

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

卵巣生理学における bone morphogenetic protein(BMP) サイトカインの役割についての検討

秋山 育美

### <背景>

女性は月経周期とともに内分泌環境が大きく変化する。複雑なホルモンの変化により卵胞は発育、排卵し、やがて黄体へと至る。卵胞は中心に卵子がありその周りを顆粒膜細胞、その外側を更に莢膜細胞に包まれている。視床下部からのゴナドトロピン放出ホルモン(Gn-RH)により下垂体から卵胞刺激ホルモン(Follicle Stimulating Hormone, FSH)と黄体形成ホルモン(Luteinizing Hormone, LH)の分泌を促進する。FSHが卵胞の発育を促し、顆粒膜細胞は増殖し、エストロゲンを産生する。成熟した卵胞はLHサージにより排卵し、やがて黄体へ至る。

顆粒膜細胞と莢膜細胞は基底膜で区切られており、血管は莢膜細胞層にのみ存在する。卵胞発育において卵巣外因子が卵胞に到達するには、莢膜細胞層における血管網発達のための血管新生が必須であるが、その調節についての詳細は不明である。

一方、排卵は一種の炎症反応とも捉えられており、種々の化学伝達物質や蛋白分解酵素が関わっている。ラットにおいて、好中球を抑制すると排卵数が減少することからも、好中球も排卵に一定の役割を果たすことが示唆されている。

卵胞発育にはFSHやLHなどの卵巣外の因子以外に局所のホルモンも重要で、その1つがBMPサイトカインである。今までの研究でBMPサイトカインがヒト卵巣に発現し、ゴナドトロピンやその受容体へ作用することが報告されている。

今回の検討ではBMPサイトカインに注目して、それらが卵胞発育や排卵に果たす役割について検討した。まず、BMP-7の血管新生作用に関して、検討をおこなった。また、BMP-6ノックアウトマウスでは排卵数が減少することが知られている。そこで、好中球とBMP-6の関係に着目し、排卵におけるBMP-6が果たす役割について検討した。また、BMPサイトカインの調節因子であるProprotein convertase(PC)ファミリーのうちproprotein convertase subtitling/ kexin type 6 (PCSK6)の局在や調節機序について検討を行った。

### <方法及び結果>

東京大学倫理委員会の承認のもと、患者の文書同意を得て検体採取、実験を行った。体外受精時に得られる卵胞洗浄液より顆粒膜細胞を分離培養した。

① ヒト顆粒膜細胞にBMP-7(100 ng/ml)を24時間添加し、血管新生因子であるvascular endothelial growth factor(VEGF)のmRNAの発現を定量的PCR法で、培養上清中のVEGF蛋白濃度をELISA法で測定した。BMP-7の血管内皮細胞への直接作用をみるために、ヒト臍帯

静脈内皮細胞 (HUVEC) 培養系に BMP-7 (100 ng/ml) を 48 時間添加し、HUVEC 細胞数を cell count assay にて測定し、VEGF 受容体 mRNA 発現を定量的 PCR 法で測定、管状構造について matrigel を用いて検討した。

BMP-7 は VEGF mRNA 発現を濃度依存的、時間依存性に発現を促進した。培養上清の VEGF 蛋白発現も上昇していた。BMP-7 で HUVEC を培養すると 1.8 倍に細胞数は増加し、BMP-7 を添加した HUVEC で有意に管状構造の増加を認めた。また、BMP-7 により VEGF 受容体の mRNA 発現は 2 倍に増加した。

- ② ヒト顆粒膜細胞を BMP-6 (100ng/ml) と共に 24 時間培養し、好中球を遊走するサイトカインである Growth-regulated oncogene  $\alpha$  (GRO- $\alpha$ ) の mRNA 発現を定量的 PCR 法で測定し、培養上清の蛋白濃度を ELISA 法で測定した。また、培養上清を用いて好中球の遊走能の検討を行った。次に、好中球が放出するプロテアーゼの阻害物質の 1 つである secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) と whey acid protein (WAP) 14 の mRNA の発現を定量的 PCR 法で測定した。

BMP-6 により GRO- $\alpha$  の mRNA 発現は濃度依存的に亢進し、GRO- $\alpha$  の蛋白濃度は 1.6 倍に上昇した。好中球遊走能の実験では BMP-6 により好中球の遊走は増加し、抗 GRO- $\alpha$  抗体により抑制された。また、ヒト顆粒膜細胞において BMP-6 は SLPI, WAP14 の mRNA 発現をそれぞれ 0.5 倍、0.2 倍へ抑制した。

