

審査の結果の要旨

秋山 育美

妊娠の高齢化に伴い、不妊治療の需要は年々高まっている。卵の質を決定する因子として卵胞発育は重要であり、ヒトにおける卵胞発育や排卵にいたるメカニズムの解明が、生殖医療をより発展させる上で求められている。本研究は、ヒト卵巣の卵胞発育および排卵におけるbone morphogenetic protein (BMP)サイトカインの果たす役割の解明を目指したものであり、下記の結果を得ている。

1. BMP-7の血管新生作用に関する検討を行なった。ヒト顆粒膜細胞にBMP-7(100 ng/ml)を添加し、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(Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC)培養系にBMP-7(100 ng/ml)を添加し、HUVEC細胞数をcell count assayで、VEGF受容体mRNA発現を定量的PCR法で測定し、管状構造についてmatrigelを用いて検討した。BMP-7はヒト顆粒膜細胞に対してVEGFのmRNA発現を濃度依存的、時間依存性に発現を促進し、培養上清のVEGF蛋白発現は上昇していた。BMP-7存在下でHUVECを培養すると細胞数は1.8倍に増加し、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により同細胞でのVEGF受容体のmRNA発現は2倍に増加した。このことから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、ヒト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。

2. 好中球とBMP-6の関係に着目し、排卵においてBMP-6が果たす役割について検討した。ヒト顆粒膜細胞にBMP-6(100ng/ml)を添加し、好中球を遊走するサイトカインであるgrowth-regulated oncogene α (GRO- α)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- α のmRNA発現は濃度依存的に亢進し、GRO- α 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、同効果は抗GRO- α 抗体により抑制された。また、ヒト顆粒膜細胞に対して、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。BMP-6が顆粒膜細胞に作用し、GRO- α の上昇を介して好中球の遊走を促進することが示唆された。また、BMP-6は顆粒膜細胞に作用し、

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。

3. BMP サイトカインの調節因子である proprotein convertase subtilizing/ kexin type 6 (PCSK6) の局在や調節機構について検討した。ヒト卵巣を用いて PCSK6 の免疫組織化学染色を施行した。ヒト顆粒膜細胞に BMP-2, -6, -7, -15, growth differentiation factor (GDF)-3, -9, activin-A (100ng/ml), follicle stimulating hormone (FSH, 0.5IU/ml) および dorsomorphin (5 μ M, BMP サイトカインの受容体阻害物質) を添加し、PCSK6 の mRNA の発現を定量的 PCR 法で測定した。ヒト卵巣において、PCSK6 蛋白は卵母細胞では原始卵胞以降のステージに、また、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。莖膜細胞での発現は胞状卵胞で弱く認めたのみであった。また、GDF-9 と activin-A は単独では顆粒膜細胞に対して PCSK6 の mRNA 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。PCSK6 は BMP サイトカインや activin-A などの TGF- β 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- β 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、本論文はヒト顆粒膜細胞に BMP サイトカインを添加し、卵胞発育や排卵に密接に関わる因子の遺伝子変化を解明した。卵胞発育や排卵の過程でヒト卵巣において BMP サイトカインが重要な役割を担っていることが明らかになった。本研究は、卵巣生理学に関する知見に新たな貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。