

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09434

研究課題名(和文) 生殖内分泌H-P-O系を取り巻くモデュレーター因子BMPの解析と応用

研究課題名(英文) Analysis and clinical application of BMP in the regulation of H-P-O axis.

研究代表者

大塚 文男(Otsuka, Fumio)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40362967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：少子高齢化社会において、不妊をきたす病態の解明は急務であるが、卵巢機能不全へのアプローチにおいて視床下部-下垂体-卵巢(H-P-O)から成る生殖内分泌調節系の分子機序が十分に解明されていない。我々は卵巢に発現し卵胞発育を調節するBMP(Bone Morphogenetic Protein)分子に着目して研究を進め、BMPが卵胞内では細胞間コミュニケーター分子として、全身ではH-P-O系のモデュレーターとして機能し、種々のリズム調節因子とともに正常な卵胞発育・ステロイド合成を調節することを明らかにした。今後、全身的なBMP分子の内分活性と生理的意義をさらに明確にしてBMPの臨床応用を目指す。

研究成果の概要(英文)：Female infertility is an urgent issue to be solved; however, the detailed regulatory mechanism of the reproductive axis composed of hypothalamus-pituitary-ovary (HPO) has yet to be fully clarified. We investigated the physiological and endocrinological significance of bone morphogenetic protein (BMP) molecules in the ovarian follicles as well as in the HPO axis. Here, we revealed that the BMP system plays critical roles as an intracellular communicator in the ovarian follicle and that it also works as a fine modulator with various circadian regulators in the HPO axis. These findings would be informative for the clinical application of BMPs for diagnosis and treatment of female infertility.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：卵巢 下垂体 視床下部 生殖内分泌 骨形成蛋白 ステロイド合成

1. 研究開始当初の背景

日本では高齢化に加えて少子化が急速に進行し深刻な状態と言える。その中で、女性の不妊症は早期に解決されるべき問題で、不妊をきたす病態の解明・治療へ挑戦は、日本の将来を背負う若年者層の人口を維持するために重要な課題である。卵巣機能不全(POF/POI)による不妊は、原因が多様であるため病態の特定に苦慮するうえ、傷害された卵母細胞は不可逆性であるために現状では妊孕性を回復する根本的な治療はない。卵巣機能不全の解決が困難となる理由として、視床下部・下垂体・卵巣の生殖内分泌調節系で統御される卵胞の発育と機能分化、そして排卵までの生理現象の分子機構が完全に掌握されていないことが挙げられる。我々はこれまで、卵巣に発現し卵胞発育を調節するBMP(Bone Morphogenetic Protein)分子に着目して基礎的研究を進めてきた。BMPは胚発生と中胚葉分化に必須であるため主要なリガンドや受容体の欠損マウスは胎生致死で、生殖内分泌に関する探求が困難であった。

我々は、卵巣に発現する機能性BMPシステムの存在を証明し、BMP-15の機能解析をはじめBMP活性を検討し、BMPネットワークが卵胞発育・ステロイド合成を巧みに調節していることを証明してきた。BMPの卵巣での直接作用に加えて、下垂体・副腎を含む広汎な作用が明らかとなり、視床下部(H)-下垂体(P)-卵巣(O)系を構成する全身においてはBMP systemとして、卵胞の中ではBMP networkとして機能し、卵胞の正常な発育・ステロイド合成調節に寄与すると考えられた。本研究では、BMPを病態解析のツールへと応用し、さらに内分泌異常の治療へと発展させるため、卵胞局所から全身へ向けて研究を展開した。

2. 研究の目的

少子高齢化社会において、不妊をきたす病態の解明は急務である。卵巣機能不全へのアプローチにおいて、H-P-O系を含む生殖内分泌調節系の細やかな分子機序は未だ十分に解明されていない。我々は、卵巣に発現し卵胞発育を調節するBMP分子に着目して研究を進め、BMPが卵胞内では細胞間コミュニケーションとして、全身ではH-P-O系のモジュレーターとして機能し、正常な卵胞発育・ステロイド合成を調節することを示してきた。

