

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2013～2014  
課題番号：25860769  
研究課題名(和文) 卵胞細胞マイクロシグナル連関による卵巣機能不全の解明と臨床への応用  
  
研究課題名(英文) Oocytes and granulosa cells communication  
  
研究代表者  
三好 智子 (MIYOSHI, TOMOKO)  
  
岡山大学・医療教育統合開発センター・助教  
  
研究者番号：40444674  
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)：少子化の進行する現代日本において女性不妊は深刻な問題である。卵巣内の機能ユニットである卵胞の発育・機能分化そして排卵までの生理現象のメカニズムの詳細が十分に解明されていないことも不妊の理由の一つである。  
今回の研究では、この卵巣における卵母細胞と顆粒膜細胞が互いに細胞間コミュニケーションをとり、卵胞発育に影響を与えていることが解明された。

研究成果の概要(英文)：Female infertility is an important problem with declining birthrate in Japan. Oocytes and granulosa cells communicate with estrogen to stimulate FSH action in rat ovary.

研究分野：内分泌学

キーワード：卵巣顆粒膜細胞 卵母細胞 骨形成蛋白 不妊

### 1. 研究開始当初の背景

少子化の進行する現代日本において女性不妊は深刻な問題である。なかでも原発性卵巣機能不全は正常妊娠に必須の卵巣自体が障害されて不妊となるため、排卵誘発は極めて困難であり、人工授精や体外受精などの治療法も難しく、現在のところ有益な治療法は確立されていない。この卵巣機能不全の治療が困難である最大の理由は卵巣内の機能ユニットである卵胞の発育・機能分化そして排卵までの生理現象のメカニズムの詳細が十分に解明されていないことが挙げられる。

これまで我々は、卵巣に特に強い発現を認め、卵胞発育を調節する新しい細胞増殖因子、骨形成蛋白(Bone Morphogenetic Protein: BMP)に着目して研究を進めてきた。BMP-15 遺伝子変異は実際にヒトでの卵巣機能不全を引き起こすことも報告されており (*Am J Obstet Gynecol. 198: 84e1, 2008*)、黄体ホルモン(LH)受容体や卵胞刺激ホルモン(FSH)受容体、Estrogen 受容体遺伝子なども卵巣機能不全の原因遺伝子とされている (*Arch Gynecol Obstet. 283: 635, 2011*)。卵巣では BMP は顆粒膜細胞に対して Progesterone 抑制因子として働くが、卵母細胞が存在することでステロイド産生能に違いがあることより、卵母細胞と顆粒膜細胞の細胞間コミュニケーションが存在することが明らかとなった。卵母細胞の働きとしては、BMP-Smad シグナルの増強、FSH による MAPK の増強、Estrogen と協調し、FSH 受容体シグナルの活性化などが認められた。また、排卵に関与するといわれている卵母細胞因子である線維芽細胞増殖因子(Fibroblast Growth Factor: FGF)-8 が BMP-Smad シグナル作用を増強することにより、顆粒膜細胞でのステロイド産生を調節することも明らかとなった。このように卵母細胞由来の BMP-6/-15、GDF-9、FGF-8 は卵胞における卵母細胞 - 顆粒膜細胞間の機能的ネットワークを形成して卵胞発育を巧みに調節することが解明された。

### 2. 研究の目的

初年度の研究としては、顆粒膜細胞 kit ligand-卵母細胞 c-kit を通じて、卵母細胞 - 顆粒膜細胞間ネットワークの相互機能的連関について研究を進める。in vitro での卵胞成熟における FSH / ER / BMP / FGF / kit ligand system の相互作用の解析を行う。

卵巣での BMP の働きについては、自然発症した不妊のヒツジで BMP-15 の遺伝子異常が報告され、一方で多産のヒツジから BMP 受容体変異が報告された (*Nature Genet 25: 279, 2000*)。そして 2004 年には卵巣機能不全ヒトで BMP-15 のプロテイン変異が発見され (*J Biol Chem 278: 3713, 2004*)。ヒトに於ける不妊・卵巣機能異常における BMP 分子の重要性が認識された。卵巣では、卵母細胞・顆粒膜細胞・莢膜細胞の3つの卵胞構成

