

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3月31日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592093

研究課題名（和文） GDF-9の卵胞内標的遺伝子解析に基づく卵子機能マーカーの確立

研究課題名（英文） GDF-9 as a possible marker for oocyte quality, based on studies of gene expression in rat preantral follicles.

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

研究成果の概要（和文）：不妊治療において、難治性排卵障害や低受精率・母体原因流産の最大原因のひとつである多嚢胞性卵巣症候群（PCOS）では、卵子の質低下とともに卵子内の GDF9 発現減弱が報告されている。本研究課題では PCOS の in vitro モデル作成を試み、卵子 GDF9 や顆粒膜細胞 FSH 受容体の発現抑制といった PCOS 病態を再現することに成功した。特に PCOS 症例において、GDF9 の発現減弱が卵子の質低下の機能マーカーとなり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Polycystic ovary syndrome (PCOS) is commonly associated with ovulatory dysfunction with consequent subfertility, miscarriage, and poor oocyte quality. We have developed an in vitro PCOS model by using rat preantral follicles, and indicated that the gene expressions of oocyte GDF-9 and granulosa FSH receptor are suppressed in this PCOS model. The present results suggest that GDF-9 is a possible marker of oocyte quality in PCOS patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学

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。不妊治療の現場における火急の課題の一つに「移植胚の着床率向上に向けた、良好胚評価法の確立」が挙げられる。すなわち、従来の形態学的評価法に基づいた良好胚の着床率は10～15%に過ぎないため、着床能を含めた機能良好胚を正確に評価する生化学的マーカーの確立が切望されてきた。さらには、昨今の産科医療システムの混乱に関連して、多胎妊娠予防を目的に、移植胚数を原則1個とする“単一胚移植”が日本産科婦人科学会会告として推奨されるに至り（2008年4月）、最良の胚を選択するプロトコルの必要性が大きくクローズアップされている。

この問題にアプローチするにあたって当

該研究者らが着目したのは、哺乳類の性周期において、実際に発育・排卵できる卵胞はごく僅かであり、99%以上の卵胞は閉鎖に陥ってしまうという、いわゆる「卵胞の選択と閉鎖」という現象である。この一見生殖細胞のロスとも思われる現象が繰り返される生物学的意義は定かでないが、「最も健康で生命力の強い卵子だけが排卵できるよう担保するメカニズムではないか」と推察されている。

当該研究者らは「胚の質は受精よりずっと以前に、卵胞発育中の卵子の段階で既に決まっており、卵胞選択・閉鎖機構の解明が、卵子ひいては胚の機能評価に繋がる可能性が高いのではないか」と考えたことが、本研究立案の背景である。

2. 研究の目的

我々は、初期卵胞の生存・発育プロセスを卵子が主導する可能性について、研究を進めてきた。その過程で、卵子に特異的な成長因子の1つである growth differentiation factor 9 (GDF9) が、顆粒膜細胞のアポトーシスや莢膜細胞のアンドロゲン産生を制御しながら、初期卵胞の発育を誘導するメカニズムを明らかにしている。さらには、卵子中の GDF9 の産生量が、良質な卵子の機能評価マーカーとなり得る可能性について検討を重ねている。

本研究では、臨床的課題として、不妊女性の排卵障害の原因で最も頻度が高い多嚢胞性卵巣症候群 (Polycystic ovary syndrome; PCOS) に特に着目している。すなわち、PCOS 女性で卵子 GDF9 の発現減弱が報告されることから、PCOS 女性が卵胞発育障害→不妊症に陥るメカニズムについて、卵子内の GDF9 発現異常が関与する可能性を検討することにより、卵子中の GDF9 発現量が PCOS 女性の卵子機能マーカーとなり得るか考察することとした。

3. 研究の方法

アジア系女性における PCOS 女性の病態的特徴は、黄体化ホルモン (LH) の高値と卵巣局所の高アンドロゲン環境である。

本研究では PCOS の *in vitro* モデルを作成する目的で、幼若ラットから単離した前胞状卵胞を体外培養しながら、高 LH 環境や高アンドロゲン環境に曝した際の、(1) 卵子内の GDF9 発現量や、(2) 前胞状卵胞の発育スピードやホルモン産生量、(4) 卵胞中のステ

