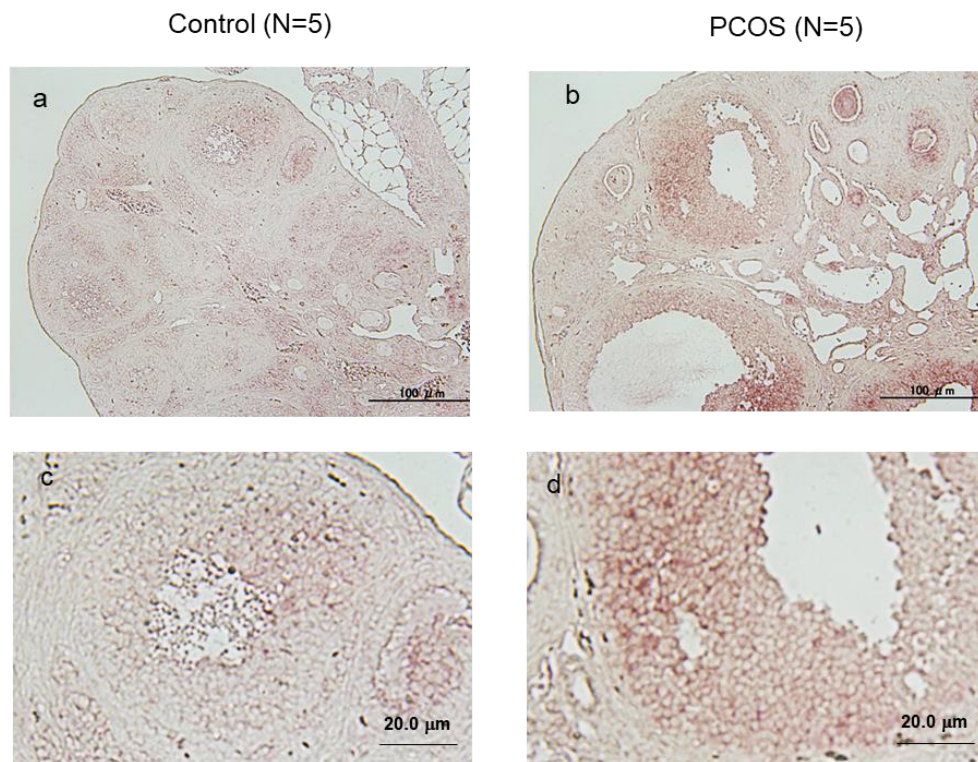
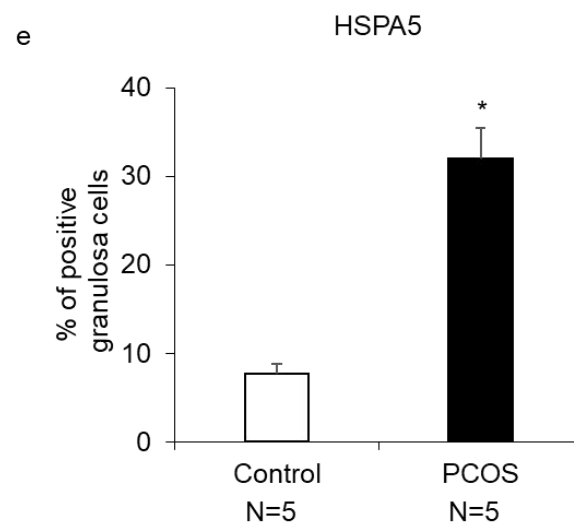
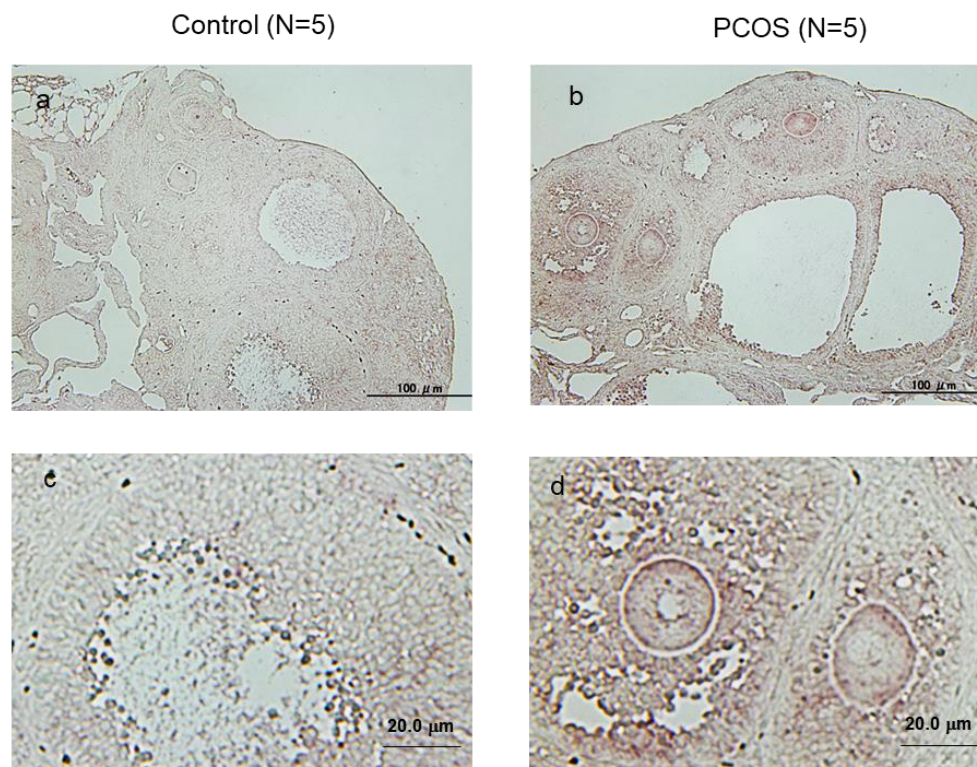
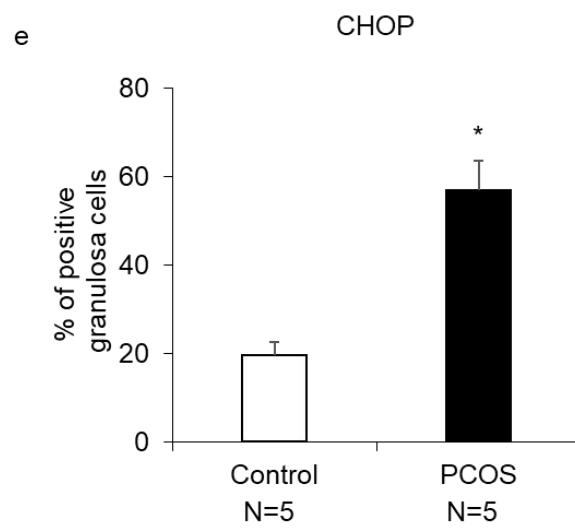
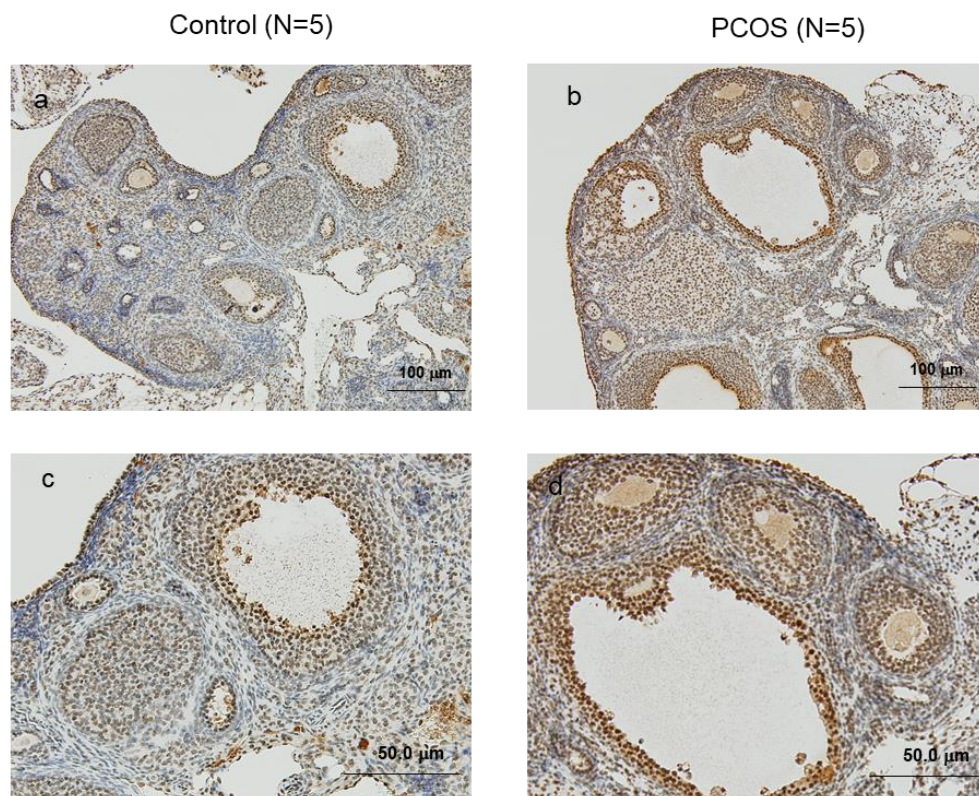


图 9B



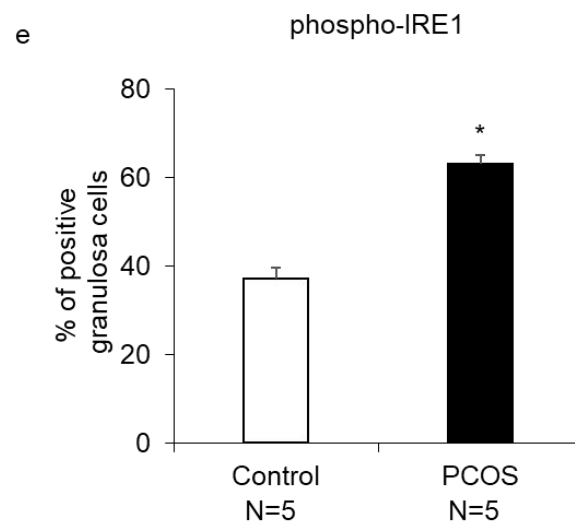
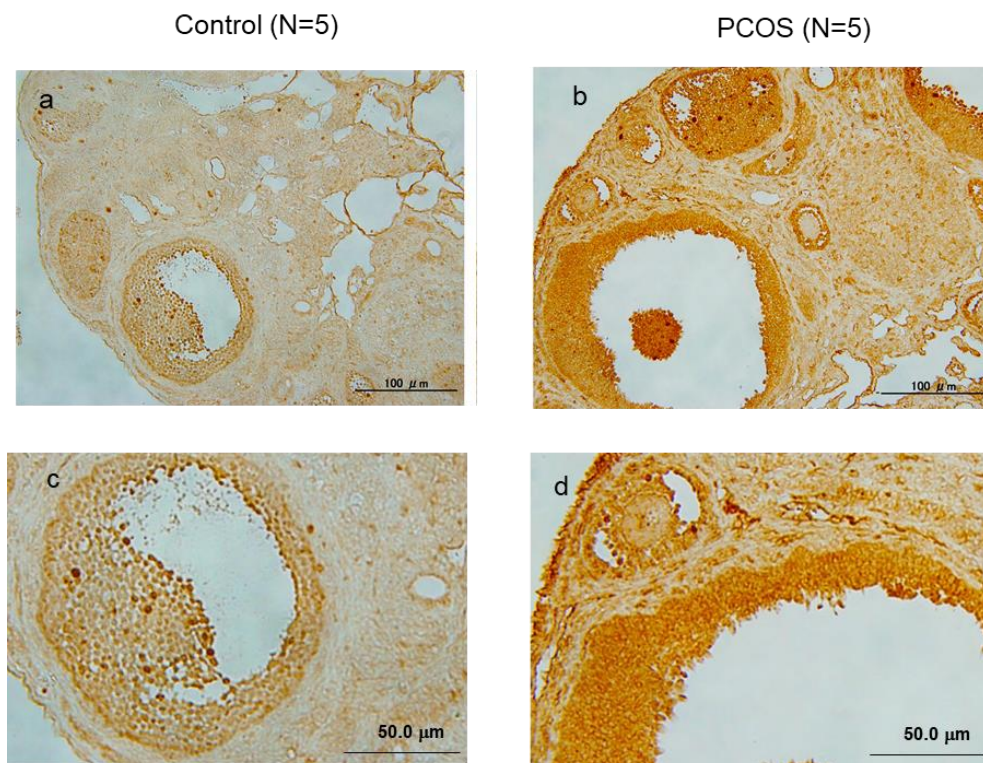


9C





9D



☒ 9E

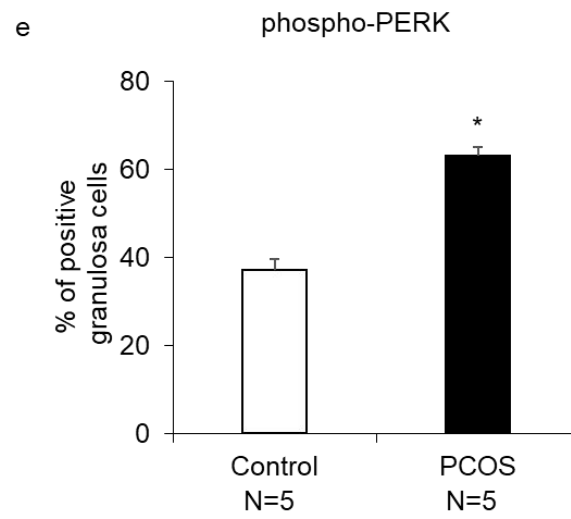
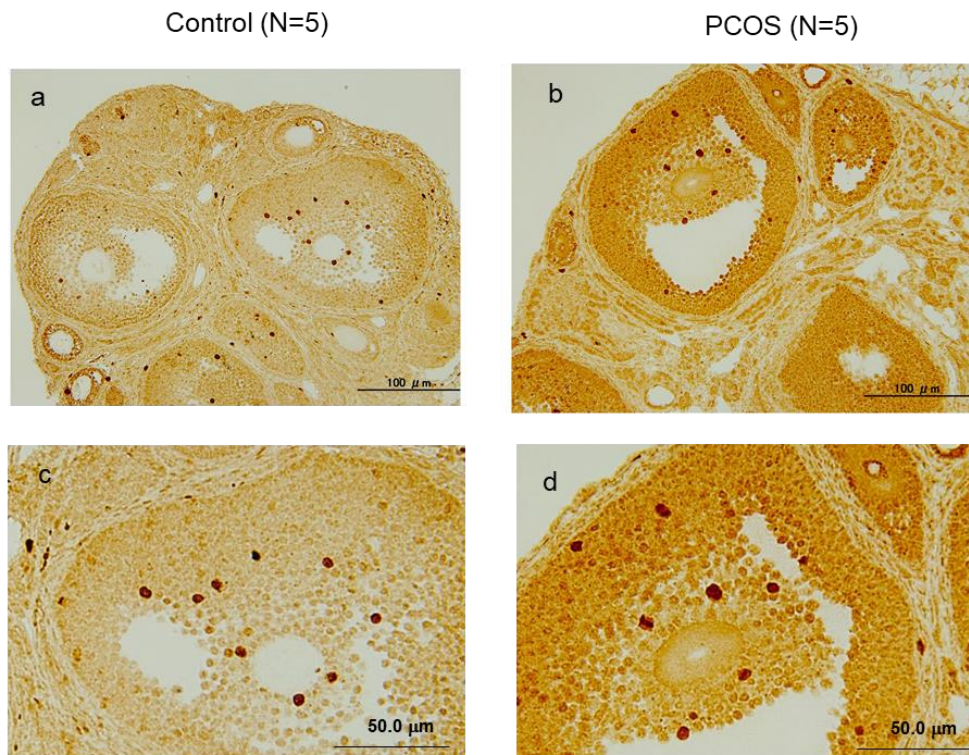


