

論文の内容の要旨

論文題目 卵巣病態における卵巣局所因子小胞体ストレスの役割

氏名 國富 千智

正常な妊娠において、良好な卵子を得るためには卵巣の局所環境は重要である。卵子は原始卵胞から成熟卵胞へと発育していくが、全て卵巣内で起こる事象であり、卵子は卵巣の局所環境の影響を受けるため、正常な卵巣の局所環境は必須である。卵巣の局所環境が悪化する要因としては加齢以外に、子宮内膜症や多嚢胞性卵巣症候群(polycystic ovary syndrome; PCOS)などの卵巣疾患の合併も挙げられる。

近年、新たに認識された卵胞微小環境における局所因子として小胞体ストレスがある。小胞体はタンパク質合成・成熟の場であり、タンパク質を折りたたみ、立体構造を作成する。しかし、何らかの要因でタンパク質の折りたたむ負荷と折りたたむ能力との間に不均衡が生じると、小胞体に変形した未熟なタンパク質が蓄積する。この状態は小胞体ストレスと呼ばれ、生理学および病理学的に様々な状態で誘発される。小胞体ストレスは、小胞体ストレス応答(unfolded protein response; UPR)と呼ばれる一連の伝達経路を活性化する。最近の研究では、UPR が糖尿病や神経変性疾患など多くの疾患発症に関わっていることが明らかになっている。小胞体ストレスは、酸化ストレスや炎症など様々な生理機能にも作用している。これまでに、成長期の卵胞の顆粒膜細胞では小胞体ストレスが活性化されており、顆粒膜細胞で活性化された小胞体ストレスが細胞機能を制御することで、卵巣過剰刺激症候群、肥満に起因するプロゲステロン欠乏症、終末糖化産物に起因する卵子の発育不全など、様々な病態に関与していることが明らかになっている。今回、子宮内膜症と PCOS それぞれの卵巣における小胞体ストレスの影響について検証した。

子宮内膜症は生殖年齢女性の 6-10%にみられ、卵巣の生理機能に悪影響を及ぼし、卵胞の健康を損なう。しかしその機序はまだ不明な点も多い。卵巣皮質にある閉鎖卵胞の割合は子宮内膜症性卵巣嚢胞のある卵巣では増加しており、前胞状卵胞期以降の閉鎖卵胞は顆粒膜細胞のアポトーシスに関与している。子宮内膜症患者の顆粒膜細胞は、アポトーシスの増加と高い酸化ストレスを特徴とする。小胞体ストレスは、酸化ストレスと密接に関連しており、近年、卵巣機能の重要な制御因子として浮上している。本研究 1 では、子宮内膜症性卵巣嚢胞のある卵巣の顆粒膜細胞において、増加した酸化ストレスにより小胞体ストレスが活性化され、これが酸化ストレスによるアポトーシスを媒介するという仮説を立てた。

この仮説を検証するため、まず子宮内膜症性卵巣嚢胞のある卵巣の顆粒膜細胞におけるアポトーシスと酸化ストレスの状態を評価した。子宮内膜症性卵巣嚢胞のある患者の卵巣切片を TUNEL 染色と抗 8-OHdG 抗体を用いて免疫組織化学染色を施行した。共に子宮内膜症性卵巣嚢胞のある群で染色陽性細胞の割合が control 群よりも高かった。次に子宮内膜

症性卵巣嚢胞のある患者の黄体化顆粒膜細胞(granulosa-lutein cells: GLCs)における小胞体ストレスの活性化を調べた。UPR 関連遺伝子である *ATF4*, *ATF6*, *HSPA5*, *sXBP1*, *CHOP* mRNA を qPCR で評価したところ、子宮内膜症性卵巣嚢胞のある群で全ての発現上昇を認めた。また免疫組織化学染色では、リン酸化された小胞体ストレスセンサータンパク質である IRE1 と PERK の発現レベルが子宮内膜症性卵巣嚢胞のある群で増加していた。小胞体ストレスは、小胞体ストレスセンサータンパク質のリン酸化や UPR 因子の誘導を引き起こすことから、これらの細胞は小胞体ストレス下にあったと考えられる。

