

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791681

研究課題名(和文) アディポサイトカインと卵胞発育—多嚢胞性卵巣症候群の治療成績向上を目指して—

研究課題名(英文) Adipocytokines and follicular development

研究代表者

原 周一郎 (Hara, Shuichiro)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10436230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：若年女性に多く見られ、排卵障害の原因となる多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)の原因究明のため、マウス卵胞体外培養系を作成し、実験を行った。アディポサイトカインはPCOSの一因と考えられているインスリン抵抗性を惹起する物質である。アディポサイトカインの一種であるTNF- α は卵胞発育を直接抑制することが分かった。そこにインスリン抵抗性改善薬を投与すると、TNF- α の抑制を改善した。以上の研究成果をまとめ、学会や国際的に評価の高い雑誌に投稿した。

研究成果の概要(英文)：Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a common ovulatory disorder in young women. We examined to clarify the pathogenesis of PCOS by using an in vitro mouse preantral follicle culture system. TNF-alpha is an adipocytokine, which raise insulin resistance. TNF-alpha directly inhibited follicular development. On the other hand, insulin-sensitizing drugs restored the TNF-alpha-mediated inhibition of follicular development.

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：アディポサイトカイン 卵胞体外培養 インスリン抵抗性改善薬

1. 研究開始当初の背景

不妊症は約 10~15%のカップルにみられるものであり、夫婦にとっては非常に重要な疾患である。主な不妊原因として排卵障害、卵管閉塞、男性不妊があげられる。排卵障害の原因として重要な疾患が多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)である。この疾患は性成熟女性の約 5~10%と比較的高頻度にみられ、卵胞発育障害により不妊症の原因となるだけでなく、肥満症、耐糖能異常、高血圧、脂質異常症といったメタボリック症候群のリスク因子となることが知られている。したがって PCOS は女性のライフステージの長期間にわたって様々な疾病を引き起こす疾患である。PCOS に対する排卵誘発の第一選択薬はクエン酸クロミフェン(CC)である。しかしその排卵率は 75~80%であり、20~25%の症例が CC 抵抗性である。

PCOS の病因は未だ不明な点が多いが、近年ではインスリン抵抗性(IR)の関与が重要であると考えられている。骨格筋や肝臓など末梢でのインスリン抵抗性が惹起されると代償的に高インスリン血症になる。インスリンは肝臓や下垂体に影響を与え、高アンドロゲン血症を引き起こし、その結果卵胞発育を阻害すると考えられている。

IR 惹起物質としてアディポサイトカインが知られている。アディポサイトカインは脂肪細胞から分泌されるサイトカインの総称であり、その生理活性から善玉(アディポネクチン、レプチン)と悪玉(tumor necrosis factor- (TNF-)、レジスチン、遊離脂肪酸、IL-6)に大きく分けられ、後者がメタボリック症候群の発症において中心的な役割を果たしていると考えられている。また、PCOS 患者では非 PCOS 患者と比較して、血中、卵胞液中の悪玉アディポサイトカインが高値であることが知られている。

近年 PCOS の排卵障害に対し、メトホルミン、ピオグリタゾン、ロシグリタゾンなどの IR 改善薬の使用経験が多数報告されるようになった。我々は、脂質異常症改善薬であるベザフィブレートが Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)の pan-agonist であり、さらに IR 改善効果を認めることに注目した。我々は脂質異常症を有する CC 抵抗性 PCOS 患者に対しベザフィブレートは CC との併用で卵胞発育を促進することを報告した。本研究ではベザフィブレートの投与は短期間であり、ベザフィブレートが卵胞発育を促進するメカニズムとしては、末梢のインスリン抵抗性を改善するだけでなく、卵胞に対する直接作用の可能性が示唆された。

2. 研究の目的

以上のような学術的背景があるが、アディポサイトカインが卵胞発育・ステロイド産生

を抑制するメカニズム、および IR 改善薬が卵胞発育を促進する詳細な分子機構は明らかでない。また、マウス卵胞体外培養系を用いて、アディポサイトカインやインスリン感受性物質、IR 改善薬の卵胞への直接作用を検討した研究報告はない。

