

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591096

研究課題名（和文）

卵母細胞と BMP 分子による卵胞細胞間での機能連携メカニズムの解明とその応用

研究課題名（英文）

BMP and oocytes integrate intrafollicular communication in the ovary

研究代表者

大塚 文男（OTSUKA FUMIO）

岡山大学・岡山大学病院・准教授

研究者番号：40362967

## 研究成果の概要（和文）：

卵胞に発現する骨形成蛋白(BMP)という分子群は、共通して顆粒膜細胞での卵胞刺激ホルモンによる女性ホルモンの産生を抑制する特徴的な作用をもち、卵胞期において未成熟な排卵を抑制している。この BMP 分子の一部は、ゴナドトロピン刺激下において、顆粒膜細胞の MAPK 経路を介して女性ホルモン分泌調節を行うこと、また別の卵母細胞因子 fibroblast-growth factor (FGF)と呼ばれる分子とは拮抗的に相互作用して、卵母細胞とホルモン産生能をもつ顆粒膜細胞との連携において重要な役割をしていることが明らかとなった。下垂体ホルモンによる卵巣機能調節について神経内分泌学的な視点からアプローチし、下垂体から分泌されるプロラクチン作用に対しても、卵巣に内在する卵胞 BMP システムが活性化されることで卵巣への影響を遮断する可能性も示唆された。さらに、卵巣外内分泌腺（視床下部・下垂体・乳腺など）への BMP の影響について検証し、組織特異的な生理活性をもつ BMP が「視床下部-下垂体-卵巣」からなる生殖内分泌系を統御する新たな側面が明らかとなった。

## 研究成果の概要（英文）：

We have investigated the BMP system that exists in the mammalian ovary and plays roles in regulating various granulosa cell functions. BMP ligands including BMP-2, -4, -6, -7 and -15 were found to inhibit gonadotropin-dependent progesterone synthesis by granulosa cells, which led to the hypothesis that BMPs are a physiological luteinization inhibitor in growing ovarian follicles during the follicular phase of the ovarian cycle. The physiological importance of the BMP system for normal mammalian reproduction has been further recognized by the discovery of antagonistic actions of BMPs to FGF signaling and inhibitory actions of BMPs on prolactin-induced ovarian dysfunctions in our current study. Based on our new findings regarding BMP system in the pituitary, hypothalamus and other tissues, we could expand the understanding of autocrine/paracrine actions of BMPs in the systemic regulation of reproductive endocrine functions.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・内分泌学

キーワード： 卵巣、生殖、不妊、女性ホルモン、排卵

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では高齢化に加えて少子化が進行しており、将来の健全な日本社会を維持する意味で深刻な状況にある。これから超高齢化社会を迎える我が国にとって、その社会を担う若年者層の減少は医療福祉や医療経済の観点のみならず、日本の文化社会の活性化においても大きな障害である。様々な病因により不妊となる病態の解明と新しい治療法へ挑戦は非常に重要な課題である。女性不妊の原因の中でも原発性卵巣機能不全による不妊は、原因が多岐にわたるために病因診断に苦慮するうえ、傷害された卵母細胞は不可逆性であるために、その根本治療は不可能か、非常に姑息的なものに留まっているのが現状である。この卵巣機能不全への解決策がないことの最大の理由として、卵巣の中の機能ユニットである卵胞の発育・機能分化そして排卵までの生理現象のメカニズムの詳細が未だ完全に解明されていないことが挙げられる。この基礎的な生命現象の解明と理解は重要な研究課題であると考えられる。

## 2. 研究の目的

今回の研究期間では、卵母細胞とBMPシグナルの関係を分子レベルで明らかにし、BMP作用に大きく影響する「卵母細胞因子の同定」を目指す。卵胞に発現するBMPは、共通して顆粒膜細胞でのFSHによるprogesterone (P4)産生を抑制する“luteinizing inhibitor”の特徴をもち、卵胞期におけるFSH刺激による未成熟排卵の抑制・黄体化抑制作用に寄与する。