さらに *in vitro* 実験にて、培養 GLCs を酸化ストレス誘発剤である H_2O_2 で刺激すると、UPR 関連遺伝子の mRNA 発現を増加させた。この効果は H_2O_2 刺激の前に、臨床的に使用されている小胞体ストレス阻害剤である tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) で刺激することで減弱した。また H_2O_2 刺激によりアポトーシスを起こした細胞は増加し、アポトーシス促進因子である caspase-8 と caspase-3 の mRNA 発現と活性の両方も上昇を認めた。これらの結果もまた、TUDCA により減弱された。

以上の結果より、子宮内膜症性卵巣嚢胞のある患者の卵巣に存在する顆粒膜細胞では、高い酸化ストレスによって活性化された小胞体ストレスが、これらの細胞のアポトーシスを媒介し、卵巣機能低下を引き起こすことが示唆された。

次に、PCOS は生殖年齢女性の 6~20% が罹患し、月経異常や排卵障害を来す。さらに高アンドロゲン状態や肥満、男性化など多様な臨床症状と病態生理が特徴である。これまで PCOS で小胞体ストレスが活性化していることは明らかとなっているが、その病態生理における役割はまだ十分に解明されていない。

近年の研究では、内分泌攪乱化学物質(endocrine-disrupting chemicals; EDC)の受容体として確立されている aryl hydrocarbon receptor(AHR)が、EDC 受容体としての活性とは独立して、多様な遺伝子の発現を制御し、様々な代謝、発生、病理学的プロセスを含む細胞の恒常性と疾患に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。一般的に EDC が AHR に結合すると、AHR は細胞質から核に移動し、パートナーである aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)と二量体を形成する。そして、生体異物代謝に関わる遺伝子の一つである cytochrome P450 1B1 (CYP1B1)を含む AHR 標的遺伝子を活性化する。しかし最近、AHR の発現およびその下流シグナルの活性化は、EDC が存在しない状態でも、成長因子やホルモンなどの様々な刺激によって制御されていることが明らかになった。これらの知見に基づき本研究 2 では、顆粒膜細胞の小胞体ストレスによって AHR の発現とその下流シグナルの活性化が増加し、EDC の存在とは無関係に PCOS の病態に寄与しているという仮説を立てた。

この仮説を検証するために、PCOS 患者および dehydroepiandrosterone(DHEA)誘発 PCOS モデルマウスの顆粒膜細胞における AHR, ARNT, および CYP1B1 の発現を測定した。AHR 下流シグナルの活性化を評価するために、代表的な AHR 標的遺伝子として CYP1B1 を選択した。PCOS 患者および PCOS モデルマウスの卵巣切片を用いて免疫組織化学染色を施行し

た結果、これらは PCOS 群での発現上昇を認めた。*In vitro* 実験において、培養 GLCs を小胞体ストレス誘導剤である tunicamycin で刺激すると、AHR と ARNT の発現が亢進し、さらに CYP11B1 の発現と活性の上昇を認めた。この効果は siRNA を用いて *AHR* をノックダウンすると減弱した。この結果より、小胞体ストレスによる CYP11B1 の活性増加において AHR が媒介していることが明らかとなった。また、PCOS モデルマウスにおいて、AHR アンタゴニストが、発情周期と閉鎖卵胞形成に及ぼす *in vivo* の影響、および顆粒膜細胞における AHR と CYP11B1 の発現を評価した。その結果、AHR アンタゴニスト投与群では発情周期が改善し閉鎖卵胞の数が減少した。また、卵巣の顆粒膜細胞における AHR と CYP11B1 の発現量も減少した。以上の結果より、卵胞の微小環境で小胞体ストレスにより活性化された AHR が PCOS の病態に関与していることが示唆された。

卵子において卵胞の微小環境は重要であり、今回局所環境因子の一つである小胞体ストレスに着目した。生殖年齢女性において罹患率が高く、また不妊の要因となる子宮内膜症と PCOS における小胞体ストレスの役割について検証した。子宮内膜症性卵巣嚢胞のある卵巣の顆粒膜細胞では、小胞体ストレスが酸化ストレス誘発アポトーシスを媒介しており、小胞体ストレスを制御することでアポトーシスが減少することを明らかにした。また PCOS においては、小胞体ストレスによる AHR の活性化が病態形成に影響をしていることを明らかにした。子宮内膜症と PCOS において、小胞体ストレスが卵巣の局所環境に影響を与えており、小胞体ストレス阻害剤を用いたホルモン非依存性の新たな治療戦略の可能性が示唆された。