図 9F

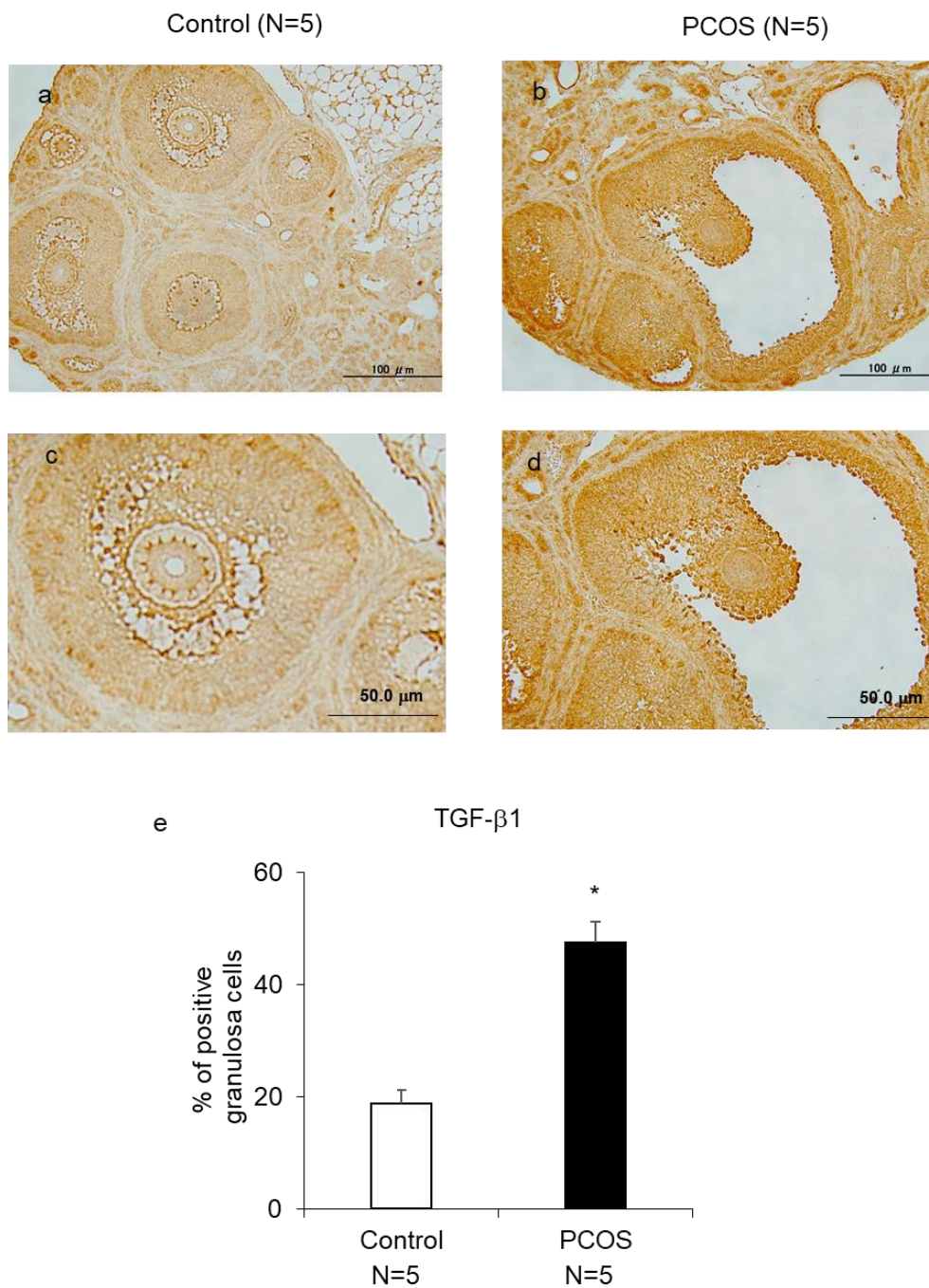


図 9. Control マウス、PCOS マウスの卵巣における小胞体ストレスの活性化(A-E)、TGF-β1 発現(F)の比較

Control マウス及び PCOS マウスの卵巣において、XBP1(S)と HSPA5 の mRNA 発現を *in situ* hybridization(A,B)で、phospho-IRE1、phospho-PERK、CHOP、TGF-β1 のタンパク発現を免疫染色(C-F)で評価した。a,b は弱拡大、c,d は強拡大、e は定量的評価を示す。\*P<0.05。

図 10

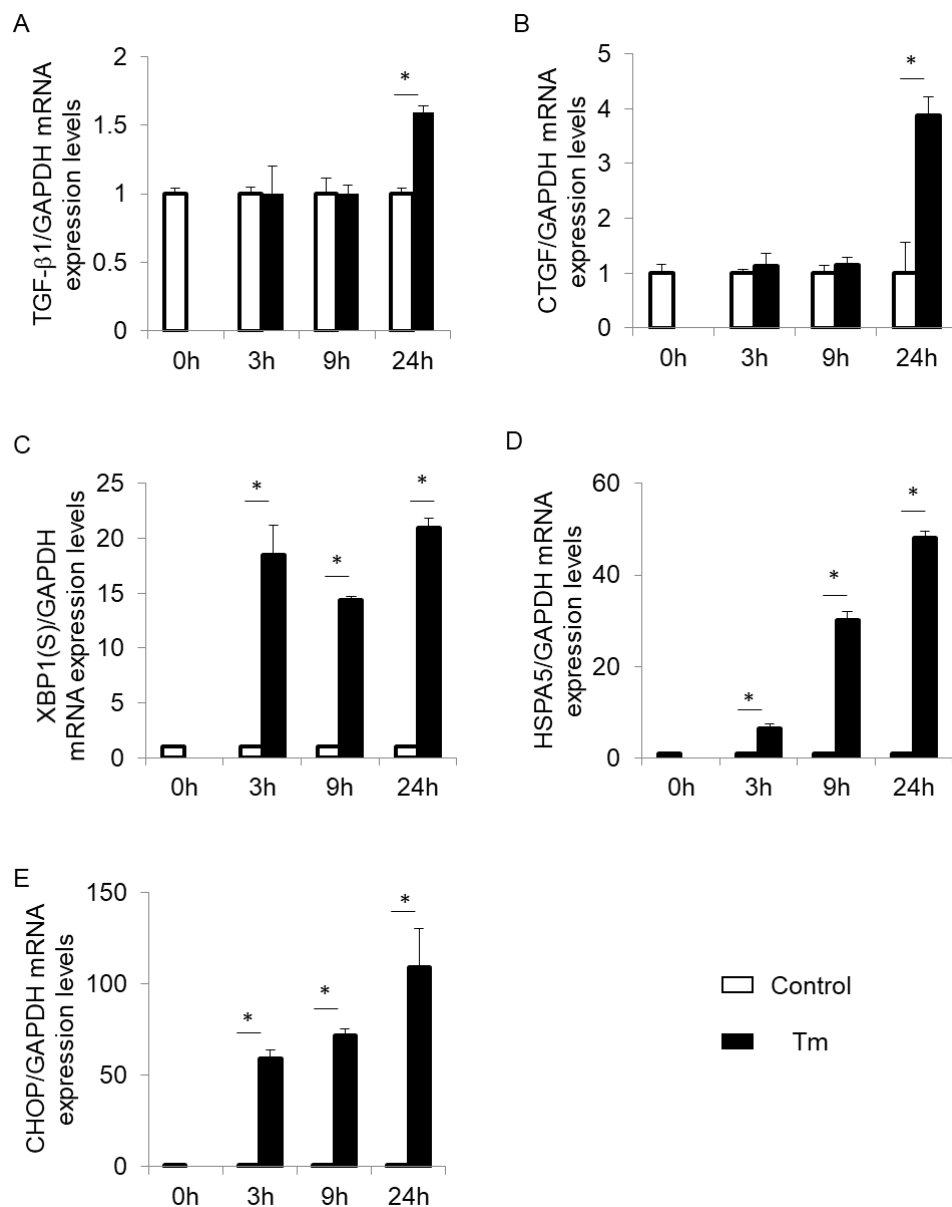


図 10. 小胞体ストレスはヒト GLCs における線維化誘導因子の発現を促進する  
ヒト GLCs に 2.5  $\mu$ g/ml tunicamycin を投与し、線維化誘導因子(A,B)と小胞体ストレス応答因子(C-E)の mRNA 発現を定量的 PCR で評価した。Internal control として GAPDH を用いた。\*, P<0.05。Tm, tunicamycin。

図 11

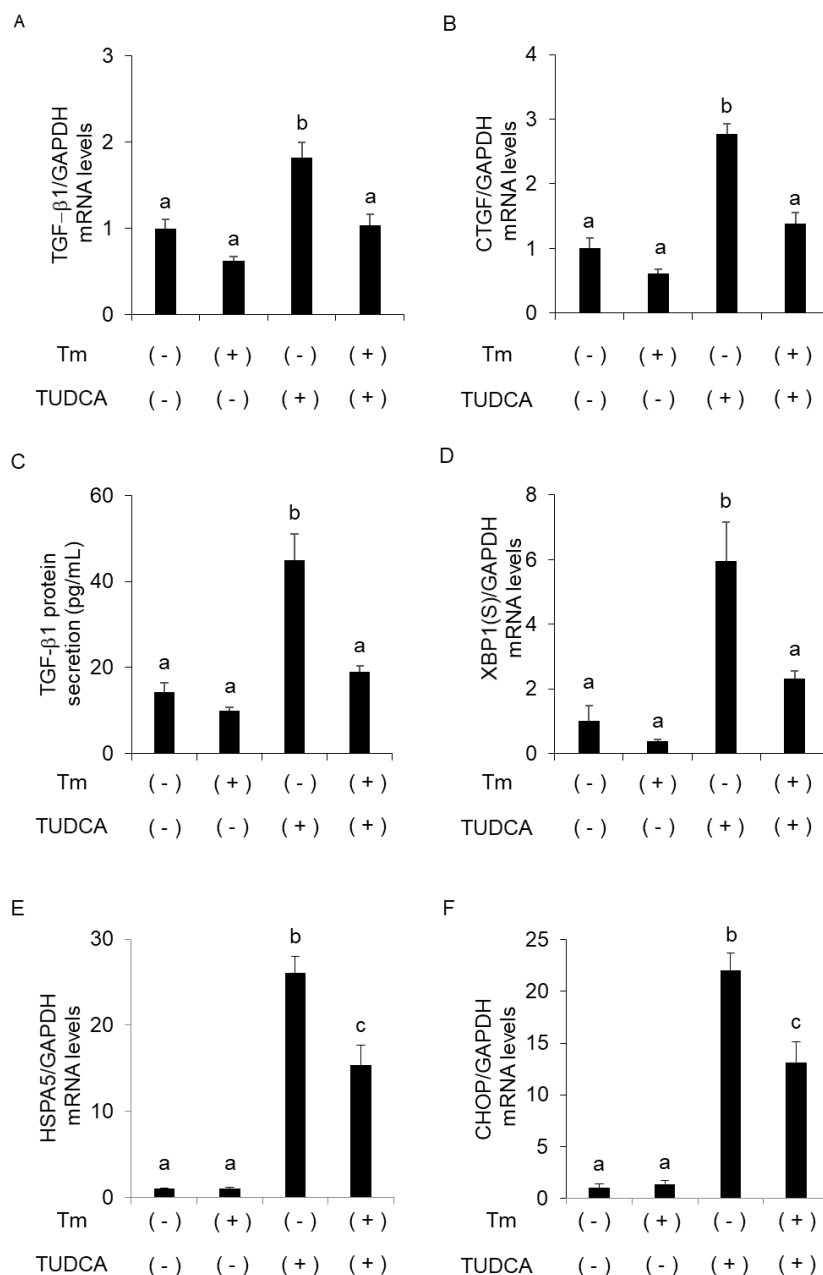


図 11. 小胞体ストレス阻害剤はヒト GLCs における tunicamycin 誘導下の線維化誘導因子の発現を抑制する

ヒト GLCs に TUDCA 1 mg/ml を 24 時間投与後、2.5  $\mu$ g/ml tunicamycin を 24 時間投与した。TGF- $\beta$ 1、CTGF、XBP1(S)、HSPA5、CHOP の mRNA 発現を定量的 PCR で評価した(A,B,D-F)。Internal control として GAPDH を用いた。活性化 TGF- $\beta$ 1 のタンパク分泌を ELISA で評価した(C)。異符号間で、 $P < 0.05$  を示す。Tm, tunicamycin; TUDCA, tauroursodeoxycholic acid。

