

審査の結果の要旨

氏名 施佳

質の高い多数の卵を安定して得ることが現代の生殖医療の進歩には必須の課題である。なかでも卵胞発育と卵子成熟は、卵の数と質を決める主要な因子である。このため、ヒトにおける卵胞発育から卵子成熟・排卵・黄体形成にいたる生理と病理のメカニズムを解明することが、より高度かつ有効な生殖医療に求められている。本研究はヒト卵巣切片と卵巣顆粒膜細胞において、Bone Morphogenetic Protein (BMP) サイトカインの卵胞発育における役割および黄体形成における生理活性物質の作用機序の解明を目指したものであり、下記の結果を得ている。

1. 子宮頸癌手術患者の正常卵巣切片を用いて、BMP-6 蛋白発現について免疫染色法を用いて検討した。BMP-6 が初期卵胞における卵子に発現していることを認めた。体外受精の採卵時に得られたヒト顆粒膜細胞培養系に BMP-6 および BMP-15(100 ng/ml)を添加し、24 時間後の mRNA 発現を定量的 PCR にて検討した。BMP-6 および BMP-15 は inhibin α subunit の発現量を変化させなかったが、inhibin/activin β A subunit および inhibin/activin β B subunit の発現量を増させた。初期卵胞の卵子に BMP-15 が発現することが知られているため、BMP-6、BMP-15 により inhibin/activin β subunit が誘導されると β subunit がダイマーを形成し、初期の卵胞では activin が産生されることが予想される。activin は顆粒膜細胞の増殖作用および FSH 受容体の誘導作用を有するため、初期卵胞は FSH 受容体を誘導するまで成長が可能となる。このことから、BMP-6 および BMP-15 はヒト初期卵胞において activin の誘導を介して卵胞発育を促進していることが示唆された。
2. ヒト卵巣において、BMP-6 が上記の卵子に加えて、顆粒膜細胞に発現していることを認め、これらの発現は卵胞の増大に伴って増強することを認めた。ヒト顆粒膜細胞培養系に BMP-2, BMP-6, BMP-7, BMP-15(100 ng/ml)を 24 時間添加し、FSH 受容体および LH 受容体 mRNA の発現変化を定量的 PCR にて検討した。BMPs は FSH 受容体の発現を誘導する一方で、LH 受容体の発現が減少することを認めた。BMPs は FSH 受容体を誘導することで、卵胞をゴナドトロピン非依存性からゴナドトロピン依存性へ移行させる。その際、LH 受容体発現を抑制し、早期黄体化を起こさせないことが考えられた。

3. 卵胞が増大するにつれ顆粒膜細胞における BMP-6 発現が増加することから、その作用として卵胞における FSH 受容体をさらに誘導することが考えられる。さて、卵胞中期以降では inhibin B の作用により血中 FSH 濃度が低下することが知られている。その意義として FSH 受容体発現が少ない卵胞は、血中 FSH 濃度の低下に対応できずに閉鎖卵胞となる一方で、FSH 受容体を多く発現する卵胞は生存することができ、このことが単一排卵にむけての卵胞選択のメカニズムであると考えられている。卵胞において BMP-6 が存在すると、FSH 受容体の発現がさらに亢進することで、血中 FSH 濃度低下に対応することができ、主席卵胞へ成長することができるが、BMP-6 の発現が少ないと、FSH 受容体の発現が弱く、血中 FSH 濃度低下に対応することができずに卵胞閉鎖へ陥ることが考えられる。事実、健常卵胞では BMP-6 の発現を顆粒膜細胞に認めたが、閉鎖卵胞では BMP-6 の発現を認められなかった。
4. BMP-2, BMP-6, BMP-7, BMP-15 は顆粒膜細胞における AMH (anti-Mullerian hormone) mRNA を増加させた。AMH は顆粒膜細胞から産生され、初期卵胞の活性化、すなわち卵胞の recruitment を抑制することが知られている。また血中 AMH 値は卵巣の予備能力を反映することから、近年注目を集めている物質だが、AMH の発現調節因子に関して殆ど報告がない。BMP-2, BMP-6, BMP-7, BMP-15 は顆粒膜細胞における AMH の誘導を介して、周囲に存在する初期卵胞の活性化を抑制することが考えられる。その意義として、初期卵胞の活性化を調節することで、卵胞の急激な枯渇化を防いでいる可能性が推測された。
5. 子宮頸癌手術患者の正常卵巣切片を用いて、BMP-2 mRNA の発現を in situ hybridization 法にて検討した。ヒト卵巣において、BMP-2 は胞状卵胞の顆粒膜細胞に発現していたが、黄体での発現は見られなかった。体外受精患者から採取した培養ヒト顆粒膜細胞に BMP-2(100 ng/ml)を 24 時間添加し、StAR mRNA の発現変化を定量的 PCR にて検討した。StAR はプロゲステロン産生に作用し、卵胞の黄体化に関与することが知られている。我々は、BMP-2 が StAR mRNA を抑制させることを認めた。また、同培養系に hCG (10 IU/ml) を 24 時間添加したところ、BMP-2 mRNA の顆粒膜細胞における発現量は減少し、一方で BMP サイトカインの 阻害作用を有する BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI) mRNA の発現は上昇した。排卵後、卵胞の黄体化が促進される必要がある。排卵時の hCG 刺激により BAMBI を誘導することで、黄体化抑制作用を有する BMP シグナルは減少することが考えられた。

以上、本論文はヒト卵巣における BMP サイトカインの発現の検討およびヒト卵巣顆粒膜細胞培養系に BMP サイトカインを添加し、種々の卵胞発育関連因子の遺伝子変化を解析した。本研究により、ヒト初期卵胞発育から、黄体形成の過程において BMP サイトカインが、重要な役割を担っていることが明らかになることができた。本研究は、卵巣生理に関する知見に新たな貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。