

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861320

研究課題名(和文) 主席卵胞選択メカニズムの解明をめざして：質の高い卵子の選択のために

研究課題名(英文) Elucidation of the intraovarian mechanism during selection of a dominant follicle

研究代表者

服部 克成 (HATTORI, KATSUSHIGE)

福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員

研究者番号：60529345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの月経周期で排卵できるのは1個の主席卵胞のみで、他の卵胞は顆粒膜細胞アポトーシスを介して閉鎖に陥る。単一卵胞が選択されるメカニズムは未だ不明な点が多い。ヒトと同じ単一排卵モデルであるウシの小胞状卵胞から顆粒膜細胞と莢膜細胞を単離し、単層培養系と、人口卵胞壁モデルを用いて解析した。莢膜細胞をLH刺激することにより、顆粒膜細胞でLH受容体とアロマトラーゼの発現が誘導され、エストロゲン産生が亢進し、アポトーシスが抑制された。卵胞がFSH依存性の発育プロセスからLH依存性の成熟過程へ移行するプロセスにおいて、莢膜細胞に対するLH刺激が中心的な役割を担う可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Only a single dominant follicle can ovulate in the human menstrual cycle, whereas most follicles undergo atresia by granulosa cell apoptosis, a selection process that ensures the release of only the healthiest and most viable oocyte. The mechanism during selection of a dominant follicle is still unknown. In this study, we isolated granulosa cells and theca cells from bovine small follicles, and cultured them in an in vitro "two-cell two-gonadotropin" system. Luteinizing hormone (LH) stimulation to theca cells induced the expressions of LH receptor and aromatase in granulosa cells. LH stimulation to theca cells also increased estrogen production and suppressed apoptosis in granulosa cells. These results suggest that LH stimulation to theca cell plays a critical role during the follicle selection from the follicle stimulating hormone (FSH)-dependent growth of early follicles to the LH-dependent maturation of a dominant follicle.

研究分野：医歯薬学

キーワード：卵胞 莢膜細胞 顆粒膜細胞 人口卵胞壁モデル LH アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

本邦では、初婚年齢の上昇やライフスタイルの変化に伴い、不妊治療とくに生殖補助医療 (ART) へのニーズが高まっており、不妊治療に向けていかに良質な卵子をより多く提供できるのかが喫緊の課題と考えられる。ヒトの性周期では、毎月 10~15 個の卵胞が発育を開始するが、最終的に排卵まで到達できるのはたった一つの主席卵胞のみであり、それ以外の卵胞はすべて閉鎖に陥ることが知られている。単一卵胞が選択されるメカニズムの詳細はいまだ不明な点が多いが、卵胞の LH 依存性獲得や、卵胞局所における高エストロゲン環境、さらには IGF システムの活性化が重要な役割を担うと推測されている。

ヒトの月経周期において、主席卵胞が選択されるのは卵胞期中期である。興味深いことに、この卵胞期中期は、下垂体ゴナドトロピンの血中レベルが、FSH 優位から LH 優位に切り替わるタイミングと一致する。そこで、ヒトと同じ単一排卵動物であるウシの顆粒膜細胞と莢膜細胞を用いて予備的検討を行った。すると LH は、顆粒膜細胞のステロイド産生や IGF 関連遺伝子の発現に影響しないが、莢膜細胞におけるアンドロゲン産生と IGF システムの活性化を促すことが判明した。

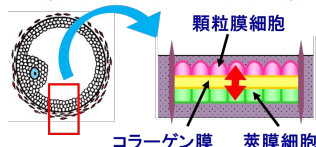
2. 研究の目的

上記背景より「LH は、莢膜細胞内の IGF システムを活性化し、オートクライン・パラクライン調節を介して莢膜細胞や顆粒膜細胞の LH 受容体発現を誘導することで、卵胞の LH 依存性獲得さらにはその後の生存や発育・成熟プロセスを促進的に制御するのではないか」と考え、(1) 莢膜細胞における IGF システムの活性化メカニズムとその役割 (2) LH が卵胞を高エストロゲン環境に導くメカニズム (3) 卵胞とくに顆粒膜細胞における LH 受容体の発現誘導メカニズム等について解析を試みた。

3. 研究の方法

ヒトと同じ単一排卵モデルである、ウシの小胞状卵胞から顆粒膜細胞と莢膜細胞を単離し、顆粒膜細胞、莢膜細胞をそれぞれ培養した単層培養モデル 卵胞の基底膜に見立てたコラーゲン膜の、表側に顆粒膜細胞を、裏側に莢膜細胞を培養し、人工卵胞壁モデル (図 1) を作成し、以下の検討を行った。