- ③ ヒト卵巣を用いて PCSK6 の免疫組織化学染色を施行した。また、ヒト顆粒膜細胞に BMP-2, -6, -7, -15, growth differentiation factor (GDF)-3, -9, activin-A (100ng/ml), FSH (0.5IU/ml) および dorsomorphin (5  $\mu$  M, BMP サイトカインの受容体阻害物質) を 24 時間添加し、PCSK6 mRNA の発現を定量的 PCR 法で測定した。

ヒト卵巣において、PCSK6 は原始卵胞から胞状卵胞までの卵母細胞に発現していた。顆粒膜細胞では一次卵胞から発現し成熟するにつれその発現を強く認めた。莢膜細胞での発現は胞状卵胞で弱く認めたのみであった。培養顆粒膜細胞を用いた検討において、GDF-9 と activin-A は単独では PCSK6 mRNA の発現を変化させなかったが、FSH 存在下では PCSK6 の mRNA 発現を亢進させた。BMP-2, -6, -7, -15 は PCSK6 の mRNA 発現を抑制し、この抑制は dorsomorphin により解除された。一方、BMP サイトカインの抑制因子である GDF-3 は PCSK6 の mRNA の発現を亢進させた。

#### <考察>

BMP-7 は直接作用として血管内皮細胞数を増加させるとともに、顆粒膜細胞および血管内皮細胞に作用して VEGF およびその受容体をそれぞれ誘導し、間接的にも血管新生に寄与することが明らかになった。BMP-7 は卵胞における血管新生を誘導することにより、卵胞発育を促進することが示唆された。

顆粒膜細胞を BMP-6 と培養すると GRO- $\alpha$  の mRNA、蛋白濃度は上昇した。また遊走する好中球の

数は増加することから BMP-6 が GRO- $\alpha$  の上昇を介して好中球の遊走することが示唆された。抗 GRO- $\alpha$  抗体で遊走する好中球は減少したが、コントロールと同等ではなく、GRO- $\alpha$  以外のサイトカイン等が遊走に関与していることが考えられた。また、プロテアーゼインヒビターを低下させることで好中球の機能を促進し、排卵を促す可能性があると考えられた。

PCSK6 は顆粒膜細胞層で卵胞が成熟するのに伴って強く発現しており、卵胞発育に何等かの役割を果たすことが推測された。PCSK6 は BMP サイトカインや activin-A などの TGF- $\beta$  スーパーファミリーの分泌を促進すると報告されている。培養顆粒膜細胞の実験では、PCSK6 は GDF-9, activin-A の分泌を促進させることから、FSH 存在下での GDF-9 と activin-A による PCSK6 の発現亢進は両者の間での positive feed back 機構の存在を示唆した。一方、同様に PCSK6 により分泌が促進される BMP-2, -6, -7, -15 は PCSK6 の発現を抑制し、negative feed back 機構の存在を示唆した。これより、卵胞において TGF- $\beta$  スーパーファミリーと PCSK6 は互いを巧妙に制御して卵胞発育を調節すると考えられた。

以上の①-③の検討により以下のような仮説を立てた。原始卵胞が二次卵胞に成長し、BMP-7 が豊富にあると莢膜細胞層に良好な血管網が張り巡らされ、良好な卵胞成熟につながる。顆粒膜細胞は FSH への感受性を獲得し、血流にのってきた FSH とともに activin-A や GDF-9 は PCSK6 の顆粒膜細胞や卵子での発現を上昇させ、BMP サイトカインは成熟し、より多く発現する。このよいサイクルが働いた卵胞は BMP-6 の生産を促すことで好中球を誘導し、良好な成熟卵胞が排卵を起こしやすいようなメカニズムになっている。

本研究では BMP サイトカインが卵胞発育や排卵に密接に関わることが示唆された。さらに BMP サイトカインが PCSK6 とフィードバック機構を形成している可能性が示された。

今回の研究で留意すべき点は、実験に使用された顆粒膜細胞が体外受精患者の卵胞液から分離しており、成熟した状態であることである。ホルモン剤の投与も受けており、自然周期とは性質が異なっている可能性がある。また、検討は in vitro のみで行っていて、実際の生体内ではより複雑な反応を示す可能性がある。これらを今後の課題とし、さらなる検討を続けていきたい。