

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592464

研究課題名(和文) 莢膜細胞/アンドロゲン系を制御する：ゴナドトロピン不応症の克服を目指して

研究課題名(英文) Dysregulation of intra-ovarian theca cell-androgen axis in women with gonadotropin-poor responsiveness and polycystic ovary syndrome

研究代表者

折坂 誠 (Orisaka, Makoto)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80324143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：排卵誘発にうまく反応できないゴナドトロピン不応症(poor responder)や多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)では、卵巣局所における莢膜細胞/アンドロゲン系の制御異常が背景に存在しており、それらに対し卵巣内のアンドロゲンレベルを正常化させることで、卵胞のゴナドトロピン依存性が回復し排卵誘発にも反応できるようになる可能性が、一連のin vitro実験により示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ovarian androgens produced by theca cells induce granulosa cell proliferation and early follicle growth. Dysregulation of theca cell-androgen axis leads to ovarian pathology such as gonadotropin poor-responsiveness (poor responder) and polycystic ovary syndrome (PCOS). Inactivation of theca cell-androgen axis in poor responder and hyperactivation of theca cell-androgen axis in PCOS can cause downregulation of FSH receptor expression in granulosa cells, resulting in poor response to gonadotropin stimulation. Normalization of androgen levels in ovaries of poor responder and PCOS would contribute the expression of FSH receptor in granulosa cells and the acquisition of gonadotropin responsiveness in growing follicles.

研究分野：生殖医学

キーワード：莢膜細胞 アンドロゲン 卵胞発育 ゴナドトロピン不応症 PCOS 排卵誘発

1. 研究開始当初の背景

近年の深刻な少子化社会において、体外受精など生殖補助医療に寄せられる期待は極めて大きい。しかしながら、ゴナドトロピン不応症 (poor responder) や多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) など、ゴナドトロピンに依存する卵胞発育過程が著しく障害されている不妊女性は、排卵誘発にうまく反応できず良質な卵子を供給できないため、生殖補助医療のスタートラインにも立てていないのが現状である。

排卵誘発に強い抵抗性を示す poor responder と PCOS は一見まったく異なる病態であるが、共通するキーワードは「卵巣局所におけるアンドロゲン制御の異常」であろう。すなわち(1) poor responder では、高齢患者を中心にアンドロゲン欠乏例を高頻度に認め、副腎性アンドロゲン (DHEA) 投与により排卵誘発への反応性が改善する可能性が報告されている。一方で(2) PCOS における卵胞発育停止の本態は卵巣アンドロゲン活性の亢進であり、従来強調されるアンドロゲンが卵胞発育に及ぼす負の影響を最も端的に表す疾患といえる。つまり「卵巣局所のアンドロゲン欠乏 = poor responder」vs. 「卵巣局所のアンドロゲン過剰 = PCOS」という構図が想起される。

そこで、「排卵誘発に抵抗性を示す poor responder や PCOS に対して、卵巣局所における莢膜細胞の活性を制御し、アンドロゲンを至適レベルにコントロールすることができれば、卵胞のゴナドトロピン依存性発育が回復し、排卵誘発にも反応するようになるのではないか」と考えたのが、本研究を立案した背景である。

2. 研究の目的

本研究の臨床的な最終ゴールは、「排卵誘発に強い抵抗性を示す poor responder や PCOS において、卵巣局所の莢膜細胞活性およびアンドロゲンレベルを適正化し、ゴナドトロピン製剤に対する反応性を回復させることで、良質な成熟卵子を生殖補助医療に供給する」ことにある。

卵胞発育過程における前胞状卵胞から胞状卵胞への移行期は、発育制御のメインシステムが卵巣内局所調節からゴナドトロピンへと切り替わる重要なターニングポイントであり、卵胞がゴナドトロピン依存性を獲得するうえで極めて重要なステージと考えられる。