細胞の成長・分化が密接に関わっている。我々の研究から、BMP-2/-4/-6/-7 は顆粒膜細胞の Progesterone の合成を抑制することにより、正常な卵胞発育の維持に寄与すること (*Endocrinology 148: 337, 2007; Endocrinology 150: 1921, 2009*) が明らかとなった。また、卵母細胞因子 BMP-15 は顆粒膜細胞における FSH 受容体の発現調節 (*J. Biol. Chem. 276:11387, 2001*) をすることにより、卵母細胞自身が卵胞形成にも関与していることを報告した。さらに、BMP 分子とともに、新規卵母細胞因子 FGF-8 が Estrogen 抑制因子として、顆粒膜細胞での卵胞ステロイド分泌調節に寄与することを明らかにした (*Mol. Cell. Endocrinol. 325: 118, 2010*)。このように我々は、BMP は卵胞における卵母細胞 - 顆粒膜細胞間の機能的ネットワークを形成し卵胞発育を巧みに調節していることを解明している。

一方で、顆粒膜細胞因子 kit-ligand が卵母細胞を介して顆粒膜細胞自身を調節していることも報告しており、ラット卵巣顆粒膜細胞を用いて、卵母細胞 - 顆粒膜細胞間ネットワークの相互機能的連関のメカニズムについて研究を進める。

### 3. 研究の方法

今回の研究では、顆粒膜細胞 kit ligand-卵母細胞 c-kit を通じて、「卵母細胞 - 顆粒膜細胞間マイクロシグナルネットワークによる内分泌調節機構」について研究を進める。in vitro での卵胞成熟における FSH / ER / BMP / FGF / kit ligand system の相互作用の解析を行う。

(1) 初年度は「顆粒膜細胞分泌 kit ligand 卵母細胞受容体 c-kit を介した」卵胞成長のメカニズムを解明する：Somatic cell-to-oocyte communication へのアプローチを検討する。

はじめに、卵胞細胞における女性ホルモン分泌能について、これまでに我々が確立したラット顆粒膜細胞と卵母細胞の共培養による初代培養系を用いて、Estrogen の存在下で kit ligand が BMP/FGF システムに及ぼす影響について検討する。kit ligand 存在下における BMP/FGF 構成分子および BMP/FGF シグナルの変化、FSH シグナルの変化を FSH 受容体のセカンドメッセンジャーである cAMP 合成能および最終ステロイド産物である Estrogen・Progesterone 産生能、ステロイド合成酵素である Aromatase および StAR mRNA の変化で検討する。また、Estrogen・Progesterone 産生に関与する ERK および p38 を蛋白レベルで評価する。次に c-kit 抗体を用いて kit ligand 受容体である c-kit シグナルをブロックすることにより、内因性および外因性の kit ligand の作用が BMP/FGF システムに及ぼす影響について検討する。BMP/FGF 構成分子および BMP/FGF シグナルの変化、FSH シグナルの変化を Estrogen・

Progesterone 産生 / cAMP 合成 / mRNA / 蛋白レベルで評価する。

(2)次年度は、「卵胞成長に強く関与する FSH 受容体を調節するメカニズム」を解明する：oocyte-somatic communication によるアプローチを検討する。

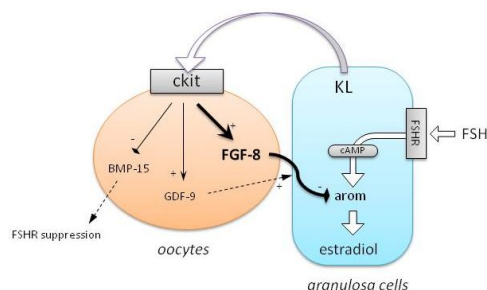
卵胞内の autocrine だけでなく、下垂体からの paracrine である FSH 刺激を踏まえ、FSH 受容体 (FSH-R) の調節機構について検討し、薬物治療による卵胞内の細胞間コミュニケーションの内分泌機構の変化に迫る。FSH-R は G-protein coupled receptor (GPCR) であり、GPCR kinase (GRK) による GPCR 脱感作が主な調節機構となっている。BMP-15 には FSH-R 発現抑制作用も報告されており、卵母細胞 - 顆粒膜細胞間ネットワーク間での FSH-R への影響を検討する。まず、invitro での卵巣顆粒膜細胞での GRK の存在について、RT-PCR を用い確認する。さらに 内因性 GRK の働きを探るため si-RNA を転写導入し、細胞内シグナル伝達やステロイド産生能力について検討する。次に、卵母細胞と estrogen による顆粒膜細胞 FSH-R シグナルの増幅メカニズムを解明する。とくに、我々の pilot study により、卵母細胞と estrogen の共存下では、顆粒膜細胞の FSH-R 脱感作機構である GRK/arrestin が負に制御されることが認められ FSH-R シグナルの増幅に寄与している可能性がある。よって、卵巣顆粒膜細胞に発現する GRK/arrestin ファミリーに着目して検討し、FSH-R 機能の変化と内因性 BMP 分子発現の関連を探索する。Estrogen 作用については、Genomic/ Non-genomic 作用かを明らかにしつつ、BMP システムの役割と生理的意義について GRK 活性変化と BMP リガンド・受容体シグナルの変調について検討する。