本研究では、BMPの組織特異的多機能性を卵巣から全身へ拡大することを目的とした。全身の組織で多彩な機能をもつBMPを、診断と治療への機能的因子として、臨床の場へ応用し、生殖内分泌の病態解析ツールや創薬への応用として進化すべく、新たな研究を展開した。

3. 研究の方法

初年度の計画では、「卵とBMP分子群により形成される卵胞細胞間コミュニケーション機構」を探索した。卵胞BMPシステムは、卵胞刺激ホルモン(FSH)の刺激下で卵母細胞を中心に、卵胞細胞間をBMP networkとして取り巻き、卵胞の正常な発育・ステロイド合成を調節する細胞間コミュニケーションとして機能する。BMPはFSHの刺激下で卵胞顆粒膜細胞によるProgesterone(P4)産生を共通して抑制する一方で、Estradiol(E2)産生に対しては多様な影響をもつ。例えば、BMP-2, -4, -7, GDF-9はFSHによるE2産生を増強するが、BMP-6, -15はE2産生には直接影響しない。BMP-2, -4, -7はFSH受容体下流のMAP kinaseを介してE2産生を促すが、この系は卵の存在下で増幅され、FSHによる顆粒膜細胞でのE2産生性も卵の存在下で増幅される。この卵と顆粒膜細胞間で形成される複雑なシグナルについて、ラットの初代培養系を用いて顆粒膜細胞から卵、卵から顆粒膜細胞の両者に着目して研究を進めた。

次年度より、「視床下部-下垂体-卵巣を含むH-P-O系におけるBMP作動系」の機能解析を行い、内分泌モジュレーターとしてのBMPの臨床応用を目指した。視床下部-下垂体を含む生殖内分泌系におけるBMP作動系をネットワークとして理解し、BMPによる内分泌制御作用を臨床へと応用することを目標として研究を進めた。また、BMPの分泌機序に迫るため、卵胞由来BMP蛋白の修飾について検討するとともに、ヒト卵巣不全(POF/POI)に見られるBMP-15プロ蛋白変異について、成熟BMP-15の分泌・修飾・機能変化の検出を試み、さらに循環血中に多く存在するBMPとして注目すべきBMP-9分子の作用について、卵胞ステロイド合成や卵胞の分化における役割を探索した。

BMPのH-P-O系における広汎でユニークな作用を検証してきたが、最終年度には、これらの知見に基づいて種々のGnRH調節因子や概日リズム因子と卵巣BMPの関連を網羅的に探索し、時計遺伝子とFSH/LH分泌制御および卵巣内分泌系の三者の関連を明らかにすることを試みた。概日リズムに影響するMelatoninなどの液性因子と下垂体前葉ホルモン分泌との相互作用を検討し、卵胞成長や排卵時機の決定に影響するリズム形成因子の役割と卵胞発育に寄与するBMPネットワークの関連を下垂体モデル細胞を用いて探求した。卵を中心に構成される細胞間連携におけるBMPの役割を統合し、内分泌モジュレーターとして機能するBMP作動性の解明に迫り、循環・局所両者のユニークなBMP機能から診断・治療への応用を目指して研究を展開した。

4. 研究成果

本研究では、BMP の組織特異的多機能性を卵巣から全身へ拡大し、本研究期間の初年度は卵胞機能調節モデュレーターとして機能する BMP を新たな側面から研究した。卵胞局所でなく血中に存在する BMP 作用の決定から卵胞ステロイド合成調節メカニズムを解析するとともに、これまでの研究から明らかとなった Estrogen 誘導性卵母細胞因子にも着目して、BMP ネットワークに寄与する生殖内分泌への作用を検討した。