図 12

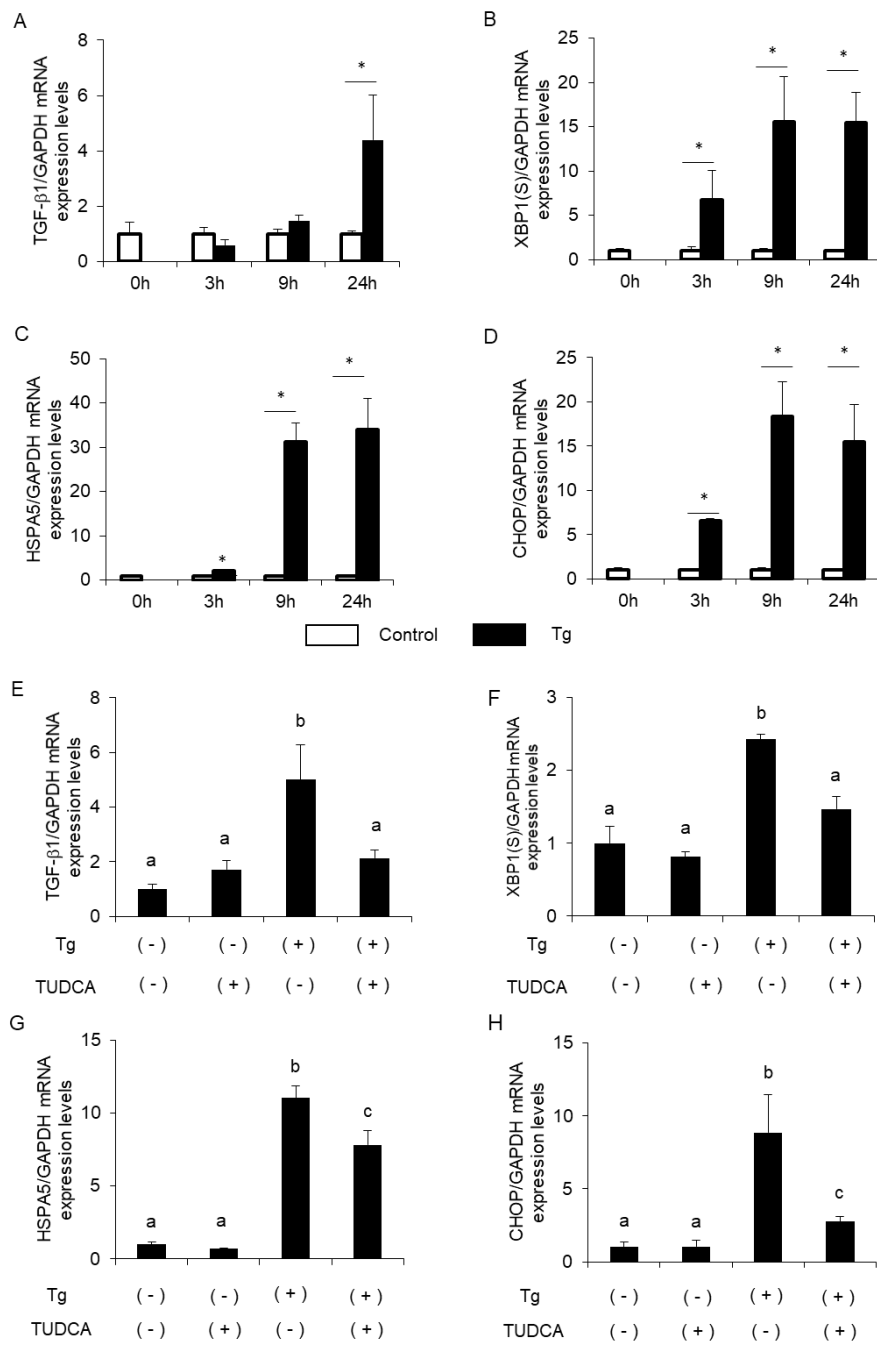


図 12. ヒト GLCs における thapsigargin による TGF-β1 mRNA 発現への影響  
A-D、ヒト GLCs に 0.5 μM Tg を投与した。E-H、TUDCA 1mg/ml を 24 時間投与後、0.5 μM Tg を 24 時間投与した。TGF-β1、XBP1(S)、HSPA5、CHOP の mRNA 発現を定量的 PCR で評価した。Internal control として GAPDH を用いた。異符号間または\*で P<0.05 を示す。Tg, thapsigargin; TUDCA, tauroursodeoxycholic acid。

図 13

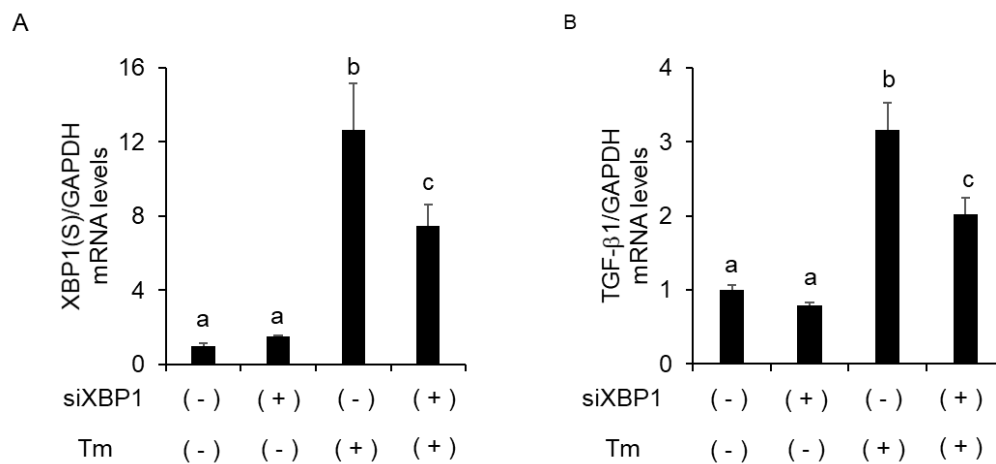
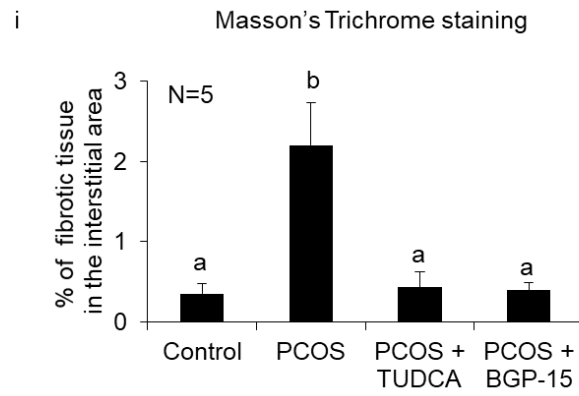
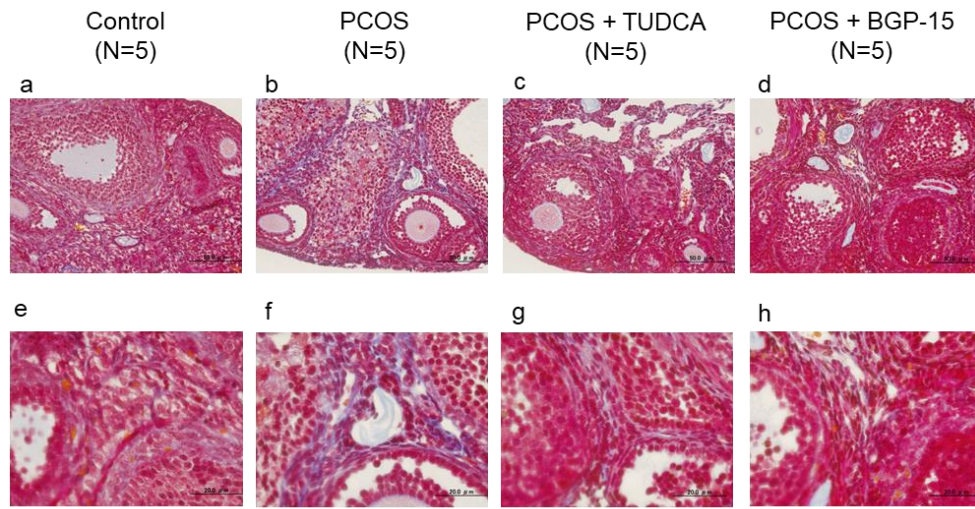


図 13. 小胞体ストレス刺激によるヒト GLCs の TGF-β1 mRNA 発現には XBP1(S)経路が介在している

ヒト GLCs に XBP1 siRNA 50 nM を 24 時間投与後、2.5 μg/ml tunicamycin を 24 時間投与した。XBP1(S)と TGF-β1 の mRNA 発現を定量的 PCR で評価した。Internal control として GAPDH を用いた。異符号間で、 $P < 0.05$  を示す。Tm, tunicamycin。

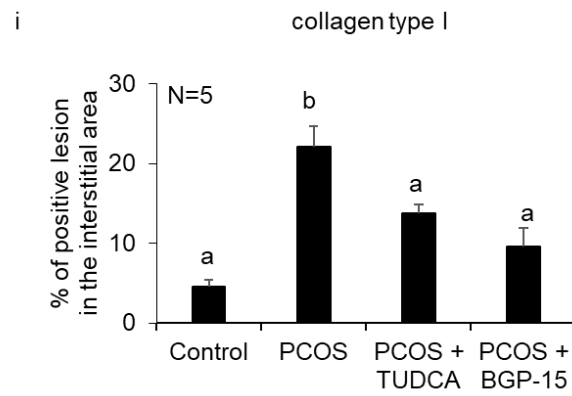
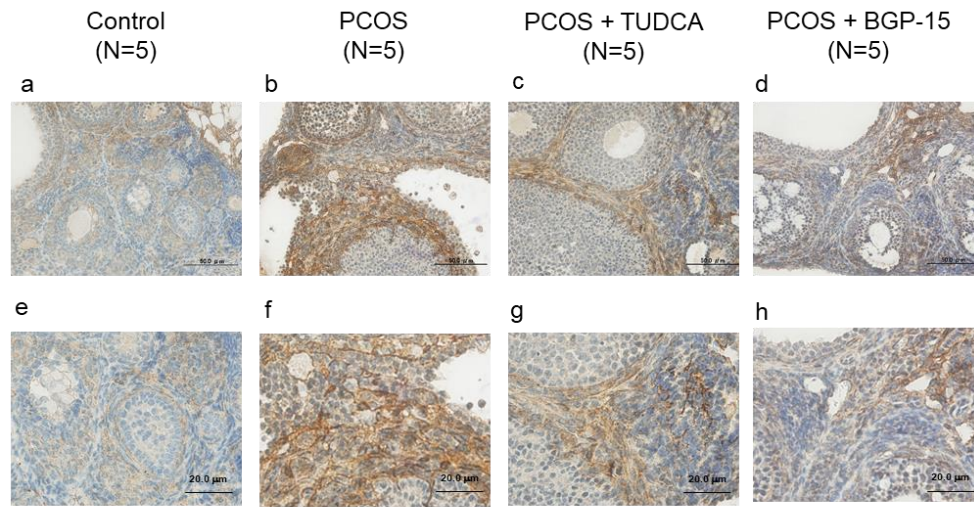


Figure 14A

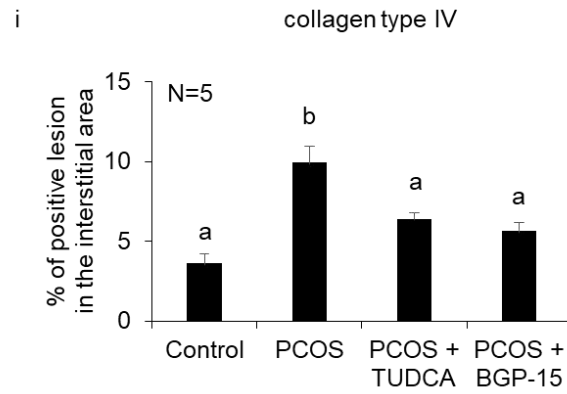
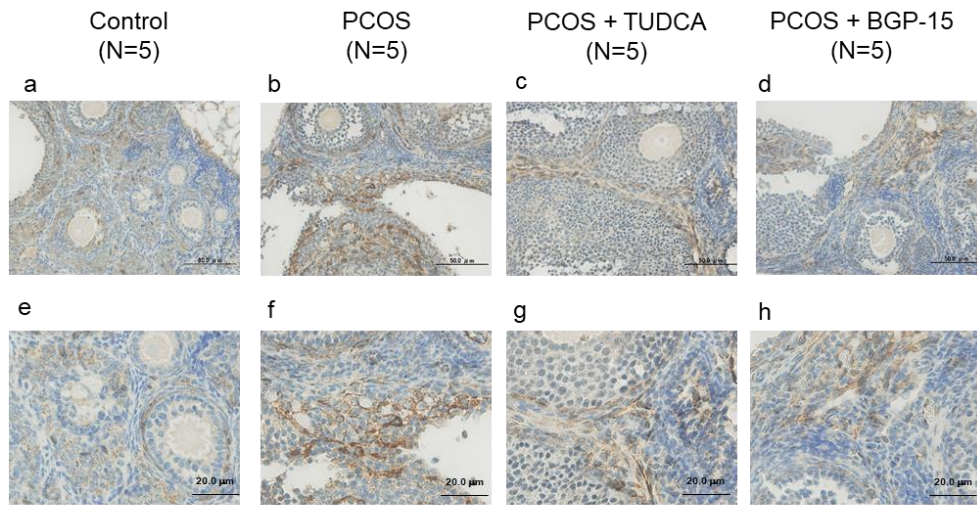




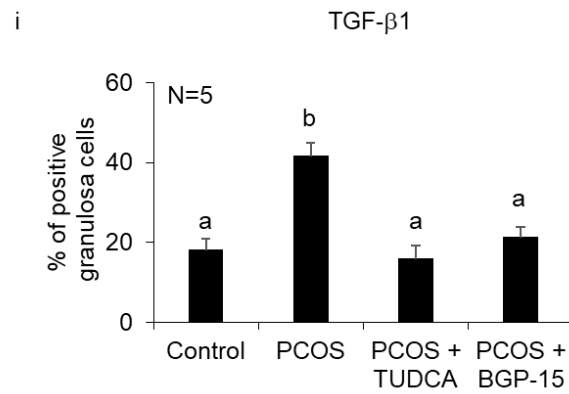
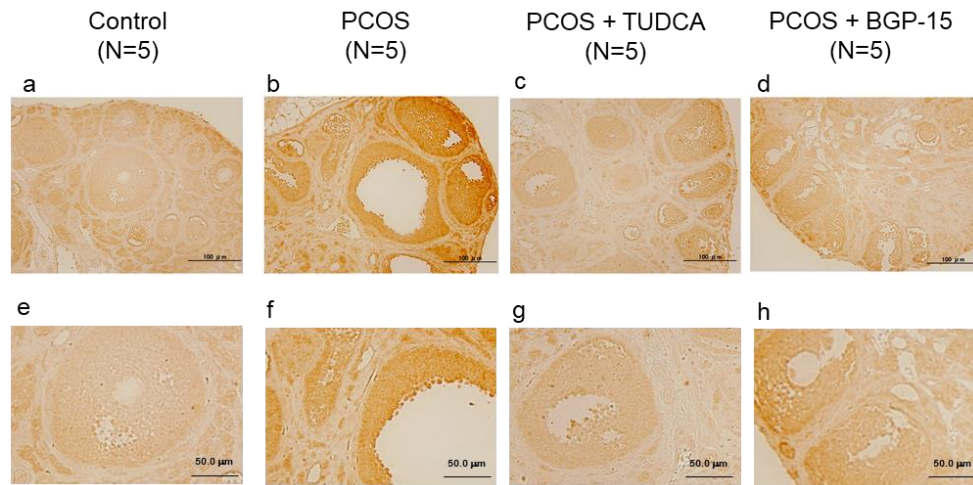
☒ 14B



