

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790886

研究課題名（和文） BMP-15のヒト生殖における役割と恒常活性型BMP-15の開発

研究課題名（英文） The biological role of BMP-15 in human female reproduction

研究代表者

稲垣 兼一（INAGAKI KENICHI）

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：80549882

研究成果の概要（和文）：

BMP-15 は TGF- β スーパーファミリーに属する蛋白で卵巣において卵母細胞に特徴的に発現する因子である。遺伝子異常が不妊の原因となる原発性卵巣機能低下症や二卵性双生児の母親において高頻度に認められることでも注目されている。今回の研究により原発性卵巣機能低下症患者に発見された変異型 BMP-15 はその蛋白合成・分泌が障害され、生理活性が低下することが明らかとなった。また BMP-15 の合成過程における翻訳後修飾に関する検討では翻訳後リン酸化されない蛋白の生理活性が低下することが明らかになった。これらの結果は BMP-15 の女性生殖内分泌における作用を解明する上で重要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

BMP-15 is a TGF- β superfamily member and produced in oocytes within the ovary. BMP-15 has recently been recognized as a candidate factor that may be involved in premature ovarian failure. In this study, BMP-15 mutants identified in premature ovarian failure patients decreased biological activities compared with wild-type, partially due to reduced production of mature protein. Loss of posttranslational phosphorylation of mature BMP-15 also resulted in impaired biological activities. These results are important to elucidate the mechanism in which BMP-15 exerts the various effects on human female reproduction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

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：骨形成蛋白 卵胞発育

1. 研究開始当初の背景

原発性卵巣機能低下症（Premature Ovarian

Failure: POF) は卵巣内における卵胞発育不全により不妊の原因となるが、その病態形成に対する理解は十分でなく、治療も姑息的な

ものに留まる。卵胞とは後に卵子となる卵母細胞とそれを取り囲む体細胞（顆粒膜細胞と莖膜細胞）で形成されるユニットであり、原始卵胞から段階的に成長し排卵前卵胞となり、最後には卵子を放出し排卵に至る。近年、この卵胞を形成する3系統の細胞が相互に autocrine/paracrine 的機序で作用することが卵胞発育にとって非常に重要であることが認識されている。中でも TGF- β スーパーファミリーに属する骨形成蛋白 (BMP) がその相互作用の大きな担い手であることが1999年に Shimasakiらにより初めて報告された (Proc Natl Acad Sci USA 96:7282, 1999)。特に卵胞というユニットの中で卵母細胞にのみ特異的に存在する BMP-15 は卵母細胞を取り巻く顆粒膜細胞に働き細胞増殖を促すとともに、排卵に至る卵胞発育期後半に重要となる下垂体由来の卵胞刺激ホルモン (FSH) に対する感受性を抑制的に制御することが我々の検討により明らかになっている (Endocr Rev 25:72, 2004)。

in vivo の検討ではヒツジにおいて卵母細胞由来の BMP-15 の重要性がすでに確立している。ホモ体で不妊、ヘテロ体で多産というユニークな生殖表現型を示す自然発症遺伝異常ヒツジの原因が X 染色体上の BMP-15 遺伝子の変異であったことが2000年に明らかになり、この発見がこの分野のブレイクスルーとなった (Nat Genet 25: 279, 2000)。その後、BMP-15 に対する能動免疫を賦活したモデルヒツジにおいて、同様の表現型が再現されており、BMP-15 のヒツジ生殖への重要性が証明された。私たちは先述のこれまでの in vitro の知見からこの現象をホモ体では BMP-15 による細胞増殖作用が完全に消失するため、卵胞が成長せず原始卵胞に留まることが不妊に繋がり、ヘテロ体では BMP-15 作用の不完全な消失から一部の卵胞が FSH への感受性を有するまでに成

