

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18681

研究課題名(和文) AMHによる卵胞発達の制御機構と副腎皮質ホルモンDHEAの相互作用

研究課題名(英文) Interaction of AMH and DHEA on ovarian folliculogenesis

研究代表者

狩野 元宏 (Kano, Motohiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師(非常勤)

研究者番号：00573403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では卵胞の発達制御と副腎皮質ホルモンの関わりについての基礎的実験を行った。

抗ミュラー管ホルモン(AMH)受容体が発現しステロイドの産生能力ももつ顆粒膜細胞の腫瘍細胞株を用いて、副腎皮質ホルモンのひとつであるデヒドロエピアンドロステロン(DHEA)の影響を検証したが、予想に反して有意な変化がみられなかった。

しかし副腎皮質ホルモンの発現変化がある思春期前後で予後が異なる胚細胞腫瘍の細胞株では、DHEAが特定の遺伝子Aの発現変化を含む遺伝子の発現変化が観察された。遺伝子Aは過去に実施したAMH付加実験において大きな変化があった遺伝子で、AMHとDHEAを連携させる可能性を持つと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究を通して浮かび上がった遺伝子Aは、以前に研究代表者が実施したAMHを用いた別の研究でも大きな発現の変化がみられ着目したことがある遺伝子であった。DHEAの投与でこの遺伝子Aの発現が大幅に減少したことは、DHEAの投与がAMHの作用に直接的影響を持つ可能性を示唆する所見である。今後この遺伝子Aが個々の細胞においてAMH、DHEAそれぞれのホルモンに対してどのような役割をしているのかを詳しく検証する事で、卵胞の発達制御と副腎皮質ホルモンの関連がより詳細が明らかとなり、新たな卵胞の発達制御機構を介した治療開発につながる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I conducted basic experiments on the relationship between the regulation of folliculogenesis and adrenal hormones.

Using granulosa cell tumor cell lines that express anti-Mullerian hormone (AMH) receptors and can produce steroids, I examined the effects of dehydroepiandrosterone (DHEA), an adrenocortical hormone, on the AMH-related genes. Contrary to expectations, no significant change was found. So I used germ cell tumor cell lines to examine further. Germ cell tumor is known to show different prognoses before and after puberty, during which the changes in adrenal hormone expression are observed. Through the experiment, supplementing DHEA was observed to change the expression of genes, including a specific gene A. Gene A was a gene that showed significant fold changes after supplementing an extra amount of AMH during the previous series of experiments. Thus, it could link AMH and DHEA in folliculogenesis or germ cell development.

研究分野：卵胞の発達制御

キーワード：卵胞の発達制御 抗ミュラー管ホルモン デヒドロエピアンドロステロン 胚細胞腫瘍 顆粒膜細胞腫

1. 研究開始当初の背景

胎児期の精巣から分泌されることで知られる抗ミュラー氏管ホルモン (Anti Mullerian Hormone; AMH. 別名ミュラー管抑制因子 Mullerian Inhibiting Substance; MIS) は、出生後卵巣からも分泌されゴナドトロピンから独立して卵胞の発達を抑制的に制御することが知られている (図1)。

近年女性の妊孕能を推定する血清マーカーの一つとして不妊患者に対してしばしば計測されている一方で、排卵障害を伴う多嚢胞性卵巣症候群 (Poly Cystic Ovarian Syndrome; PCOS) では高値を示すなど卵巣疾患の診療で重要なホルモンの一つだが、疾患のある卵巣で AMH がどのように作用しているのかはまだ明らかにされていない。AMH が低値にも関わらず、原発性卵巣機能低下症 (Primary Ovarian Insufficiency; POI) や、卵巣予備能低下 (Diminished Ovarian Reserve; DOR) の状態でも、一部の原始卵胞は成熟過程に至らずに静止している事が知られている。

デヒドロエピアンドロステロン (Dehydroepiandrosterone; DHEA) は副腎皮質ホルモンの一種で、Akt 経路や、TGF β ファミリーを介した卵胞発達の亢進作用が PCOS のモデル動物の研究結果から報告され、DHEA が DOR に対する治療の選択肢として有用とする臨床データも複数報告されている。しかし DHEA が卵胞にどのような影響を与えるのかという本質的な問いに対する明確な回答はまだない。

研究責任者は先行研究において、卵巣を摘除したマウスにおいて副腎内で DHEA 産生に必要な酵素 P450c17 が増加、副腎皮質下には腺腫様病変を形成し、さらにこの病変が AMH の特異的レセプターである AMHR2 を発現していることを確認した。加えて AMH がこの病変に対して抑制的に作用することを確認しており、これら結果は AMH と副腎皮質の関わりを示唆するものと考えられた。