まず平成 27 年度は、卵と BMP 分子群により形成される卵胞細胞間コミュニケーション機構の探求を行った。卵胞 BMP システムは、FSH の刺激下で卵母細胞を中心に、卵胞細胞間を BMP network として取り巻き、卵胞の正常な発育・ステロイド合成を調節する細胞間コミュニケーションとして機能する。顆粒膜細胞→卵、卵→顆粒膜細胞の両者に着目して本研究を進めた。我々が卵母細胞から同定した Estrogen 誘導因子:Prohibitin-2 (PHB2) に着目し、ステロイド合成・卵胞機能への影響を検討した。PHB1, 2 はアポトーシス・細胞周期などに関与するミトコンドリア蛋白であるが、PHB2 の卵胞における役割は不明であった。卵母細胞因子との関連にも着目し、PHB2 の卵胞ステロイド合成に与える影響をラット顆粒膜細胞・卵母細胞の初代培養系で検討した。PHB2 mRNA は卵母細胞優位に発現し、PHB2 を knockdown すると Progesterone 産生が増加することから、内因性 PHB2 は Progesterone の産生を制御すると考えられた。BMP-15・GDF-9 は卵胞における PHB2 mRNA の発現レベルを減弱し、BMP-15・GDF-9 による顆粒膜細胞の Smad1/5/8 および Smad2/3 のリン酸化は、Estrogen の存在下で減弱した。Estrogen は、卵母細胞の存在下で顆粒膜細胞の Progesterone 合成を抑制するが、この機序に Estrogen により誘導される卵母細胞の PHB2 を介する Progesterone 産生の抑制機序が示唆された。本検討により、卵母細胞に発現する成長因子と PHB2 および P4 制御系の間に新たな機能関連の存在が示唆され、これが卵胞における E2-P4 の産生バランスに寄与している可能性が示唆された。

そして平成 28 年度は、平成 27 年度の卵と BMP 分子群により形成される卵胞細胞間コミュニケーション機構の探求とともに、視床下部-下垂体-卵巣を含む H-P-0 系における BMP 作動系について研究を進めた。排卵やホルモン変動のリズム形成に寄与する Melatonin・Orexin 作動系、そして循環 BMP である BMP-9 について卵巣局所因子やステロイド合成系との機能的なリンクに着目して研究を進めた。Orexin は睡眠覚醒パターンや摂食行動・自律神経系の調節など機能は多岐に及ぶ分子であるが、内分泌組織においても下垂体や

副腎・性腺などに受容体発現が確認されており、視床下部-下垂体-副腎系や視床下部-下垂体-性腺系の調節に影響を与える可能性がある。下垂体前葉モデルとして Orexin-1 型受容体を認める lactotrope GH3 細胞を用いたところ、Orexin は Forskolin の刺激下で PRL mRNA レベルを抑制し、BMP 受容体シグナルを減弱することが明らかとなり、Orexin が BMP 抑制的に作用することが示された。一方、卵巣においては、Orexin が顆粒膜細胞の BMP シグナルを減弱して、P4 合成系を促進することが明らかとなった。また、循環 BMP-9 は卵巣の BMP 受容体を介して FSH によって誘導される P4 産生を抑制する分子であるが、全身内分泌系への影響として、副腎においても BMP 受容体を介して cAMP-PKA 経路を抑制することで副腎皮質ステロイド産生系を制御する可能性が示唆された。

最後に平成 29 年度は、視床下部・下垂体ゴナドトロープを包括して研究を進め、H-P-0 系・リズム形成に寄与する時計遺伝子群・リズム調節に寄与する因子として Melatonin・Incretins・Orexin 作動系について、卵巣局所因子との機能的なリンクについて研究を進めた。BMP 分子を診断ツールとして臨床へ応用するとともに、視床下部-下垂体を含めた全身的 BMP の Bioavailability と内分泌活性・生理的意義を探究した。卵胞から全身へと拡大し、中枢から末梢まで網羅する BMP network として時計遺伝子や Melatonin などのリズム形成因子との関連に着目し、H-P-0 系における BMP 作動系の機能解析を行い、内分泌モデュレーターとしての BMP の臨床応用を目指した研究をさらに展開した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

2015 年

1. 大塚文男: プロラクチノーマ: 医学書院・今日の診断指針, 査読無, 2015, 7:1197-200, DOI:なし.