#### 4. 研究成果

(1)「顆粒膜細胞分泌 kit ligand 卵母細胞受容体 c-kit を介した」卵胞成長のメカニズムを解明する：Somatic cell-to-oocyte communication へのアプローチ

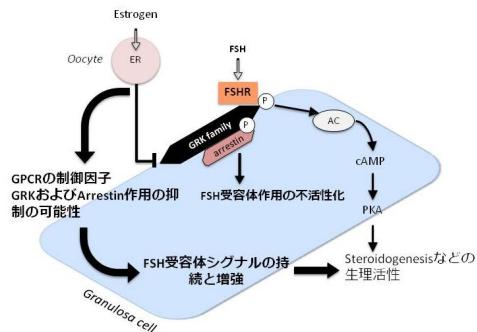
卵胞細胞における女性ホルモン分泌能について、これまで我々が確立したラット顆粒膜細胞と卵母細胞の共培養による初代培養系を用いて、Estrogen の存在下で kit ligand が BMP/FGF システムに及ぼす影響について、検討した。kit ligand の存在下におけるラット顆粒膜細胞内のステロイド合成を検討したところ、KL-c-kit シグナルは FSH によるエストロゲン (E2) 産生を抑制したが、プロゲステロン (P4) 産生には影響を与えなかった。このことより、KL-c-kit シグナルの E2 抑制作用は、cAMP を介さない経路が関与すると示唆された。次に c-kit 抗体を用いて kit ligand 受容体である c-kit シグナルをブロックすることにより、内因性および外因性の kit ligand の作用が BMP/FGF システムに及ぼす影響について検討した。KL-c-kit シグナル

は卵巣に關与する BMP システムのうち、BMP-6、GDF-9 および FGF-8 の発現を増強した。このうち、卵母細胞因子 FGF-8 は FSH による E2 産生を抑制した。つまり、KL-c-kit シグナルは卵母再病院し FGF-8 を介し、Aromatase の産生を抑制することで E2 産生に寄与することが解明された。



(2)「卵胞成長に強く関与する FSH 受容体を調節するメカニズム」を解明する：oocyte-somatic communication によるアプローチ

卵胞内の autocrine だけでなく、下垂体からの paracrine である FSH 刺激を踏まえ、FSH 受容体 (FSH-R) の調節機構について検討し、卵胞内の細胞間コミュニケーションの内分泌機構の変化に迫った。FSH-R は G-protein coupled receptor (GPCR) であり、GPCR kinase (GRK) による GPCR 脱感作が主な調節機構となっている。BMP-15 には FSH-R 発現抑制作用も報告されており、卵母細胞 - 顆粒膜細胞間ネットワーク間での FSH-R への影響を検討した。まず、invitro での卵巣顆粒膜細胞での GRK の存在について、RT-PCR を用い確認した。さらに ラット顆粒膜細胞においてエストロゲン (E2) と卵母細胞存在下では、FSH による cAMP 産生増加と同様にアロマトラーゼや FSH 受容体の発現も増強したが、adenylate cyclase 刺激因子の forskolin ではこの FSH の効果と同様の効果を呈さなかった。つまり、adenylate cyclase より上流で卵母細胞因子が顆粒膜細胞に影響を与えていることが示唆された。そこで、内因性 GRK の働きを探るため si-RNA を転写導入し、細胞内シグナル伝達やステロイド産生能力について検討した。GRK6 の発現を抑制するとラット顆粒膜細胞における FSH によるアロマトラーゼの発現が増加した。このことより、内因性の GRK6 は FSH によるアロマトラーゼの発現を抑制していることが示唆された。ラット卵巣では、Estrogen は卵母細胞の ER 下流にある何らかの卵母細胞因子を介して、顆粒膜細胞の GRK 発現を抑制し、FSHR の脱感作機転を抑制し、FSHR シグナルを増強・維持する可能性が示唆された。



これらの報告は随時、日本内分泌学会や米国内分泌学会で報告している。今後は *in vitro* だけでなく、*in vivo* の研究も進めていく予定である。

## 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)

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*. 査読有, 134, 2013, 67-74.

