

シンポジウム 卵胞発育の調節機構—局所因子を中心として—

卵胞の発育，退行，閉鎖に伴う成長因子と受容体
ならびに癌遺伝子の発現とその役割に関する
細胞分子生物学的解析

神戸大学助教授 丸 尾 猛

目 的

卵胞発育は顆粒膜細胞の増殖と分化に特徴づけられ，gonadotropin による中枢性調節を受けるが，近年，各種の卵巣内因子による局所調節の重要性が指摘され，卵胞発育調節機構における卵巣内 autocrine/paracrine 因子と卵巣外 endocrine 因子の相互作用が注目される。

そこで本研究では，局所調節因子として重要な位置を占める成長因子とその受容体ならびに癌遺伝子の卵胞発育調節機構における役割を明らかにするため，まず卵胞の発育，退行，閉鎖に伴う各種局所調節因子の発現態度を細胞レベルならびに分子レベルで解析した。次いで，顆粒膜細胞の増殖と分化に及ぼす各種成長因子固有の生物作用の特性を明らかにするため，顆粒膜細胞の *in vitro* 無血清培養系でそれぞれの生物作用を卵胞の発育段階別に比較，検討した。また，細胞生理との関連で注目される glucose transporter (GLUT) の卵胞発育機構における役割を知る目的で，卵胞の発育，退行，閉鎖に伴う GLUT 発現とその修飾因子を細胞レベルならびに分子レベルで解析した。さらに，ホメオスターシス維持のうえで重要な apoptosis と排卵卵胞選択機序との関わりを考察する目的で，卵胞の退行，閉鎖に伴う apoptosis 特有の DNA fragmentation 発現とその制御因子につき分子レベルで解析を加えた。

方 法

I. 卵胞発育に伴う成長因子とその受容体ならびに癌遺伝子発現の解析：(1) EGF と受容体，IGF-I と受容体，insulin 受容体，TGF α ，TNF α ，c-myc 産物の免疫組織学的発現を卵胞発育との関連で調べた。(2) 各発育段階卵胞のブタ顆粒膜細胞を用い，Northern blot 法で c-myc，c-erb-A，

c-erb-B 発現を調べた。(3) 無血清培養系でブタ顆粒膜細胞による EGF，IGF-I 産生とその修飾因子を調べた。(4) 各発育段階卵胞のブタ顆粒膜と [¹²⁵I]-EGF，IGF-I，insulin，triiodothyronine (T₃) 結合の Scatchard 解析から，卵胞発育と成長因子受容体発現の関連を調べた。

II. 顆粒膜細胞の増殖と分化に及ぼす成長因子の作用の解析：ブタ顆粒膜細胞の無血清培養系で FSH の存在下，非存在下に EGF，IGF-I，TGF β ，TNF α ，T₃ならびに insulin の添加実験を卵胞の発育段階別に行い，細胞増殖への影響を PCNA 免疫染色と [³H]-thymidine uptake から検討し，分化機能への影響を細胞形態，LH 結合能，progesterone (P₄) と estradiol (E₂) 産生能，3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) と aromatase 活性から検討した。

III. 卵胞発育に伴う GLUT 発現とその修飾因子の解析：卵胞発育に伴う GLUT (1～5) 発現とその修飾因子を免疫組織学的，分子生物学的に調べた。

IV. 卵胞の退行，閉鎖に伴う apoptosis とその制御因子の解析：卵巣構成細胞での DNA fragmentation 発現を *in situ* DNA 3'-end labeling 法で，apoptosis のシグナルを媒介する Fas 抗原と抗 apoptosis 遺伝子 bcl-2 の発現態度を免疫組織学的に検討した。

成 績

I. 卵胞発育に伴う成長因子とその受容体ならびに癌遺伝子の発現：原始卵胞と一次卵胞の卵細胞ならびに顆粒膜細胞に限定的な c-myc mRNA の発現を認め，またこれらの未熟卵胞の顆粒膜細胞では T₃受容体とそれをコードする c-erb-A mRNA の発現が高いことを認めた。EGF と受容

体の発現は原始卵胞と一次卵胞の顆粒膜細胞では陰性であるが、二次卵胞の顆粒膜・莢膜細胞で陽性となり、卵胞成熟と共に増強した。IGF-Iと受容体ならびに insulin 受容体の顆粒膜・莢膜細胞での発現は一次卵胞の段階から陽性で、卵胞成熟と共に増強した。EGF, IGF-I, insulin の受容体発現は黄体期中期の黄体細胞で最大となり、黄体退行と共に低下し、白体では陰性となるが、白体周辺の間質部でこれら受容体の発現が増強した。このことより EGF, IGF-I, insulin は卵胞でのステロイド産生と黄体退行後の局所間質の再構築に役割を果たすことが示唆された。閉鎖卵胞では、顆粒膜細胞の EGF, IGF-I, insulin の受容体発現は陰性であったが、莢膜細胞の EGF, IGF-I, insulin の受容体発現は増強した。また、PCOS 卵巣では莢膜細胞と間質細胞での IGF-I 受容体発現の増強が特徴的であった。