2016 年

2. Toma K, Otsuka F, Oguni K, Terasaka T, Komatsubara M, Tsukamoto-Yamauchi N, Inagaki K, Makino H: BMP-6 modulates somatostatin effects on luteinizing hormone production by gonadotrope cells. *Peptides*. 査読有, 2016, 76:96-101, DOI:10.1016/j.peptides.2016.01.011.
3. Murakami K, Eguchi J, Hida K, Nakatsuka A, Katayama A, Sakurai M, Choshi H, Furutani M, Ogawa D, Takei K, Otsuka F, Wada J: The anti-obesity

action of ACAM by modulating the dynamics of cell adhesion and actin polymerization in adipocytes. *Diabetes*. 査読有, 2016, 65:1255-67, DOI:10.2337/db15-1304.

2017年

4. Komatsubara, Hara T, Hosoya T, Toma K, Tsukamoto-Yamauchi N, Iwata N, Inagaki K, Wada J, Otsuka F: Melatonin regulates catecholamine biosynthesis by modulating bone morphogenetic protein and glucocorticoid actions. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 査読有, 2017, 165:182-9, DOI:10.1016/j.jsbmb.2016.06.002.
 5. 大塚文男, 山内尚子: 下垂体卒中. 診断と治療社・内分泌代謝専門医ガイドブック改訂第4版, 査読無, 2016:148-9, DOI:なし.
 6. 大塚文男, 中村絵里, 長谷川高誠: 成長障害・医学書院・Medicina 2016 増刊号, 査読無, 2016, 53:85-9, DOI:なし.
 7. Ogura-Ochi K, Fujisawa S, Iwata N, Komatsubara M, Nishiyama Y, Tsukamoto-Yamauchi N, Inagaki K, Wada J, Otsuka F: Regulatory role of melatonin and BMP-4 in prolactin production by rat pituitary lactotrope GH3 cells. *Peptides*. 査読有, 2017, 94:19-24, DOI:10.1016/j.peptides.2017.06.001.
 8. Harada K, Kimura K, Iwamuro M, Terasaka T, Hanayama Y, Kondo E, Hayashi E, Yoshino T, Otsuka F: The clinical and hormonal characteristics of primary adrenal lymphomas: The necessity of early detection of adrenal insufficiency. *Intern Med*. 査読有, 2017, 56:2261-9. DOI:10.2169/internalmedicine.8216-16.
 9. Hasegawa T, Kamada Y, Hosoya T, Fujita S, Nishiyama Y, Iwata N, Hiramatsu Y, Otsuka F: A regulatory role of androgen in ovarian steroidogenesis by rat granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 査読有, 2017, 172:160-5, DOI:10.1016/j.jsbmb.2017.07.002.
 10. Kageyama K, Murasawa S, Niioka K, Otsuka F, Yagi H, Daimon M: Regulation of gonadotropins by urocortin 2 in gonadotrophic tumor L β T2 cells. *Neurosci. Lett*. 査読有, 2017, 660:63-7. DOI:10.1016/j.neulet.2017.08.052.
- 2018年
11. Nishiyama Y, Hasegawa T, Fujita S, Iwata N, Nagao S, Hosoya T, Inagaki K, Wada J, Otsuka F: Incretins modulate

progesterone biosynthesis by regulating BMP activity in rat granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 査読有, 2018, 178:82-8, DOI:10.1016/j.jsbmb.2017.11.004.

12. Otsuka F: Interaction of melatonin and BMP-6 in ovarian steroidogenesis (Ovarian Cycle: Chapter 5): *Vitam Horm*. 査読有, 2018, 107:137-53, DOI:10.1016/bs.vh.2018.01.012.
13. Fujita S, Hasegawa T, Nishiyama Y, Fujisawa S, Yasuhiro N, Nada T, Iwata N, Kamada Y, Masuyama H, Otsuka F: Interaction between orexin A and BMP system on progesterone biosynthesis by rat granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 査読有, 2018, in press, DOI:10.1016/j.jsbmb.2018.03.004.
14. Otsuka F: Modulation of BMP by melatonin in ovarian steroidogenesis. *Reprod Med Biol*. 査読有, 2018, in press, DOI:なし.

