

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592468

研究課題名(和文)良好卵獲得を目指したヒト卵胞発育における脂質メディエーターの解析

研究課題名(英文) Analysis of lysophospholipid mediators in human follicle growth toward good-quality oocytes

研究代表者

岩瀬 明 (IWASE, Akira)

名古屋大学・医学部附属病院・病院教授

研究者番号：20362246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：卵由来卵胞発育誘導因子であるGrowth differentiation factor-9刺激にて、ヒト顆粒膜細胞においてコレステロール合成系酵素群が増加することを確認した。体外受精採卵時に得られたヒト黄体化顆粒膜細胞において、上記酵素群の発現を定量的RT-PCRで解析し、妊娠群vs.非妊娠群で一部の酵素に有意な発現量の違いがみられた。

脂質メディエーターであるShingosine-1-phosphateは、顆粒膜細胞において細胞増殖シグナルであるPI3K-Akt経路の活性化および細胞増殖促進効果を有し、H2O2添加により誘導される顆粒膜細胞のアポトーシスを抑制することを見出した。

研究成果の概要(英文)：An oocyte-derived growth factor, growth differentiation factor-9 upregulated the cholesterol-synthetic enzymes in human granulosa cells. We found the significant differences in the expression of the cholesterol-synthetic enzymes between luteinized granulosa cells derived from pregnant and non-pregnant follicles.

A lysophospholipid mediator, shingosine-1-phosphate (S1P) activated the PI3K-Akt pathway and stimulated proliferation of human granulosa cells. In addition, S1P inhibited H2O2-induced apoptosis of granulosa cells.

研究分野：産婦人科学

キーワード：卵胞発育 顆粒膜細胞 脂質メディエーター コレステロール合成 S1P GDF-9

1. 研究開始当初の背景

体外受精などの生殖補助医療は我が国でも広く普及している。しかしながら、20代でも総治療周期あたりの妊娠率は約25%に過ぎず、35歳以降、漸減している。すなわち不妊症診療の成績向上には、35歳以上の患者に対する治療成績の向上が課題となる。治療成績に影響を及ぼす因子として、最も問題なのは加齢による卵の質的低下であると考えられている。また抗がん剤などの薬剤による卵巣機能低下は良く知られているが、不妊症の原因となる子宮内膜症や多嚢胞性卵巣症候群においても不良胚の割合が増加することが知られている。すなわち加齢を筆頭に薬剤、内分泌的要因、卵胞周囲の環境(炎症、サイトカイン、酸化ストレスなど)が、卵の質に影響を及ぼすと考えられている。不妊症診療の成績向上のためには、これらの要因から卵を保護し良好卵を得ることが必須であると言える。

卵胞発育の過程で起きるイベントが、受精可能な成熟卵の質に影響を与えていると推測される。ヒトの場合、卵胞発育は卵胞構成要素(卵、顆粒膜細胞、莢膜細胞)の形態的・機能的変化が関与している。その具体例として、顆粒膜細胞の増殖と多層化、莢膜細胞層と基底膜の出現、卵胞腔の出現などが挙げられる。特に顆粒膜細胞の増殖は、本細胞がエストロゲン産生細胞であること、顆粒膜細胞のアポトーシスが卵胞閉鎖と関連していること、顆粒膜細胞由来因子がparacrine的に卵成熟に影響を及ぼすことを考慮すると、卵胞発育の重要な要素であると言える。我々はこれまで、顆粒膜細胞の増殖制御機構に注目し研究を行い、増殖およびステロイド産生にphosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway と extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 pathway の細胞内シグナルが関与していること、PI3K/Akt pathway に抑制的に働く phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) が、顆粒膜細胞の増殖制御を修飾していること、顆粒膜細胞内 PTEN 発現が妊娠群 vs. 非妊娠群で差があることを報告してきた

卵胞構成要素によって局所的に産生される物質が、paracrine 的に相互的かつ双方向性に影響を及ぼすことが卵胞発育にとって重要であるという概念 (bi-directional communication) が提唱され、それを支持するデータが蓄積されつつある。その代表である Growth differentiation factor-9 (GDF-9) は、卵特異的に発現し顆粒膜細胞に作用し、ノックアウトマウスでは顆粒膜細胞の多層化がみとめられず卵胞発育が停止することが知られているが、その作用機序の詳細は不明である。我々は、我々の樹立した不死化細胞株を用い GDF-9 刺激による網羅的遺伝子解析を行った結果、一連のコレステロール合成系酵素、および sphingosine kinase (sphk) の発現増加を認めた。コレステロール合成経路の