Miyoshi T, Otsuka F, Shimasaki S. GRK-6 mediates FSH action synergistically enhanced by estrogen and the oocyte in rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 434(2), 2013, 401-406

[学会発表](計 11 件)

細谷武史、大塚文男、中村絵里、稲垣兼一、寺坂友博、山内尚子、原孝行、当真貴志雄、三好智子、榎野博史、BMP-9 による卵巣プロゲステロン産生抑制と受容体シグナルの解析、第 88 回 日本内分泌学会学術総会、2015/4/23~4/25、東京都

細谷武史、大塚文男、中村絵里、稲垣兼一、寺坂友博、山内尚子、原孝行、当真貴志雄、三好智子、榎野博史、顆粒膜細胞における BMP-9 のステロイド産生能への影響とそのメカニズムの検討、第 19 回 日本生殖内分泌学会学術集会、2015/1/10、大阪府豊中市

原 孝行、大塚 文男、塚本 尚子、稲垣 兼一、細谷武史、当真 貴志雄、中村 絵里、寺坂 友博、三好 智子、榎野 博史、メラトニンによる副腎皮質アルドステロン分泌への影響と機序、第 87 回 日本内分泌学会学術総会、2014/4/24~4/26、福岡

中村 絵里、大塚 文男、細谷武史、寺坂 友博、原 孝行、当真 貴志雄、越智 可奈子、塚本 尚子、三好 智子、稲垣 兼一、榎野 博史、BMP による卵巣ステロイド合成調節に対するメラトニンの拮抗作用、第 87 回 日本内分泌学会学術総会、2014/4/24~4/26、福

岡

細谷武史、大塚文男、中村絵里、稲垣兼一、寺坂友博、塚本尚子、原孝行、当真貴志雄、三好智子、榎野博史、循環因子 BMP-9 による卵巣ステロイド合成調節への影響とその機序の検討、第 87 回 日本内分泌学会学術総会、2014/4/24~4/26、福岡

Tomohiro Terasaka, Fumio Otsuka, Naoko Tsukamoto, Kishio Toma, Eri Nakamura, Tomoko Miyoshi, Kenichi Inagaki, Mark A Lawson, Hirofumi Makino. A novel interaction of kisspeptin, estrogen and BMP-4 in GnRH regulation by GT1-7 cells. ENDO2013, June 15-18, 2013, San Francisco(USA)

Eri Nakamura, Fumio Otsuka, Kenichi Inagaki, Tomoko Miyoshi, Naoko Tsukamoto, Kishio Toma, Tomohiro Terasaka, Hirofumi Makino, Interaction of melatonin and BMP-6 in regulation of steroidogenesis by rat granulosa cells. ENDO2013, June 15-18, 2013, San Francisco(USA)

寺坂 友博、大塚 文男、塚本 尚子、中村 絵里、越智 可奈子、当真 貴志雄、武田 昌也、三好 智子、稲垣 兼一、榎野 博史、Kisspeptin と ER による GnRH 分泌調節と BMP-4 の拮抗作用、第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013/4/25~4/27、仙台

当真 貴志雄、大塚 文男、塚本 尚子、大國 皓平、中村 絵里、越智 可奈子、武田 昌也、三好 智子、稲垣 兼一、榎野 博史、Gonadotrope 細胞における Somatostatin 受容体反応性の検討、第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013/4/25~4/27、仙台

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、卵巣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、2013/4/25~4/27、仙台

大塚 文男、檜崎 真理子、勝山 隆行、松本 佳則、越智 可奈子、当真 貴志雄、中村 絵里、塚本 尚子、三好 智子、稲垣 兼一、小倉 俊郎、榎野 博史、骨芽細胞分化に対する BMP と ER の相互作用の検討、第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013/4/25~4/27、仙台

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

三好 智子 (MIYOSHI TOMOKO)

岡山大学・医療教育統合開発センター・助教

研究者番号：40444674

(2)研究分担者

( )

研究者番号：