長し、BMP-15 による FSH 感受性の十分な抑制を受けず、結果として複数の未成熟卵胞の排卵が起こり多産となると解釈している。一方、ラット、マウスといったげっ歯類では BMP-15 は排卵直前の卵胞において発現を認めるのみで、遺伝子改変動物においても生殖における大きな表現型の違いを生じないことがわかっており、げっ歯類のように一度に複数の卵子を排卵する多排卵動物とヒツジなどの通常1つの卵子を排卵する単排卵動物における BMP-15 の生殖に及ぼす影響には差がある可能性が示唆された。そして最近ヒトにおいても、高ゴナドトロピン性卵巣不全の姉妹例において BMP-15 遺伝子のヘテロ変異の存在が初めて発見された (Am J Hum Genet 75:106, 2004)。この変異では、BMP-15 プロタン部位のアミノ酸置換 (Y235C) が生じ、正常な BMP-15 による顆粒膜細胞の増殖作用に干渉することが確認された。その後 POF 患者に対する BMP-15 遺伝子のスクリーニングが行われ、多施設より複数の遺伝子異常が POF において認められることが明らかになった (Hum Mutat 30: 804, 2009)。しかし、これらのスクリーニングにより発見された遺伝子異常については、ほとんど in vitro における機能解析がなされておらず、生殖表現型に関与する変異であるか、単なる遺伝子多型であるかも含め、明らかにされていない。また最近、ヒト BMP-15 の成熟蛋白の6番目のセリン残基が翻訳後修飾として、リン酸化されていることが報告された (Endocrinology 149:812, 2008)。この成熟蛋白の翻訳後修飾が BMP-15 の有する生理活性にどのように影響するかについての詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

「ヒトにおいてもヒトと同じく単排卵動物であるヒツジのように、BMP-15の異常により無排卵や多排卵といった生殖異常をきたす」という仮説の下、ヒトにおけるBMP-15の役割を解明すべくPOF患者に発見された遺伝子変異蛋白を作成し、その機能解析を本研究で行う。また、ヒトBMP-15の成熟蛋白の6番目のセリン残基の翻訳後リン酸化の意義を生理活性への影響に注目して検討する。

3. 研究の方法

(1) 変異型BMP-15発現プラスミドの安定遺伝子導入細胞の作製

POF患者に発見されたBMP-15遺伝子変異の発現プラスミドの作成をsite-directed mutagenesisにより行う。変異BMP-15発現プラスミドをそれぞれリポフェクション法により遺伝子導入し、抗生剤により耐性遺伝子を含むプラスミドを有する細胞のみを選択・継代し、安定遺伝子導入細胞株を樹立する。

(2) 安定遺伝子導入細胞株におけるBMP-15蛋白の発現についての検討

野生型及び変異型BMP-15の成熟蛋白及びプロ蛋白発現を安定遺伝子導入細胞株の細胞溶解液と培養液において行う。

(3) 変異BMP-15蛋白の生理活性の検討

生理活性の検討にはラット卵巢顆粒膜初代培養細胞とヒト卵巢顆粒膜細胞株KGN細胞を用い、顆粒膜細胞における細胞増殖・分化に与える影響を野生型BMP-15と比較・検討する。BMP-15を添加する際には、遺伝子導入細胞の培養液（精製前）と精製成熟蛋白の両方において検討する（精製は抗Flag抗体結合アガロースを用いたカラムクロマトグラフィで行う）。精製前の培養液による刺激では、成熟蛋白産生能、プロセッシング効率、変異プロ領域・プロ蛋白の影響を、精製蛋白による刺激

では変異による成熟蛋白自体への影響を評価する。細胞増殖能の検討では顆粒膜細胞に上記の2通りの方法でBMP-15を添加し、チミジン取り込みアッセイを行う。分化に対する検討では、FSH受容体、ステロイド合成酵素の発現をリアルタイムPCRで、ステロイド産生能をラジオイムノアッセイで検討する。

(4) 擬似リン酸化及び非リン酸化BMP-15発現プラスミドの作製とリコンビナント蛋白精製

POF患者の遺伝子変異を導入した際と同じく、site-directed mutagenesisにより、擬似リン酸化及び非リン酸化hBMP-15F発現プラスミドを作成する。すなわち、BMP-15のリン酸化部位であるmature proteinのN末端から6番目のセリンをそれぞれアスパラギン酸またはグルコン酸に（擬似リン酸化）、あるいはアラニン（非リン酸化）に変換する。その後、293F細胞に一過性遺伝子導入し、その培養液よりBMP-15蛋白を精製する。

