

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790946

研究課題名(和文) 間脳下垂体機能障害による卵巣機能への影響とその分子機序の検討

研究課題名(英文) Effects of hypothalamo-pituitary damages on female reproductive functions.

研究代表者

中村 絵里 (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) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣におけるステロイドホルモン分泌や卵胞の正常な発育は、下垂体ゴナドトロピン(FSH/LH)と卵胞に発現するFSH/LH受容体シグナルを主軸に制御されている。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。その機序としては、FSH/LH分泌能の低下以外にGH/PRLによる直接的な卵胞への影響も示唆されている。本研究では下垂体ホルモン分泌障害に関連する生殖内分泌系への影響とその機序について細胞レベルで検討した。

研究成果の概要(英文)：Ovarian steroidogenesis and folliculogenesis are controlled by pituitary gonadotropins and their receptors expressed in the ovary. In the patients with hypothalamo-pituitary disorders, impairment of reproductive functions often occurs. In that mechanism, not only the reduction of gonadotropins, but also the changes in growth hormone and prolactin, could be involved. In the present study, we investigated the biological impact of pituitary damages on the reproductive functions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：生殖内分泌 卵巣 下垂体

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

視床下部・下垂体の疾患やその治療により間脳・下垂体機能障害をもつ女性では、ゴナドトロピン (FSH: 卵胞刺激ホルモンと LH: 黄体形成ホルモン) 分泌障害による排卵機能の低下や卵巣ステロイドホルモン産生の低下に加えて、成長ホルモン (GH) やプロラクチン (PRL) の変化により、妊孕能の低下や不妊をきたす。しかしながら、種々の視床下部・下垂体疾患に様々なレベルで伴ってくる GH や PRL の分泌異常が、各個体の妊孕性や卵巣機能にどの程度影響を与えるか? その治療として GH・PRL をどの程度抑制あるいは補充して加療すべきか? という問題に明確な解答はない。その理由として、GH・PRL による卵巣機能・卵胞発育に対する直接的な作用およびそのインパクトが不明であることが挙げられる。PRL は黄体の機能維持に重要であり、GH とインスリン様成長因子 (IGF)-I は卵胞成長の初期に重要であるとともに、これまでの基礎的研究から GH 受容体シグナルの脱落により、BMP-15 の過剰発現モデルと類似した生殖形質となることが推測される。GH・PRL の分泌異常に起因する卵胞成長への影響の詳細は未だ明らかでなく、生殖内分泌の観点からのアプローチは残された課題といえる。我々は、近年その重要性が明らかとなってきた卵胞に発現する骨形成蛋白 (BMP: Bone Morphogenetic Proteins) 分子に着目し、GH/IGF-I・PRL そして下垂体腫瘍などの治療薬として用いられるソマトスタチン受容体 (SSTR) 作動薬の卵巣機能への影響について細胞生物学的な視点から明らかにしたいと考えた。

## 2. 研究の目的

正常な卵胞成長・卵の発育のためには、視床下部・下垂体などの上位内分泌器官・神経内分泌系のパルス状の統御機構と、卵巣の機能ユニットである卵胞の発育・分化そして排卵までの一連の生理現象が正常に生じることが必要である。FSH/LH の分泌以外に GH や PRL もこの統御機構に関与している可能性がある。下垂体腫瘍・脳腫瘍・頭蓋内炎症や外傷をはじめ、種々の病因による下垂体ホルモン分泌異常症は間脳下垂体疾患として新たに 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 つとなったが、この病態に伴う卵巣機能への影響を明らかに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。本邦における間脳・下垂体機能低下患者数は推定

36000 人とされ、年間受療者数は 7000 人を上回るとされる。これらの疾患における性腺系への影響は患者の QOL の向上を考えるうえで、重要な問題と考えている。これまでの我々の研究に基づくと、顆粒膜細胞の増殖作用とステロイドホルモンの制御機能を併せ持つ分子 BMPs (骨形成蛋白) は、GH/IGF-I 系および PRL による卵胞成長の鍵となっている可能性が高い。本研究では生殖内分泌領域における GH/IGF-I/BMP ネットワークに着眼し、卵胞細胞において、この機能連携のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

