

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860706

研究課題名(和文) 生殖内分泌調節におけるGH/IGF-I系の役割とBMPの関与

研究課題名(英文) A role of GH/IGF-I and participation of BMP in the regulation of reproductive internal secretion

研究代表者

寺坂 絵里(中村絵里)(Terasaka (Nakamura), Eri)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：30612634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：成長ホルモン(GH)やプロラクチン(PRL)などの下垂体ホルモン分泌異常を伴う病態では、卵巣機能障害や不妊症などの生殖内分泌機能への影響が認められる。GH/IGF-1を取り巻く因子として今回我々はメラトニンに着目した。メラトニン受容体はGnRH神経や卵巣に発現しており、生殖内分泌系に影響していると示唆されているが、その詳細は未だ不明である。ラット顆粒膜細胞においてBMP-6を用いて、メラトニンの卵巣機能への影響について検討を行った。検討の結果、メラトニンは卵巣顆粒膜細胞において、BMP-6シグナルに拮抗することでプロゲステロンの合成維持に寄与するという新たな作用機序が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the patients with hypothalamus-pituitary disorders, impairment of reproductive functions often occurs. As a factor surrounding GH/IGF-1 hormone, we paid attention to a melatonin. Melatonin receptors were detected in GnRH neurons and ovaries, suggesting that melatonin plays a functional role in the reproductive system not only centrally but also peripherally in the ovary. we studied the role of melatonin in ovarian steroidogenesis regulated by BMP-6 using rat primary granulosa cells of immature female rat ovaries. As a result of discussion, it was shown that melatonin plays a key role in the regulation of BMP-6 signal intensity for controlling progesterone production in the ovary.

研究分野：医歯薬学

キーワード：生殖内分泌学 卵巣 下垂体

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣のステロイドホルモンの分泌や卵の発育プロセスは、視床下部(GnRH)・下垂体・卵巣からなる生殖内分泌軸により、緻密な統御を受けている。一方で卵巣に発現する骨形成蛋白(BMP: Bone Morphogenetic Protein)は、下垂体前葉から分泌される卵巣刺激ホルモン(FSH)の影響下で、顆粒膜細胞による卵巣ホルモン分泌や卵巣成長を巧みに制御している。様々な原因により生じる間脳・下垂体機能障害をもつ女性では、ゴナドトロピン分泌障害による排卵機能や卵巣ステロイドの合成能の低下に加え、視床下部・下垂体前葉ホルモンの分泌低下により妊孕能の低下を来すが、その詳細な機序は不明である。我々のグループはこれまでラット卵巣顆粒膜細胞・卵母細胞の共培養系を用いて、プロラクチン(PRL)や成長ホルモン(GH)などの種々のホルモンが H(視床下部)-P(下垂体)-O(卵巣)系に与える影響について、卵巣の BMP 分子との関係に着目して検討を行ってきた。PRL や GH 分泌異常は臨床的にも妊孕性に与えるが、我々は高 PRL 血症に晒された卵巣において PRL が直接的に卵巣刺激ホルモン(FSH)の作用を制御することを証明した。また卵巣内の GH/IGF-1 と BMP のシグナルが相互に拮抗すること、視床下部で下垂体機能を抑制するソマトスタチンも卵巣ステロイド分泌能に影響することを明らかにした。引き続き GH/IGF を取り巻く内分泌因子として、松果体から分泌されるメラトニンに着目して研究を進める。メラトニンは概日リズムの調節や睡眠調節への作用に加えて、卵成熟や黄体化などの生殖内分泌機能にも関与することが知られている。メラトニン受容体(MT1・MT2)は脳だけでなく全身の諸臓器に存在しており、卵巣顆粒膜細胞にも発現し LH 受容体やプロゲステロン分泌の維持・抗酸化作用にも寄与する。また近年不妊症や多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)治療にも有効性が期待されてい

