

主論文

A regulatory role of androgen in ovarian steroidogenesis by rat granulosa cells

(アンドロゲン過剰が卵巣ステロイド合成系に与える影響とその機序の検討)

[緒言]

多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)患者では、インスリン抵抗により血清インスリン濃度が上昇する。高インスリン血症は卵巣局所のインスリン様成長因子(IGF)-I活性を増強しその結果、莖膜細胞でのアンドロゲン合成を促進させる。このIGF-I活性上昇と高アンドロゲン環境が、PCOS患者の排卵障害に関与している可能性が想定される。

卵巣の発育・成熟は、性腺刺激ホルモンと様々な調整因子の相互作用により起こる。卵巣刺激ホルモン(FSH)反応の細やかな制御は、主席卵巣の選定や排卵過程において重要である。卵巣の骨形成タンパク質(BMP)系がオートクライン/パラクリン的に作用し、黄体化抑制因子としてFSHによる黄体ホルモン合成を抑えることが知られている。BMP-6の発現は、健康なグラーフ期のラット卵母細胞と顆粒膜細胞に局所している。ラットの顆粒膜細胞でBMP-6は主席卵巣を選ぶステップで減少している。このことは、BMP-6が主席卵巣選択過程において生理的調整をしていることを示唆する。病態生理学に見ると、PCOS患者の卵巣から分離されるヒト顆粒膜細胞で、BMP-6の発現が非常に増加していることが知られている。

本研究で、我々はBMP-6に着目し卵巣のステロイド合成におけるアンドロゲン過剰とIGF-Iの機能的な役割についてラット顆粒膜細胞初代培養系を使用し検討した。

[材料と方法]

ラット卵巣顆粒膜細胞初代培養系の作成

22日齢のメスSDラットを実験に供した。細胞数を増加させるため吸入麻酔下で皮下にDESカプセルを埋め込み3日暴露の後、ラットを安楽死させ卵巣を採取した。27ゲージ針にて卵巣を穿刺し、100 μ m, 40 μ mのフィルターを通すことで顆粒膜細胞を単離した。単離した顆粒膜細胞は全て抗生剤混注の無血清培地で37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 5 \times 10⁵細胞/mLの条件で培養した。本研究は岡山大学動物実験委員会の承認のもと施行した。

エストロゲン, プロゲステロン, cAMP 測定

アロマターゼの基質であるアンドロステンダイオンを加え96 wellプレートを使用しラット顆粒膜細胞を培養した。10 ng/mlのFSHとIGF-I, DHTを単独もしくは合わせて加え、48時間の培養の後、上清を回収した。エストロゲン, プロゲステロン測定にはCayman Chemical社のCLIA測定キットを使用した。顆粒膜細胞のcAMP産生を評価するため0.1 mMのIBMX(ホスホジエステラーゼ選

拮抗剤)を添加し上記条件にて培養, 上清を回収した。ENZO life Sciences 社の ELISA キットを用い, 各検体をアセチル化した後に測定した。

RNA 抽出と定量的 RT-PCR

12 well プレートを使用しラット顆粒膜細胞を培養した。10 ng/ml の FSH と IGF-I, DHT を単独もしくは共添加した。48 時間の培養の後, Invitrogen 社の TRzol®を用い tRNA の抽出を行った。RNA 量は 260 nm 波長の吸光度により測定した。1 μ g の抽出 RNA を用い 42 °C を 50 分, 70 °C を 10 分で逆転写した。各プライマーは DNA のコンタミによる PCR 産物を避けるため異なるエクソンから選んだ。RPL19 で補正し Δ CT 法を用いリアルタイム PCR (qPCR) で標的遺伝子の発現量を検討した。

Western immunoblotting

24 well プレートを使用しラット顆粒膜細胞を培養した。24 時間, IGF-I, DHT 単独もしくは共添加で培養した後, BMP-6 で 60 分刺激し回収した。細胞可溶物は抗リン酸化 Smad1/5/8 抗体を用い SDS-PAGE/免疫ブロットで評価した。標的タンパク濃度は標的タンパクとアクチンの信号強度の比を用い評価した。

統計解析

結果は少なくとも各条件の 3 検体を 3 回の異なる実験で測定し平均値 \pm 標準誤差で示した。統計解析には ANOVA 法, unpaired t-test を用いた。P 値<0.05 を統計学的有意差ありとした。

[結果]

我々は, まずアンドロゲンと IGF-I の卵巣のステロイド合成に対する複合効果を幼弱メスラットの卵巣から分離した顆粒膜細胞初代培養を用い検討した。AR の適切な評価のため, エストラジオール (E2) に転換され得るテストステロンではなく DHT を使用した。IGF-I (100 ng/ml) または DHT (100 nM) 単独では, ラット顆粒膜細胞での E2 と P4 生産の基礎レベルに影響を及ぼさなかった。IGF-I (0~300 ng/ml) 共培養は, 濃度依存性にラット顆粒膜細胞での FSH (10 ng/ml) に誘導される E2 ならびに P4 生産を増加した。DHT (100 nM) を用いた高アンドロゲン処置は, FSH, IGF-I (0~300 ng/ml) 共存下の E2 生産をわずかに増やすだけであったのに対し P4 産生を著明に増加させた。

アンドロゲンと IGF-I のステロイド合成に対する効果を確かめるために, qPCR を用いステロイド合成酵素 (StAR, P450scc, 3 β HSD, P450arom) の mRNA 発現量を調べた。我々は以前に, IGF-I による処置がラット顆粒膜細胞で FSH に誘導されるステロイド合成酵素の発現を強化することを報告した。本研究では, FSH と IGF-I によって誘導されるステロイド合成酵素発現に対するアンドロゲンの効果に焦点を置いた。DHT (100 nM) 処理は, StAR, P450scc と 3 β HSD の発現をさらに強化した。他方, E2 生産の結果と一致して, P450arom の発現は変化しなかった。アンドロゲン