今回の研究期間においては、未成熟ラット卵巣より単離した卵巣顆粒膜細胞の初代培養系を用いて、卵胞における BMP システムと GH/PRL の作用との機能連関についてアプローチするとともに、SSTR 作動薬 (ソマトスタチンアナログ) を用いて卵胞ステロイド合成能および FSH 受容体シグナル強度への影響を決定した。卵胞には細胞特異的に BMP 分子群 (BMP-2, -4, -6, -7, -15) が発現するが、これらは自己・傍分泌機序で卵胞の正常な発育に寄与し、特に FSH 受容体活性や感受性を調節する分子群である。また、卵胞細胞間コミュニケーションにおける GH/IGF-I と PRL の意義についての検討では、GH/PRL がその受容体を卵母細胞 (oocyte) にも強く発現することから、卵巣の培養細胞を用いるうえで、oocyte の存在を考慮した培養条件を設定した。顕微鏡下で健常な卵母細胞の単離と卵母細胞・顆粒膜細胞共培養を行い、この系を用いて GH/IGF-I 系を活性化した条件下で、FSH・forskolin・cAMP アナログによる卵巣顆粒膜細胞におけるエストラジオール (E2) とプロゲステロン (P4) 産生能への影響を観察し、定量リアルタイム PCR によるステロイド合成酵素 (aromatase, P450sc, StAR, 3 HSD) の発現レベルを評価した。卵母細胞と顆粒膜細胞の共培養下においても GH/IGF-I および PRL による E2/P4 合成能の変化を明らかにするとともに、GH/IGF-I による BMP-Smad シグナルへの影響をウエスタンブロット法と BMP/Smad レポーターアッセイ法により検討した。卵胞に発現する BMP 分子群は、下垂体からの FSH 存在下で、顆粒膜細胞による卵胞ホルモン分泌を巧みに制御している。内因性 BMP の作用を結合蛋白 (Noggin など) および特異的 Smad 抑制薬 (Dorsomorphin など) により抑制した条件下においても、GH/IGF-I による卵胞成長への影響について検証し、GH/IGF-I と BMP の機能連関を探究した。また、内因性

IGF-1 を中和抗体で抑制してこれらの検討を再評価した。また、間脳・下垂体障害によって影響を受ける日内リズム形成因子：松果体ホルモン・メラトニンについても、その卵胞機能への影響を追加検討した。

#### 4. 研究成果

間脳・下垂体障害をもつ女性の生殖内分泌機能を改善・維持するために、GH/PRL と FSH/LH との相互作用を解明し、臨床における確かなホルモンコントロールへと還元することを目的とし、分子生物学的な手法を用いて検討した。卵胞の正常な発育は、下垂体 FSH/LH と卵胞に発現する FSH/LH 受容体シグナルを軸に制御される。GH や PRL などの下垂体ホルモン分泌異常では、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が、FSH/LH 分泌能の低下と GH/PRL による直接的な卵胞への影響も示唆される。間脳・下垂体障害をもつ女性では、FSH/LH 分泌障害による排卵機能の低下や卵巣ホルモンの低下に加えて、GH/PRL の分泌異常により妊孕能の低下や不妊をきたすと考えられる。

まず下垂体移行性薬剤として SSTR アナログによる卵巣機能への影響を検討した。ソマトスタチン受容体 (SSTR) のうち、SSTR-2/-5 が齧歯動物の卵胞にも発現し、顆粒膜細胞・卵母細胞に分布する。未成熟雌ラットから単離した卵巣顆粒膜細胞の初代培養細胞において、Pasireotide (SOM230): multiple-SSTRs agonist および Octreotide (OCT): SSTR-2/5 agonist を用いて、卵胞ステロイド産生への影響について卵胞成長因子 BMP との関係に着目して検討した。SSTR アナログは、卵母細胞の有無に関わらず FSH 誘導性の卵胞ステロイド E2 と P4 の産生を抑制したが、BMP 作用を中和する Noggin の存在下では、SSTR アナログによる P4 産生と cAMP の抑制が減弱することから、SSTR アナログの作用機序には、内因性 BMP の関与が示された。さらに、SSTR アナログは、BMP の標的遺伝子である Id-1 の発現を増強し、BMP の抑制性 Smad6/7 の発現を減弱することで、卵胞 BMP シグナルを増強して卵胞ステロイド産生を制御していると考えられた。今後研究を進め、視床下部・下垂体疾患に伴う GH や PRL の分泌異常と治療が、妊孕性や卵巣機能にどの程度影響を与えるか、治療として GH/PRL をどの程度抑制すべきか、という問題解決に繋がるものと考えられた。