不妊治療の場において比較的高頻度に遭遇する PCOS の卵胞発育抑制機序を明らかにすることは、PCOS 患者の妊娠率を向上させる治療方法を確立するにあたり非常に有用であると考え、本課題の着想に至った。本研究ではマウス卵胞体外培養系を用いて、アディポサイトカインによる卵胞発育抑制機序、そしてインスリン抵抗性改善薬の卵胞発育促進作用の分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

まずはマウス卵胞体外培養系の確立を目指した。マウス卵巣より前胞状卵胞を機械的に採取し、120~150 μm の卵胞のみを選択した。培地は -MEM GlutaMax 培地を用い、5% fetal bovine serum (FBS)、100 units/ml penicillin、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin および 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ transferrin、5 ng/ml selenium を添加し培養。24 ウェルのディッシュに、1 ウェルあたり 1 つの卵胞を入れインキュベータ内で 13 日間培養した。2 日毎に卵胞の観察(卵胞径、卵胞の生存、卵胞腔の有無)および培地の交換を行った。交換の際、培地は -80 で保存し、後日 17 -estradiol (E2)濃度を測定した。培養 12 日目に卵胞腔を形成していた場合、hCG を投与して 16 時間後に排卵の有無を確認した。

FSH を添加した卵胞培養系に TNF- を添加し、卵胞発育およびステロイド産生に及ぼす影響について検討した。

臨床的に効果のあったベザフィブレートが、TNF- による卵胞発育、ステロイド産生抑制系に及ぼす影響について、マウス卵胞体外培養系を用いて検討した。

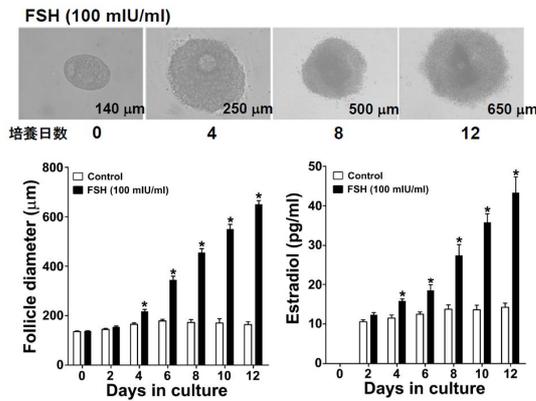
50 個の二次卵胞を採取し、卵胞における PPAR サブタイプの発現を Western blot にて検討した。

ベザフィブレートの場合と同様に、IR 改善薬であるピオグリタゾンが、TNF- による卵胞発育、ステロイド産生抑制系に及ぼす影響について、マウス卵胞体外培養系を用いて検討した。

4. 研究成果

マウス卵胞体外培養系に FSH (100 mIU/ml) を添加すると、卵胞発育、E2 濃度ともに有意に促進された(図 1)。

図1 FSHは卵胞発育およびE2産生を有意に促進する



一方、FSH群に比べFSH+TNF-群は、卵胞径、卵胞生存率、卵胞腔形成率、E2濃度は有意に低下した。TNFは卵胞に直接作用し、卵胞発育を抑制することが示唆された。よって、このTNFによる卵胞発育抑制系をPCOSの排卵障害モデルと考え、今後の実験を行った。

このTNFによる卵胞発育抑制系にベザフィブレートを追加したところ、FSH+TNF-群と比べ、卵胞径(図2-A)には有意差がなかったが、卵胞生存率(図2-B)、卵胞腔形成率(図2-C)、E2濃度(図2-D)は有意に改善した。