しかし、同じくFSHに誘導されるaromatase活性・estradiol(E2)産生に対する作用についてはBMP ligandにより異なる反応を呈する。我々の検討では、BMP-7とFSHによるE2産生は卵母細胞の存在で増幅されることから、BMP以外の何らかの卵母細胞因子がBMPシグナルの増幅に影響していると考えられる。同様の現象はBMP-15による顆粒膜細胞の増殖作用においても認められた。我々は以前、BMP-15が顆粒膜細胞kit ligand (KL)と卵母細胞c-kitによる細胞増殖機構を有することを示したが、このKL-c-kit loopの活性化は卵母細胞BMP-15の発現を抑制することから、ここにもBMP以外の卵母細胞因子による増殖機転が示唆された。またBMP-7による顆粒膜細胞増殖には、KL-c-kitと独立した卵母細胞由来mitogenの関与も示唆された。これらの知見に基づき、顆粒膜細胞のE2産生能とmitosisに着目し、卵母細胞と顆粒膜細胞間のcell-to-cell communicationの中で、BMPのparacrine作用に寄与する卵母細胞因子を特定する。さらに生殖内分泌系におけるBMPシステムの意義・位置づけについて検討を深める。

## 3. 研究の方法

1) 卵胞発育の細胞生理として「BMP→卵母細胞因子→FSH→estrogen」で構成されるcell-to-cell communicationの解明とこれに寄与する「卵母細胞因子」の特定を目指す。「卵母細胞由来conditioned mediumと顆粒膜細胞」と「卵母細胞と顆粒膜細胞」の共培養系においてBMPの作用を検討する。Estrogen誘

導性の *oocyte factor* 同定のために、*estrogen* 処理および非処理での卵母細胞蛋白を抽出し、2D-electrophoresis・LC-MS/MS解析を行い、*estrogen*により誘導される卵母細胞蛋白を決定する。次に、卵母細胞による顆粒膜細胞FSH受容体シグナルの増幅機序にアプローチする。GRK-6-siRNAを用いたFSH受容体機能の変化とBMP作用との関連を探る。さらに*estrogen*作用がERによるgenomic作用か、膜受容体でのnon-genomic作用が関与するか決定する。一方で、顆粒膜細胞の増殖・DNA合成能に寄与する「KL-c-kitに誘導される*oocyte factor*」を特定するために、KL刺激下での卵母細胞単離培養系において卵母細胞蛋白を抽出し、proteome解析を実施する。

2) 卵母細胞からのBMP分子を診断ツールとして応用するための研究、全身的なBMPのbioavailabilityと内分泌活性、その生理学的意義について研究を遂行する。最近報告された新たな卵母細胞因子：fibroblast-growth factor(FGF)-8に着目して検討を進める。FGF-8によるBMPシグナルへの影響、顆粒膜細胞ステロイド合成能・増殖能の変化、*estrogen*による卵母細胞FGF-8の発現変化についてラット卵巣初代培養細胞を用いて検討し、FGF受容体キナーゼ阻害薬によりデータを検証する。さらにcDNA array/realtime PCR法を用いて、FGF-8刺激下での卵母細胞と卵胞構成細胞でのBMPリガンドとBMP受容体の発現変化を明らかにする。次いで、BMP受容体の細胞内ドメインを欠くconstructを初代培養細胞に遺伝子導入する。このdominant-negative model細胞およびSmad-siRNA導入細胞を用いて、成長段階におけるFGF-8/BMP依存性を決定する。次の段階では、内因性BMPシステムの生体内作用を探求する。そのためBMP中和抗体による受動

免疫法とKLH-hapten付加BMP-antigenによる能動免疫法によりless toxicな手段で内因性BMPを抑制して、卵巣ステロイド合成能の変化・卵胞ステロイド合成酵素発現の変化と卵胞成長・排卵への影響を組織学的な視点から評価する。さらに、BMPの生体内デリバリーにおける全身作用を包括的に捕らえるため、卵巣外内分泌腺(視床下部・下垂体・甲状腺・副腎皮質・副腎髄質・膵ラ氏島・骨組織・乳腺など)へのBMPの影響についてin vitroとin vivoにて把握する。組織特異的な生理活性をもつBMP分子が、「視床下部-下垂体-卵巣」からなる生殖内分泌系へ及ぼす影響の重要性和その位置づけ、臨床応用を目指す。