中間代謝産物である FF-MAS は卵の減数分裂の再開に関連していること、生体膜構成要素スフィンゴ脂質の代謝産物であり、sphk により産生される S1P は、他の細胞で増殖促進やアポトーシス抑制作用が報告されていることを考えると大変興味深い結果である。

2. 研究の目的

脂質メディエーターである S1P, FF-MAS の卵胞内誘導因子と卵胞発育制御メカニズムを解明するとともに、最終的には卵胞単位、個体単位での卵胞保護・卵質改善における有用性が期待できるかどうかを検証する。また、採卵時に保存された個別の卵胞液検体を用い S1P やコレステロール, FF-MAS の濃度が、妊娠成立予測に有用なマーカーと成りうるかどうかを検証する。

(1) 顆粒膜細胞由来 S1P の作用解析

マイクロアレイで得られたデータを検証するために、ヒト不死化非黄体化顆粒膜細胞株を用い、定量的 RT-PCR にて sphk の増加を確認する。GDF-9 の他、卵胞構成要素の bi-directional communication に関与している TGF- β superfamily (bone morphogenetic proteins; BMPs, anti-Mullerian hormone; AMH)、および卵胞発育の主たる促進因子である FSH, IGF-1 刺激下での発現変化を検証し、S1P 産生誘導因子を同定する。S1P の作用を検証するため不死化細胞株を用いた in vitro での増殖促進作用、抗アポトーシス作用を解析する。この際、S1P 受容体サブタイプの発現解析を合わせて行い、サブタイプ特異的な S1P 誘導体を用いて同様の実験を行い S1P の作用経路をレセプター、シグナルともに同定する。卵胞培養レベルでは、酸化ストレス、抗がん剤添加時の、個体レベルでは疾患モデル動物を用い、S1P や sphk 誘導因子として同定された物質が卵胞保護作用を有するかどうか検討する。

(2) 顆粒膜細胞内コレステロール合成系と FF-MAS の作用解析

卵にはコレステロール合成系が存在せず、顆粒膜細胞で産生されたコレステロールが輸送されると考えられている。受精後の卵割開始部位の細胞膜にはコレステロールの豊富な部位があり卵割に関与していると考えられている。S1P の場合と同様に、各種刺激下で顆粒膜細胞株でのコレステロール合成系酵素の発現を確認する。

3. 研究の方法

(1) 各種刺激によるヒト不死化非黄体化顆粒膜細胞における sphk 発現と S1P 分泌、コレステロール合成系酵素発現とコレステロール、FF-MAS 産生の検証

予備実験のマイクロアレイで確認されている GDF-9 に加え、卵胞発育に重要な TGF- β superfamily (BMP-4,-5,-6,-7,-15, AMH), FSH, IGF-1,-2 刺激下での sphk の発現を SYBR Green を用いた定量的 RT-PCR,

Western blotting (WB)にて確認する。細胞内および培養上清中の S1P 濃度については、キットを用いて測定する。一連のコレステロール合成系酵素 (HMGCS, HMGCR, SQLE, LSS, CYP51, SC4MOL) についても同様の方法で発現解析を行う。顆粒膜細胞中のコレステロールについては、filipin III 用いたキットにより細胞内蓄積の増加を検証する。FF-MAS については液体クロマトグラフィーによる測定系を確立する。

(2) S1P および S1P レセプターサブタイプ別作用薬による顆粒膜細胞増殖促進、アポトーシス抑制作用とその細胞内シグナルの解析

顆粒膜細胞で産生される S1P は、autocrine で顆粒膜細胞自身に作用している可能性がある。実験(1)での各種刺激下、あるいは S1P そのものの添加により、顆粒膜細胞増殖能の変化を BrdU アッセイにて、アポトーシス抑制を TUNEL 法、アポトーシスの指標である caspase を WB で評価する。S1P 受容体は 5 種類のサブタイプがあり、顆粒膜細胞での発現は予備実験で確認をしている。サブタイプ特異的アゴニスト、アンタゴニストを用い S1P の作用経路を検証する。顆粒膜細胞増殖・生存に重要なシグナルである PI3K/Akt pathway, ERK1/2 pathway の関与についても、それぞれの経路の阻害薬を適宜使用し、活性型であるリン酸化を指標に WB で検出する。