図 1. ウシ卵胞細胞を用いた人工卵胞壁モデル



(1) 単層培養モデルを使用し、莢膜細胞お

よび顆粒膜細胞をゴナドトロピンで刺激した際の、LH 受容体・ステロイド産生因子・IGF システムの mRNA 発現

(2) 人工卵胞壁モデルを使用し顆粒膜細胞をゴナドトロピンで刺激した際の、顆粒膜細胞での LH 受容体・ステロイド産生因子・IGF システムの mRNA 発現

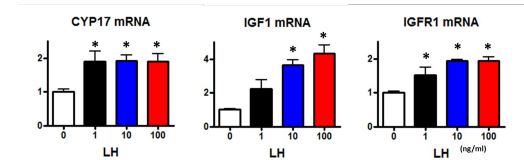
(3) 人工卵胞壁モデルを使用し莢膜細胞を LH で刺激した際の、顆粒膜細胞での LH 受容体・ステロイド産生因子・IGF システムの mRNA 発現

(4) 人工卵胞壁モデルを使用し、顆粒膜細胞のアポトーシスへの影響

4. 研究成果

(1) 顆粒膜細胞を FSH や LH で刺激したが、LH 受容体や IGF の発現誘導は認めなかった。莢膜細胞を LH で刺激したところ、アンドロゲン産生の key enzyme である 17 α ヒドロキシラーゼとともに、IGF1 と IGF 受容体の発現が誘導された。(図 2)

図 2. 莢膜細胞を LH 刺激したときの mRNA 発現



(2) 人工卵胞壁モデルにおいて、表側の顆粒膜細胞を FSH で刺激したところ、顆粒膜細胞において IGF1 と IGF2 の発現が誘導された (図 3) エストロゲン産生が亢進した。顆粒膜細胞を LH で刺激しても、顆粒膜細胞では LH 受容体や IGF システムに変化は認めなかった。(図 4)

図 3. 顆粒膜細胞を FSH 刺激したときの顆粒膜細胞での mRNA 発現 (人工卵胞壁モデル)

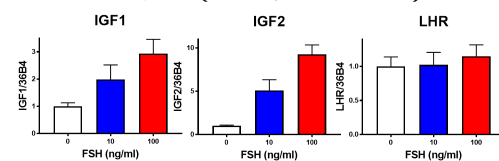
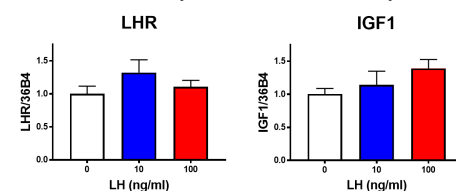


図 4. 顆粒膜細胞を LH 刺激したときの顆粒膜細胞での mRNA 発現 (人工卵胞壁モデル)



(3) 人工卵胞壁モデルにおいて裏側の莢膜細胞を LH で刺激したところ、反対側の顆粒膜細胞において LH 受容体とアロマターゼの発現が誘導され (図 5) エストロゲン産生が亢進した。この顆粒膜細胞で誘導された LH 受容体は、hCG 刺激で cAMP を産生 (図 6) しその機能が証明された。

図 5. 莢膜細胞を LH 刺激したときの顆粒膜細胞

での mRNA 発現 (人工卵胞壁モデル)

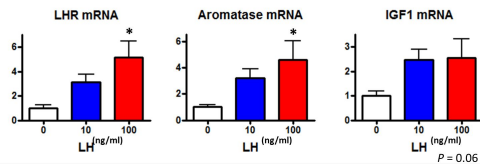
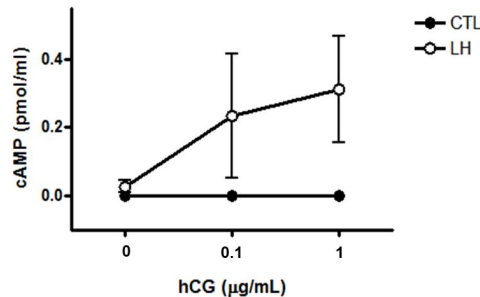


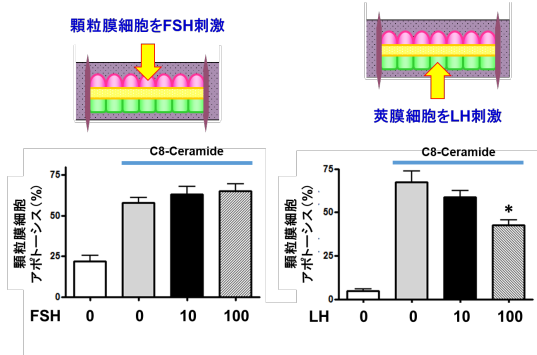
図6. 顆粒膜細胞で誘導された LH 受容体を hCG 刺激した時の cAMP 産生