ロイド産生酵素やゴナドトロピン受容体の mRNA 発現量の変化などについて、それぞれ検討した。

4. 研究成果

(1) 過剰な LH やアンドロゲンは、①前胞状卵胞の発育を有意に促進した (図 1) が、②卵子内の GDF9 発現量は抑制されていた (図 2)。

図 1. LH やアンドロゲンは卵胞発育を促進する

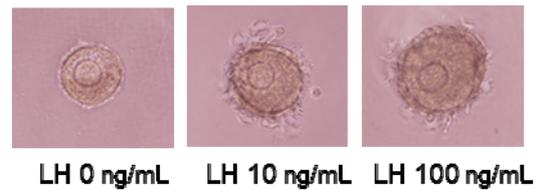
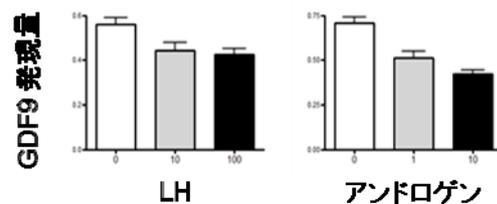
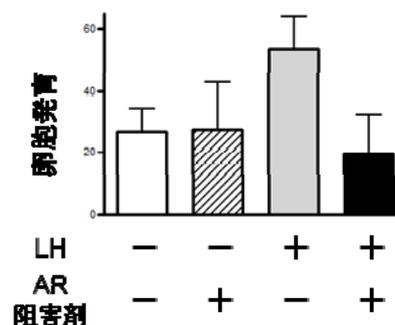


図 2. LH/アンドロゲンは GDF9 発現を抑制する



(2) LH は、卵胞中の 17α -ヒドロキシラーゼ発現を介して、アンドロゲン産生を亢進した。また、アンドロゲン受容体の特異的阻害剤を添加すると LH 誘導性の卵胞発育が抑制された (図 3)。

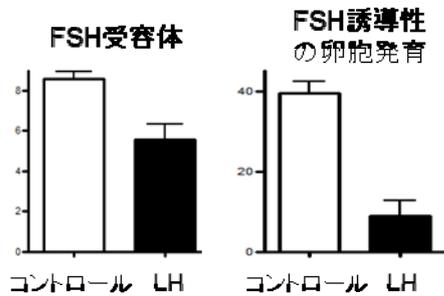
図 3. LH はアンドロゲン作用を介して、卵胞発育を促進する



以上の結果より、LH は前胞状卵胞のアンドロゲン産生亢進を介して、卵胞発育を促進すると考えられた。

(3) LH 刺激により増大した卵胞では、顆粒膜細胞における FSH 受容体発現が減弱しており、FSH 誘導性の卵胞発育も有意に抑制された (図 4)。

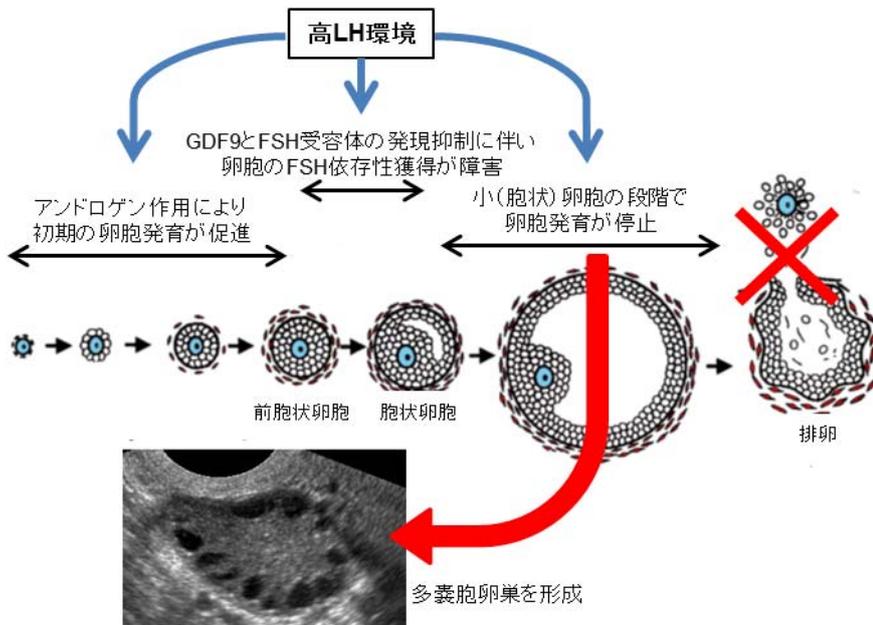
図 4. LH は前胞状卵胞の FSH 受容体抑制を介して、FSH 誘導性の卵胞発育を抑制する



