

# 主 論 文

Interaction between orexin A and bone morphogenetic protein system on progesterone biosynthesis by rat granulosa cells  
(オレキシンと BMP による卵巣プロゲステロン産生への影響とその機序の検討)

## [緒言]

オレキシン A およびオレキシン B は、摂食中枢である視床下部外側野とその周辺に発現する神経ペプチドであり、共通の前駆体であるプレプロオレキシンから生成される。オレキシンは、睡眠・覚醒、摂食の制御に重要な役割を担っている。オレキシン受容体には、2種類のサブタイプ (OX1受容体およびOX2受容体) が存在し、オレキシン A は両者と親和性をもつ。オレキシンおよびその受容体は、中枢神経以外の消化管、副腎、生殖器、臍臓、脂肪細胞などの末梢組織にも存在する。オレキシンの生殖への作用として、視床下部の GnRH 分泌を調整し、下垂体や性腺ホルモンの産生に間接的に関与することが知られている。また、卵巣にも OX1受容体およびOX2受容体が存在し、オレキシンが直接的に FSH 誘導性の Estradiol 分泌を減少することが報告されているが、卵巣ステロイド産生調節への影響とその機序は明らかになっていない。

卵胞の成長、成熟は、ゴナドトロピンと骨形成蛋白 BMP (bone morphogenetic protein) を含む様々な卵巣局所因子の autocrine-paracrine 作用により生ずる。BMP は卵胞構成細胞特異的にリガンドや受容体を有し、卵巣ステロイド産生や細胞分化増殖を調節するが、共通して顆粒膜細胞における FSH 誘導性 Progesterone 産生を抑制することから黄体化抑制因子として働くと考えられている。

以上の背景をもとに、今回我々はラット卵胞顆粒膜細胞の初代培養系を用いて、オレキシンの卵胞ステロイド合成に与える影響について BMP との関連に着目して検討を行った。

## [材料と方法]

### 試薬と材料

実験動物として雌 Sprague-Dawley rats (Charles River) を、初代培養培地として Medium 199, McCoy 5A, HEPES (Invitrogen社), penicillin-streptomycin solution (Sigma-Aldrich社) を使用した。培養試薬として Diethylstilbestrol (DES), ovine pituitary FSH, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), human Orexin A (Wako Pure Chemical Industries), 4-androstene-3,17-dione (Sigma-Aldrich社), human BMP-6 and BMP-7 and mouse Noggin (R&D system社), BMP-receptor signaling inhibitors ; LDN193189 (Stemgent社) and dorsomorphin (Calbiochem社), a selective non-peptide OX1 antagonist ; SB408124 (Tocris Bioscience社) を使用した。

### ラット卵胞顆粒膜細胞の初代培養

22日齢の雌 SD ラットに DES (10 mg) カプセルを皮下に埋め込み、3-4日後に卵巣を摘出し、27ゲージ針を用いて卵母細胞と顆粒膜細胞を採取した。卵母細胞・顆粒膜細胞懸濁液を段階的に cell strainer (100  $\mu$ m および 40  $\mu$ m ; BD Falcon 社) を用いて分離し、顆粒膜細胞のみを抗生素を混じた McCoy 5A による無血清培地にて培養した。

### Estradiol・Progesterone および cAMP 測定

顆粒膜細胞 ( $1 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ l) を androstenedione (100 nM) と FSH (10 ng/ml) を混じた McCoy 5A の medium にオレキシン A (100 nM), Noggin (30 ng/ml), LDN193189 (300 nM), dorsomorphin (300 nM)を加え、96-well plate にて 37°C 5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。48時間培養後に培養液を回収し、培養液中の Estradiol と Progesterone を CLIA 法 (Cayman Chemical 社) にて測定した。培養液中の cAMP は IBMX (0.1mM)を混じて 48 時間の培養後 ELISA 法 (Enzo Life Sciences 社) にて測定した。

### RNA 抽出・RT-PCR と定量リアルタイム PCR 解析

顆粒膜細胞 ( $5 \times 10^5$  cells/1 ml) を McCoy 5A 培地で培養し、FSH (10 ng/ml), オレキシン A (100 nM), BMP-6 (100 ng/ml), BMP-7 (100 ng/ml), SB408124 (10  $\mu$ M) を加え、12-well plate

にて 24 時間あるいは 48 時間培養後, TRIzol (Invitrogen 社) を用いて細胞中の total RNA を抽出した。RNA(1 µg)より cDNA を作成し, OX1 受容体および OX2 受容体について RT-PCR を行い, 電気泳動を行った。Cyp11a, StAR, Hsd3b, Cyp19, BMP 標的遺伝子 Id-1, FSH 受容体, Hctr1/Hctr2 受容体, BMP 受容体, Smad の mRNA 発現レベルはリアルタイム PCR 法にて定量し (Roche Diagnostics 社), 各データは ribosomal protein L19 (RPL19) 発現量で標準化した。各プライマーの増幅効率は *Rpl19*, 92%; *Star*, 94%; *Cyp11a*, 96%; *Hsd3b*, 97%; *Cyp19*, 96%; *Id1*, 91%; *Actvr1*, 99%; *Bmpr1a*, 86%; *Bmpr1b* 87%; *Bmpr2*, 96%; *Actvr2a*, 98%, *Smad6*, 96%; *Smad7*, 86%; *Hctr1*, 91%; *Hctr2*, 90%; and *Fshr*, 96% であった。