本研究では「前胞状卵胞がゴナドトロピン依存性を獲得するプロセスにおいて、アンドロゲンを含む莢膜細胞由来の因子が重要な役割を担っており、このステージにおける莢膜細胞 / アンドロゲン系の制御異常は、ゴナドトロピンに対する卵胞の反応異常 (排卵誘発剤に対する無・低反応) につながる」と仮説し、以下の2点について解析を試みた。

(1) 前胞状卵胞がゴナドトロピン依存性を獲得するプロセスにおいて、アンドロゲンを含む莢膜細胞由来の因子がどのような役割を担うのかを解明する。

(2) poor responder や PCOS を念頭に、莢膜細胞 / アンドロゲン系が過度に抑制もしくは亢進した状態が、前胞状卵胞のゴナドトロピン依存性獲得プロセスにどのような悪影響を及ぼすのか、検討する。

3. 研究の方法

(1) 本研究の前半では、「正常の卵胞発育過程において、卵胞中のゴナドトロピン受容体が機能するためには、莢膜細胞からのパラクライン・サポートが必要である」と仮説し、卵胞のゴナドトロピン依存性獲得プロセスにおける莢膜細胞 / アンドロゲン系の役割を、当該研究者らが確立した「人工卵胞壁モデル」を用いて解析した。

(2) 本研究の後半では、当該研究者らが確立した「卵胞培養モデル」を応用し、莢膜細胞 / アンドロゲン系の過剰活性化を反映した「PCOS モデル」を作成することで、これらのアンドロゲン制御異常が、前胞状卵胞のゴナドトロピン受容体発現やゴナドトロピン誘導性発育にどのような悪影響を及ぼすのかを検討した。

4. 研究成果

(1) 卵胞のゴナドトロピン依存性獲得プロセスにおける莢膜細胞 / アンドロゲン系の役割

莢膜細胞由来の液性因子を網羅的に解析しパラクライン調節の主要シグナルを絞り込む

莢膜細胞 / アンドロゲン系の制御メカニズムを解析するにあたり、まず莢膜細胞が産生・分泌する液性因子を網羅的に解析し、パラクライン調節の主要シグナルを探索することとした。莢膜細胞の main regulator が LH であることに基づき、ウシ小卵胞から回収した莢膜細胞を LH 刺激し、その際の莢膜細胞内の遺伝子変化を DNA マイクロアレイで網羅的に解析し、その発現をリアルタイム PCR 法で最終確認した。

莢膜細胞を LH 刺激すると、アンドロゲン産生に関与する一連の酵素群が強く発現誘導されるとともに、インスリン様成長因子である IGF1 の発現誘導が観察された。これらの事実より、顆粒膜細胞の機能をパラクライン調節する莢膜細胞由来のシグナルとして、アンドロゲンと IGF1 の存在がクローズアップされた。

莢膜細胞由来の液性因子が、顆粒膜細胞のゴナドトロピン受容体発現に影響するか？

ウシの小卵胞から単離した顆粒膜細胞をコラーゲン膜の表側に、莢膜細胞をコラーゲン膜の裏側にそれぞれ培養し、人工卵胞壁モデルを作成した。莢膜細胞由来の液性因子群

が、(卵胞基底膜に見立てた)コラーゲン膜を通過して顆粒膜細胞に到達し、顆粒膜細胞における FSH 受容体および LH 受容体の mRNA 発現をパラクライン調節する可能性について、リアルタイム PCR を用いて検討した。

本培養モデルにアンドロゲン受容体の特異的阻害剤を加えると、顆粒膜細胞の FSH 受容体発現が著しく抑制された。すなわち顆粒膜細胞で FSH 受容体が発現するためには、アンドロゲンを介した莖膜細胞からのパラクライン調節が不可欠であることが明らかになった。

次に、莖膜細胞を LH 刺激し莖膜細胞/アンドロゲン系を賦活化すると、対側の顆粒膜細胞で LH 受容体の発現が誘導された。この現象は、培養系にアンドロゲン受容体と IGF1 の阻害剤を加えることで完全に抑制された。すなわち顆粒膜細胞で LH 受容体が発現するためには、アンドロゲンと IGF1 を介した莖膜細胞からのパラクライン調節が必須であることが明らかになった。