また卵巣における正常な卵発育には、視床下部・下垂体などの上位内分泌器官での神経内分泌系の統御機構と、卵巣の機能ユニット

である卵胞の発育・分化、排卵までの一連の生理現象が正常に生じることが必要である。下垂体腫瘍・頭蓋内炎症・外傷など様々な病因で生じる GH 分泌異常では、GH の分泌過剰・低下ともに排卵機能や妊孕性の低下をもたらすがその詳細な機序は不明である。GH・IGF-1 が卵胞機能に与える影響については、卵胞に発現する BMP との関係に着目して検討した。顆粒膜細胞への GH 添加により FSH により誘導された MAPK シグナルの活性化が増強し、E2 産生系が抑制され、P4 産生系が促進することが明らかとなった。GH は JAK/STAT 経路を介して顆粒膜細胞の IGF-1 の発現を誘導したが、内因性の IGF-1 を中和すると GH による P4 分泌への影響は抑制された。すなわち、FSH による P4 産生が GH により増幅される機序には、顆粒膜細胞由来の IGF-1 発現の増強が関与しているといえる。興味深い事に、SSTR アナログの場合は BMP 結合蛋白 Noggin によってその作用が減弱するのに対し、GH による卵胞ステロイドの分泌調節は、BMP 作用に干渉する Noggin の存在下で反対に増幅された。また、BMP リガンドの処理により GH および IGF-1 受容体と IGF-1 の発現が減弱し、IGF-1 作用は抑制された。現在、下垂体機能における GH/PRL のリズム変動に影響する松果体ホルモン・メラトニン作用との関連について、さらに検討を進めている。本結果から、GH はゴナドトロピンと協調して卵胞成長を支持するが、卵巣では IGF-1 と BMP 分子間の拮抗作用を通じて、卵胞ステロイド分泌能の恒常性を維持するという新たなメカニズムが明らかとなった。

一方 PRL は、ゴナドトロピン分泌因子 (GnRH) およびゴナドトロピン分泌を直接的に抑制することが知られるが、卵巣においても PRL は直接的にゴナドトロピンの作用を制御する。PRL 作用は、その受容体サブタイプ (long・short-form) の存在と種差により複雑なものであることが明らかとなってきた。long-form は、卵巣では黄体を中心に、莢膜細胞・顆粒膜細胞・間質細胞に発現し、long-form 作用により、LH 受容体の発現が増加し黄体機能を維持すると考えられるが、この機序には黄体血管新生・分化・リモデリングに重要な分子が関与する。PRL 受容体 long-form は、卵巣では主に黄体維持・妊娠の維持に重要な働きを担っていると考えられる。一方で、short-form 受容体は閉鎖卵胞に強く発現している。PRL 受容体 short-form による黄体機能不全の発生機序としては、short-form 受容体が卵母細胞の転写因子である FOXO3 や、卵胞の糖代謝に関与する Galt の発現を抑制している可能性があるが、この点については、今後さらに検討を進める予定である。これまでの検討から、高 PRL 状態に

晒された卵胞では、早期の P4 増加により未成熟な排卵を生ずる可能性があるが、それを回避するために卵巣に内在する BMP システムが活性化され、PRL 作用を抑制するというフィードバック機構の可能性も新たに示された。

本研究では、GH・PRL 各分子の独自の作用と、卵巣に存在する IGF-I との機能連携に着目して生殖内分泌作用を検討した。これにより、GH/IGF-I および PRL、そして下垂体作動薬 SSTR アナログの卵胞発育への直接作用を決定づけ、卵胞成長の key factor である BMP 作用との関連を明確にすることができた。

#### 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7件)

1) Terasaka T, Otsuka F, Tsukamoto N, Nakamura E, Inagaki K, Toma K, Ogura-Ochi K, Glidewell-Kenney C, Lawson MA, Makino H. Mutual interaction of kisspeptin, estrogen and bone morphogenetic protein-4 activity in GnRH regulation by GT1-7 cells. *Mol Cell Endocrinol.* 381: 8-15, 2013. (査読有) (10.1016/j.mce.2013.07.009.)

