

審査の結果の要旨

氏 名 小池 洋

多嚢胞性卵巣症候群(polycystic ovary syndrome, PCOS)は、生殖年齢女性で最も頻度が高い内分泌・代謝疾患である。表現型は広範なスペクトラムをもち、月経周期異常、排卵障害、不妊症、多毛、にきび、脱毛、肥満、耐糖能異常、心血管障害、悪性腫瘍、抑うつなど多様な症状を呈し、若年女性の不妊原因として重要な位置を占める疾患である。

PCOS の卵巣では卵胞発育障害、排卵障害による多嚢胞性卵巣の像を認める。卵胞発育はゴナドトロピンの協調した分泌に加えて、卵巣局所環境における多くの因子によって調節されており、小胞体ストレスがそのひとつとして注目されている。小胞体ストレスとは、タンパク質の合成・成熟の場である小胞体に異常なタンパク質が蓄積した状態であり、細胞は恒常性を保つために、小胞体ストレス応答/ UPR (unfolded protein response) と呼ばれる反応を誘導する。この反応によって、新たなタンパク質の合成抑制、小胞体シャペロンによる変性タンパク質の修復、異常タンパク質の分解除去が促進し、小胞体の負荷が軽減されることになる。しかし、小胞体ストレスが長期に及ぶ場合や、負荷が過剰な場合には、細胞死が誘導される。小胞体ストレスは卵巣機能を調節する卵巣局所因子として、生理的機能だけでなく PCOS の病態にも深く関わることが報告されている。卵胞が成熟して排卵に至る過程は下垂体から分泌されるゴナドトロピンによる調節を受けており、さらに、卵巣内の局所因子による細胞間情報伝達が重要な役割を果たしている。様々な方法で細胞間の情報伝達が行われるが、その中でも細胞同士の接触による情報伝達を担う分子として Notch 受容体が知られており、卵巣における機能が近年明らかになりつつある。Notch シグナルは細胞の分化や増殖を制御することで個体の発生に深く関与し、さらに成体においても多くの細胞の機能に関わることが分かっている。卵巣の生理機能、病的状態において、Notch シグナルは重要な役割を持つことが分かっており、PCOS との関連も多数報告されているが、まだ PCOS の病態にどのように関与するのか一致した見解は得られていない。本研究では、PCOS の卵巣の顆粒膜細胞で生じている小胞体ストレスが Notch シグナルを過剰に活性化させ、適正な細胞間情報伝達が行われなくなることで、排卵に必須の反応である卵丘-卵子複合体の膨化(cumulus-oocyte complex expansion, COC expansion)に異常をきたすという仮説を立て、実験を行った。

最初に、PCOS 患者の顆粒膜細胞における Notch シグナルの状態を解析した。体外受精患者の採卵時に黄体化顆粒膜細胞(granulosa-lutein cells, GLCs)を回収し、Notch シグナル関連分子を qPCR で解析すると、Notch2、Hey2、Hes1 の発現量が PCOS 患者で上昇していた。ヒト卵巣組織を免疫組織化学染色で解析すると、PCOS 患者では顆粒膜細胞層の同分

子の発現量が増加していた。PCOS モデルマウスの卵巣を免疫組織化学染色で解析すると、PCOS 群では顆粒膜細胞層の同分子の発現量が増加していた。このことから、PCOS の顆粒膜細胞では Notch シグナルが異常亢進していることが示唆される。

PCOS の顆粒膜細胞が小胞体ストレスの亢進した状態にあることは既に先行研究から分かっているため、次に小胞体ストレスが Notch シグナルに与える影響を解析した。培養ヒト GLCs に小胞体ストレス誘導剤を投与すると、Notch2、Hey2 の発現量が増加した。小胞体ストレス阻害剤を加えるとこの変化は抑制された。siRNA を用いて ATF4 をノックダウンすると同様に発現増加が抑制された。この結果より、小胞体ストレスは UPR の中でも ATF4 を介した経路が関与することによって、Notch シグナルを活性化させていることが示唆される。

次に、排卵に対する影響を検討するために、ヒト GLCs を hCG を含む培養液で培養し、小胞体ストレス誘導剤および Notch シグナル阻害剤を投与した。小胞体ストレス誘導剤により排卵関連遺伝子群の発現が誘導され、Notch シグナル阻害剤によりその変化は抑制された。続いて、マウス卵巣より単離した COC を同様の条件で培養し、COC の広がる面積を測定した。小胞体ストレス誘導剤によって COC の広がる面積は増加し、Notch シグナル阻害剤によりその変化は抑制された。これより、小胞体ストレスによって Notch シグナルを介して、排卵関連遺伝子群の発現が上昇し、COC expansion を亢進させたことが示唆される。

最後に、PCOS モデルマウスを用いて生体内での COC expansion の状態を検討した。マウスに排卵誘発を行った後に、卵管内より COC を採取し、COC の広がる面積を測定した。PCOS モデルマウス群の COC の広がる面積はコントロール群より有意に増加していた。PCOS モデルマウスに Notch シグナル阻害剤を投与すると、COC 面積の増加は抑制された。この結果より、PCOS モデルマウスでは Notch シグナルが活性化し、COC expansion が亢進していることが示唆される。

本研究の結果から、卵胞微小環境の小胞体ストレスが Notch シグナルを活性化し、COC 成熟異常を惹起し、PCOS の主要な病態である排卵障害に寄与していることが示唆される。本研究の成果により、PCOS の病態を解明するための新たな基礎的知見が明らかになり、今後の研究の発展に大きく寄与することが期待される。また、PCOS の画期的な治療戦略として、小胞体ストレス応答や Notch シグナルの調節を行う薬剤を提案することで、PCOS 患者の治療への貢献が期待される。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。