生体内で卵胞は、顆粒膜細胞に先ず FSH 受容体が、続いて LH 受容体が発現することで、ゴナドトロピン依存性を順次獲得していくことが知られている。研究(1)の結果より、卵胞がゴナドトロピン依存性を獲得するうえで、莖膜細胞/アンドロゲン系の賦活化が本質的な役割を担うことが明らかになった。さらには、莖膜細胞/アンドロゲン系がうまく賦活化されないと、卵胞がゴナドトロピン依存性を獲得できず poor responder に陥る可能性が推測された。

(2) 莖膜細胞/アンドロゲン系の制御異常が卵胞のゴナドトロピン依存性獲得プロセスに及ぼす悪影響

アンドロゲン過剰が卵胞のゴナドトロピン依存性獲得プロセスに及ぼす悪影響

PCOS を念頭に、莖膜細胞/アンドロゲン系の過剰活性化が前胞状卵胞に及ぼす影響を検討した。具体的には、日本人女性に典型的な非肥満型 PCOS の内分泌的特徴である高 LH 環境を再現する目的で、高濃度の LH が前胞状卵胞の FSH 受容体発現や FSH 誘導性の卵胞発育にどのような影響を及ぼすのか、卵胞培養モデルを用いて検討した。

ラット前胞状卵胞を LH 刺激すると、アンドロゲン産生と胞状卵胞への発育が促進された。この系にアンドロゲン受容体の阻害剤を加えると、LH 誘導性の卵胞発育が完全に抑制されたことから、LH がアンドロゲンの卵胞発育効果を利用することで前胞状卵胞から胞状卵胞への発育を誘導することが明らかになった。

LH 刺激による卵胞内の遺伝子発現の変化を調べると、莖膜細胞の 17 α -ヒドロキシラーゼ発現が強力に促進される一方で、卵子の GDF9 や顆粒膜細胞の FSH 受容体の発現が有意に抑制された。当該研究者らは「卵子由

来の GDF9 が、顆粒膜細胞の FSH 受容体発現に必須である」ことを報告しているが、高 LH 環境はこのような卵子~顆粒膜細胞間のクロストークを破綻させると思われる。

次に、LH で前培養した前胞状卵胞に FSH 刺激を加えたところ、FSH 誘導性の cAMP 産生や卵胞発育効果が著しく減弱していた。ちなみに、アンドロゲンで前培養した卵胞ではこのような減弱効果は認めていない。以上の結果より、高 LH 環境では、莖膜細胞由来の(アンドロゲン以外の何らかの)ファクターが、顆粒膜細胞の FSH 受容体発現をパラクライン的に抑制する可能性が推測された。

研究(2)の結果をまとめると、「日本人女性に多い非肥満型 PCOS で特徴的な高 LH 環境は、莖膜細胞/アンドロゲン系を強力に活性化することで、前胞状卵胞から胞状卵胞への発育を誘導する。ところがこの高 LH 環境は、卵子~顆粒膜細胞~莖膜細胞間のクロストークを破綻させ、顆粒膜細胞の FSH 受容体発現を抑制するため、せっかく発育してきた卵胞がゴナドトロピン依存性をうまく獲得できず、結果的に卵胞発育が停止してしまうのではないかと結論付けられた。

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 3 件)

- H.Tsuyoshi, M.Orisaka, S.Fukuda, K.Hattori, BK.Tsang, Y.Yoshida. Protective effect of dienogest on chemotherapy-induced reduced fertility in female rats. *Steroids*. 査読有, 93, 2015, 1-7. DOI : 10.1016/j.steroids.2014.10.010.
- M.Orisaka, K.Hattori, S.Fukuda, T.Mizutani, K.Miyamoto, T.Sato, BK.Tsang, F.Kotsuji, Y.Yoshida. Dysregulation of ovarian follicular development in female rat: LH decreases FSH sensitivity during preantral-early antral transition. *Endocrinology*. 査読有, 154(8), 2013, 2870-2880. DOI : 10.1210/en.2012-2173
- S.Kawabe, T.Yazawa, M.Kanno, Y.Usami, T.Mizutani, Y.Imamichi, Y.Ju, T.Matsumura, M.Orisaka, K.Miyamoto. A novel isoform of liver receptor homolog-1 is regulated by steroidogenic factor-1 and the specificity protein family in ovarian granulosa cells. *Endocrinology*. 査読有, 154(4), 2013, 1648-1660. DOI : 10.1210/en.2012-2008

[学会発表](計 14 件)

M.Orisaka, H.Tsuyoshi, Y.Yoshida.