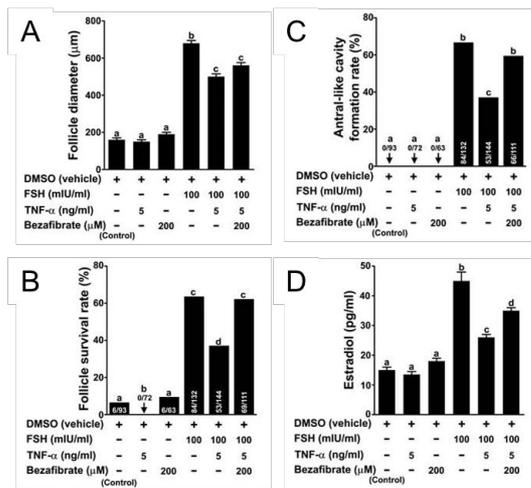


図2 ベザフィブレートはTNF-αの抑制作用を有意に改善する

50個の二次卵胞を採取、PPARサブタイプの発現をWestern blotにて検討したところ、二次卵胞にはPPARのサブタイプはPPARαのみが発現していた(図3)。

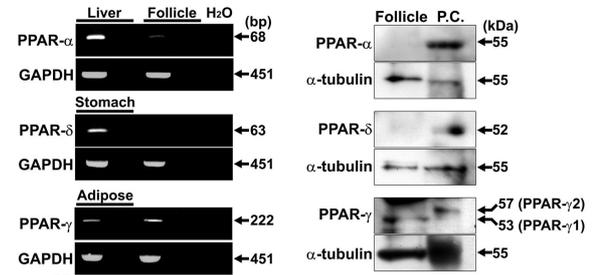


図3 マウス卵胞におけるPPARサブタイプの発現

そこで選択的PPARαアゴニストであるGW1929をTNF-αによる卵胞発育抑制系に添加したところ、ベザフィブレート添加群と同様に卵胞発育改善およびE2濃度の上昇を認めた。逆に選択的PPARαアンタゴニスト(GW9662)は、ベザフィブレートの改善効果を抑制した。以上よりベザフィブレートはPPARαを介してTNF-αによる卵胞発育とE2産生の抑制作用を改善することが示唆された。

ベザフィブレートの場合と同様に、TNF-αによる卵胞発育抑制系にピオグリタゾンを追加し、実験を行った。FSH+TNF-α群と比べ、ピオグリタゾン添加群では、卵胞径(図4-A)には有意差がなかったが、卵胞生存率(図4-B)、卵胞腔形成率(図4-C)、E2濃度(図4-D)は有意に改善した。ピオグリタゾンの排卵促進効果の機序の一つとして、卵胞への直接作用が示唆された。

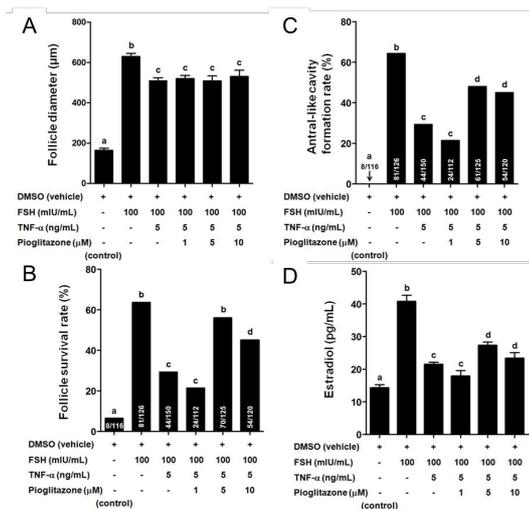


図4 ピオグリタゾンはTNF-αの抑制作用を有意に改善する

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. Journal of mammalian ova research
2014;31(1) 査読有

Peroxisome proliferator-activated receptor- agonists prevent tumor necrosis factor- mediated inhibition of FSH-induced follicle development and estradiol production in a preantral follicle culture system

Hara S, Takahashi T, Igarashi H, Amita M, Matsuo K, Hasegawa A, and Kurachi H

2. Journal of ovarian research 2013 Sep
30;6(1):69 査読有

Pioglitazone counteracts the tumor necrosis factor-alpha inhibition of follicle-stimulating hormone-induced follicular development and estradiol production in an in vitro mouse preantral follicle culture system.

Hara S, Takahashi T, Amita M, Matsuo K, Igarashi H, and Kurachi H.

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 周一郎 (HARA Shuichiro)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10436230