(5) 擬似リン酸化及び非リン酸化BMP-15蛋白の生理活性の検討

精製蛋白を用いて（3）の方法で生理活性を検討する。また擬似リン酸化蛋白の受容体結合能・細胞内シグナル伝達への影響を調べるため、BMP受容体細胞外ドメインへの結合能を免疫沈降により検討し顆粒膜細胞に添加後のSmad, MAPKなどのリン酸化も検討する。

4. 研究成果

原発性卵巢機能低下症患者に報告された変異BMP-15は卵巢顆粒膜細胞の細胞増殖能・Smadシグナル伝達などの生理活性の減弱を認めた。さらにイムノブロットによる細胞溶解液や培養液の検討にて、変異型BMP-15はプロ蛋白の合成障害を認めないが、成熟蛋白の生成・分泌が減少することが明らかになった。このこ

とより変異型BMP-15に認める生物活性の低下はプロ蛋白の翻訳後processing障害による成熟蛋白の分泌低下に起因することが示唆された。ヒトと同じく単排卵であるヒツジにおいても成熟蛋白の減少が多排卵・多胎に関与することが既に報告されていることから、卵母細胞因子BMP-15の変異が、ヒトにおいても臨床的に多排卵による二卵性双生児の発生や多排卵後の卵胞枯渇による早期卵巣機能不全に関与する可能性が考えられた。ヒトを含む哺乳動物の卵胞形成・発育に、卵巣局所にて作用するautocrine/paracrine factorが重要な役割を果たすことが明らかになっており、なかでも卵母細胞に発現するBMP-15は卵胞成長に必須の因子であると認識されているが、今回の知見はそれを裏付けるものと考えられる。またヒトBMP-15の成熟蛋白の6番目のセリン残基が翻訳後修飾として、リン酸化されていることの生理学的意義に関する検討ではsite-directed mutagenesisの手法により、ヒトBMP-15のリン酸化部位であるmature proteinのN末端から6番目のセリン (Ser6) をアラニンに変換し、非リン酸化モデルの変異型BMP-15発現プラスミドを作成した。その後HEK293細胞に変異型BMP-15発現プラスミドを遺伝子導入した上で分泌蛋白の生理活性を野生型と比較検討した。その結果、非リン酸化BMP-15蛋白は野生型BMP-15蛋白のもつ卵巣顆粒膜細胞のFSH受容体発現抑制作用を有さないことが明らかになった。また卵巣顆粒膜細胞におけるプロゲステロン産生に関するステロイド合成酵素の発現を野生型BMP-15が抑制するのに対し、非リン酸化モデルではこの作用がキャンセルされることが明らかとなった。BMP-15の機能的異常がヒトと同じく単排卵動物であるヒツジにおいて不妊や多産といった独自の生殖表現型を引き起こすことが以前から知られている。また、ヒトにおいても近年、

原発性卵巣機能低下症患者や二卵性双生児の母親においてBMP-15遺伝子の点突然変異が高頻度にかかることが報告されている。本研究は卵母細胞から発現・分泌されるBMP-15が卵巣顆粒膜細胞に作用し卵巣機能に重要な影響を及ぼすメカニズムを解明する上で重要な知見と考えられた。現在も本研究を進行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

①稲垣兼一、大塚文男、Shunichi Shimasaki、卵巣機能低下および多胎発生におけるBMP-15/GDF-9 変異の関与、日本生殖内分泌学会雑誌、査読無、16巻、2011、21-25

〔学会発表〕(計2件)

①稲垣兼一、卵巣内分泌調節におけるBMPの役割と生殖表現型への影響、第29回内分泌代謝サマーセミナー、2011/7/7、仙台市

②稲垣兼一、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集会、2010/11/20、大阪市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 兼一 (INAGAKI KENICHI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：80549882

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者