(3) 酸化ストレスや抗がん剤からの S1P による保護作用の検証

加齢に伴う卵の質の低下の原因は明らかではないが、酸化ストレスの関与が示唆されている。また抗がん剤による卵巣機能の低下は良く知られた事実であるが、近年、若年者の化学療法後の予後が改善しており、卵巣機能温存の必要性が高まっている。培養ヒト顆粒膜細胞並びにマウス卵胞および卵-卵丘複合体を用い、H₂O₂ 添加による酸化ストレス、抗がん剤添加時の sphk 発現を実験(1)と同様に、顆粒膜細胞のアポトーシスを実験(2)と同様に検証するとともに、S1P 添加により、アポトーシスや卵胞発育抑制が回復可能かどうかを検証する。

(4) 体外受精採卵時に得られた個別卵胞ごとの、顆粒膜細胞中 sphk 発現、コレステロール合成系酵素発現、卵胞液中の S1P 濃度、コレステロール濃度の卵質や治療成績との相関の解析

卵の質が、受精後の胚の質や妊娠成立に強く影響していると推測されるため、卵の質に影響を及ぼす因子は、良好卵であることに加え、その後の良好な胚発育、妊娠成立の予測因子(マーカー)となる可能性がある。良好卵マーカーの探索は、移植胚の選択に重要な意味を持つ。我々は、個別の卵胞から選られた顆粒膜細胞の RNA および卵胞液を保存しており、それぞれ、その卵胞由来卵の受精の有無、受精後の胚のグレード、移植後の妊娠成立の

有無のデータと関連づけられている。これらの保存検体を用い、定量的 RT-PCR にて顆粒膜細胞中の sphk, コレステロール合成系酵素の発現を、卵胞液中の S1P 濃度、コレステロール濃度、FF-MAS 濃度を測定し、妊娠前後との相関を解析し、これら物質のマーカーとしての有用性を検証する。

4. 研究成果

(1) ヒト不死化非黄体化顆粒膜細胞に、GDF-9 を添加し、マイクロアレイでコレステロール合成系にかかわる酵素群(HMGCS, SQLE, LSS, CYP51)の増加をみとめた。定量的 RT-PCR でも、GDF-9 添加時に上記酵素群の発現増加をみとめた(図 1)。

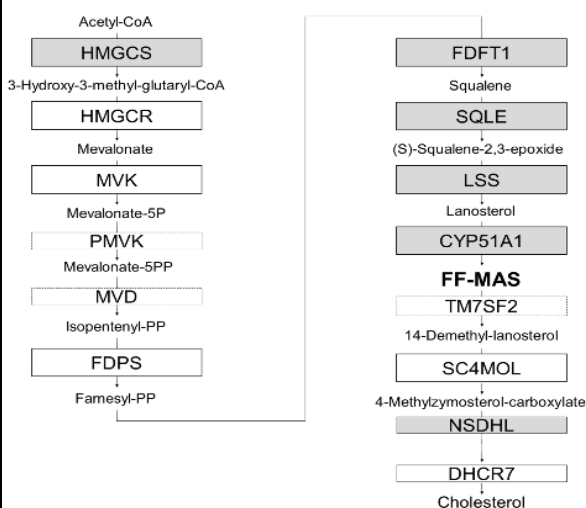


図 1. コレステロール合成に関わる酵素群。網掛けの酵素が GDF-9 刺激においてヒト顆粒膜細胞株で増加した。

同じく卵胞発育にかかわるホルモンである FSH の同時添加により、上記コレステロール合成酵素発現が、GDF-9 添加時と比べ相乗的に増加することを見出した。一方、細胞内へのコレステロールおよび FF-MAS の蓄積については、GDF-9, FSH 添加で増加を認めなかったが、これは測定系の感度の問題と考えられた。さらに体外受精採卵時に得られたヒト黄体化顆粒膜細胞の初代培養細胞において、上記酵素群の発現を定量的 RT-PCR で解析し、妊娠群 vs. 非妊娠群で一部の酵素に有意な発現量の違いがみられた。これらのデータはヒトの卵胞発育においてコレステロール合成系が関与していることを示すとともに、良好卵の選別マーカーになり得ることを示唆するものである。