2) Tsukamoto N, Otsuka F, Ogura-Ochi K, Inagaki K, Nakamura E, Toma K, Terasaka T, Iwasaki Y, Makino H. Melatonin receptor activation suppresses adrenocorticotropin production via BMP-4 action by pituitary AtT20 cells. *Mol Cell Endocrinol.* 375: 1-9, 2013 (査読有) (10.1016/j.mce.2013.05.010.)

3) Matsumoto Y, Otsuka F, Takano-Narazaki M, Katsuyama T, Nakamura E, Tsukamoto N, Inagaki K, Sada KE, Makino H. Estrogen facilitates osteoblast differentiation by upregulating bone morphogenetic protein-4

signaling.

*Steroids* 78: 513-520, 2013 (査読有)  
(10.1016/j.steroids.2013.02.011.)

4) Nakamura E, Otsuka F, Inagaki K, Tsukamoto N, Ogura-Ochi K, Miyoshi T, Toma K, Takeda M, Makino H: Involvement of bone morphogenetic protein activity in somatostatin actions on ovarian steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 134: 67-74, 2013 (査読有)  
(10.1016/j.jsbmb.2012.10.018.)

5) Matsumoto Y, Otsuka F, Inagaki K, Tsukamoto N, Takano-Narazaki M, Miyoshi T, Nakamura E, Ogura-Ochi K, Takeda M, Makino H. An in vivo role of bone morphogenetic protein-6 in aldosterone production by rat adrenal gland. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 132: 8-14, 2013 (査読有) (10.1016/j.jsbmb.2012.04.004.)

6) Miyoshi T, Otsuka F, Nakamura E, Inagaki K, Ogura-Ochi K, Tsukamoto N, Takeda M, Makino H. Regulatory role of kit ligand-c-kit interaction and oocyte factors in steroidogenesis by rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 358: 18-26, 2012 (査読有) (10.1016/j.mce.2012.02.011.)

7) Suzuki J, Otsuka F, Matsumoto Y, Inagaki K, Miyoshi T, Takeda M, Tsukamoto N, Nakamura E, Ogura K, Makino H. Enhanced expression of bone morphogenetic protein system in aldosterone-treated mouse kidneys. *Hypertens Res.* 35: 312-317, 2012 (査読有)

(10.1038/hr.2011.186.)

〔学会発表〕(計4件)

1) 中村絵里、大塚文男、細谷武史、寺坂友博、三好智子、稲垣兼一、榎野博史：メラトニンとBMP-6による卵胞プロゲステロン分泌への影響とその機序：第18回日本生殖内分泌学会(東京)2013年12月07日

2) Nakamura E, Otsuka F, Inagaki K, Miyoshi T, Tsukamoto N, Toma K, Terasaka T, Makino H: Interaction of melatonin and BMP-6 in regulation of steroidogenesis by rat granulosa cells: The Endocrine Society's 95th Annual Meeting San Francisco, CA, USA: 2013年6月15日~2013年6月18日

3) 中村絵里、大塚文男、塚本尚子、当真貴志雄、越智可奈子、三好智子、稲垣兼一、武田昌也、榎野博史：卵胞ステロイド産生におけるソマトスタチン反応性の検討：第86回日本内分泌学会学術総会(仙台市)2013年04月25日~2013年04月27日

4) 中村絵里、大塚文男、稲垣兼一、三好智子、塚本尚子、武田昌也、越智可奈子、当真貴志雄、榎野博史：ソマトスタチンアナログの卵巣ステロイド産生への影響と卵巣BMPシステムの関与：第17回日本生殖内分泌学会(東京)2012年12月08日~2012年12月08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

中村 絵里 (NAKAMURA ERI)

岡山大学病院・医員

研究者番号：30612634