Protective effect of dienogest on chemotherapy-induced fertility female rats. IFFS/JSRM International Meeting 2015. 2015.4.26-29, パシフィコ横浜 (横浜市)

折坂 誠. 卵胞発育における卵子・顆粒膜細胞・莢膜細胞間のクロストーク. 第67回日本産科婦人科学会学術講演会(シンポジウム). 2015.4.9-12, パシフィコ横浜 (横浜市)

折坂 誠. 不妊治療後の妊娠・分娩はハイリスク!. 第7回福井生殖生物学・医学研究会. 2014.11.6, ユアーズホテルフクイ (福井市)

折坂 誠. 不妊治療後の妊娠・分娩はハイリスク!. 第3回福井県総合周産期勉強会. 2014.6.22, 福井大学 (永平寺町) 今道 力敬, 矢澤 隆志, 河邊 真也, 向井 邦晃, 折坂 誠, 水谷 哲也, 宮本 薫. ヒト生殖腺におけるHSD11B2の役割. 第87回日本内分泌学会学術集会. 2014.4.24-26, 福岡国際会議場 (福岡市)

今道 力敬, 矢澤 隆志, 河邊 真也, 向井 邦晃, 折坂 誠, 水谷 哲也, 宮本 薫. ヒト生殖腺における新たなアンドロゲン代謝機構. 第18回日本生殖内分泌学会学術集会. 2013.12.7, シェーンバッハ・サボー (東京)

折坂 誠. 多嚢胞性卵巣症候群における卵胞発育停止メカニズム. 第31回日本受精着床学会総会・学術講演会(ワークショップ). 2013.8.8-9, 別府国際コンベンションセンター (別府市)

M.Orisaka, Hattori K, S.Fukuda, Y.Yoshida. Dysregulation of ovarian follicular development:LH decreases FSH sensitivity during preantral-early antral transition. 46th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (SSR). 2013.7.22-26, Montreal(Canada)

Hattori K, M.Orisaka, S.Fukuda, Y.Yoshida. Luteinizing hormone stimulates insulin-like growth factor (IGF) system in bovine theca cells. 46th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (SSR). 2013.7.22-26, Montreal(Canada)

折坂 誠. 多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)の病態を探る~私たちの研究から見えてくること~. 第50回北陸生殖医学会学術総会イブニングセミナー(招請講演). 2013.6.16, 石川県地場産業振興センター (金沢市)

折坂 誠, 服部 克成, 福田 真, 吉田 好雄. 脂肪由来の炎症性サイトカインTNF α はFSH受容体の発現抑制を介して卵胞発育を抑制する. 第65回日本産科婦人科学会学術講演会. 2013.5.10-12,

札幌プリンスホテル(札幌市)
折坂 誠. 前胞状卵胞における卵子・顆粒膜細胞・莢膜細胞間のネットワーク. 日本生殖再生医学会第8回学術集会(シンポジウム). 2013.3.10, シェーンバッハ・サボー (東京)

折坂 誠. 卵胞発育の基礎知識アップデート. 第57回日本生殖医学学術講演会・総会(シンポジウム). 2012.11.8-9, 長崎ブリックホール (長崎市)

折坂 誠. PCOSの病変解明を目指して. 日本内分泌学会 第30回内分泌代謝学サマーセミナー(シンポジウム). 2012.7.12-14, 伊香保「福一」(渋川市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

折坂 誠 (ORISAKA, Makoto)
福井大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 80324143