#### 4. 研究成果

卵胞に発現するBMPは、共通して顆粒膜細胞での卵胞刺激ホルモン(FSH)によるprogesterone産生を抑制する黄体化抑制因子の特徴をもち、卵胞期におけるFSH刺激に対する未成熟排卵の抑制に寄与する。しかし、同じくFSHにより誘導されるaromatase活性とestradiol産生に対する作用については各BMPリガンドにより異なった作用を発揮する。平成20年度の研究では顆粒膜細胞の*estrogen*産生能に着目して卵胞顆粒膜細胞におけるステロイド合成調節機序について検討した。ラット顆粒膜初代培養細胞において、MAP kinase阻害薬を用いた検討により、ERK1/ERK2の活性化はestradiol産生を抑制し、p38-MAPKの活性化はestradiol産生を促進することが示された。顆粒膜細胞由来のBMP-2と莢膜細胞由来のBMP-4は、activinと同様にFSH-p38シグナルの増強により顆粒膜細胞でのestradiol産生を促進し、一方でFSHによるcAMP-PKAシグナルを抑制してprogesterone合成を減少した。また莢膜細胞由来のBMP-7は、FSHによるERK1/ERK2

のリン酸化を抑制して estradiol 産生を増加した。さらに卵母細胞との共培養では、FSH による顆粒膜細胞での MAP kinase 活性化が増幅され、BMP-2, -4, -7 による estradiol 産生がさらに増幅されることも明らかとなった。このように卵胞に発現する BMP は、共通する progesterone 産生の抑制作用に加えて、リガンド依存性に MAP kinase を制御することにより、卵母細胞との細胞間連携を介して estrogen 産生に促進的に作用することが明らかとなった。現在は、卵母細胞と顆粒膜細胞間の communication の中で、BMP の paracrine 作用に寄与する卵母細胞因子を二次元電気泳動を用いて同定中である。平成 21 年度の研究では、近年報告された新たな卵母細胞因子である FGF-8 に着目して検討を進めた。FGF-8 による BMP シグナルへの影響として、顆粒膜細胞ステロイド合成能・増殖能の変化、estrogen による卵母細胞 FGF-8 の発現変化についてラット卵巣初代培養細胞を用いて検討したところ、FGF-8 が卵胞の BMP シグナルを増幅し、主に estradiol 抑制に寄与することが明らかとなった。一方で、FGF 受容体シグナルを抑制すると BMP 作用が前面に出ることから、BMP と FGF シグナルは一部拮抗的に相互作用している可能性も示唆された。また、顆粒膜細胞の FSH 受容体発現を促す内因性 activin と BMP の相互作用着目した検討において、卵母細胞が FSH と BMP-2/4 により p38-MAPK を介して estradiol 分泌を促すことも明らかとなった。さらに、卵巣外内分泌腺（視床下部・下垂体・甲状腺・副腎皮質・副腎髄質・睪ラ氏島・骨組織・乳腺など）への BMP の影響について検証し、組織特異的な生理活性をもつ BMP が、「視床下部-下垂体-卵巣」からなる生殖内分泌系へ中枢から末梢まで広く調節作用を発揮することが示唆された。平成 22 年

度の研究では、神経内分泌学的な視点からアプローチし、プロラクチン(PRL)分子に着目した卵巣機能への影響を検討した。PRL は乳腺への作用に加えて黄体機能維持など性腺にも重要な役割をもつ。種々の原因で生じる高 PRL 血症は生殖内分泌機能に影響し、その機序としてゴナドトロピン分泌の抑制や卵胞の LH 受容体発現を抑制が知られるが、詳細な機序は十分に解明されていない。顆粒膜細胞・卵母細胞には PRL 受容体 L-, S-isoform の発現を認め、FSH により PRL 受容体の発現が増強した。PRL は顆粒膜細胞で JAK/STAT および MAPK 経路を活性化するが、FSH による ERK 経路の活性化が PRL による estradiol 抑制・progesterone 増加に寄与していた。高 PRL 血症は卵胞発育に干渉するが、卵胞 BMP システムが活性化されることで PRL 作用に対して拮抗する可能性が示唆された。PRL は、卵胞顆粒膜細胞において、FSH 受容体下流に生じる MAPK 経路の活性化を介してステロイド合成調節に寄与するが、同時に JAK/STAT 経路を介して、BMP/Smad シグナルを抑制することで卵胞機能に直接影響することが新たに示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 32 件）

2011 年：

1. **Otsuka F**, et al.(①番目/3 人): Integral Role of GDF-9 and BMP-15 in Ovarian Function. *Mol. Reprod. Dev.* (invited review) 78: 9-21, 2011.(査読有り)
2. Tsukamoto N, **Otsuka F**, et al.(②番目/9 人): Activities of bone morphogenetic proteins in prolactin regulation by somatostatin analogs in rat pituitary GH3 cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 332: 163-169, 2011.(査読有り)