[学会発表] (計 25 件)

2016年

1. 京谷美月、中村絵里、細谷武史、寺坂友博、岩田菜穂子、三好智子、長谷川徹、久保光太郎、稲垣兼一、大塚文男: 卵胞における Prohibitin-2 の役割と卵胞成長因子の関与, 第 20 回日本生殖内分泌学会学術集会, 2016 年 1 月 9 日 (神戸市)
2. 小松原基志、稲垣兼一、寺坂友博、和田淳、大塚文男: Melatonin と BMP-4・副腎皮質ステロイドによるカテコラミン合成への影響, 第 23 回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 2016 年 1 月 15 日 (倉敷市)
3. 大塚文男: AGHD の内科診療: 鑑別から診断・治療導入とフォローアップ, 第 26 回日本間脳下垂体腫瘍学会 (招待講演), 2016 年 2 月 20 日 (福島市)
4. Komatsubara M, Hara T, Terasaka T, Hosoya T, Toma K, Yamauchi N, Inagaki K, Otsuka F: Melatonin regulates catecholamine synthesis by activating bone morphogenetic protein signaling and glucocorticoid actions. *ENDO2016 (国際学会)*, 2016 年 4 月 1-4 日 (ボストン、米国)
5. Kyoya M, Hosoya T, Hasegawa T, Nakamura E, Iwata N, Komatsubara M, Yamauchi N, Miyoshi T, Inagaki K, Otsuka F: *ENDO2016 (国際学会)*, 2016 年 4 月 1-4 日 (ボストン、米国)
6. Otsuka F: Roles of melatonin and BMP in the regulation of corticotrope functions. *International Symposium*