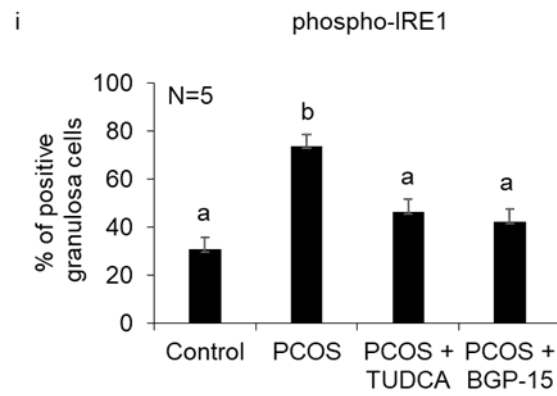
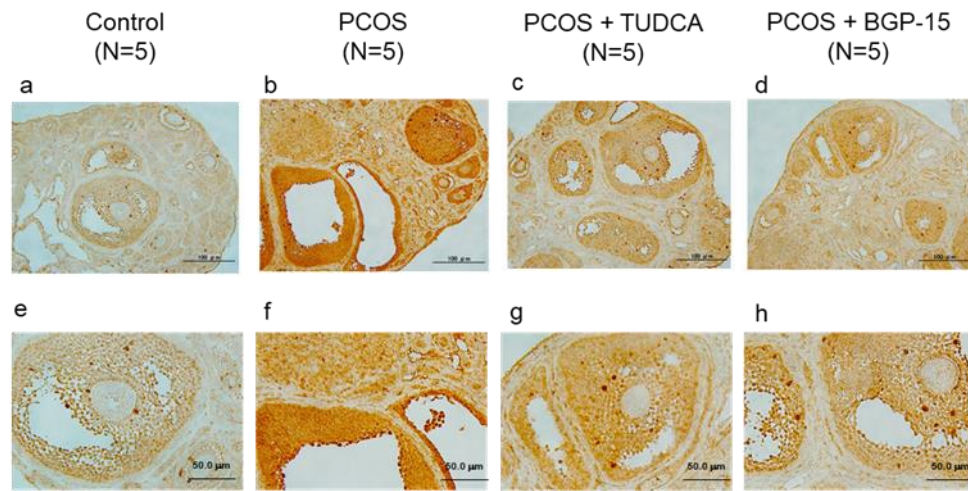
14C



☒ 14D



☒ 14E



☒ 14F

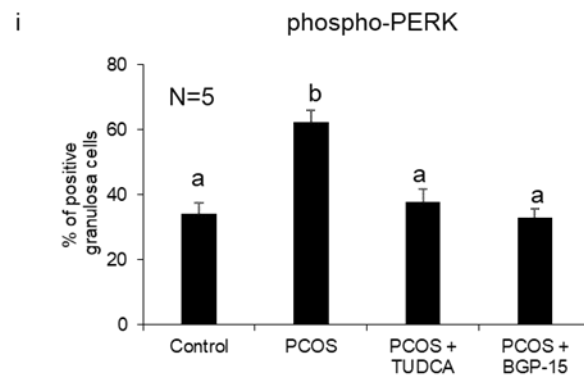
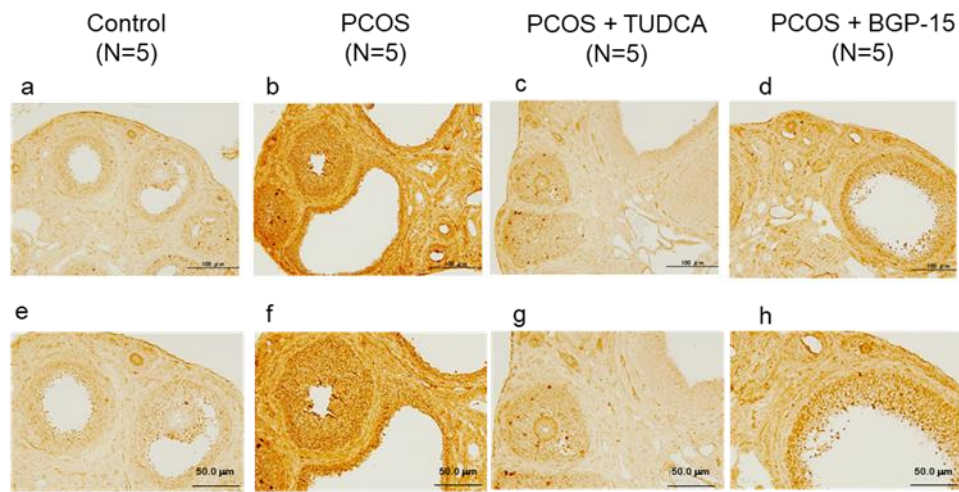


図 14G

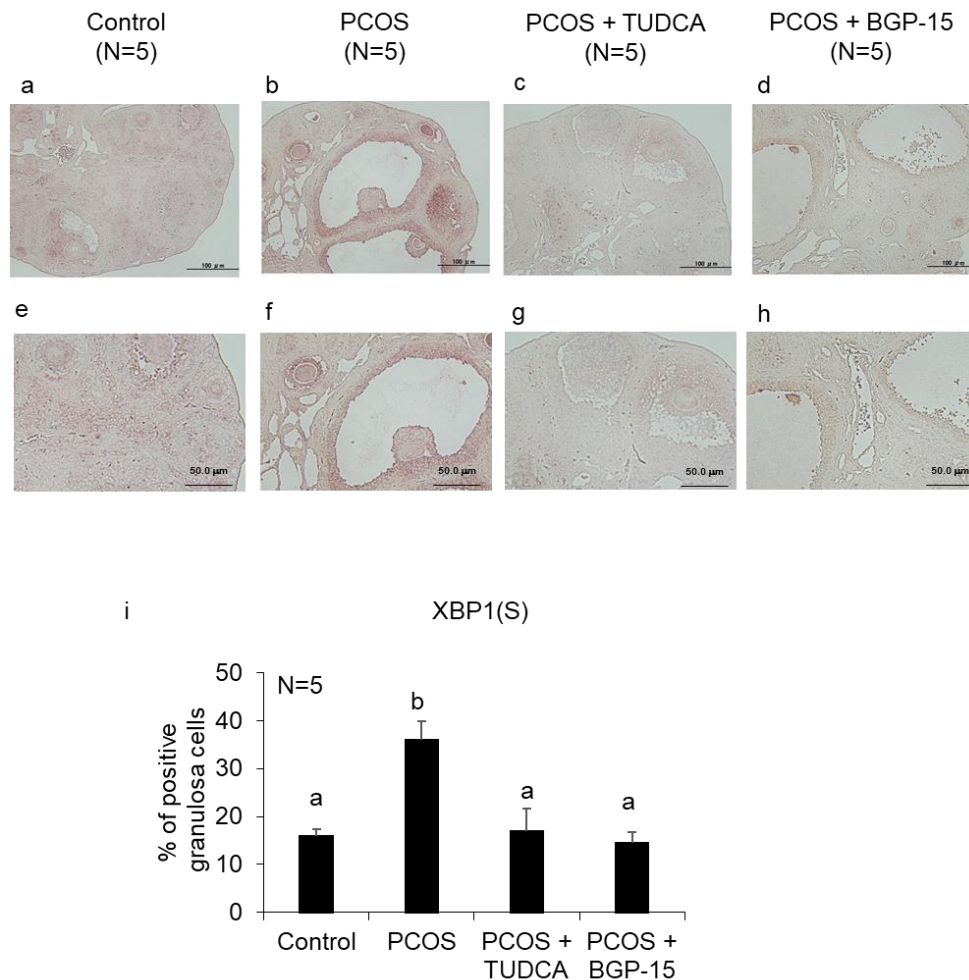


図 14. 小胞体ストレス阻害剤の PCOS マウスにおける卵巣線維化への影響

PCOS マウスに 20 日間 TUDCA または BGP-15 を 20 日間経口投与した。卵巣線維化を Masson's trichrome 染色で評価した(A)。collagen type I、collagen type IV、phospho-IRE1、phospho-PERK、TGF- $\beta$ 1 のタンパク発現を免疫染色で評価した(B-F)。XBP1(S) mRNA 発現を *in situ* hybridization で評価した(G)。a-d は弱拡大、e-h は強拡大、i は定量的評価を示す。異符号間で、 $P < 0.05$  を示す。TUDCA, tauroursodeoxycholic acid。



図 15

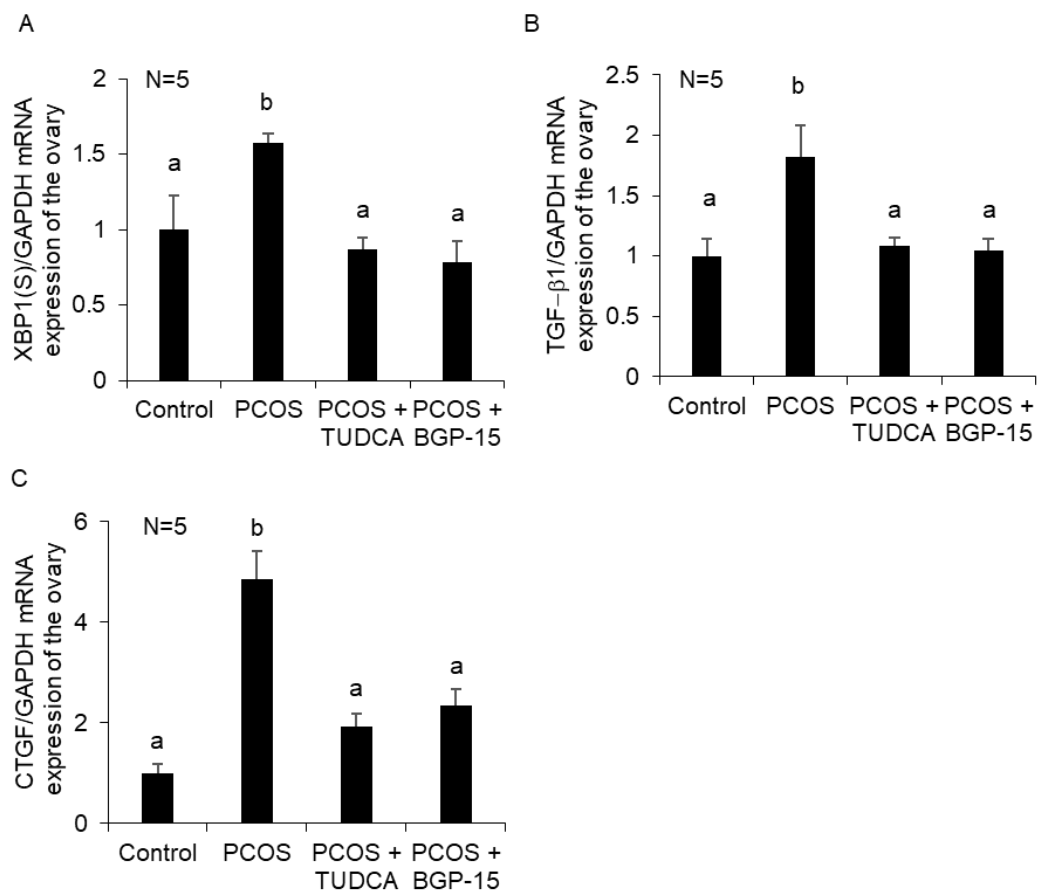


図 15. 小胞体ストレス阻害剤の PCOS マウスの卵巣における mRNA 発現への影響

PCOS マウスに 20 日間 TUDCA または BGP-15 を 20 日間経口投与した。卵巣を回収し、XBP1(S)、TGF-β1、CTGF の mRNA 発現を定量的 PCR で評価した。Internal control として GAPDH を用いた。異符号間で、 $P < 0.05$  を示す。TUDCA, tauroursodeoxycholic acid。

図 16

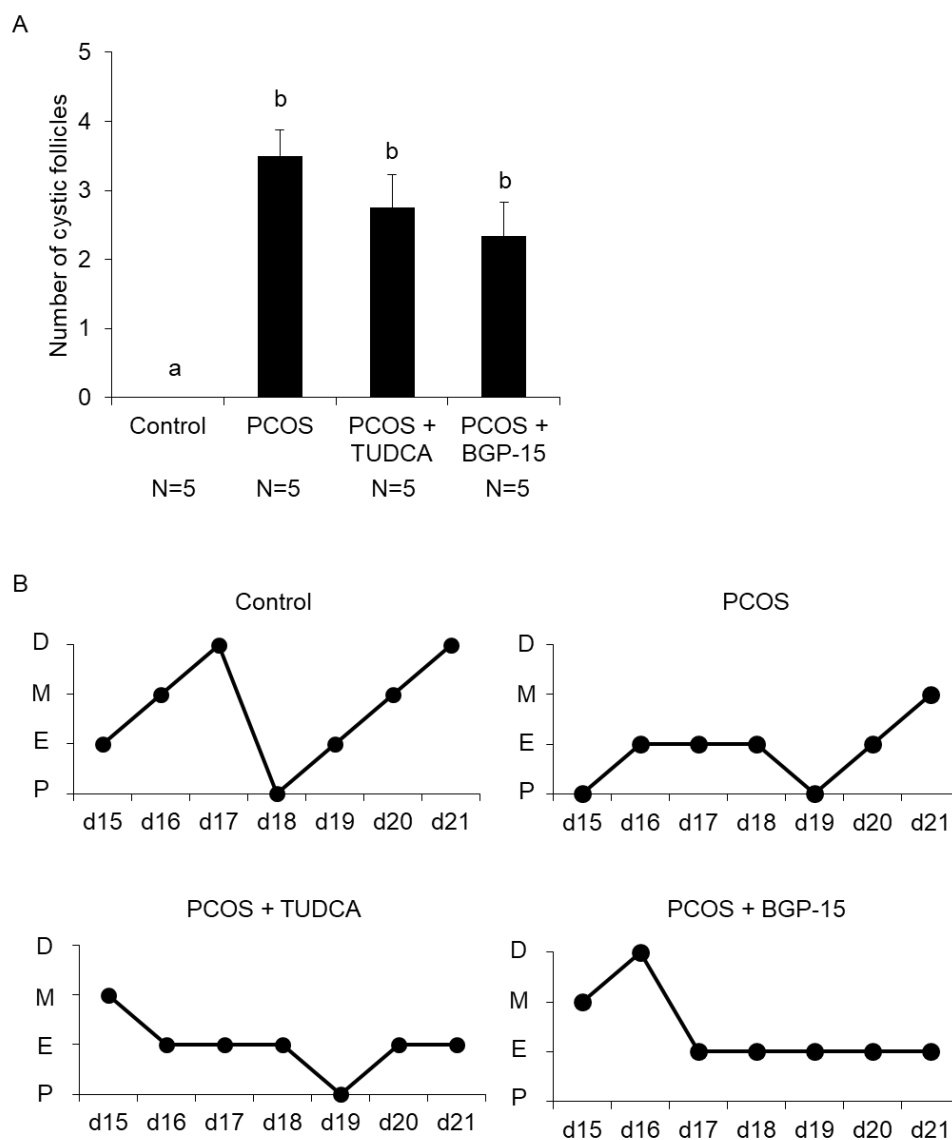


図 16. 小胞体ストレス阻害剤の PCOS マウスにおける卵巢形態・性周期に与える影響

PCOS マウスに 20 日間 TUDCA または BGP-15 を 20 日間経口投与した。A、卵巢最大断面における囊胞状卵胞数を計測した。B、薬物投与後 15 日から 21 日まで、性周期を経腔細胞診で評価した。代表的な性周期変化を示す。異符号間で、 $P < 0.05$  を示す。TUDCA, tauroursodeoxycholic acid、P、発情前期、E、発情期、M、発情後期、D、発情休止期。