(4) 顆粒膜細胞のアポトーシスについて、人工卵胞壁モデルでの検討

顆粒膜細胞を FSH 刺激しても、顆粒膜細胞のアポトーシスは抑制されなかったが、莢膜細胞を LH 刺激したところ、反対側の顆粒膜細胞でアポトーシスが抑制された (図7)。

図7. 顆粒膜細胞のアポトーシスへの影響 (人工卵胞壁モデル)



(結論) 莢膜細胞を LH 刺激することにより、顆粒膜細胞で LH 受容体とアロマトラーゼの発現が誘導され、エストロゲン産生が亢進し、アポトーシスが抑制された。卵胞が FSH 依存性の発育プロセスから LH 依存性の成熟過程へ移行するプロセスにおいて、莢膜細胞に対する LH 刺激が中心的な役割を担う可能性が示唆された。

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 2 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. 93:1-7,2015.1
DOI;10.1016/j.steroids.2014.10.010.

大沼 利通, 田嶋 公久, 佐藤 久美子, 服部 克成, 辻 隆博, 吉田 好雄. 当院における術前診断 CIN3 に対する子宮頸部円錐切除術後の細胞診による管理. 産婦人科の実際, 65(1):101-6, 2016.1

[学会発表](計 11 件)

服部 克成, 折坂 誠, 福田 真, 吉田 好雄. LH~莢膜細胞系が卵胞選択を主導する可能性. 第21回日本生殖内分泌学会学術集会. 2017.1.14, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

福田 真, 服部 克成, 佐藤 久美子, 辻 隆博, 田嶋 公久: 大量の血性腹水を伴う子宮内膜症の一例, 福井県産婦人科医師連合第82回夏期臨床研修会, 2016.8.28, (福井県福井市)

服部 克成, 折坂 誠, 福田 真, 田嶋 公久, 吉田好雄. LH~莢膜細胞系が卵胞選択を主導する可能性. 第9回福井産婦人科研究会. 2016.8.6, 福井大学医学部臨床研修センター(福井県吉田郡永平寺町)

服部 克成, 折坂 誠, 福田 真, 吉田 好雄. LH~莢膜細胞系が卵胞選択を主導する可能性. 中日本産婦人科セミナー. 2016.7.30-31, ホテルイタリヤ軒(新潟県新潟市)

大沼 利通, 田嶋 公久, 佐藤 久美子, 服部 克成, 辻 隆博, 吉田 好雄: 当院における術前診断の CIN3 に対する子宮頸部円錐切除術後の細胞診による管理, 第58回日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 2016.7.8-10, 米子コンベンションセンター(鳥取県米子市)

田嶋 公久, 大沼 利通, 佐藤 久美子, 服部 克成, 辻 隆博: 子宮頸管炎に続発したクラミジア直腸炎の一例, 第17回福井性感染症研究会, 2016.3.17, 福井商工会議所(福井県福井市)

大沼 利通, 佐藤 久美子, 服部 克成, 辻 隆博, 田嶋 公久: 当院における婦人科癌に合併した深部静脈血栓症及び肺塞栓症への対応, 第23回福井婦人科腫瘍研究会, 2015.6.17, ユアーズホテルフクイ(福井県福井市)

田嶋 公久, 大沼 利通, 佐藤 久美子, 服部 克成, 辻 隆博. 過多月経に対する子宮内膜切除術の治療成績. 第43回北陸産婦人科学会総会並びに学術集会. 2015.5.30-31, 富山国際会議場(富山県富山市)

知野 陽子, 黒川 哲司, 服部 克成, 品川 明子, 吉田 好雄, 笠島 忍, 今村 好章: 子宮内膜細胞診が陽性だった卵巣出血の1例, 第32回福井県日本臨床細胞学会総会並びに学術集会, 2015.3.15, 福井県立病院(福井県福井市)

服部 克成. 子宮頸癌とHPV(ヒトパ

ピローマウイルス) - がん検診から、診断・治療について - . 福井赤十字病院イブニングセミナー . 2014. 8. 21 , 福井赤十字病院 (福井県福井市)

山本 真, 服部 克成, 福田 真, 西島浩二, 折坂 誠, 吉田 好雄: 正常血圧で reversible posterior leukoencephalopathy syndrome を発症し産褥子癩と最終診断した一例, 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2014. 04. 18-20 東京国際フォーラム (東京都千代田区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 : なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

服部 克成 (HATTORI KATSUSHIGE)
福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員

研究者番号 : 60529345

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

折坂 誠 (ORISAKA MAKOTO)
福井大学・学術研究院医学系部門 (附属病院部) ・講師

研究者番号 : 80324143