(4) 上記の結果をまとめると、LH/アンドロゲン系は、初期の卵胞発育を直接促進する可能性がある。

しかしながら、一旦 LH/アンドロゲン系が過剰状態になると、卵子内の GDF9 発現が抑制されるとともに、前胞状卵胞が FSH に対する通常の反応性を失ってしまい、FSH に依存する胞状卵胞以降の発育・成熟過程も損なわれる可能性が推測された (図 5)。

図 5. PCOS の病態メカニズム (仮説)



(5) 不妊治療において、難治性排卵障害や低受精率・母体原因流産の最大原因のひとつである PCOS では、卵子の質低下とともに、卵子内の GDF9 発現減弱が報告されている。

本研究課題では PCOS の in vitro モデル作成を試み、卵子 GDF9 や顆粒膜細胞 FSH 受容体の発現抑制といった PCOS 病態を再現することに成功した。

高 LH 環境に伴う卵子 GDF9 や顆粒膜細胞 FSH 受容体の発現抑制は、PCOS における難治性排卵障害や高い流産率と関連するかもしれない。

このように、特に PCOS 症例において、GDF9 の発現減弱が卵子の質低下の機能マーカーとなり得る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6件)

- ① Orisaka M, Hattori K, Fukuda S, Kotsuji F. Oocyte-Thecal Cell Regulatory Loop in the Control of Preantral Follicle Development. *J Mamma Ova Res.* 査読有. Vol 28. 2011. 2-7.
http://www.meteo-intergate.com/library/journal/journal-archive_ct6mamma.php
- ② 折坂 誠, 小辻 文和. 卵胞発育における卵胞細胞間の相互作用. *Hormone Frontier in Gynecology.* 査読有. Vol 18. 2011. 413-418.
http://www.meteo-intergate.com/library/journal/journal-archive_ailhogye.php
- ③ Orisaka M, Jiang JY, Orisaka S, Kotsuji F, Tsang BK. Growth differentiation factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis. *Endocrinology.* 査読有. Vol 150. 2009. 2740-2748.
DOI:10.1210/en.2008-1536
- ④ Kobayashi N, Orisaka M, Cao M, Kotsuji F, Leader A, Sakuragi N, Tsang BK. Growth differentiation factor-9 mediates follicle-stimulating hormone-thyroid hormone interaction in the regulation of rat preantral follicular development. *Endocrinology.* 査読有. Vol 150. 2009. 5566-5574.
DOI:10.1210/en.2009-0262
- ⑤ Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *J Ovarian Res.* 査読有. Vol 2. 2009. 9-15.
DOI:10.1186/1757-2215-2-9
- ⑥ Fukuda S, Orisaka M, Tajima K, Hattori K, Kotsuji F. Luteinizing hormone-induced Akt phosphorylation and androgen production are modulated by MAP Kinase in bovine theca cells. *J Ovarian Res.* 査読有. Vol 2. 2009. 17-24.
DOI:10.1186/1757-2215-2-17

[学会発表] (計5件)

- ① 折坂 誠. アンドロゲンが卵胞発育に及ぼす光と影. 第59回北日本産科婦人科学会・特別講演 (秋田、2011年9月24日)
- ② 折坂 誠. 初期卵胞発育における卵子と莢膜細胞の細胞間ネットワーク. 第52回日本哺乳動物卵子学会・シンポジウム (栃木、2011年5月22日)
- ③ 折坂 誠: 初期卵胞発育における卵～顆粒膜細胞～莢膜細胞の細胞間相互作用の役割. 第55回日本生殖医学会・シンポジウム (徳島、2010年11月11日)
- ④ M. Orisaka: Polycystic ovary syndrome and luteinizing hormone: Effects of LH on rat preantral follicular development. FertiLink 2010 & International Ovarian Conference 2010・シンポジウム (京都、2010年10月16日)
- ⑤ 折坂 誠: 多嚢胞性卵巣症候群と LH:LH が初期の卵胞発育に及ぼす影響. 第28回日本受精着床学会・ワークショップ (横浜、2010年7月28日)

[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]

なし

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

(2) 研究分担者

服部 克成 (HATTORI KATSUSIGE)
福井大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 60529345
福田 真 (FUKUDA SIN)
福井大学・医学部・助教
研究者番号: 40397279
(H21. 10. 15 辞退)