2010 年：

3. Nakamura E, **Otsuka F**, et al.(②番目/9 人): A novel antagonistic effect of the BMP system on prolactin actions in

regulating steroidogenesis by granulosa cells. *Endocrinology* 151: 5506-5518, 2010.(査読有り)

4. Tsukamoto N, **Otsuka F**, et al.(②番目/12人): Effects of BMP on ACTH production by pituitary corticotrope cells: Involvement of upregulation of BMP receptor signaling by somatostatin analogs. *Endocrinology* 151: 1129-1141, 2010.(査読有り)
5. **Otsuka F**: Multiple endocrine regulation by bone morphogenetic protein system. *Endocr. J.* (invited review) 57: 3-14, 2010.(査読有り)
6. Miyoshi T, **Otsuka F**, et al.(②番目/9人): Functional relationship between fibroblast growth factor-8 and BMPs in regulating steroidogenesis by rat granulosa cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 325: 84-92, 2010.(査読有り)
7. Matsumoto Y, **Otsuka F**, et al.(②番目/9人): Estrogen and glucocorticoid differentially regulate osteoblast differentiation through the interaction of BMP-2 and TNF- $\alpha$  in C2C12 cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 325: 118-127, 2010.(査読有り)

2009年:

8. Inagaki K, **Otsuka F**, et al.(②番目/8人): p38-mitogen-activated protein kinase stimulated steroidogenesis in granulosa cell-oocyte co-cultures: role of BMP-2 and -4. *Endocrinology* 150: 1921-1930, 2009.(査読有り)
9. Otani H, **Otsuka F**, et al.(②番目/11人): Regulation of gonadotropin-releasing hormone production by estrogen and bone morphogenetic proteins in GT1-7 hypothalamic cells. *J. Endocrinol.* 203: 87-97, 2009.(査読有り)
10. Goto J, **Otsuka F**, et al.(②番目/10人): Enhancement of aldosterone-induced catecholamine production by BMP-4 through activating Rho and SAPK/JNK pathway in adrenomedullar cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296: E904-E916, 2009.(査読有り)
11. 稲垣兼一、**大塚文男**: BMPによる卵巣刺激: 特集/生殖内分泌の新しい視点. *産科と婦人科* 77: 317-322, 2009.(査読無し)

2008年:

12. Otani H, **Otsuka F**, et al.(②番目/9人): Aldosterone breakthrough caused by chronic blockage of AT1R in human

adrenocortical cells: Possible involvement of BMP-6 actions. *Endocrinology* 149: 2816-2825, 2008.(査読有り)

13. Takahashi M, **Otsuka F**, et al.(②番目/9人): BMP-6 and BMP-7 inhibit estrogen-induced proliferation of breast cancer cells by suppressing p38 MAPK activation. *J. Endocrinol.* 199: 445-455, 2008.(査読有り)
14. Miyoshi T, **Otsuka F**, et al.(②番目/9人): Involvement of BMP-4 in growth hormone regulation by octreotide and bromocriptine in rat pituitary GH3 cells. *J. Endocrinol.* 197: 159-169, 2008.(査読有り)
15. Yamashita M, **Otsuka F**, et al.(②番目/9人): Simvastatin antagonizes TNF- $\alpha$  inhibition of BMP-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-MAPK pathway. *J. Endocrinol.* 196: 601-613, 2008.(査読有り)

[学会発表] (計 48 件)

2010年:

1. 松本佳則、**大塚文男**、他: ステロイドによる骨芽細胞分化および炎症性骨分化抑制への影響、第18回日本ステロイドホルモン学会、2010年11月27日、名古屋
2. 稲垣兼一、**大塚文男**、他: 卵巣機能低下および多胎発生におけるヒトBMP-15/GDF-9変異の関与。第15回日本生殖内分泌学会学術奨励賞講演、2010年11月20-21日、大阪市
3. **大塚文男**、中村絵里、他: プロラクチンによる卵巣内分泌機能への影響とその機序の検討。第37回日本神経内分泌学会、2010年10月22-23日、京都
4. Miyoshi T, **Otsuka F**, et al.: A functional interaction between BMPs and FGF-8 in ovarian steroidogenesis. 8th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins. Sept. 15-18, 2010, Leuven, Belgium
5. **Otsuka F**, Tsukamoto N, et al.: BMP actions in the anterior pituitary: BMP-4 inhibits adrenocorticotropin production by pituitary corticotrope cells. 8th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins, Sept. 15-18, 2010, Leuven, Belgium
6. Takeda M, **Otsuka F**, et al.: Bone Morphogenetic Proteins Regulate GnRH-Induced FSH Transcription in