#### ウエスタンプロット解析

顆粒膜細胞 ( $2.5 \times 10^5$  cells/500 µl) にオレキシン A (100 nM) を添加した McCoy 5A 培地で 24-well plate にて 24 時間培養後, BMP-6 (100 ng/ml) あるいは BMP-7 (100 ng/ml) を添加し 1 時間刺激した。その後 RIPA lysis buffer (Upstate Biotechnology) で細胞を溶解し, SDS-PAGE にて展開した後, 抗 pSmad1/5/8(9)抗体 (Cell Signaling Technology 社), 抗 total-Smad1 抗体 (Cell Signaling Technology 社), 抗 actin 抗体 (Sigma-Aldrich 社) を用いてイムノプロット解析を行った。各シグナル強度は C-Digit Blot Scanner System (LI-COR Bioscience) により解析した。

#### 統計解析

すべての結果は少なくとも異なる 3 回以上の実験データの平均値と標準誤差 (SEM) により示した。各群の有意差は, ANOVA および t 検定によって解析し, *P* 値 < 0.05 を有意とした。

### **[結果]**

ラット卵巣にオレキシン受容体の発現を確認した。オレキシンは FSH 誘導性の Progesterone 産生を増強したが, Estradiol 産生には影響を与えたかった。BMP 結合蛋白である Noggin あるいは BMP 受容体シグナル阻害剤である Dorsomorphin, LDN193189 により内因性 BMP 作用を抑制すると, オレキシンによる Progesterone 産生の増加反応は減弱した。オレキシンは FSH 誘導性の cAMP 産生を増強し, FSH 誘導性の StAR, Cyp1a, Hsd3b を含む Progesterone 合成酵素系の mRNA 発現レベルを増強したが, Cyp19 には影響を与えたかった。次に, 顆粒膜細胞における Progesterone 産生を特異的に抑制する BMP との関連を検討したところ, オレキシンは BMP-6 および BMP-7 による Smad1/5/8(9)のリン酸化及び標的遺伝子 Id-1 の mRNA レベルを抑制したが, この作用は OX1 受容体阻害剤の存在下で減弱した。またオレキシンによる BMP 受容体活性への影響を検討した結果, オレキシンは BMP-I 型受容体 (Acvr1, Bmpr1a, Bmpr1b) および BMP-II 型受容体 (Acvr2a, Bmpr2) の発現を抑制し, 抑制性 Smad (Smad6, 7) の発現を増強することが示された。一方で BMP 刺激によりオレキシン受容体の mRNA 発現レベルが抑制されたことから, 両者の間におけるネガティブフィードバック機構の存在が示唆された。

以上より, オレキシンが顆粒膜細胞における FSH 誘導性 Progesterone 産生を抑制すること, そのメカニズムの一つとして内因性 BMP 受容体シグナルの増強を介することが明らかとなった。

### **[考察]**

オレキシンの視床下部・下垂体・卵巣系への作用はこれまで報告されている。オレキシンは視床下部の GnRH ニューロンに関与し, 下垂体の LH 分泌に影響を及ぼす。またオレキシン受容体を阻害すると排卵前卵胞数は増加するが, 黄体数は減少し, 排卵率が低下する。卵巣局所においては, 卵巣に OX 受容体 1 および OX2 受容体が存在し, ホルモン周期に合わせて受容体発現量が変化している。さらにブタの卵巣ではプレプロオレキシンが存在し, その発現量はホルモン状態に関連している。

本研究でオレキシンは, FSH 誘導性の Progesterone 産生を増強したが, Estradiol 産生には影響を与えたかった。BMP-2, -4, -5, -6, -7, GDFs に対する中和蛋白である Noggin や BMP 受容体シグナル阻害剤である Dorsomorphin, LDN193189 により内因性 BMP 作用を抑制すると, オレキシンによる Progesterone 産生の増加反応は減弱した。またオレキシンは, BMP-6 および BMP-7 による Smad1/5/8(9)のリン酸化及び標的遺伝子 Id-1 の mRNA レベルを抑制したが, こ

の作用は OX1 受容体阻害剤の存在下で減弱した。BMP が顆粒膜細胞の FSH 応答性を抑制することにより黄体形成および Progesterone 産生を抑制する働きを持つことを考慮すると、内因性の BMP 活性の抑制を介して卵巣内のオレキシン A の作用が少なくとも部分的に誘発される可能性がある。またオレキシン受容体を阻害すると、内因性 BMP 作用が抑制されず、黄体形成不全の抑制につながることが示唆された。BMP-6 および BMP-7 は BMP-I 型受容体の Acvr1, Bmpr1a および BMP-II 型受容体 Acvr2a, Bmpr2 に結合する。オレキシンは、BMP-I 型受容体および II 型受容体の発現を抑制し、抑制性 Smad6・7 の発現を増強した。BMP-Smad シグナル伝達とオレキシン受容体シグナル伝達が卵胞発育における卵巣ステロイド合成の調整に相互的に影響する可能性がある。さらに BMP-6 および BMP-7 により OX1 受容体および OX2 受容体の発現は抑制されたことから、顆粒膜細胞におけるオレキシン作用には、内因性 BMP の存在が機能的に関与していることが明らかとなった。一方で、末梢組織や血中に存在するオレキシンの起源や局所的役割はいまだ明らかでない。オレキシン受容体シグナルと BMP システムを関連付ける詳細な分子機序の解明が今後の研究課題である。

### 【結論】

ラット卵巣にはオレキシン受容体（OX1 受容体および OX2 受容体）の発現を認め、オレキシンは顆粒膜細胞における FSH 誘導性 Progesterone 産生を増強した。その作用機序として BMP 受容体の発現抑制、抑制性 Smad の発現増強を介して内因性 BMP-6 および BMP-7 受容体シグナルを抑制することが明らかとなった。また BMP-6 および BMP-7 はオレキシン受容体発現レベルを抑制したことから両者間のネガティブフィードバック機構の存在も示唆された。以上より卵胞ステロイド産生におけるオレキシン/BMP/FSH 分子間の新たな機能連関が明らかとなった。