るが、その詳細なメカニズムは不明である。これらの背景を踏まえ、今回は松果体ホルモンであるメラトニンが卵巣機能にどのように影響を及ぼすかを明らかにしたいと考えた。

## 2. 研究の目的

間脳下垂体疾患は新たに 2009 年 10 月より厚生労働省の特定疾患として追加された難病の 1 つとなっている。患者の QOL の向上のために、これら下垂体疾患による性腺系・生殖内分泌系へのインパクトとその機序を解明することは医学的観点から少子化の阻止・不妊症の解決のためにも重要な課題である。下垂体からの FSH/LH の分泌以外に PRL や GH/IGF-1 もこの HPO axis に関与していると考えられている。我々のこれまでの検討から BMP 因子は GH/IGF-1 系による卵巣成長の鍵となっている可能性が高い事が考えられ、GH/IGF-1 系と GH/IGF-1 を取り巻く内分泌因子に着目し、両者の機能連携のメカニズムについて明らかにすることを目的とした。また新たな検討項目として卵巣に発現するミトコンドリア蛋白である Prohibitin(PHB)にも着目している。PHB は卵巣では顆粒膜細胞の増殖と分化を制御する因子として知られているが、その詳細な分子機序は不明である。今回卵巣における PHB の役割と BMP 因子を含む卵巣成長因子との関与について検討したいと考えている。また estrogen による GnRH 分泌への正・負の両方のフィードバックに寄与するキスペプチンシステムと、GnRH 抑制因子である GnIH の新たな作用にも着目し、視床下部 GnRH ニューロン GT1-7 と下垂体ゴナドトロフ細胞 L T2 を用いて GH-IGF-1/somatostatin、メラトニンによる GnRH-FSH、LH 転写・分泌への影響についての検討を予定している。

### 3. 研究の方法

未成熟ラットの卵巣より分離した卵巣顆粒膜細胞初代培養系を用いて、GH/IGF-1を取り巻く因子と卵巣局所因子BMPとの機能連関に注目し卵巣内分泌調節への影響について検討する。我々はラット卵母細胞および顆粒膜細胞自体に、GH受容体(GHR)・IGF-1受容体(IGF-1R)の両者と、somatostatin受容体(SSTR-2,5>SSTR-1,3,4)、melatonin受容体(MT1>MT2)の発現を検出している。卵母細胞存在下と非存在下での顆粒膜細胞条件下において、メラトニンによるFSH誘導性の卵巣ステロイド分泌への影響とステロイド合成酵素(aromatase, P450scc, StAR, 3 HSD2)の転写活性を評価する。またメラトニンを活性化した条件下でForskolin/cAMPアナログによる顆粒膜細胞におけるステロイド産生能への影響を観察し、定量リアルタイムPCRでステロイド合成酵素の発現レベルを評価する。BMP分子のうち特にBMP-6との関係に着目して、BMP受容体Smadシグナルへの影響をウエスタンブロット法とId1-reporterによるレポーターアッセイにより検証し、の卵巣機能への影響とその機序について解析する。PHBについての検討も同様の培養系を用いて、顆粒膜細胞・卵母細胞におけるPHBの発現状況をPCRで確認し、卵母細胞に発現するBMP-15とGDF-9との関係について、ステロイド合成能への影響やSmadシグナルへの影響を検証する。

### 4. 研究成果

BMP-6は卵巣顆粒膜細胞と卵母細胞に発現し、顆粒膜細胞のcAMP産生を減少してプロゲステロン合成を抑制する。メラトニンの顆粒膜細胞への添加では、FSHによる卵巣ステロイド分泌には変動を与えなかった。しかし、メラトニンはFSHにより誘導されるcAMPとプロゲステロン合成に対するBMP-6の抑制作用と、プロゲステロン合成酵素系(StAR・