図 17

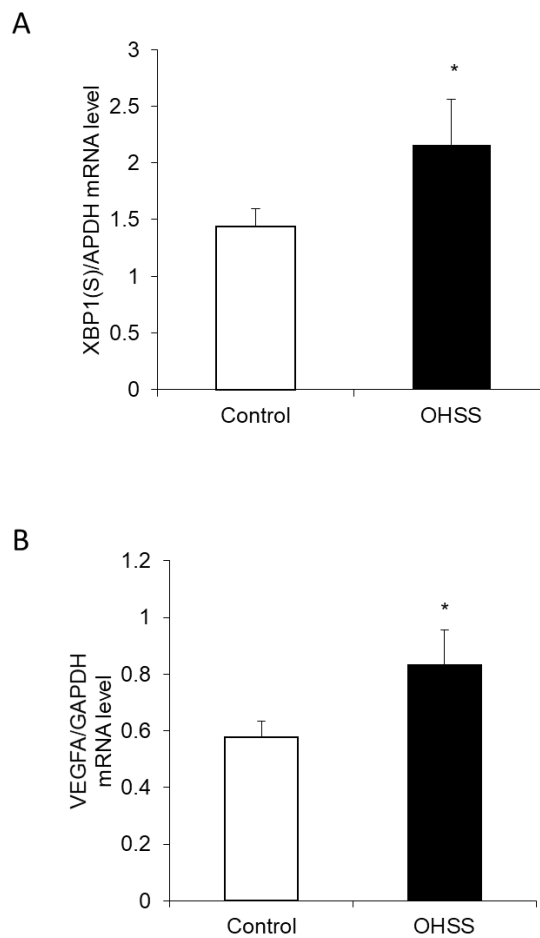


図 17. Control 患者と OHSS 発症患者の卵丘細胞における XBP1(S)、VEGFA mRNA の発現比較

Control 患者 22 人、OHSS 発症患者 9 人の計 31 人より採取した 134 個の卵丘細胞を使用し、XBP1(S)、VEGFA の mRNA 発現を定量的 PCR で評価した。Internal control として GAPDH を用いた。\* $P < 0.05$ 。

図 18

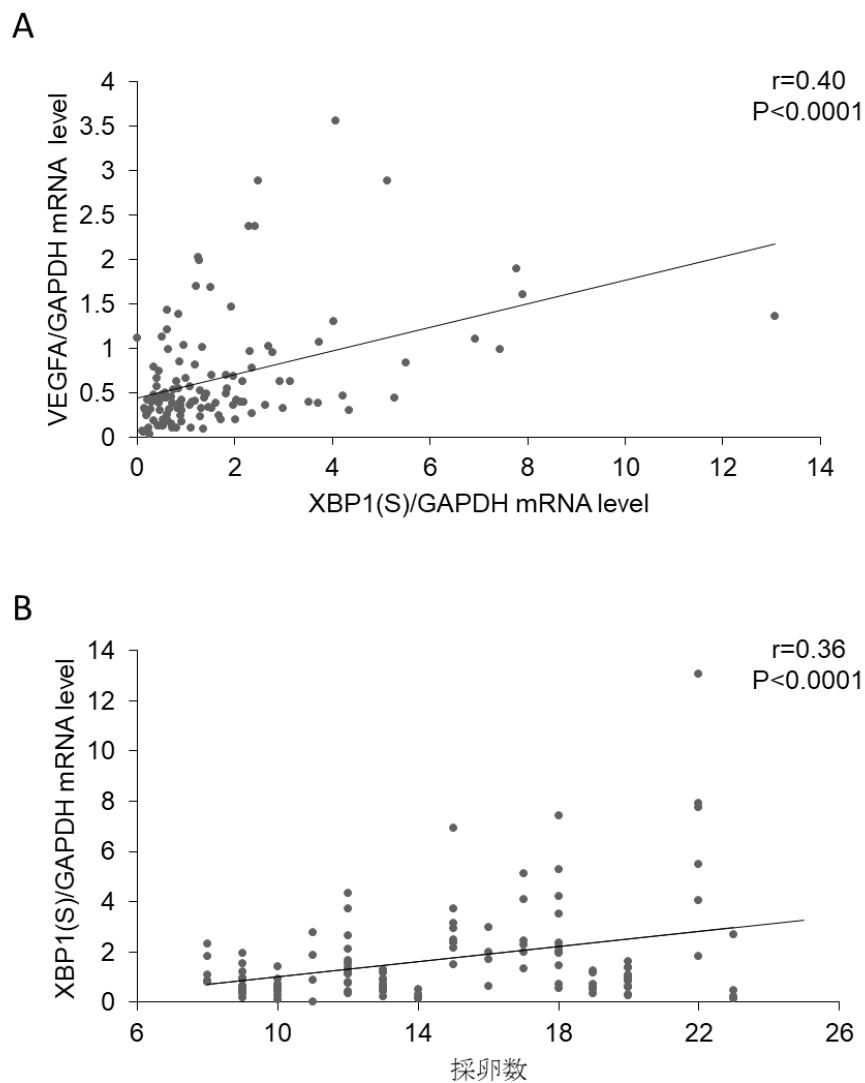


図 18. 卵丘細胞における XBP1(S)と VEGFA mRNA(A)、XBP1(S)と採卵数の相関  
Control 患者 22 人、OHSS 発症患者 9 人の計 31 人より採取した 134 個の卵丘細胞を使用し、XBP1(S)、VEGFA の mRNA 発現を定量的 PCR で評価した。Internal control として GAPDH を用いた。

図 19

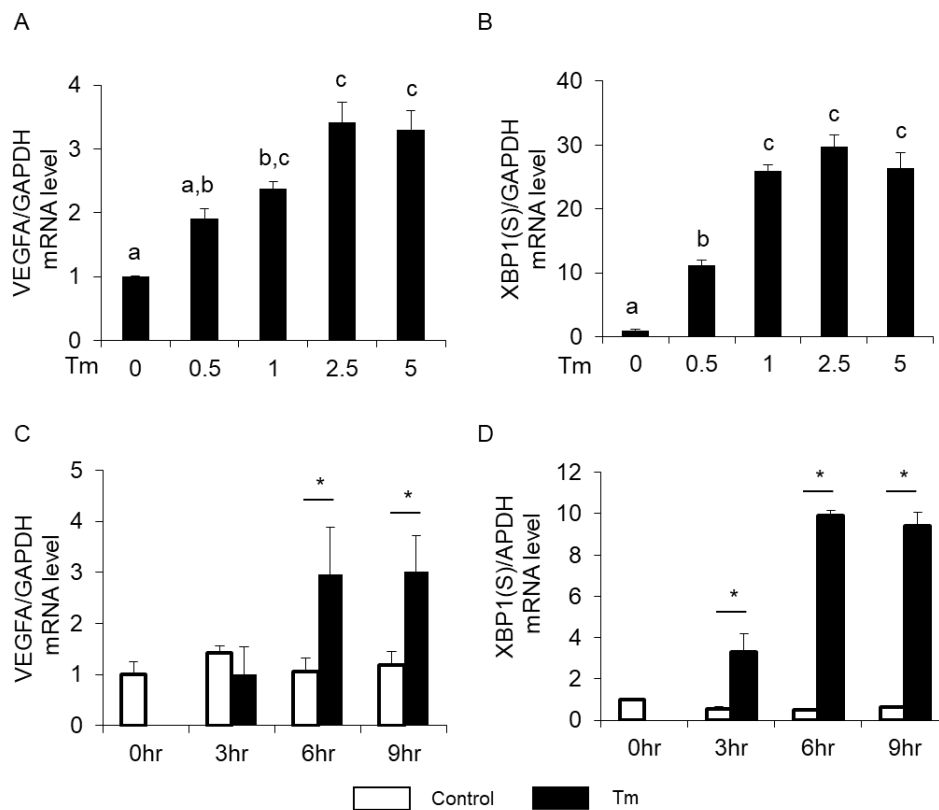


図 19. 小胞体ストレスは VEGFA 発現を誘導する

ヒト GLCs に 0-5  $\mu\text{g/ml}$  tunicamycin を 6 時間(A,B)、2.5  $\mu\text{g/ml}$  tunicamycin を 3-9 時間投与(C,D)し、VEGFA と XBP1(S)の mRNA 発現を定量的 PCR で評価した。Internal control として GAPDH を用いた。異符号間または\*で  $P<0.05$  を示す。Tm, tunicamycin。

図 20

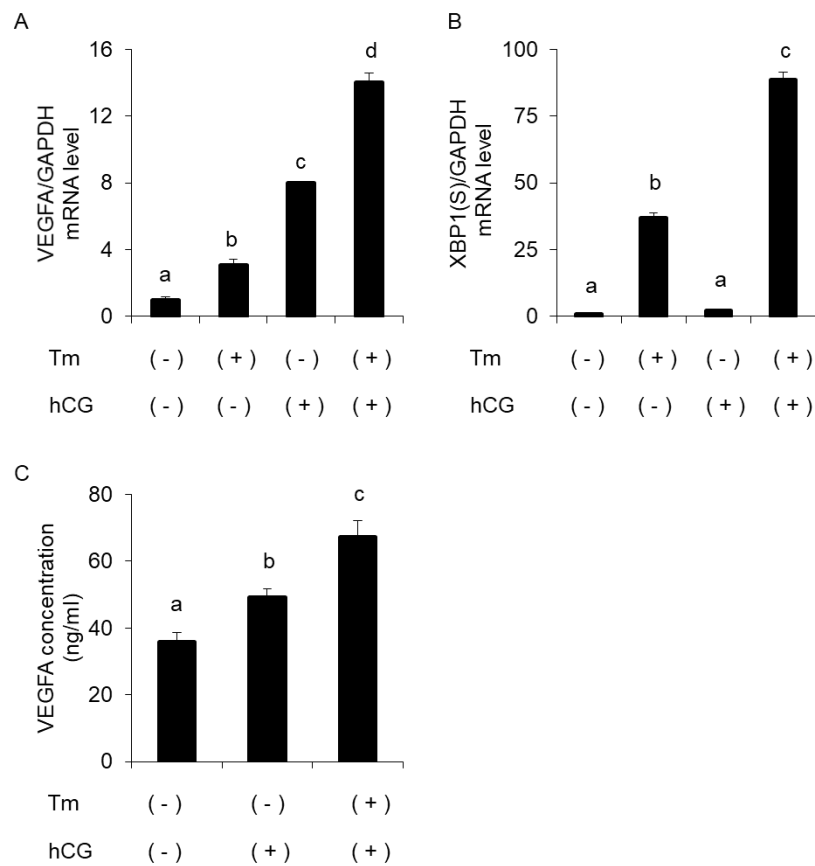


図 20. 小胞体ストレスは hCG 誘導下の VEGFA 発現を増強する

ヒト GLCs に 2.5  $\mu\text{g/ml}$  tunicamycin を 6 時間投与後、10 IU/ml hCG を 6 時間投与する。VEGFA と XBP1(S) の mRNA 発現を定量的 PCR で (A, B)、VEGFA タンパク分泌を ELISA で評価した (C)。Internal control として GAPDH を用いた。異符号間は  $P < 0.05$  を示す。Tm, tunicamycin。

図 21

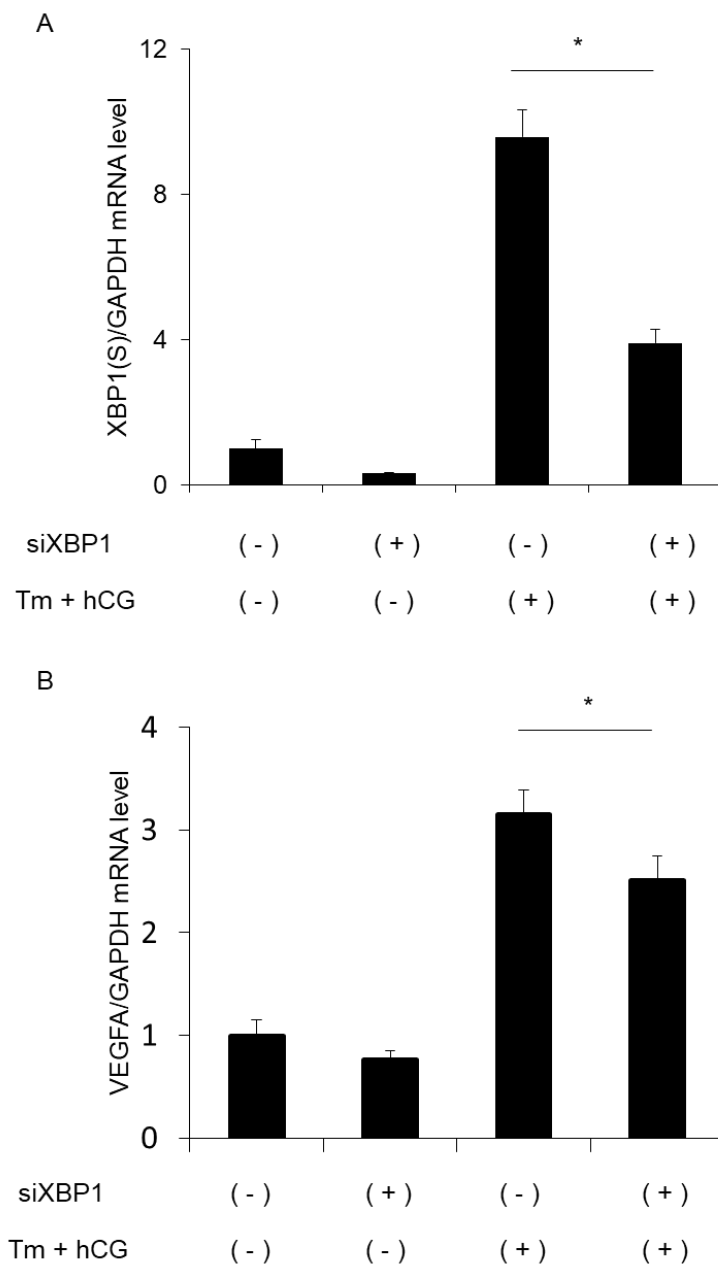


図 21. 小胞体ストレス刺激によるヒト GLCs の VEGFA mRNA 発現には XBP1(S)経路が介在している

ヒト GLCs に XBP1 siRNA 1  $\mu$ M を 72 時間投与後、2.5  $\mu$ g/ml tunicamycin を 6 時間、10 IU/ml hCG を 6 時間投与した。XBP1(S)と VEGFA の mRNA 発現を定量的 PCR で評価した。Internal control として GAPDH を用いた。\* $P < 0.05$ 。Tm, tunicamycin。