2. 研究の目的

上記背景を踏まえ、卵胞の発達制御機構に抑制的に関わる AMH が、直接的および間接的にゴナドトロピン・性ホルモン経路とは異なる系で卵胞の発達を制御している、と考えられた。特に本研究では AMH と副腎皮質ホルモンの Cross-talk を介して卵胞の発達制御や副腎皮質ホルモンの分泌制御がなされているという仮説をたて、これを検証することを目的とした。

さらにその結果として、血中の AMH レベルだけでは説明がつかない PCOS や DOR といった疾患における卵胞の発達制御において、上記背景に記載した様に DHEA が原始卵胞の動員や卵胞発達において促進的作用があるかどうか、それらがどのように制御されているのかを、卵巣下垂体系からは外れる副腎皮質ホルモンの一種との相互作用の観点から解析し、POI や DOR 症例における新たな治療の選択肢を提示する基礎となるような結果を提示することを目標とした。

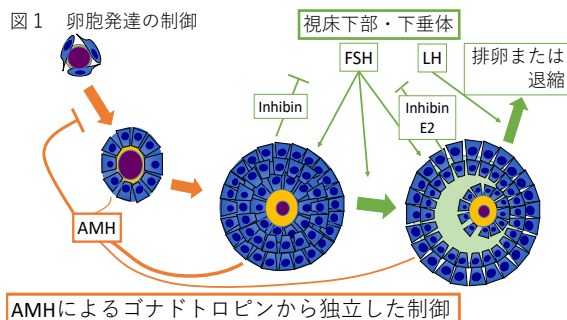
3. 研究の方法

まず In vitro 実験として細胞株を用いた AMH および DHEA の影響についてそれぞれの関連遺伝子の発現変化などを指標に確認し、仮説が実験動物を用いた実験系で検証する価値があるかを検証するためのコントロールデータなどを収集することとした。

その上で、DHEA や AMH の投与によって得られる変化が生体で再現されるかどうかなどを検証するための in vivo 実験を計画した。in vivo 実験では、PCOS モデルマウスや DOR モデルマウスを作成し、卵巣の卵胞発達の制御について関連遺伝子の発現変化などを検証し、また DHEA や AMH の投与による変化の検証を行う計画とした。さらに臓器培養プロトコルを確立させ、ex vivo 実験によって in vivo 実験で得られた結果が、再現性をもって確認できるかを評価し、未知の内因性ホルモンの関連の有無について再検討する予定とした。

4. 研究成果

まず容易に入手可能な DHEA と腫瘍細胞株を用いた in vitro 実験によって DHEA 影響下の AMH 関連遺伝子の変化を解析することにした。とくに重要な解析対象と考えられたのは卵胞の構成細胞の一つで、特異的に AMH レセプターを高発現し、またステロイドホルモンの産生能も備えた顆粒膜細胞だったので、その腫瘍細胞株である KGN と COV434 を用いて、DHEA 影響下の AMH 関連遺伝子の発現変化を検証した。DHEA の投与濃度や投与後のタイミングなどの条件を検討したが、コントロールと考えた Steroidogenesis に関連する遺伝子の発現変化に有意な変化がなく、AMH



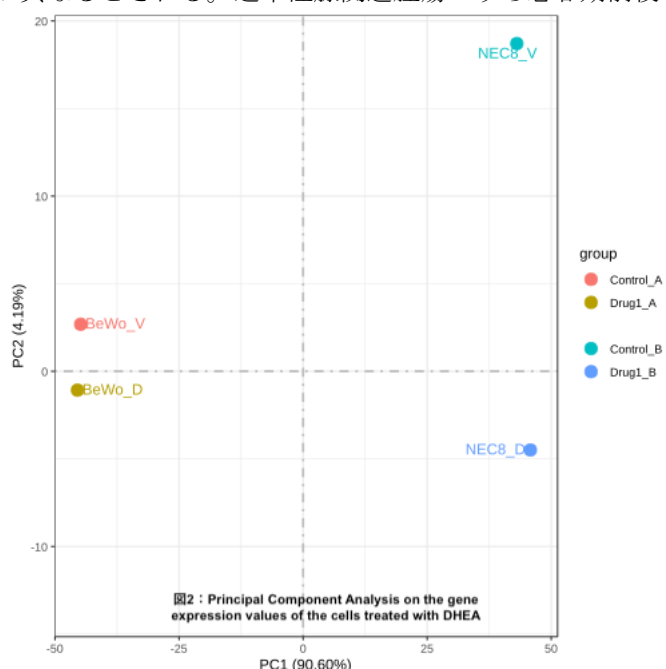
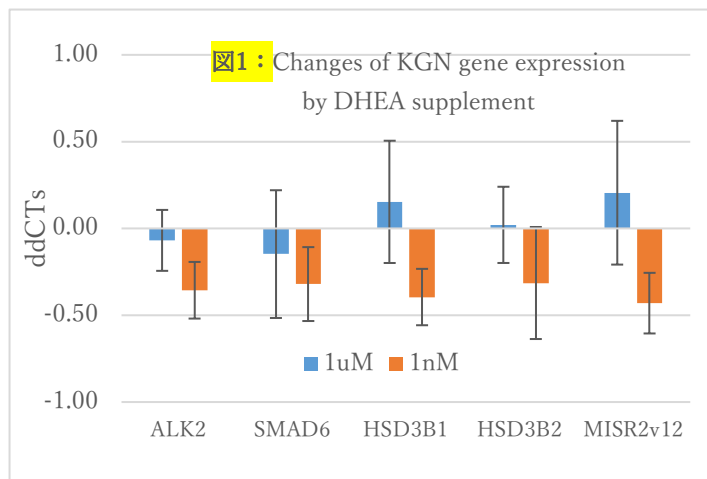
関連遺伝子の発現にも有意な変化を確認することができなかった。(図1: 定量PCRの結果の代表的な一部を右に提示する。) この段階で顆粒膜細胞腫瘍の細胞株においてはDHEAの投与はAMH関連遺伝子の発現や増殖などに変化をきたさない、と結論づけた。