P450scc・3 HSD2)の発現に対するBMP-6の抑制作用に拮抗した。この顆粒膜細胞におけるメラトニン作用は卵母細胞との共培養下でも認められた。BMP-6はMT1受容体の発現レベルに影響せず、メラトニンはBMP1型・2型受容体(ALK-2, -6/BMPRII, ActRII)の発現を変動しなかったが、メラトニンは抑制性Smad6の発現を増加してBMP-6によるSmad1/5/8シグナル伝達を減弱した。以上より、メラトニンは卵巣顆粒膜細胞でのBMP作用に拮抗してプロゲステロン合成維持に寄与する新たな作用機転を明確にすることができた。PCOSの顆粒膜細胞には、正常人と比較してBMP-6が過剰に発現していることが複数のグループから近年報告されている。メラトニンは不妊症やPCOS治療へ有効性が期待されているが、その分子機序の詳細は不明であった。今回の研究は新たなメラトニン作用を示すものであり、生殖内分泌と神経内分泌の接点ともなりうる研究であったと考える。

一方、卵巣に発現するProhibitin(PHB)の検討においては、ラット卵巣顆粒膜細胞と卵母細胞にはPHB1とPHB2両者の発現を認めたが卵母細胞にPHB2が多く発現していた。Estrogen存在下で卵母細胞のPHB2の発現が増幅された。siRNAを用いてPHB2をノックアウトした検討では、顆粒膜細胞におけるプロゲステロン合成が促進され、一方でプロゲステロン産生を抑制するBMP-15/GDF-9で処理するとPHB2の発現の抑制を認めた。PHB2を誘導するEstrogen処理下ではSmadシグナルが抑制されており、これまでの結果から、PHB2はBMP-15/GDF-9との機能連関を介して卵巣ステロイド合成に関与している可能性が示唆される。今後もさらに検討を続けていく予定である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1) Hara T, Otsuka F, Tsukamoto-Yamauchi N, Inagaki K, Hosoya T, Nakamura E, Terasaka T, Komatsubara M, Makino H. Mutual effects of melatonin and activin on induction of aldosterone production by human adrenocortical cells. J Steroid Biochem Mol Biol. 2015 Aug;152:8-15.

(査読有)(10.1016/j.jsbmb.2015.04.012.)

2) Hosoya T, Otsuka F, Nakamura E, Terasaka T, Inagaki K, Tsukamoto-Yamauchi N, Hara T, Toma K, Komatsubara M, Makino H. Regulatory role of BMP-9 in steroidogenesis by rat ovarian granulosa cells. Steroid Biochem Mol Biol. 2015 Mar;147:85-91.

(査読有)(0.1016/j.jsbmb.2014.12.007.)

3) Nakamura E, Otsuka F, Terasaka T, Inagaki K, Hosoya T, Tsukamoto-Yamauchi N, Toma K, Makino H. Melatonin counteracts BMP-6 regulation of steroidogenesis by rat granulosa cells. J Steroid Biochem Mol Biol. 2014 Sep;143:233-9.

(査読有)(10.1016/j.jsbmb.2014.04.003.)

〔学会発表〕(計3件)

1) Mituki Kyoya, Takeshi Hosoya, Toru Hasegawa, Eri Nakamura, Nahoko Iwata, Motoshi Komatsubara, Naoko Yamauchi, Tomoko Miyoshi, Kenichi Inagaki and Fumio Otsuka : Functional role of oocyte prohibitin-2 in the regulation of progesterone production by rat granulosa cells. : The Endocrine Society's Annual Meeting( Boston, Massachusetts : USA 、2016年4月1日～4月4日 : 発表確定)

2)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(神戸国際会議場 : 神戸市、2016年1月9日)

3)中村絵里、大塚文男、細谷武史、寺坂友博、

原孝行、当真貴志雄、越智可奈子、塚本尚子、三好智子、稲垣兼一、榎野博史 : BMP による卵胞ステロイド合成調節に対するメラトニンの拮抗作用 : 第87回日本内分泌学会学術集会(福岡国際会議場 : 福岡市、2014年4月26日)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

## 6 . 研究組織

研究代表者

寺坂(中村)絵里 (TERASAKA/NAKAMURA ERI)  
岡山大学病院・医員  
研究者番号 : 30612634