Gonadotrope L $\beta$ T2 Cells. The Endocrine Society's 92nd Annual Meeting ENDO2010, June 19-22, San Diego, CA, USA

7. Nakamura E, Otsuka F, et al.: Interaction of prolactin and bone morphogenetic protein system in regulating steroidogenesis by rat granulosa cells. The Endocrine Society's 92nd Annual Meeting ENDO2010, June 19-22, San Diego, CA, USA

2009年:

8. 三好智子、大塚文男、他: 卵母細胞因子 FGF-8 と BMP による新たな卵巣ステロイド分泌調整の検討。第 14 回日本生殖内分泌学会学術集会、2009 年 11 月 28 日、東京
9. 大塚文男、他: GnRH ニューロン細胞でのエストロゲンによる GnRH 制御と BMP によるその調節。第 17 回日本ステロイドホルモン学会、2009 年 11 月 14 日、福岡市
10. 大塚文男、他: BMP-4 による corticotrope からの ACTH 分泌抑制と SSTR 作動薬の関与。第 36 回日本神経内分泌学会、2009 年 9 月 4-5 日、北九州市
11. 大塚文男: 内分泌組織における Bone morphogenetic protein の多様な機能。第 27 回内分泌代謝学サマーセミナー、2009 年 7 月 16-17 日、福井市
12. Tsukamoto N, Otsuka F, et al. Inhibitory effects of BMP-4 on Adrenocorticotropin Production by Pituitary Corticotrope Cells: Involvement of Upregulation of BMP-Receptor Signaling by Somatostatin Analogues. The Endocrine Society's 91st Annual Meeting ENDO2009, June 10-13, Washington DC, USA
13. Otsuka F, et al.: Bone Morphogenetic Protein-6, -7 and Activin Antagonize Estrogen-Induced Breast Cancer Proliferation by Inhibiting p38-MAPK Pathway. The Endocrine Society's 91st Annual Meeting ENDO2009, June 10-13, Washington DC, USA
14. Miyoshi T, Otsuka F, et al.: Functional Relationship of FGF-8 and BMPs in Regulating Steroidogenesis by Rat Granulosa Cells. The Endocrine Society's 91st Annual Meeting ENDO2009, June 10-13, Washington DC, USA

2008年:

15. 三好智子、大塚文男、他: 卵巣 BMP による MAP kinase の制御を介した estradiol 分泌調節メカニズムの検討。第 13 回 日本生殖内分泌学会学術集会、2008 年 11 月 29 日、大阪市
16. 後藤順子、大塚文男、他: アルドステロンによる副腎髄質機能への影響と BMP-4 によるその調節機序。第 16 回日本ステロイドホルモン学会、2008 年 11 月 22 日、福井市
17. Miyoshi T, Otsuka F, et al. Involvement of p38 MAPK pathway in regulating FSH-induced steroidogenesis by BMP-2 and -4 in rat granulosa cells. The Endocrine Society's 90th Annual Meeting ENDO2008, June 15-18, San Francisco, USA
18. Otani H, Otsuka F, et al. Regulation of GnRH Production by Estrogen and Bone Morphogenetic Proteins in GT1-7 Hypothalamic Cells. The Endocrine Society's 90th Annual Meeting ENDO2008, June 15-18, San Francisco, USA
19. Otsuka F, et al. Antagonistic Effects of Simvastatin on TNF- $\alpha$  Inhibition of BMP-2-Induced Osteoblast Differentiation by Modulating Smad and Ras/Rho-MAP Kinase Signaling. The Endocrine Society's 90th Annual Meeting ENDO2008, June 15-18, San Francisco, USA
20. 三好智子、大塚文男、他: 卵巣顆粒膜細胞でのステロイド合成調節における p38-MAPK の役割と BMP-2,-4 作用の関与。第 81 回 日本内分泌学会学術総会、2008 年 5 月 16-18 日、青森市
21. 大谷寛之、大塚文男、他: 視床下部 GT1 細胞における Estrogen・BMP による GnRH 発現抑制の検討。第 81 回 日本内分泌学会学術総会、2008 年 5 月 16-18 日、青森市

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大塚 文男 (OTSUKA FUMIO)  
岡山大学・岡山大学病院・准教授  
研究者番号: 40362967