

論文の内容の要旨

論文題目 卵巣の病態における小胞体ストレス応答の意義の解明

氏名 高橋 望

卵巣は正常月経周期・妊娠の成立における最も重要な臓器の一つである。間脳-下垂体-卵巣系のホルモン分泌によって、卵胞の発育・排卵・黄体機能が調節されているが、近年、卵巣内の局所因子が卵巣機能に影響を与えていることが明らかとなってきた。一方、小胞体ストレスと呼ばれる細胞における微小環境の重要性が様々な臓器で示されている。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、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。小胞体ストレスは様々な病態に関与し、新規治療のターゲットとして近年注目されている。小胞体ストレス応答因子が発育卵胞中の顆粒膜細胞で発現していることが報告されているが、卵巣の病態における小胞体ストレスの意義については、ほとんど明らかとなっていない。本研究では、多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)、卵巣過剰刺激症候群(OHSS)、黄体ホルモン分泌不全に着目し、小胞体ストレスの各種病態における役割を明らかにすることを目的とした。

PCOS は高アンドロゲン血症、排卵障害、多嚢胞性卵巣を認める症候群で、主な不妊原因の一つであるが、その病態の全容は不明である。PCOS の卵巣において線維化を認め、また線維化誘導因子であるTGF- β 1の発現が亢進していることが知られている。一方、小胞体ストレスは各種臓器において線維化を誘導することが知られている。本研究ではPCOSの病態における小胞体ストレスの役割を調べた。まず、PCOSの卵巣で小胞体ストレスが活性化しているかどうかを検討した。Control患者と比べてPCOS患者の卵胞液中の黄体化顆粒膜細胞(GLCs)で小胞体ストレス応答因子であるXBP1(S)、HSPA5、ATF4、ATF6、CHOPのmRNA発現が増加していた。TGF- β 1の発現も同様に増加を認めた。また、PCOS卵巣において、CHOP及び、小胞体ストレスセンサータンパク質であるphospho-IRE1とphospho-

PERK の発現が顆粒膜細胞で増加していた。Masson's trichrome 染色により、PCOS 患者の卵巣では間質の線維化を来とし、顆粒膜細胞における TGF- β 1 の発現が増加していた。また、DHEA 投与により作成した PCOS モデルマウスにおいて、XBPI(S)・HSPA5 の mRNA、CHOP・phospho-IRE1・phospho-PERK・TGF- β 1 タンパクの発現が顆粒膜細胞で増加を認めた。これらの結果より、PCOS の卵巣では線維化を認め、小胞体ストレスが顆粒膜細胞で活性化ならびに TGF- β 1 の発現上昇を認めることが示された。次に小胞体ストレスが顆粒膜細胞において TGF- β 1 を誘導するかどうかを調べた。小胞体ストレス刺激剤である tunicamycin の投与により、ヒト GLCs において TGF- β 1 と CTGF の発現が増加し、小胞体ストレス阻害剤である TUDCA の投与で抑制を認めた。また、XBPI(S)を siRNA でノックダウンすると、TGF- β 1 の mRNA 発現が減少を認め、XBPI(S)経路が小胞体ストレスによる TGF- β 1 発現調節に関与していると考えられた。PCOS モデルマウスに TUDCA を経口投与すると、卵巣間質における線維化と collagen 蓄積が抑制をされ、顆粒膜細胞における TGF- β 1 の発現上昇が抑制された。異なる小胞体ストレス阻害剤である BGP-15 の投与でも、同様の結果が得られた。小胞体ストレスは顆粒膜細胞における TGF- β 1 の発現を亢進し、PCOS における卵巣線維化を誘導している可能性が示唆された。

OHSS は卵巣腫大・胸腹水貯留・血管内脱水を認め、体外受精における重篤な合併症の一つである。OHSS では hCG がトリガーとなり VEGFA の発現が亢進し、血管透過性が亢進するため発症するといわれているが、その詳細な機序は明らかとなっていない。他の細胞において小胞体ストレスが VEGFA 発現を亢進させることが知られている。そこで、OHSS の卵巣では小胞体ストレスが活性化し、OHSS の病態に関与しているという仮説を立て、それを検証した。まず、OHSS 患者で小胞体ストレスが活性化しているかを調べた。OHSS 発症患者の卵丘細胞では OHSS 非発症患者に比べて、XBPI(S)と VEGFA の mRNA 発現が有意に増加していた。また、XBPI(S)と VEGF mRNA 発現に正の相関を認めた。OHSS の卵胞では小胞体ストレスが活性化し、VEGFA 発現が亢進していると考えられた。次に顆粒膜細胞において小胞体ストレスが VEGFA 発現を誘導するかを調べた。ヒト GLCs に tunicamycin を投与すると、VEGFA 発現の増加を認めた。また、tunicamycin 投与後に hCG を投与すると、hCG 単独に比べて VEGFA 発現は著明に増加を認めた。XBPI(S)を siRNA でノックダウンすると、tunicamycin と