(2) S1P をヒト不死化非黄体化顆粒膜細胞および体外受精採卵時に得られた黄体化顆粒膜細胞に添加した実験では、細胞増殖シグナルである PI3K-Akt 経路の活性化および BrdU アッセイによる細胞増殖促進効果を確認した。H₂O₂ 添加により顆粒膜細胞のアポトーシスを誘導した系において、S1P はアポ

トーンスを抑制することを TUNEL 法 (図 2) および caspase-3 のアッセイにより見出した。

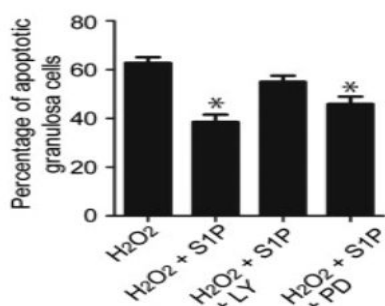


図 2. H₂O₂ で誘導されたアポトーシスは S1P の添加で抑制される。LY294002(LY)でこの効果が打ち消されることから、S1P の作用が PI3K-Akt 経路を介することがわかる。

S1P レセプターサブタイプ別の阻害剤および PI3K 阻害剤、ERK1/2 経路阻害剤の添加により、S1P のアポトーシス抑制効果発現に必要なレセプターサブタイプ(S1P1 と S1P3) と細胞内情報伝達系(PI3K/Akt 経路)を同定した。これらのデータは S1P が、加齢や卵巣毒性物質からの卵巣保護剤として使用できる可能性を示唆するものである。さらに体外受精採卵時に得られた卵胞液中の S1P 濃度を測定し、妊娠群 vs.非妊娠群で比較した。妊娠群で高い傾向をみとめたが、有意差はみとめられなかった。

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)

1. CYP51A1 induced by GDF-9 and FSH in granulosa cells is a possible predictor for unfertilization. Nakamura T, Iwase A, Bayasula, Nagatomo Y, Kondo M, Nakahara T, Takikawa S, Goto M, Kotani T, Kiyono T, Kikkawa F Reproductive Sciences 2015;22(3): 377-84. 査読有
doi: 10.1177/1933719114559375.
2. Sphingosine-1-phosphate inhibits H₂O₂-induced granulosa cell apoptosis via the PI3K/Akt signaling pathway. Nakahara T, Iwase A, Nakamura T, Kondo M, Bayasula, Kobayashi H, Takikawa S, Manabe S, Kotani T, Kikkawa F Fertil Steril 2012;98:1001-8 査読有
doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.008.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Proliferation and apoptosis of granulosa cells: A link to folliculogenesis. Akira Iwase

The 9th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility 2013.11.13 Kobe Portopia Hotel (Kobe, Hyogo, JAPAN)

2. Follicular fluid concentration of sphingosine-1-phosphate is associated with embryo quality and pregnancy outcome in in vitro fertilization treatment. Nakahara T, Iwase A et al. (他 4 名) Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine 2013 2013.10.13-17 Boston, MA, (USA)
3. Follicular fluid concentration of S1P is associated with the outcome of IVF treatment. Nakahara T, Iwase A et al. (他 7 名) 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会 2013.5-10-12 ロイトン札幌 (北海道、札幌市)
4. S1P は酸化ストレスによる顆粒膜細胞のアポトーシスを PI3K-Akt 経路を介して阻害する. 中原辰夫, 岩瀬 明 他 7 名 日本生殖医学会 2012.11.8-9 長崎ブリックホール(長崎県、長崎市)
5. Shingosine-1-phosphate inhibits hydrogen peroxidase-induced granulosa cell apoptosis via the PI3K/Akt signaling pathway. Nakahara T, Iwase A et al. (他 4 名) American Society for Reproductive Medicine 68th Annual Meeting 2012.10.20-24 San Diego, CA (USA)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/obgy/>

(名古屋大学医学部産婦人科)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩瀬 明 (IWASE, Akira)

名古屋大学・医学部附属病院・病院教授
研究者番号：20362246

(2)研究分担者

後藤 真紀 (GOTO, Maki)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
研究者番号：90378125

(3)連携研究者

中村 智子 (NAKAMURA, Tomoko)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号：40732681

中原 辰夫 (NAKAHARA, Tatsuo)

名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50534830