背景に記載したようなDHEAの投与によって得られる卵胞発達の亢進作用は、間接的にAMH関連遺伝子の発現変化を介して起こっている可能性は否定できないものの、直接的にAMH関連遺伝子の発現変化を起こしている可能性は低いと考えられた。

この考察は当初のDHEAのような副腎皮質ホルモンとAMHのCross-talkが卵胞の発達制御に重要とした仮説の正しさを疑わせるに十分であり、続いて実施する予定としていた実験動物を用いた実験を中止して、実験計画を再設定する必要があると考えた。

DHEAは思春期前後でその血中濃度が異なるとされる。近年性腺関連腫瘍のうち思春期前後で

予後が異なることが明らかにされた胚細胞腫瘍に着目し、胚細胞腫瘍の細胞株を用いてDHEAがAMH関連遺伝子に与える影響を検討する事とした。胚細胞腫瘍の細胞株として入手可能なものは胚細胞腫瘍のうち絨毛癌の細胞株であるBeWoと精巣原発卵黄嚢癌のNEC8であったので、この2種類を用いて、実験を進めることとした。顆粒膜細胞腫の細胞株を用いた実験で使った条件を参考に培養条件の調整を行ったのち、DHEAの投薬などの実験をすすめた。各条件で培養した細胞から核酸を抽出してmRNAシーケンスを実施したところ、DHEAの投薬によってBeWoおよびNEC8いずれも遺伝子の発現変化が見られた。(図2: Principal Component Analysis of the cells treats with DHEA)。さらにここから遺伝子Aを含む複数の候補遺伝子について、投薬前後で発現に有意な変化が見られた。(表1: Partial Result of Differential Expression Analysis)



さらにここから遺伝子Aを含む複数の候補遺伝子について、投薬前後で発現に有意な変化が見られた。(表1: Partial Result of Differential Expression Analysis)

Gene name	gene_description	Fold Change	p value	p adj
BOLA2B	bolA family member 2B	-6.26	2.55E-22	5.34E-18
CBSL	cystathionine-beta-synthase like	-4.12	3.66E-14	3.83E-10
Gene A	A transmembrane transporter of an amino acid	-2.73	2.61E-07	0.00109
ITGB6	integrin subunit beta 6	2.63	9.64E-09	6.7E-05

この遺伝子Aは、以前に研究代表者が実施した別の基礎研究でAMHを投与した群とそうでない群で大きな発現の変化がみられ着目したことがある遺伝子であったことから、DHEAの投与でこの遺伝子Aの発現が大幅に減少していることは、非常に興味をひく結果であった。当時AMHのSignal transductionの下流にあると考えられた遺伝子Aについては、まだ詳細の検証ができていなかったこともあり、改めてこの遺伝子AについてAMH、DHEAそれぞれのホルモンの作用の中でどのような役割をしているのかを評価することが重要と考えられた。また、遺伝子Aの発現変化についてKGN・COV434といった顆粒膜細胞腫の細胞株のものは検証していなかったため今後これについても検証が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Marie-Charlotte Meinsohn; Hatice D. Saatcioglu; Lina Wei; Yi Li; Heiko Horn; Maeva Chauvin; Motohiro Kano; Ngoc Minh Phuong Nguyen; Nicholas Nagykerly; Aki Kashiwagi et al.	4. 巻 118
2. 論文標題 Single-cell sequencing reveals suppressive transcriptional programs regulated by MIS/AMH in neonatal ovaries	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2100920118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2100920118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	黒田 達夫 (Kuroda Tatsuo)	慶應義塾大学・医学部小児外科・教授 (32612)	
研究協力者	藤野 明浩 (Fujino Akihiro)	国立成育医療研究センター・小児外科系専門診療部外科・診療部長 (82612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Massachusetts General Hospital		