hCG 誘導下の VEGFA mRNA 発現は減少を認めた。小胞体ストレス存在下では hCG による VEGFA 発現が過剰となり、その経路に XBPI(S)が関与していることが示された。また TUDCA の投与により、tunicamycin と hCG 誘導下の VEGFA 発現は抑制され、in vitro における TUDCA の予防的効果が示された。生体内における TUDCA の効果を調べるため、OHSS モデルラットに TUDCA を腹腔内投与した。OHSS モデルラットにおいて、卵巣における VEGFA mRNA 発現の増加、血管透過性の亢進を認めるが、TUDCA 投与により、卵巣の VEGFA 発現は減少し、血管透過性の抑制を認めた。小胞体ストレスは hCG 誘導下の VEGFA を過剰発現させ、血管透過性の亢進に寄与し、OHSS の病態に関与している可能性が示唆された。

最後に黄体ホルモン分泌不全における小胞体ストレスの役割について調べた。progesterone は妊娠の維持に重要なホルモンであるが、黄体ホルモン分泌不全の原因・機序は明らかとなっていない。肥満患者では黄体ホルモン分泌不全を認めることが知られ、また、小胞体ストレスは肥満状態で惹起されることが知られている。肥満患者における黄体ホルモン分泌不全の機序を明らかとするため、小胞体ストレスの progesterone 分泌に与える影響を調べた。まず、肥満状態の卵巣において、小胞体ストレスが活性化しているかを調べるため、肥満マウス(Ob/Ob マウス)の卵巣における小胞体ストレス応答因子の mRNA 発現を調べた。Control マウスと比較して、肥満マウスの卵巣では、XBPI(S)、HSPA5、ATF4、ATF6 の mRNA 発現が上昇していた。次に、ヒト GLCs に小胞体ストレス刺激剤として tunicamycin を投与すると、hCG 誘導下における progesterone 産生の抑制を認めた。異なる小胞体ストレス刺激剤である thapsigargin でも同様の結果を得た。また、ステロイド合成酵素の発現を調べたところ、StAR と 3 β -HSD の mRNA 発現は抑制され、P450scc、aromatase の mRNA 発現は抑制されなかった。StAR タンパクと 3 β -HSD 酵素活性も tunicamycin 投与によって抑制を認めた。tunicamycin 投与は、hCG 誘導下の LHR mRNA と細胞内 cAMP 濃度上昇には影響を与えなかった。また、cAMP 刺激による StAR・3 β -HSD mRNA 発現は tunicamycin により抑制を認めたが、P450scc、aromatase は抑制されなかった。これらの結果より、tunicamycin は adenylyl cyclase の下流で作用していると考えられた。次に、adenylyl cyclase の下流に位置する PKA と ERK1/2 の活性化を調べたところ、hCG 誘導下の PKA 及び ERK1/2 のリン

酸化が tunicamycin 投与で抑制された。小胞体ストレスの生体内における progesterone へ与える影響を調べるため、PMSG-hCG 投与したマウスに tunicamycin を腹腔内投与した。tunicamycin 投与によって、卵巣の StAR と 3 β -HSD の mRNA 発現は抑制され、P450scc と aromatase 発現は変化を認めなかった。また、血清 progesterone 濃度は hCG 投与後 48 時間で抑制を認め、estradiol 濃度・黄体数は変化を認めなかった。小胞体ストレスは肥満状態の卵巣で惹起され、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。

小胞体ストレスは様々な局所環境によって惹起されるが、特に密接に関与しているものとして、酸化ストレスと炎症があげられる。PCOS、OHSS、黄体ホルモン分泌不全の各種病態において、卵巣内の局所で酸化ストレスと慢性炎症状態を認めることが知られている。小胞体ストレスは酸化ストレスと慢性炎症と相互に影響を及ぼし、卵巣における病態に関与していると考えられるが、今後更なる研究による解明が必要である。卵巣の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、新たな治療戦略の開発に寄与するものと考えられる。