II. 顆粒膜細胞の増殖と分化に及ぼす成長因子の作用：(1) EGF は、未熟卵胞では FSH による顆粒膜細胞増殖を促進したが、成熟卵胞では顆粒膜細胞の E_2 産生を抑制するのに対し P_4 産生を促進し、卵胞の発育段階に応じて異なる二面的な生物作用を示した。(2) IGF-I と insulin は、顆粒膜細胞の生存維持に働き、FSH による顆粒膜細胞の形態分化、LH 結合能、 3β -HSD と P_4 産生、aromatase と E_2 産生の誘導を促進した。(3) 至適濃度の甲状腺ホルモン ($10^{-8}MT_3$) は、IGF-I と類似の FSH 作用増幅効果を示し、特に未熟卵胞での FSH による顆粒膜細胞増殖と分化促進の増幅効果が顕著であった。(4) $TGF\beta$ と $TNF\alpha$ は、FSH と IGF-I による顆粒膜細胞増殖と E_2 産生促進を抑制したが、その増殖抑制効果は未熟卵胞で著明であるのに対し、 E_2 産生抑制効果は成熟卵胞で顕著であった。つまり、卵胞発育に伴い $TGF\beta$ と $TNF\alpha$ 作用の中心は顆粒膜細胞の増殖抑制から分化機能抑制へと移行した。

III. 卵胞発育に伴う GLUT の発現とその修飾因子：GLUT (1, 4) 発現は原始卵胞と一次卵胞では卵細胞にのみ認められたが、二次卵胞では顆粒膜細胞でも陽性となり、卵胞成熟と共に増強し、黄体細胞で強い発現をみた。白体での GLUT 発

現は陰性であった。閉鎖卵胞では、顆粒膜細胞の GLUT 発現は陰性であったが莢膜細胞に GLUT の発現を認めた。また、 T_3 は無血清培養系での顆粒膜細胞の GLUT(1)の発現を増加させた。

IV. 卵胞の退行、閉鎖に伴う apoptosis とその制御因子：Fas 抗原は原始卵胞から各発育段階卵胞を通して卵細胞のみに発現し、その発現は卵胞発育と共に減少した。他方、黄体化と共に Fas 抗原の発現を黄体細胞に認めたが、白体での発現は陰性であった。閉鎖卵胞では退行する卵細胞、顆粒膜細胞、莢膜細胞に順次 Fas 抗原発現の増強をみた。Fas 抗原発現に符合して、原始卵胞の大多数の卵細胞に DNA 断片化をみたが、発育卵胞の卵細胞では DNA 断片化は認められなかった。また、閉鎖卵胞ではほとんどすべての顆粒膜・莢膜細胞が DNA 断片化を示した。bcl-2発現は原始卵胞、発育卵胞では陰性であったが、黄体細胞で陽性となり黄体退行と共に減少した。閉鎖卵胞での bcl-2 発現は陰性であった。 $TNF\alpha$ は培養顆粒膜細胞の aromatase 活性を抑制し、DNA 断片化発現を増強した。

結 論

(1) 原始卵胞と一次卵胞での顆粒膜細胞の増殖には myc と erb-A が役割を担うと考えられ、FSH 刺激が不可欠な二次卵胞以降の顆粒膜細胞の増殖と分化は、卵巣内局所因子である EGF と IGF-I によって促進的に、 $TNF\alpha$ と $TGF\beta$ によって抑制的に調節されるのに対し、卵巣外成長因子の T_3 と insulin は FSH 作用の増幅因子として働くことを示した。(2) EGF と $TNF\alpha$ ならびに $TGF\beta$ の作用中心は、卵胞発育に伴い顆粒膜細胞の増殖能調節から分化機能調節へと変化することを認めた。(3) 卵胞発育に伴い顆粒膜細胞の GLUT 発現が増加し、至適濃度の T_3 はその誘導因子として働く可能性を示した。(4) DNA 断片化と Fas 抗原の発現態度より、卵胞閉鎖と黄体退行ならびに主席卵胞選択に apoptosis 機構の関与が推察された。(5) 黄体細胞での bcl-2発現態度より、黄体維持に bcl-2による apoptosis 抑制機構の関与が示唆された。