図 22

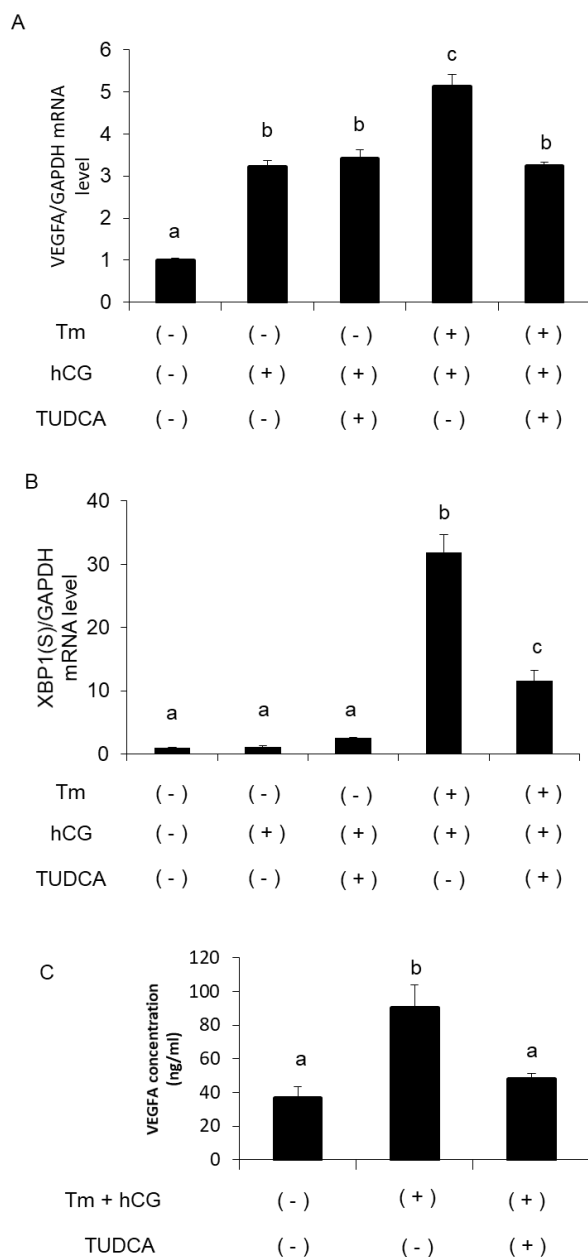


図 22. 小胞体ストレス阻害剤は、ヒト GLCs における小胞体ストレス+hCG 誘導下の VEGF 発現を抑制する

ヒト GLCs に 1 mg/ml TUDCA 投与後、続けて 2.5  $\mu$ g/ml tunicamycin、10 IU/ml hCG を投与した。VEGFA と XBP1(S) の mRNA 発現を定量的 PCR で(A, B)、VEGFA 産生を ELISA で評価した(C)。Internal control として GAPDH を用いた。異符号間には  $P < 0.05$  を示す。Tm, tunicamycin; TUDCA, tauroursodeoxycholic acid。

図 23

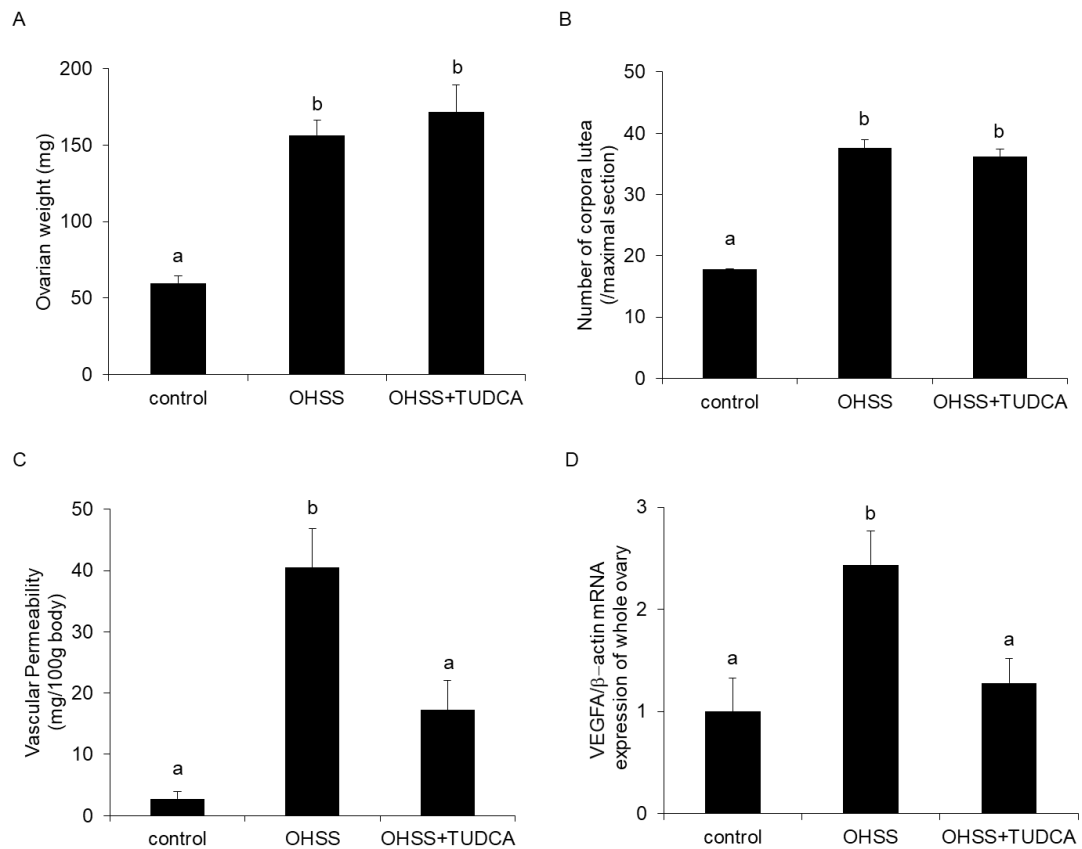


図 23. TUDCA 投与の OHSS ラットへの効果

Control 群では、10 IU PMSG を腹腔内投与後、50 IU hCG を腹腔内投与した。OHSS 群では、10 IU PMSG を 4 日間腹腔内投与後、50 IU hCG を腹腔内投与した。また、OHSS + TUDCA 群では、OHSS ラットに TUDCA を 6 日間腹腔内投与した。hCG 投与 48 時間後、卵巣重量、黄体数、血管透過性を測定し、卵巣における VEGFA mRNA 発現を定量的 PCR で評価した。Internal control として $\beta$ -actin を用いた。異符号間で、 $P < 0.05$  を示す。TUDCA, tauroursodeoxycholic acid。

図 24

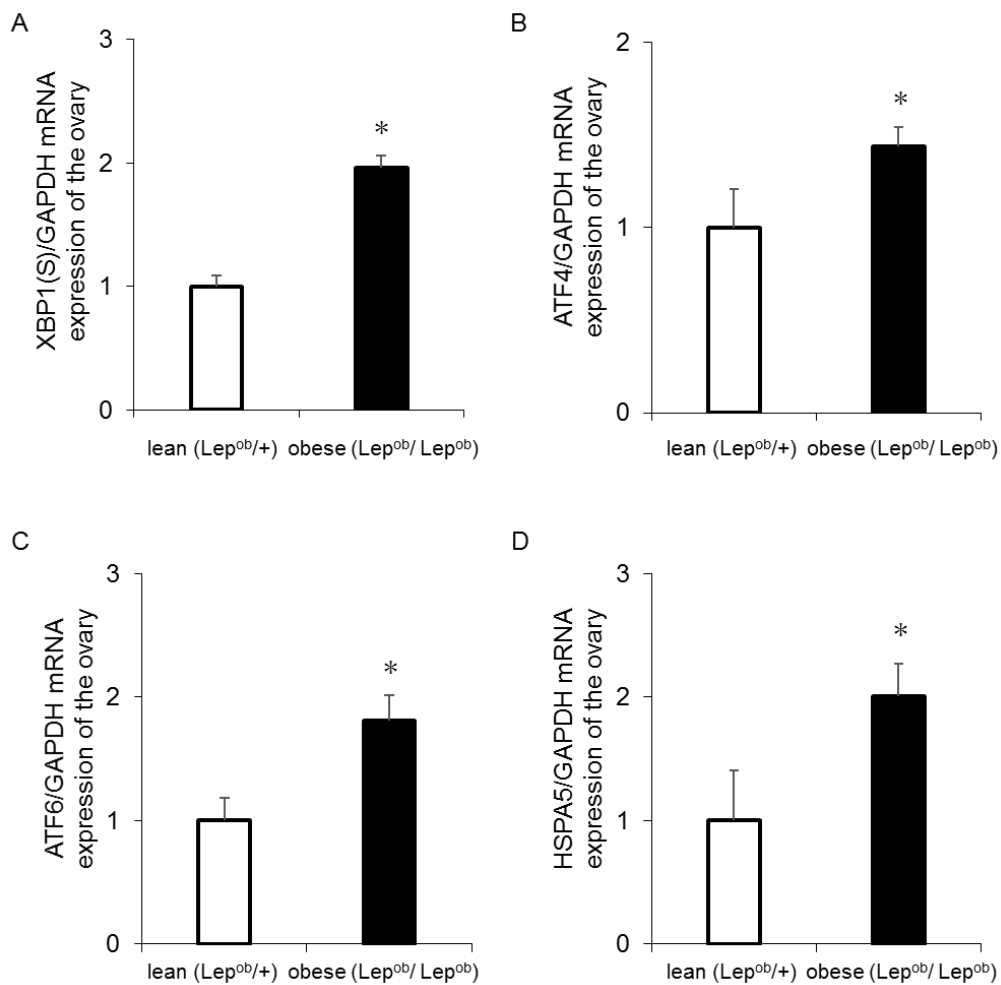


図 24. 肥満マウスの卵巣における小胞体ストレスの活性化

6 週齢の control マウス( $Lep^{ob/+}$ )と Ob/Ob マウス( $Lep^{ob}/Lep^{ob}$ )の卵巣における XBP1(S)、ATF4、ATF6、HSPA5 mRNA の発現を定量的 PCR で評価した。Internal control として GAPDH を用いた。\* $P < 0.05$ 。



図 25

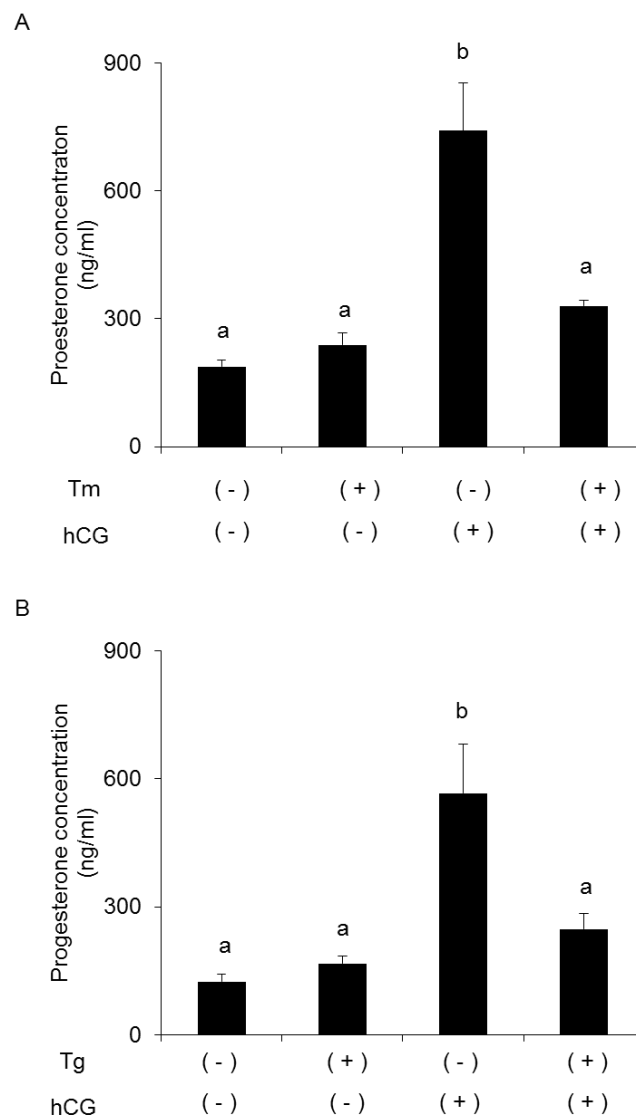


図 25. ヒト GLCs において、小胞体ストレスは hCG 誘導下の progesterone 分泌を抑制する

ヒト GLCs に 2.5  $\mu\text{g/ml}$  Tm または 1  $\mu\text{M}$  Tg を 6 時間投与後、10 IU/ml を 18 時間投与した。細胞上清中の progesterone 濃度を EIA で評価した。異符号間で、 $P < 0.05$  を示す。Tg, thapsigargin; Tm, tunicamycin。

図 26

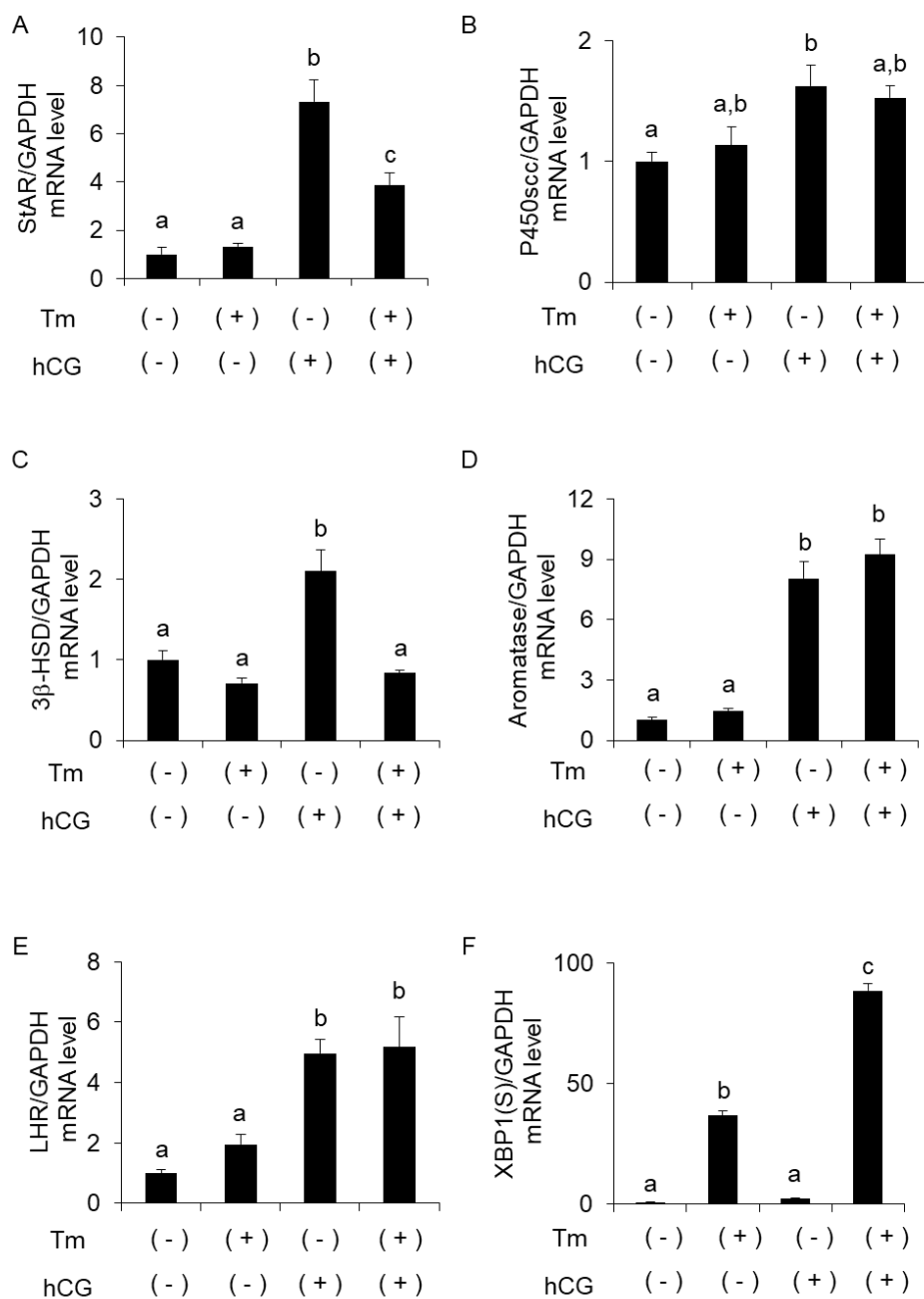


図 26. ヒト GLCs における小胞体ストレスの hCG 誘導下の progesterone 合成酵素 mRNA への影響

ヒト GLCs に 2.5  $\mu\text{g/ml}$  Tm を 6 時間投与後、10 IU/ml hCG を 6 時間投与した。StAR、P450scc、3 $\beta$ -HSD、aromatase、LHR、XBP1(S) mRNA 発現を定量的 PCR で評価した。Internal control として、GAPDH を用いた。異符号は  $P < 0.05$  を示す。Tm, tunicamycin。

図 27

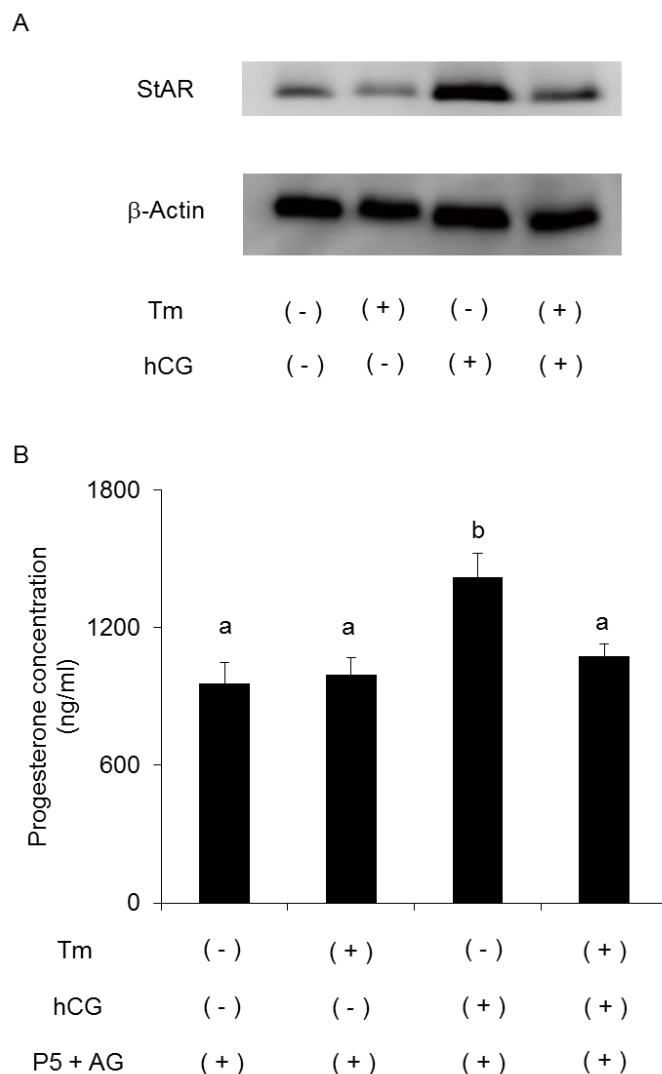


図 27. ヒト GLCs において、小胞体ストレスは StAR タンパクと 3 $\beta$ -HSD の酵素活性を抑制する

A, ヒト GLCs に 2.5  $\mu$ g/ml Tm を 6 時間投与後、hCG を 18 時間投与し、StAR タンパク発現を Western blot で評価した。Internal control とし  $\beta$ -actin を用いた。B, 3 $\beta$ -HSD は P450<sub>scc</sub> により合成された P5 を基質として progesterone を合成する酵素であるため、pregnenolone と P450<sub>scc</sub> の阻害剤(AG)を投与した後に、progesterone 産生を測定することで 3 $\beta$ -HSD 酵素活性を評価した。AG と P5 を投与後、Tm、hCG を投与し、progesterone 濃度を EIA で測定した。異符号は  $P < 0.05$  を示す。Tm, tunicamycin; P5, pregnenolone; AG, aminoglutethimide。

図 28

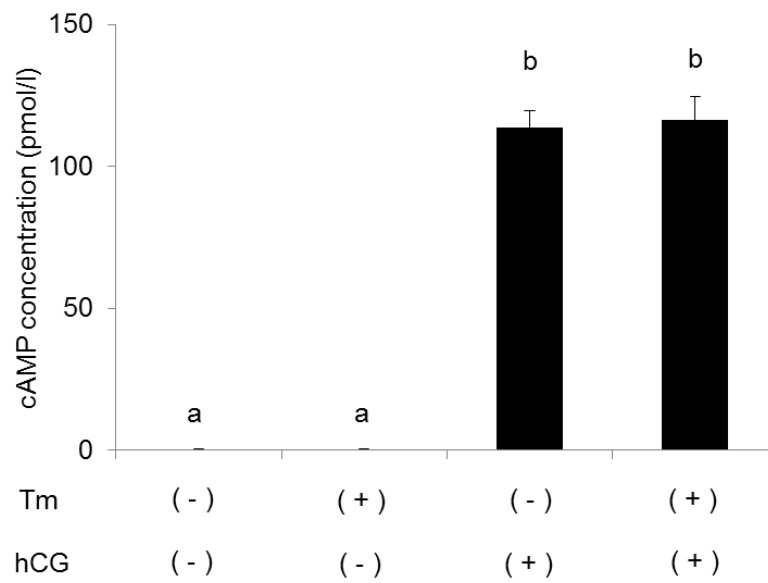


図 28. ヒト GLCs における小胞体ストレスの hCG 誘導下の細胞内 cAMP 濃度への影響

ヒト GLCs に 2.5  $\mu\text{g/ml}$  Tm を 6 時間投与後、10 IU/ml hCG を 60 分間投与し、細胞内 cAMP 濃度を ELISA で評価した。異符号は  $P < 0.05$  を示す。Tm, tunicamycin。

図 29

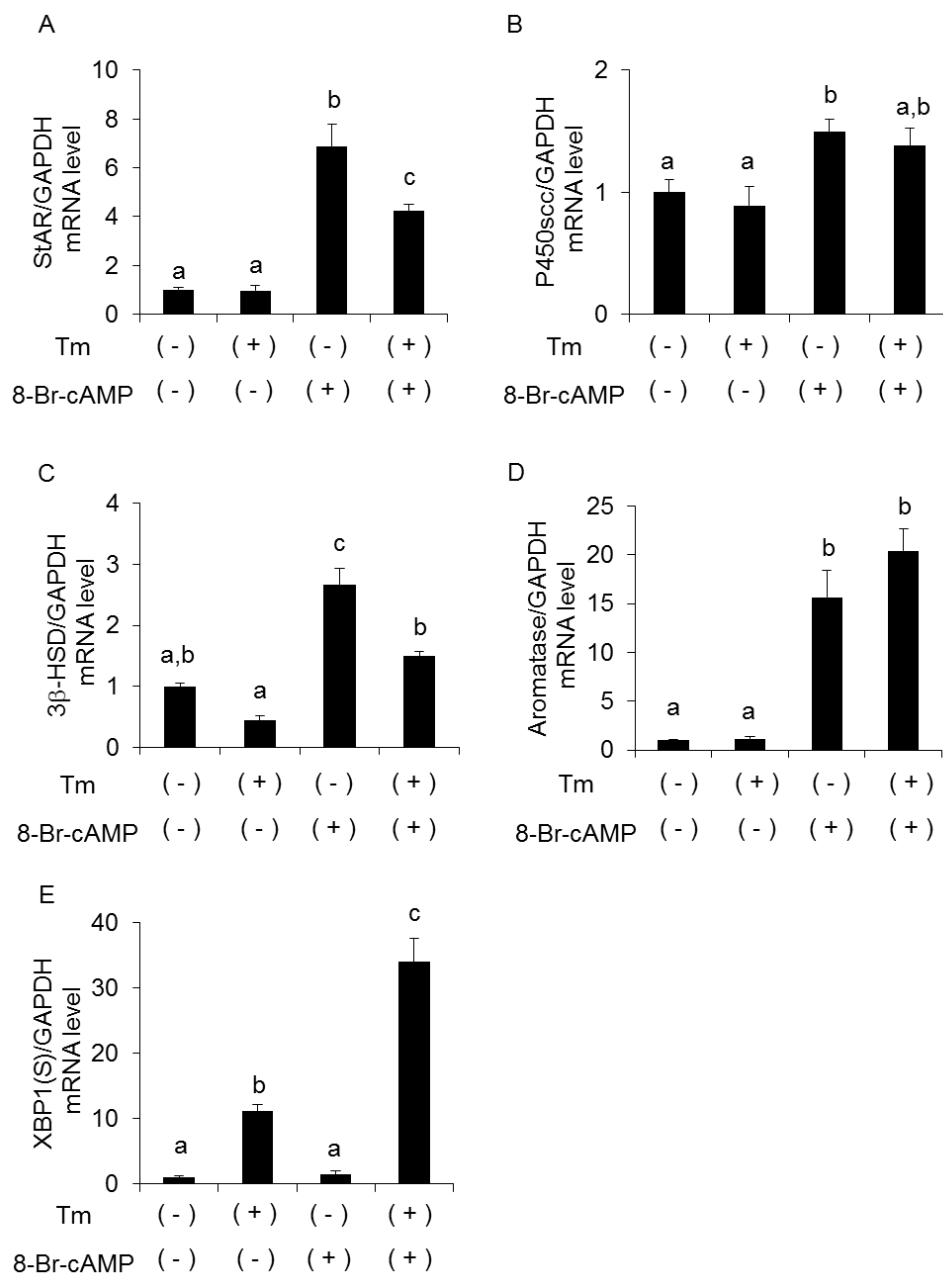


図 29. ヒト GLCs における小胞体ストレスの hCG 誘導下の progesterone 合成酵素 mRNA への影響

ヒト GLCs に 2.5  $\mu\text{g/ml}$  Tm を 6 時間投与後、1mM 8-bromo-cAMP(8-Br-cAMP) を 6 時間投与した。StAR、P450scc、3 $\beta$ -HSD、aromatase、XBP1(S) mRNA 発現を定量的 PCR で評価した。Internal control として、GAPDH を用いた。異符号は  $P < 0.05$  を示す。Tm, tunicamycin。

図 30

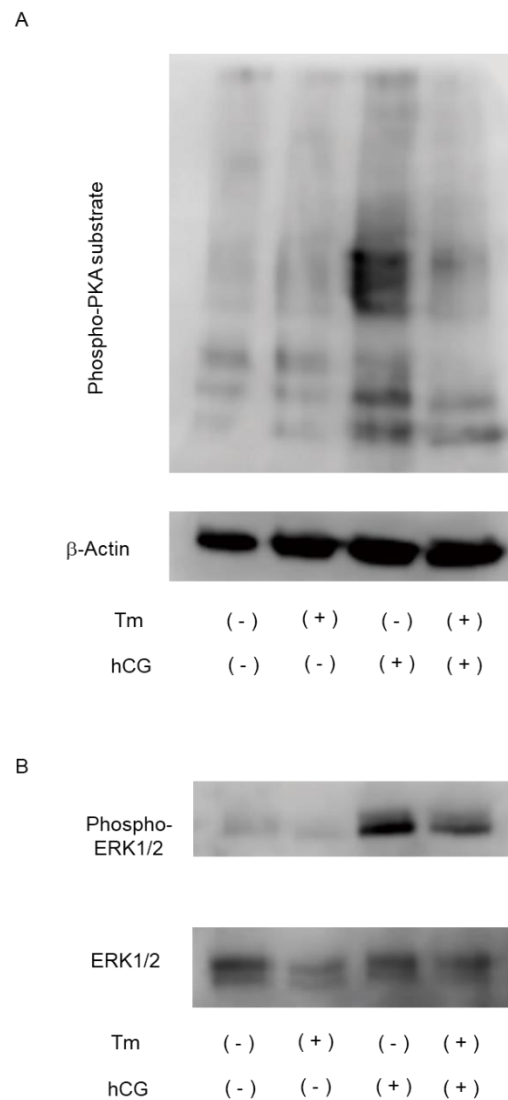


図 30. ヒト GLCs における小胞体ストレスの hCG 誘導下の PKA、ERK1/2 への影響  
ヒト GLCs に 2.5  $\mu\text{g/ml}$  Tm を 6 時間投与後、10 IU/ml hCG を 10 分(B)または 60 分間(A) 投与した。PKA のリン酸化、ERK1/2 のリン酸化を Western blot で評価した。Internal control とし  $\beta$ -actin を用いた(A)。異符号は  $P < 0.05$  を示す。Tm, tunicamycin。

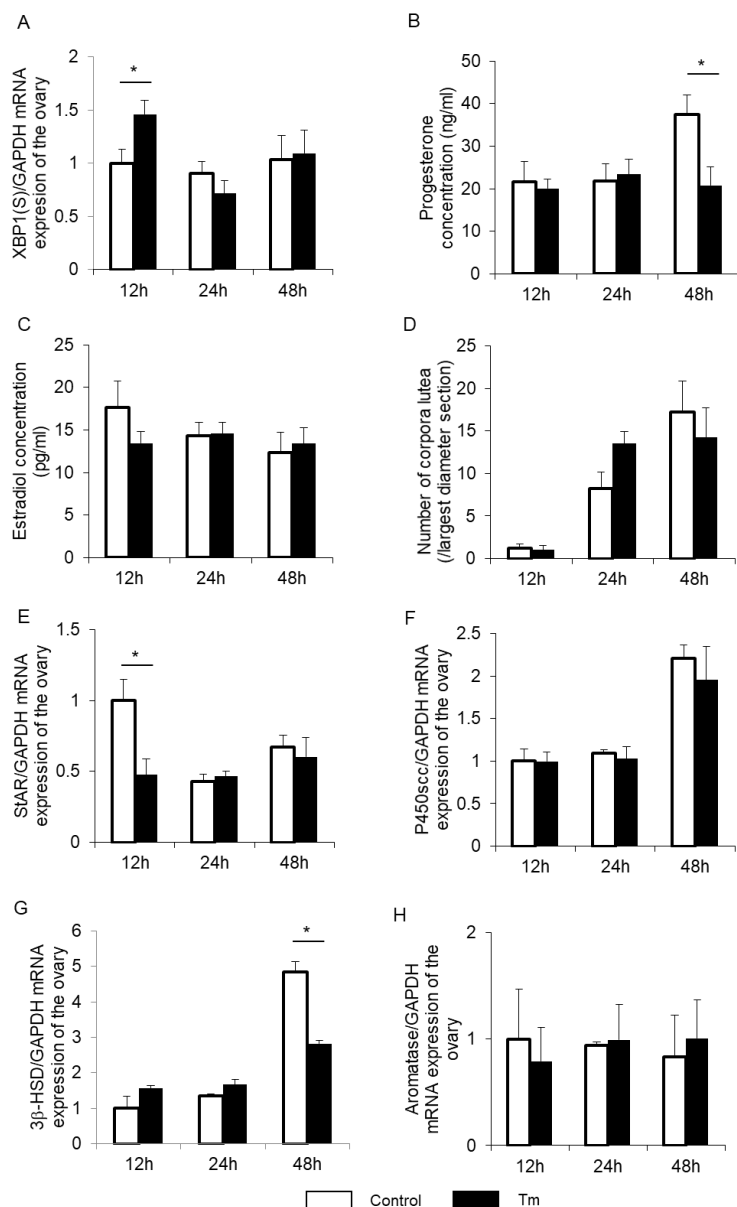


図 31. マウスモデルにおける小胞体ストレスの progesterone 分泌への影響

3 週齢雌マウスを用いて、Control 群は day1 に 15 IU PMSG、day3 に 15 IU hCG を腹腔内投与した。Tm 群は、PMSG-hCG 投与に加えて、day2 に 1.0  $\mu$ g Tm を腹腔内投与した。hCG 投与 12、24、48 時間後の卵巣における XBP1(S)、3 $\beta$ -HSD、P450scc、StAR、aromatase の mRNA 発現を定量的 PCR(A,E-H)で、血清 progesterone・estradiol 濃度を ELISA(B,C)で、卵巣最大割面における黄体数(D)を評価した。\*P<0.05。Tm, tunicamycin。

図 32

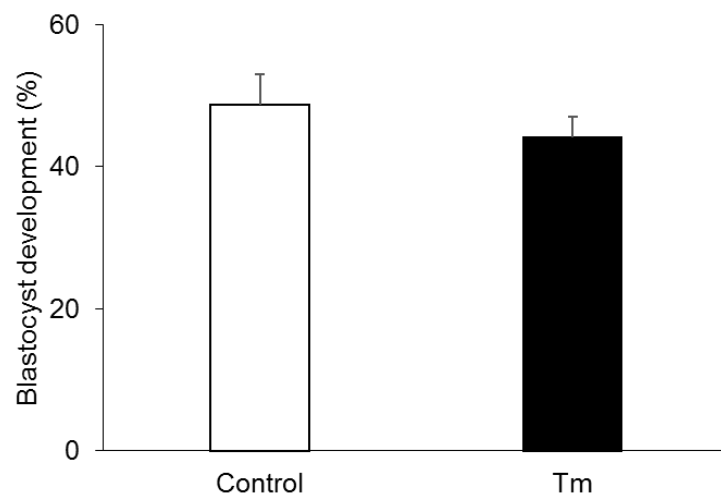


図 32. マウスモデルにおける小胞体ストレスの胚盤胞達成率への影響

3 週齢雌マウスを用いて、Control 群は day1 に 15 IU PMSG、day3 に 15 IU hCG を腹腔内投与した。Tm 群は、PMSG-hCG 投与に加えて、day2 に 1.0  $\mu\text{g}$  Tm を腹腔内投与した。hCG 投与 12 時間後に雄マウスと交配させ、膣栓を認めた日を day1 とし、day4 に子宮内の胚盤胞数を評価した。Tm, tunicamycin。



図 33

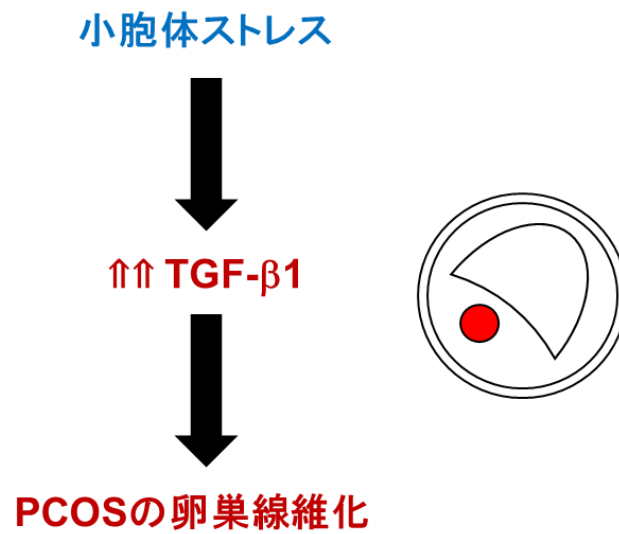


図 33. 小胞体ストレスの活性化による PCOS の卵巣線維化の機序

卵巣における小胞体ストレスの活性化により、顆粒膜細胞における TGF-β1 の発現が亢進し、PCOS における卵巣の線維化を来たす。

図 34

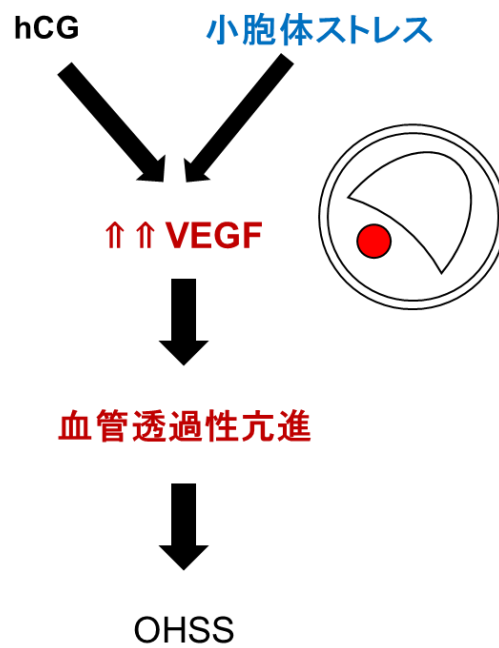


図 34. 小胞体ストレスの活性化による OHSS 発症機序

小胞体ストレスの活性化により、hCG で誘導される VEGF が過剰発現し、血管透過性の亢進を来し、OHSS を引き起こす。

図 35

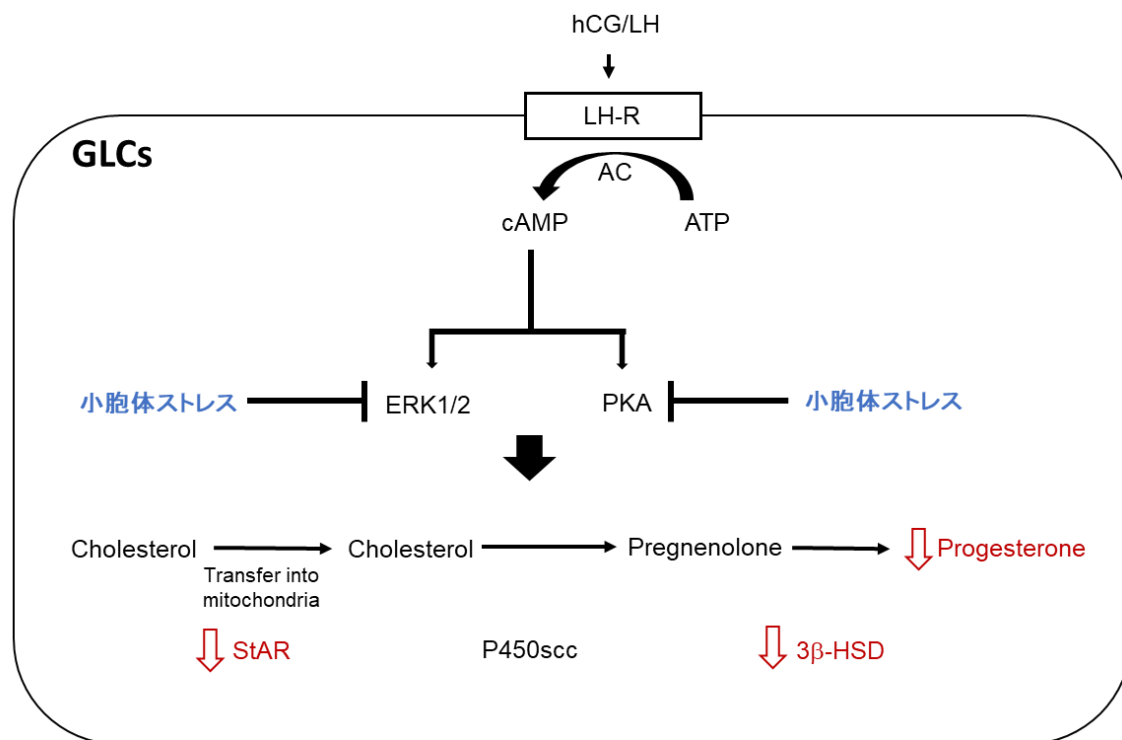


図 35. 小胞体ストレスの progesterone 産生経路への影響

小胞体ストレスによって、hCG/LH で誘導される PKA、ERK1/2 のリン酸化を抑制し、StAR と 3β-HSD の発現を抑制し、GLCs における progesterone 分泌を抑制する。

図 36

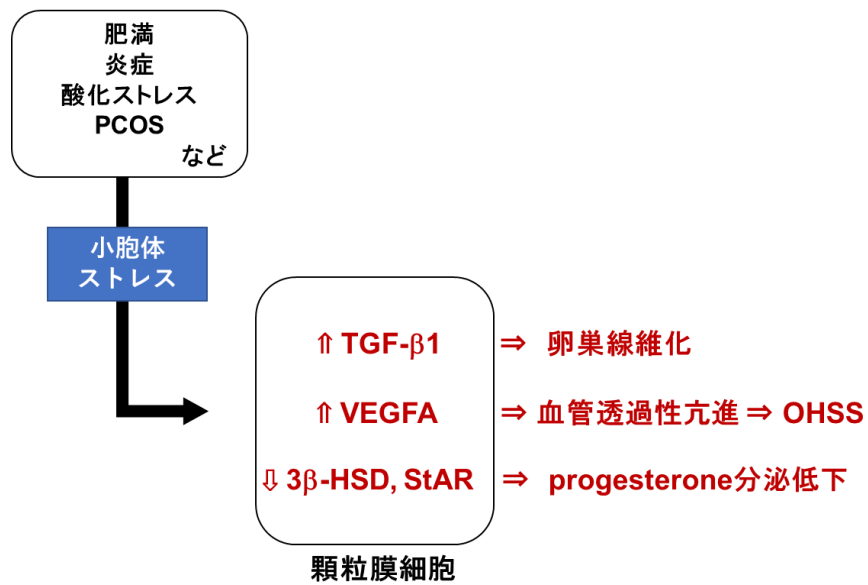


図 36. 小胞体ストレスの卵巣病態における役割

肥満状態、炎症、酸化ストレス、PCOSなどの局所環境によって小胞体ストレスは活性化し、顆粒膜細胞の機能へ影響を与え、卵巣の各種病態を引き起こす。

表 1. プライマーリスト

遺伝子	Forward Primer 5'- 3'	Reverse Primer 5'- 3'
human XBP1(S)	TGCTGAGTCCGCAGCAGGTG	GCTGGCAGGCTCTGGGGAAG
human HSPA5	CGAGGAGGAGGACAAGAAGG	CACCTTGAACGGCAAGAAGT
human ATF4	GGCTGGCTGTGGATGGGTTG	CTCCTGGACTAGGGGGGCAA
human ATF6	TCAGACAGTACCAACGCTTATGC	GTTGTACCACAGTAGGCTGAGA
human CHOP	GGAGAACCAGGAAACGGAAAC	TCTCCTTCATGCGCTGCTTT
human TGF- $\beta$ 1	GGCCAGATCCTGTCCAAGC	GTGGGTTTCCACCATTAGCAC
human CTGF	CAGCATGGACGTTCTGTCTG	AACCACGGTTTGGTCCTTGG
human VEGFA	AAGATCCGCAGACGTGTAAATGTT	CGGCTTGTCACATCTGCAAGTA
human StAR	AAGGACGAAGAACCACCCTT	CAGCCCTCTTGGTTGCTAAG
human P450scc	CAGGAGGGGTGGACACGAC	AGGTTGCGTGCCATCTCATAC
human 3 $\beta$ -HSD	GCCTTCAGACCAGAATTGAGAGA	TCCTTCAAGTACAGTCAGCTTGGT
human aromatase	TCACTGGCCTTTTTCTCTTGGT	GGGTCCAATTCCCATGCA
human LHR	GGTCTCACTCGACTATCACTTGC	CTCCGGGCTCAATGTATCTCA
human GAPDH	GGACCTGACCTGCCGTCTA	CTGCTTCAACCACTTCTTGA
mouse XBP1(S)	GCTGAGTCCGCAGCAGGTGC	CATGACAGGGTCCAACCTTGTCCAG
mouse TGF- $\beta$ 1	CCACCTGCAAGACCATCGAC	CTGGCGAGCCTTAGTTTGGAC
mouse CTGF	GGCCTCTTCTGCGATTTCTG	GCAGCTTGACCCTTCTCGG
mouse HSPA5	GACATTTGCCCCAGAAGAAA	CTCATGACATTAGTCCAGCA
mouse ATF4	CCTTCGACCAGTCGGGTTTG	CTGTCCCGAAAGGCATCC
mouse ATF6	TCGTGTTCTTCAACTCAGCAC	TGGAGTCAGTCCATGTTCTGT
mouse StAR	CGGGTGGATGGGTCAAGTTC	GCACTTCGTCCCCGTTCTC
mouse P450scc	AGGTCCTTCAATGAGATCCCTT	TCCCTGTAAATGGGGCCATAC
mouse 3 $\beta$ -HSD	AGCTCTGGACAAAGTATTCCGA	GCCTCCAATAGGTTCTGGGT
mouse aromatase	AACCCCATGCAGTATAATGTCAC	AGGACCTGGTATTGAAGACGAG
mouse GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
rat VEGFA	CAGCTATTGCCGTCCAATGA	CCAGGGCTTCATCATTGCA
rat $\beta$ -actin	AGGGAAATCGTGCGTGACA	AAACCGCTCATTGCCGATAGT

表 2. Control 患者と PCOS 患者の患者背景

	<b>Control (N=10)</b>	<b>PCOS (N=11)</b>	<b>p-value</b>
年齢 (歳)	36 (34-43)	34 (29-41)	0.0661
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	19.3 (18.6-21.2)	19.3 (16.7-20.9)	0.7237
採卵数	7 (5-12)	12 (3-21)	0.0828
排卵誘発方法	クロミフェン:1 short法:2 Antagonist法:7	hMG:1 short法:1 long法:1 Antagonist法:8	0.6626
LH (mIU/mL)	3.85 (2.3-6.5)	9.9 (2.2-20.6)	<b>0.0002</b>
FSH (mIU/mL)	8.55 (4.4-16.3)	6.4 (4.3-10)	0.1415
LH/FSH	0.45 (0.34-0.92)	1.32 (0.43-3.38)	<b>0.0002</b>
Estradiol (pg/mL)	29.7 (18.0-45.7)	39.7 (16.0-68.7)	0.1547
PRL (ng/mL)	10.0 (7.3-26.6)	10.0 (5.0-41.1)	0.5669
AMH (ng/mL)	2.56 (0.1-3.0)	6.32 (3.7-17.0)	<b>0.0002</b>

Median (range)

AMH: anti-Müllerian hormone, BMI: body mass index, FSH: follicle stimulating hormone,  
LH: luteinizing hormone, PRL: prolactin