と IGF-I のステロイド合成制御メカニズムを明らかにするために、顆粒膜細胞での cAMP 合成を検討した。FSH (10 ng/ml) で誘導された cAMP 合成は IGF-I (100 ng/ml) 共培養では変化を認めなかったが、さらに DHT (100 nM) が加わることで cAMP 合成を著明に増強した。

顆粒膜細胞におけるアンドロゲンと IGF-I の相互作用を調べるために、IGF-IR と AR の mRNA 発現レベルについて qPCR を用い検討した。AR の発現は、IGF-I (100 ng/ml) 処置によって増強された。一方、IGF-IR の発現は、DHT (100 nM) 処置によって減弱された。

次に我々は、アンドロゲン、IGF-I が BMP シグナルに与える影響について検討した。1 時間の BMP-6 (100 ng/ml) 刺激は Smad1/5/8 のリン酸化を速やかに誘導した。IGF-I (100 ng/ml), DHT (100 nM) 共培養はそのリン酸化を大幅に抑制した。次に BMP 標的遺伝子である Id-1 の mRNA 発現量を qPCR で評価した。IGF-I (100 ng/ml) と DHT (100 nM) 単独では、Id-1 mRNA レベルに、影響を及ぼさなかった。しかし、BMP-6 (100 ng/ml) に起因する Id-1 発現は、IGF-I, DHT の共培養によって有意に抑制された。アンドロゲンが BMP-Smad シグナルを抑えるメカニズムを明らかにするために、アンドロゲンと IGF-I 共培養による BMP 受容体の mRNA 発現量の変化を評価した。タイプ I 受容体 (ALK-2 と ALK-6), タイプ II 受容体 (ActRII) の発現量は DHT (100 nM) 共培養によって減弱した。ALK-6 と ActRII の発現量は IGF-I (100 ng/ml) 共培養によっても減少した。

[考察]

本研究において、高アンドロゲン環境と IGF-I 活性増加がステロイド合成の調節不全をきたすことで PCOS 患者の排卵障害に至っていると、仮説を立てた。ラット顆粒膜細胞初代培養を用いた研究により、アンドロゲンと IGF-I は複合的に内因性 BMP シグナルを抑えることで、FSH 誘導性の P4 生産を促進することが明らかになった。

卵巣における IGF-I 系は通常の卵胞発育と閉鎖卵胞の退縮過程で重要な役割を演じる。IGF-I は顆粒膜細胞では FSH 受容体の発現を増強することで、感度上昇に関与している。前胞状卵胞早期での PCOS の病理学的変化への IGF-I 活性と IGF-IR 発現の重要性も報告されている。他方、PCOS の病態生理学におけるアンドロゲンと AR の役割も認められた。AR はラット卵巣では前胞状卵胞の卵母細胞、顆粒膜細胞、莢膜細胞で発現しており表現パターンは卵胞発育段階により異なる。本研究において、ラット顆粒膜細胞で IGF-I が AR の mRNA の発現を増強する一方、アンドロゲンが IGF-IR の mRNA の発現を抑制することが示された。

臨床的には女性におけるアンドロゲン過剰は、インスリン抵抗性やメタボリックシンドロームと関連がある。齧歯動物において、DHT の長期暴露は、閉鎖卵胞様の卵巣多嚢胞性変化と排卵数の減少を示すなど PCOS の様々な生殖、代謝的特徴を引き起こす。このことは AR が PCOS の生殖、代謝的特徴の進展に及ぼす直接的な効果を示唆する。

体外受精を施行されたコントロール患者と比較すると PCOS 患者から単離された顆粒膜細胞における BMP-6 の mRNA 発現が著明に増加していることを示す臨床研究がある。BMP-6 の発現は閉鎖卵胞だけでなく健常な発育卵胞でも見られるため、BMP-6 の過剰発現は PCOS 卵巣における成長を妨げられた卵胞の存在を示している可能性や過剰なアンドロゲンと IGF-I の影響による

BMP-Smad シグナリング抑制に起因するフィードバック機構の存在を反映している可能性がある。

これまでの結果から、アンドロゲンは顆粒膜細胞における内因性の BMP-6 の働きを抑制することで IGF-I に誘導される P4 産生を増強することが示された。このメカニズムは、PCOS 患者の卵巣で見られるステロイド合成の変化と機能的に関連することが推察される。これに関連して、我々は以前に PCOS 患者の不妊治療薬として効果があるとされるメラトニンの卵巣のステロイド合成における作用を報告した。その研究で、メラトニンがラット顆粒膜細胞で BMP-6 に拮抗的な役割をすることで黄体ホルモン合成と黄体形成を調整することが示された。メラトニンやアンドロゲンの BMP-6 の活動抑制効果は、PCOS 患者で見られる黄体ホルモン産生障害や卵胞発育停止を補填するのに効果的であると考えられた。

[結論]

アンドロゲン過剰は顆粒膜細胞における内因性の BMP-6 の働きを抑制することで IGF-I に誘導される P4 産生を促すことが明らかとなった。さらにアンドロゲンが IGF-IR の発現を抑える一方、IGF-I は AR の発現を増強するというネガティブフィードバック機構の存在が示唆された。発育卵胞における卵巣ステロイド合成を微調整するために、アンドロゲン/IGF-I と BMP システムのバランスが生理的に重要であることが示唆された。