

BMPに着目した新たな生殖内分泌調節機構とその応用

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 総合内科学
大塚 文男

1. 研究目的

少子高齢化社会の進む日本では、原因不明の女性不妊・排卵異常は早期に解決されるべき社会問題の一つである。この問題に対して生殖内分泌学の見地から介入したいと考えた。卵巣機能不全による不妊はその原因が多様であるため診断に苦慮し、卵母細胞の脆弱性から治療は不可能もしくは姑息的なものに留まっている。我々はこれまで、卵巣に強い発現を認め卵胞発育を調節する新しい因子として骨形成蛋白(Bone Morphogenetic Protein: BMP)に着目して研究を進めてきた。BMPは、胚発生と中胚葉分化にも必須であるためBMPノックアウトマウスは胎生致死となり、BMPの生殖内分泌機能に関する探求が困難であった。我々は細胞レベルでの詳細な検討を重ね、卵母細胞より分泌されるBMP-15/GDF-9が卵胞を構成する卵母細胞・顆粒膜細胞の間でネットワークを形成し、卵胞BMPシステムが卵胞発育に必須であることを明らかにした。

本研究では、この基盤からBMPを臨床的に応用する方向性を鑑み、H(視床下部) - P(下垂体) - O(卵巣)系として全身的に捉え、卵胞・卵母細胞機能の非侵襲的診断ツール、そして治療への発展を目指す研究を行った。

2. 研究へのアプローチ

以下の3つのテーマを軸として研究を遂行した。

1) BMPを含む卵胞細胞間ネットワークと新規卵因子の探索:

卵母細胞BMP-15, -6, GDF-9・顆粒膜細胞BMP-2, -6・莢膜細胞BMP-3b, -4, -7は、顆粒膜細胞において卵胞刺激ホルモン(FSH)によるProgesterone分泌を共通して抑制する。一方、Estradiol産生には各リガンド独自の作用をもち、この調節系は「卵」の存在により増幅される。この卵とBMPによる顆粒膜細胞のFSH受容体シグナル増幅が細胞間分子ネットワークの要といえることから、この機序の解明に主眼をおき、ラット顆粒膜細胞・卵母細胞共培養系を用いてBMPの役割を明確にする。

2) BMPによる生殖内分泌診断ツールとしての展開:

生殖機能異常におけるBMPの血中・組織内濃度を明らかにし、ヒト卵巣機能不全(POF)や多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)などの病態におけるBMPの分泌動態・血中レベルあるいはBMP-15/GDF-9変異の意義について、卵胞ステロイド合成系および顆粒膜細胞増殖能へ与える影響を評価する。特に、血中BMPとして比較的高濃度に存在するBMP-9に着目し、生理作用と作動メカニズムを解明する。

3) ストレス・日内リズムとBMPによるゴナドトロピン調節の探索:

日内リズムやストレスによる生殖機能への負の影響を緩和する方法を探索する。我々は、日内変動の形成に重要なホルモンであるMelatoninが下垂体ホルモンを抑制し、この作用が下垂体BMP-4と協調的に作動することを見出した。Melatonin/kisspeptin/GnIHと連動する時計遺伝子の発現とFSH/LH分泌能との関連を視床下部GnRH細胞、下垂体前葉ゴナドトロフ細胞を用いて探求する。

3. 研究成果

上記の研究アプローチにより、本研究期間において以下の2つの主な成果を得た。

① 卵胞ステロイド合成調節に寄与するBMP作用に対して、メラトニンは拮抗作用をもつ:

Melatoninは、概日リズムの調節や睡眠調節への作用に加えて、卵成熟や黄体化などの生殖内分泌機能にも影響する。Melatonin受容体(MT1, MT2)は卵胞顆粒膜細胞に存在し、LH受容体の維持、

hCGによるProgesterone分泌や抗酸化作用に関与するとされるが、そのメカニズムの詳細は不明である。ラット卵巢より単離した初代顆粒膜細胞を用い、Progesterone分泌や黄体化を抑制する作用をもつBMP-6に着目し、Melatoninによる卵胞ステロイド分泌調節との関連について検討した。BMP-6は卵胞顆粒膜細胞と卵母細胞に発現し、顆粒膜細胞のcAMP産生を減少してProgesterone合成を抑制する。Melatoninの顆粒膜細胞への添加では、FSHによる卵胞ステロイド分泌には変動を与えなかった。しかし、MelatoninはFSHにより誘導されるcAMPとProgesterone合成に対するBMP-6の抑制作用と、Progesterone合成酵素系 (StAR・P450_{scc}・3βHSD2) の発現に対するBMP-6の抑制作用に拮抗した。BMP-6はMT1受容体の発現レベルに影響せず、またMelatoninもBMP受容体の発現には影響を与えないが、Melatoninは抑制性Smad6の発現を増加してBMP-6によるSmad1/5/8シグナルを減弱した。以上の結果より、Melatoninは卵胞顆粒膜細胞でのBMP作用に拮抗してProgesterone合成維持に寄与するという新たな作用機転が示された(論文 1)。

② 循環血中に存在するBMP-9は、卵巢プロゲステロン産生を低濃度でも強く抑制する：

卵胞内のBMP分子はautocrine-paracrine機序によって細胞間の機能的連携に寄与しており、FSHによるProgesterone産生を抑制し、未成熟排卵や黄体化をブロックしている。しかし、BMP分子の中では高濃度で循環血液中に存在するBMP-9の内分泌調節作用については未だ知られていない。BMP-9は乳癌、前立腺癌、卵巢癌でも発現が認められ、リンパ系の形成にも重要とされている。我々は、血中に存在するBMP-9に着目し、ラット顆粒膜初代培養細胞を用いてステロイド産生に対する影響と卵母細胞との関連を検討した。結果として、BMP-9はFSHにより誘導された顆粒膜細胞でのEstradiol産生能には影響を与えないが、Progesterone合成を低濃度で強く抑制すること、その作用は卵母細胞の有無により変動しないこと、FSHによるcAMP産生とStAR・P450_{scc}・3βHSD・FSH受容体のmRNAレベルを抑制することが明らかとなった。BMP-9は顆粒膜細胞の細胞内シグナル伝達としてSmad1/5/8のリン酸化を介すること、BMP-9の顆粒膜細胞における受容体はALK-1/BMPRII complexが機能していることも示された。BMP-9は顆粒膜細胞にも発現を認めることから、卵胞に局在する他のBMP分子と同様にFSHにより誘導されるProgesterone合成を減少することで、黄体化抑制因子として機能することが明らかとなった(論文 2)。

4. まとめ

我々は、BMPの卵巢における内分泌作用に着目して研究を進めてきた。世界に先駆けて活性型BMP-15蛋白を作成し、顆粒膜細胞初代培養を用いて機能解析することにより、BMP-15がFSHにより誘導される遺伝子群の発現を抑制すること、Kit ligand/c-kit経路を介して顆粒膜細胞に作用すること、細胞外follistatinの調節下でALK-6/BMPRII-Smad1/5/8経路を介して機能し、GDF-9とダイマーを形成することを示した。2004年にイタリアから、bmp-15遺伝子変異による高ゴナドトロピン性卵巢不全の姉妹例がヒトにおいて初めて報告されたが、この病態の存在は、ヒトの原発性卵巢機能低下や下垂体ゴナドトロピン分泌異常の原因にBMP-15の機能異常が重要な役割を果たすことを示す大きなブレイクスルーとなった。近年、bmp-15遺伝子変異によるPremature Ovarian Failure (POF)病態との関連が報告され、BMP分子の生殖内分泌機能に与える作用として、*in vitro*と*in vivo*での成果が融合する段階に入り、体外受精(ART, IVF)を始めとする臨床の場への応用が現実的となる時機が近いといえる。今後も引き続き本研究を遂行していきたいと考えている。

最後に、この度は長い歴史と伝統のある貴財団より平成25年度研究助成を賜り、心より有り難く存じます。本研究助成を活用して研究課題を推進するとともに、私の培ってきたことを次世代へ伝え、かつフィードバックを受けながら若手の教育にも貢献したいと思っています。

5. 発表論文

今回の研究成果は以下の2報で論文化し、末尾に本財団への謝辞を述べております。

1. Nakamura E, Otsuka F et al.: Melatonin counteracts BMP-6 regulation of steroidogenesis by rat granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 143: 233-239, 2014
2. Hosoya T, Otsuka F et al.: Regulatory role of BMP-9 in steroidogenesis by rat ovarian granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 147: 85-91, 2015