- on Pituitary Gland (ISPGR) 2016 (招待講演) (国際学会), 2016年9月1-5日 (ハワイ、米国)
7. Komatsubara M, Hara T, Tsukamoto-Yamauchi N, Inagaki K, Wada J, Otsuka F: A new role of melatonin in catecholamine production regulated by BMP-4 and adrenocortical steroids. The 9th International Aldosterone Forum in Japan, 2016年5月28日 (Tokyo)
 8. 原 孝行、小松原基志、細谷武史、当真貴志雄、山内尚子、稲垣 兼一、和田 淳、大塚文男: 循環因子 BMP-9 による副腎皮質ステロイド産生系への影響. 第 89 回日本内分泌学会学術総会, 2016年4月21-23日 (京都市)
 9. 小松原基志、原 孝行、細谷武史、寺坂友博、山内尚子、稲垣兼一、和田 淳、大塚文男: カテコラミン合成系におけるメラトニンと BMP-4・ステロイドの作用とその機序. 第 89 回日本内分泌学会学術総会, 2016年4月21-23日 (京都市)
 10. 細谷武史、長谷川徹、鎌田泰彦、久保光太郎、稲垣兼一、平松祐司、大塚文男: 高 IGF-I・高アンドロゲンによる卵胞ステロイド合成への影響. 第 89 回日本内分泌学会学術総会, 2016年4月21-23日 (京都市)
 11. 京谷美月、細谷武史、長谷川徹、岩田菜穂子、中村絵里、小川弘子、三好智子、稲垣兼一、大塚文男: プロゲステロン制御に寄与する Prohibitin-2 と卵胞局所因子の機能連関. 第 89 回日本内分泌学会学術総会, 2016年4月21-23日 (京都市)
 12. 小松原基志、稲垣兼一、原 孝行、細谷武史、寺坂友博、山内尚子、和田 淳、大塚文男: Melatonin による副腎髄質機能調節メカニズムの検討. 第 43 回日本神経内分泌学会学術集会, 2016年10月14-15日 (浜松市)
 13. 木村耕介、寺坂友博、岩田菜穂子、大塚文男: アンドロゲンと GH が骨芽細胞分化へ及ぼす影響とその機序の検討. 第 24 回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 2016年12月3日 (大分市)
 14. 長谷川徹、鎌田泰彦、細谷武史、藤田志保、西山悠紀、岩田菜穂子、平松祐司、大塚文男: 卵巣顆粒膜細胞のステロイド産生に及ぼすアンドロゲン・IGF-I・BMP の影響. 第 24 回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 2016年12月3日 (大分市)
- 2017年
15. 長谷川徹、鎌田泰彦、藤田志保、細谷武史、西山悠紀、稲垣兼一、岩田菜穂子、平松祐司、大塚文男: アンドロゲン・IGF-I による BMP シグナルと卵胞ステロイド合成への影響. 第 21 回日本生殖内分泌学会学術集会, 2017年1月14日 (大阪市)
 16. Kimura K, Iwata N, Otsuka F: Combined effects of androgen and GH on BMP-induced expression of osteoblast markers in C2C12 and MC3T3-E1 cells. ENDO2017 (国際学会), 2017年4月1-4日 (オランダ、米国)
 17. Iwata N, Hasegawa T, Fujita S, Nishiyama Y, Komatsubara M, Hosoya T, Otsuka F: Effects of metformin on ovarian steroidogenesis and BMP receptor signaling in rat granulosa cells. ENDO2017 (国際学会), 2017年4月1-4日 (オランダ、米国)
 18. Hasegawa T, Kamada Y, Hosoya T, Fujita S, Nishiyama Y, Iwata N, Otsuka F: Effects of androgen and IGF-I on ovarian steroidogenesis and involvement of BMP action in rat granulosa cells. ENDO2017 (国際学会), 2017年4月1-4日 (オランダ、米国)
 19. Fujisawa S, Komatsubara M, Hara T, Toma K, Yamauchi N, Inagaki K, Otsuka F: Effects of orexin on prolactin production modulated by BMP-4 in rat pituitary GH3 cells. ENDO2017 (国際学会), 2017年4月1-4日 (オランダ、米国)
 20. 越智可奈子、藤澤 論、岩田菜穂子、小松原 基志、西山悠紀、山内尚子、稲垣 兼一、和田 淳、大塚文男: Melatonin による PRL 分泌制御メカニズムと BMP-4 の関与. 第 44 回日本神経内分泌学会, 2017年10月21-22日 (相模原市)
 21. 大塚文男: BMP と Melatonin によるステロイド分泌調節メカニズムの解析と応用 (研究奨励賞受賞講演). 第 25 回日本ステロイドホルモン学会 (招待講演), 2017年11月18日 (東京)
- 2018年
22. 大塚文男: 下垂体機能低下症: 性ホルモン補充の実際と留意点. 第 28 回間脳下垂体腫瘍学会 (招待講演). 2018年2月10日 (浜松市)
 23. Nishiyama Y, Hasegawa T, Fujita S, Iwata N, Nagao S, Hosoya T, Inagaki K, Wada J, Otsuka F: Incretins affect progesterone production by regulating bone morphogenetic protein activity in rat granulosa cells. ENDO2018 (国際学会), 2018年3月17-20日 (シカゴ、米国)
 24. Hasegawa T, Fujita S, Nishiyama Y, Hosoya T, Nakano Y, Nagao S, Iwata N, Kamada Y, Masuyama H, Otsuka F: Orexin enhances progesterone production by suppressing bone morphogenetic protein activity in rat granulosa

- cells. ENDO2018 (国際学会), 2018年
3月17-20日(シカゴ、米国)
25. Oka K, Hanayama Y, Obika M, Otsuka F:
Involvement of occult thyrotoxicosis
in tachycardia of febrile patients.
ENDO2018(国際学会), 2018年3月17-20
日(シカゴ、米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 文男 (OTSUKA, FUMIO)
岡山大学
大学院医歯薬学総合研究科
教授
研究者番号: 40362967

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし