

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—

ヒト卵胞の発育・選択・成熟・閉鎖と局所因子

東北大学医学部附属病院周産母子センター (主任: 矢嶋 聡教授)

深谷 孝夫

Human Folliculogenesis and Local Regulation

Takao FUKAYA

*Maternal and Perinatal Center, School of Medicine University of Tohoku, Sendai**(Director: Prof. Akira Yajima)*

緒言

卵胞は、原始卵胞から発育卵としてのリクルートを受けた後、形態学的には primary follicle, preantral follicle, antral follicle, mature follicle へ発育し、最終的に排卵へ至る。この卵胞の発育および排卵に対しては、視床下部下垂体系内分泌調節機構が、大きな役割を果たしていることは明らかである。しかし、中枢のコントロールが卵巣に作用した後、発育卵胞あるいは主席卵胞の選択や成熟が、卵巣局所においてどのように調節されているかは、現在のところ詳細には判明していない。特に、ヒト卵巣局所における因子については、研究対象採取や in vitro 研究の困難性から、その報告は少ない。

このヒト卵胞発育に関する局所因子について、われわれが今まで報告した知見や、今回新たに得られた成績をもとに報告する。

研究対象と研究方法

1. 研究対象

研究対象は、子宮悪性病変手術時に病理検索目的のために採取した正常月経周期を有する51症例の卵巣組織と、多嚢胞性卵巣症例において診断および治療目的に楔状切除された11症例の卵巣組織である。採取された卵巣組織に対して、1) ステロイド合成酵素転写調節因子として近年発見された Ad4 binding protein (Ad4BP)¹⁾, P450 Side chain cleavage (scc), 3 β hydroxysteroid dehydrogenase (3 β HSD), P450 17 α hydroxylase (17 α), aromatase などのステロイドホルモン合成酵素と estrogen receptor (ER), androgen receptor

(AR) などのステロイドホルモン受容体, estrogen 産生のための重要な酵素である aromatase の活性, 2) Epidermal growth factor (EGF), Transforming growth factor α (TGF α) とその受容体である EGF receptor (EGFR) や近年生殖医学領域にてその作用が注目されている成長ホルモンに対する受容体 Growth hormone receptor (GHR) などの成長因子, 3) 細胞増殖の検索のために Ki67, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Ag nucleolar organizing regions (AgNORs) などの細胞増殖関連因子, 細胞死 programmed cell death (apoptosis) の検索に Le^y の発現と terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 法²⁾ による DNA 断片化を卵巣局所において検討した。

なお、対象症例の性周期は月経歴の記録、血中 estradiol と progesterone 値および子宮内膜日付診で決定した。

本研究は、東北大学医学部倫理委員会の承認のもとに行われたものである。

2. 研究方法

1) 卵胞の分類

本研究におけるヒト卵胞の分類を表1に示した。原始卵胞は、一層の spindle shape の原始顆粒膜細胞が卵を取り囲む状態から、立方状の細胞で全周が取り囲まれるまでとし、発育卵胞 (preantral follicle) は顆粒膜細胞層が重層化するも卵胞腔が未形成である卵胞、発育卵胞 (antral follicle) は卵胞腔が形成され莢膜細胞層および顆

表1 卵胞および黄体の分類

卵胞：原始卵胞	(primordial follicle)
発育卵胞	(preantral follicle)
発育卵胞	(antral follicle)
成熟卵胞	(mature follicle)
閉鎖卵胞	(atretic follicle)
主席卵胞	(dominant follicle)
非主席卵胞	(non dominant follicle)
黄体：機能黄体	
退縮黄体	
白体	

表2 検索卵胞数

卵胞および黄体の分類	卵胞期	黄体期
原始卵胞	893	1,140
発育卵胞(preantral follicle)	13	7
発育卵胞(antral follicle)	40	25
排卵期卵胞	11	0
閉鎖卵胞	19	28
機能黄体	0	16
退縮黄体	20	24
白体	44	58

粒膜細胞層が形態的にも明らかになった卵胞，成熟卵胞は，卵胞径が増大し成熟卵胞へ至るものと定義した。なお，研究内容によっては，antral follicleの中で将来排卵すべき卵胞を主席卵胞，排卵に至らない卵胞を非主席卵胞と表現した。閉鎖卵胞は，顆粒膜細胞層が消失し，変性した莢膜細胞のみに囲まれた卵胞とした。黄体は，内分泌機能が活発と考えられる機能黄体，退縮黄体および白体に分類した。

これらの分類に従って検討した卵胞数を表2に示した。

2) 標本作成法

卵巣組織は，4%PFAにて6～12時間固定後，パラフィンにて包埋し3 μ の連続切片を作成し，免疫組織化学，in situ hybridization法，AgNORs，TUNELの検索に供した。

3) 免疫組織化学

Ad4BP, scc, 3 β HSD, 17 α , aromatase, AR, ER, EGF, TGF α , EGFR, GHR, Ki67, PCNA, Le^yの発現はそれぞれ特異的抗体を用いて免疫染色を施行した。免疫染色は，Histofine Kit(Nichi-

rei, Tokyo)を用いた strept-avidin biotin peroxidase (ABC) 法にて施行した。具体的には，薄切標本を脱パラフィン後沸騰したクエン酸緩衝液(2mM citric acid+0mM trisodium citrate dehydrate)に入れ，microwave (500W, 15分)により抗原性を賦活した。これを冷却後，0.3% H_2O_2 により内因性 peroxidase をブロックし，蒸留水および phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した。その後，蛋白非特異吸着防止のため normal rabbit serum と反応させ再度洗浄し，一次抗体(over night) および二次抗体(30分)と反応させた。発色には，DAB 溶液(0.001M Diaminobenzidine+0.05M Tris-HCl buffer+0.01M sodium azide+0.006M H_2O_2)を用いた。通常の封入後，検鏡し各々の因子を解析した。なお，すべての因子において negative あるいは positive control を施行し，その特異性を確認した。

細胞増殖能の指標である Ki67, PCNA は，標本の細胞の中に占める陽性細胞数の割合 labeling index (LI) を算出し，各時期の細胞増殖能も評価した。

4) in situ hybridization 法

in situ hybridization 法に応用した oligonucleotide probes は³⁵S で標識した。in situ hybridization 法は以下の手順で施行した。すなわち，脱パラフィン後 pronase (0.25mg/ml in 50mM Tris-HCl, pH 7.6, and 5mM EDTA) で室温にて30分間処理し，ついで10分間のアセチル化(0.25% acetic anhydride in 0.1M triethanolamine buffer, pH8.0)を行い，その後，標識した oligonucleotide probes (10⁷cpm), yeast tRNA (500 μ g/ml), salmon sperm DNA (80 μ g/ml), 50% formamide, 10mM Tris-HCl, pH7.0, 15mM NaCl, 1mM EDTA, pH7.0, 10% dextran sulfate と45°C18時間 incubation し hybridize した。これを洗浄後，autoradiography にて mRNA の分布を切片上に発現させた。negative control には sense probe を用いた。

5) Computer image analysis (CAS) による aromatase 活性測定

ヒト卵巣標本では，aromatase の活性を直接測

定できないため、CAS (CAS 200, Cell Analysis Systems)にて評価した。具体的には、aromatase 活性を有することが知られているヒト培養細胞株 (HHUA, Ishikawa, HEC-59, OMC-2, MCF-7) の aromatase 活性を直接測定すると共に、培養細胞に対して免疫染色を施行後 CAS により免疫強度を評価した。この結果をもとに、卵巣標本の aromatase 活性を解析した。

a) aromatase 測定

培養細胞株の aromatase 測定には、tritiated water 法を用いた。すなわち、培養液中に 1β - ^3H -androstenedione を加え24時間 incubation, その後、5% charcoal にて培養液中のステロイドホルモンを吸着させ、上清中の ^3H - H_2O を測定し aromatase 活性値を測定した。

b) CAS による解析

培養細胞株は、あらかじめ charcoal で処理したステロイド除去培養液を用い培養した。培養細胞が単層化した後、培養液に testosterone を加え24時間培養した。細胞ブロックキット (Cytoblock Kit: Shandon, USA)を用いて再ブロック化した後、aromatase 免疫染色を施行し、CAS にて免疫強度を測定した。卵巣の aromatase 免疫組織標本は、直接 CAS を用い解析した。

6) AgNORs の検索

脱パラフィン後の卵巣標本を、50%硝酸銀溶液と1%formic acid+2%gelatin 溶液を用いて、暗室の中で30分間処理し洗浄後封入する。染色された標本は、各々の時期の卵胞、黄体について、鍍銀染色された核内の点状物をカウントし、その平均数を算出した。

7) TUNEL の検索

apoptosis が発現する際に、細胞質の凝縮や apoptotic body の出現などの形態的变化に先だつて核内に DNA 断片が認められる。この断片の3'-OH 末端に biotin 標識 dUTP を結合して、細胞内で apoptosis を検索する方法が、TUNEL 法²⁾である。具体的な方法を以下に示す。まず、標本を脱パラフィン後20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の proteinase K 溶液で20分反応させ、DNA 断端周囲の蛋白を取り除く。ついで内因性 peroxydase のブロッキング

を行い、洗浄後 TdT buffer (100mM potassium cacodylate+2mM CoCl_2 +0.2mM dithiothreitol, pH7.2) を添加し、TdT 反応液 (0.3U/ μl TdT: Gibuco+0.04nM/ μl biotinylated uridine triphosphate: Boehringer Mannheim+TdT buffer) にて90分反応させる。ABC 法による染色後、TUNEL 陽性細胞を各時期について検討した。なお、positive control は DNase 1 (Stratagene, USA) を、negative control は dUTP のかわりに TdT buffer を用いた。

研究結果

1. ステロイド合成酵素転写調節因子の発現と局在

ステロイド合成酵素転写調節因子 Ad4BP は、P450系ステロイド合成酵素遺伝子の転写活性に必要な Ad4配列の機能調節に重要な因子である。主としてラットにおいてその発現が認められているが、ヒト卵巣においてはまだ確認されていない。今回、ヒト卵巣における Ad4BP の発現を確認するために、Western blotting を施行したところ、ヒト卵胞および黄体に53KD の Ad4BP のバンドが確認され(図1)、この蛋白はヒト卵巣に発現していることが判明した。

卵胞発育に伴う Ad4BP の発現の結果では、原始卵胞にはその発現が認められなかった。しかし、

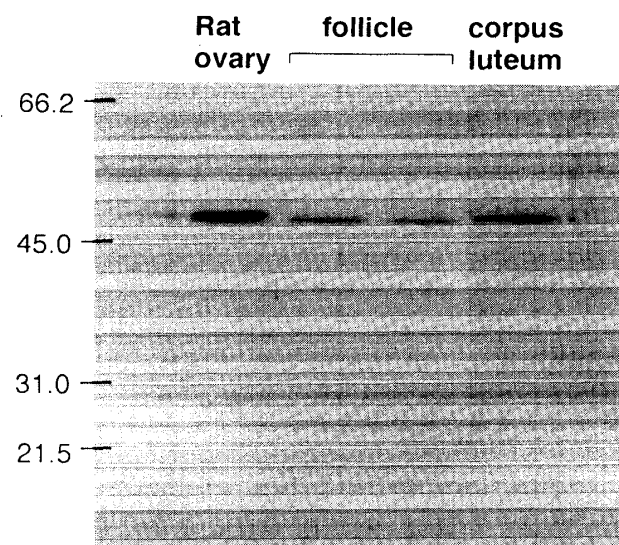


図1 卵胞における Ad4BP の発現 (Western blotting)

preantral follicle においては、重層化した顆粒膜細胞の核に局在が認められた。antral follicle および成熟卵胞では、顆粒膜細胞、莢膜細胞の核に著明に局在が確認された。一方、閉鎖卵胞では、わずかの莢膜細胞にのみ局在していた。Ad4BP はステロイド合成酵素より、はやく局在が開始していた。

黄体においては、ステロイド産生が活発と考えられる機能黄体において、顆粒膜細胞、莢膜細胞共に局在し、ステロイド産生が認められなくなった退縮黄体ではその局在は消失していた。

2. ステロイド合成酵素およびステロイドホルモン受容体の発現と局在

a) ステロイド合成酵素

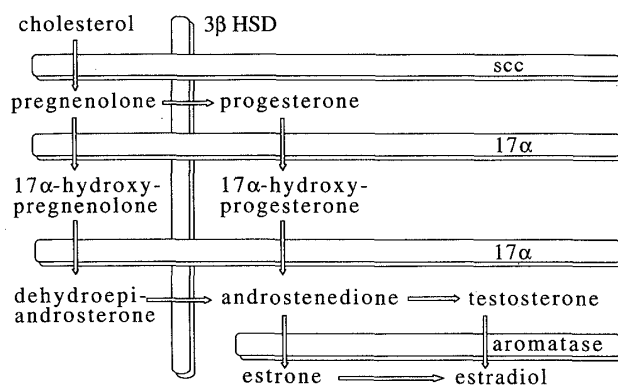
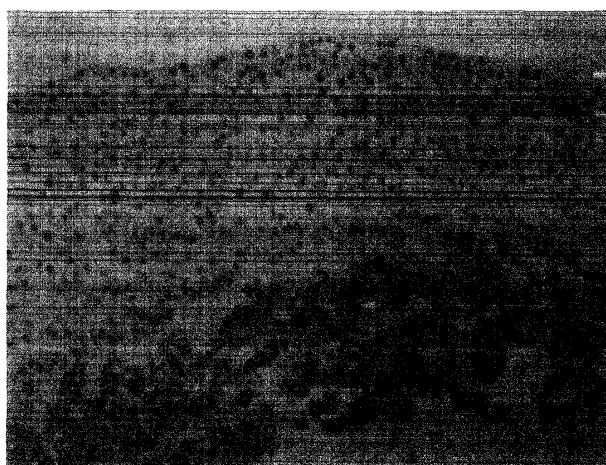
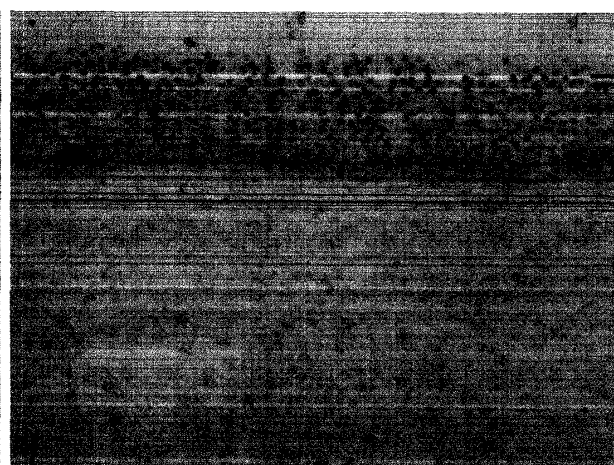


図2 ステロイドホルモン代謝経路

図2にステロイドホルモンの代謝経路を示した。卵巣においては、sccによってcholesterolからpregnenoloneへ、続いて 3β HSDにより



17 α

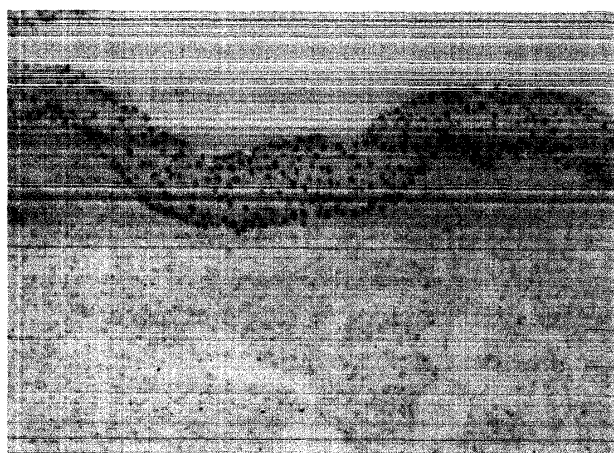


AR

図3 発育卵胞 (antral follicle) における17 α と AR の発現



aromatase



ER

図4 発育卵胞 (antral follicle) における aromatase と ER の発現

pregnenolone から progesterone へ, さらに 17α により progesterone から androgen へ, 最後に aromatase により androgen から estradiol へ転換される。今回は, これらステロイド合成酵素が卵胞の発育に伴ってどのように局在するかを検討した。

scc, 3β HSD の免疫組織化学染色結果では, 原始卵胞および preantral follicle に, scc, 3β HSD の発現は認められなかった。しかし, antral follicle および成熟卵胞では, 主として莢膜細胞に, さらに一部の成熟卵胞では顆粒膜細胞にも局在していた。また, scc, 3β HSD の mRNA は in situ hybridization 法によって, 莢膜細胞に発現することが確認された。

progesterone から androgen へ転換する 17α は, 原始卵胞には認められず, preantral follicle に至り莢膜細胞に局在が開始した。卵胞発育に伴い antral follicle および成熟卵胞の莢膜細胞に強く局在が認められ (図3), androgen までの代謝が antral follicle で活発になっていることが示唆された。 17α の mRNA も, in situ hybridization 法により莢膜細胞に発現することが確認された。

最終的に estradiol 合成をつかさどる aromatase の局在は, 原始卵胞, preantral follicle まで認められず, antral follicle では発現しない卵胞と顆粒膜細胞に発現している卵胞が認められた。成熟卵胞では, 顆粒膜細胞にその局在と発現が強く確認された (図4)。 aromatase の mRNA は, in situ hybridization 法により顆粒膜細胞に発現することが確認された。この aromatase の発現は, 一つの標本中に確認された数個の antral follicle 群の中で一つのみであった。したがって, aromatase の発現した卵胞はステロイド合成能がすべて完成した卵胞であり, 以後 aromatase の発現した卵胞を主席卵胞と定義した。

閉鎖卵胞においては, 17α の局在が認められたが aromatase は消失していた。

b) ステロイドホルモン受容体

antral follicle までの莢膜細胞における 17α の発現は, androgen までのステロイド代謝が完了することを意味する。この androgen が作用を発

表3 Ad4BP とステロイド合成酵素の発現

Stages	Cell type	Ad4BP	scc	17α	aromatase
原始卵胞	G	-	-	-	-
発育卵胞 (preantral follicle)	G	+	-	-	-
	T	+	-	-	-
発育卵胞 (antral follicle)	G	+	-	-	-
	T	++	++	++	-
主席卵胞 (成熟卵胞)	G	++	++	-	++
	T	++	++	++	-

G: 顆粒膜細胞, T: 莢膜細胞

揮するためには, AR の発現が不可欠である。

AR の発現は, preantral follicle の莢膜細胞に発現し始め, antral follicle および成熟卵胞では, 主として顆粒膜細胞に強く発現した (図3)。

閉鎖卵胞においては, AR の局在が認められた。

ER の局在は, 原始卵胞と preantral follicle には認められず, aromatase の発現した antral follicle と成熟卵胞の顆粒膜細胞にその発現が強く認められた (図4)。 ER の発現は aromatase の発現と同様に, 主席卵胞としての性格を獲得するために重要であることが判明した。

表3にステロイド合成酵素の発現のまとめを示した。scc とは, 卵胞発育に伴い preantral follicle から主として莢膜細胞に発現し, progesterone までの代謝をすすめる。 17α は antral follicle から莢膜細胞に発現し androgen の産生を促す。 AR は, antral follicle 以降の発育卵胞の顆粒膜細胞に強く発現し, 顆粒膜細胞における estradiol 産生のための準備が antral follicle 以降に完成することが明らかになった。 aromatase が発現した antral follicle は estradiol の産生能力を獲得し, ER を介して卵胞の成熟をさらに促進する機序が存在することが判明した。

c) aromatase 活性値

培養 estrogen 産生細胞株の培養液中 aromatase 活性値と, 免疫染色強度の相関を図5に示した。両者の間には有意な相関関係が認められ, CSA により aromatase 活性を評価が可能であることが判明した。図6には, 卵巣周期各期の顆粒膜細胞一個あたりの aromatase 免疫染色強度と血清 estradiol 値を示した。卵胞期における顆粒膜細胞一個あたりの aromatase 免疫染色強

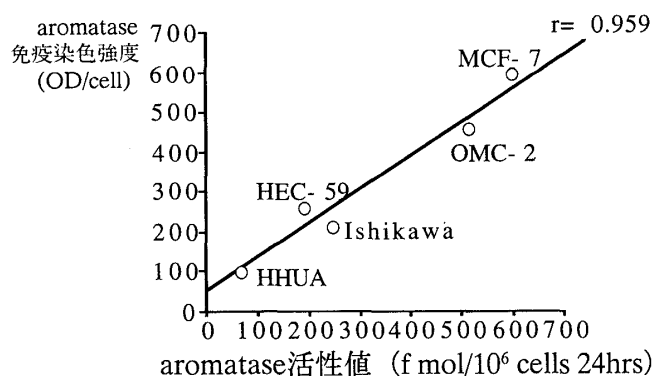


図5 aromatase 活性値と免疫染色強度の相関性

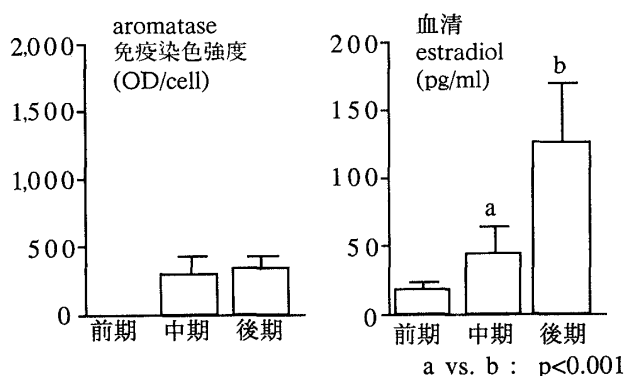


図6 卵巣周期(増殖期)の顆粒膜 aromatase 免疫染色強度と血清 estradiol 値

度は、著明な変化を認めなかった。一方、血清 estradiol 値は卵胞期後期では有意に増加し、成熟が進んでいる主席卵胞においては、顆粒膜細胞数が著明に増加することにより、顆粒膜全体としての aromatase 活性が亢進していることが明らかになった。

3. 成長因子

a) EGF

EGF は卵胞発育過程において、mRNA および蛋白レベルでの発現は認められなかった。

b) TGF α , EGFR

TGF α , EGFR は、原始卵胞および preantral follicle に発現が認められず、antral follicle 以降では莢膜細胞と顆粒膜細胞に TGF α が局在し、顆粒膜細胞に EGFR が局在していた(表4)。TGF α は、in situ hybridization 法により莢膜細胞に発現することが確認された。この結果より、TGF α は antral follicle 以降に、その受容体である EGFR と共同して paracrine 調節機構を営ん

表4 卵胞における成長因子の発現

免疫組織染色 ISH	卵胞数	TGF α G+T T	EGFR G	GHR G
原始卵胞	15	0	0	0
発育卵胞 (preantral follicle)	10	0	0	0
発育卵胞 (antral follicle)	37	6(16%) 6	14(38%)	0
成熟卵胞	14	6(43%) 6	10(71%)	3(21%)
閉鎖卵胞	31	0	0	0

ISH: in situ hybridization G: 顆粒膜細胞 T: 莢膜細胞

でいることが明らかになった。

黄体では、TGF α が機能黄体に高率に認められたが、受容体である EGFR の発現は認められなかった。

c) GHR

GHR は、今回検討した発育過程の卵胞ではほとんど発現が認められず、成熟卵胞の顆粒膜細胞の21%のみ確認されたにすぎなかった(表4)。一方、活発な機能を有している黄体では GHR が著明に局在していた。

4. 細胞増殖因子と細胞死関連因子の発現と局在

a) 細胞増殖因子 (Ki67, PCNA) の免疫染色

Ki67の発現は、preantral follicle の顆粒膜細胞に発現が開始し、antral follicle, 成熟卵胞では、莢膜細胞と顆粒膜細胞に著明に認められ、細胞増殖が活発であることが明らかであった。PCNA も同様であった。

b) 細胞増殖因子 (Ki67, PCNA, AgNORs) 陽性細胞出現率

Ki67の LI を図7に示した。卵胞における Ki67 陽性細胞は、preantral follicle, 卵胞期 antral follicle, 黄体期 antral follicle, 主席卵胞の顆粒膜・莢膜細胞、および閉鎖卵胞の莢膜細胞に認められた。顆粒膜細胞において Ki67LI 最高値は黄体期 antral follicle で、LI 間の有意差を認めるのは、原始卵胞と卵胞期 antral follicle, 黄体期 antral follicle および主席卵胞の間であった ($p < 0.01$)。莢膜細胞においては、preantral follicle, 卵胞期 antral follicle, 黄体期 antral follicle, 主

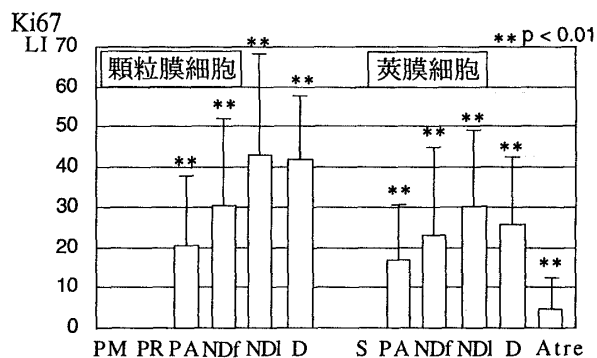


表5 正常卵巣卵胞と多嚢胞性卵巣卵胞における Ad4BP とステロイド合成酵素の局在

	Cell type	Ad4BP	scc	17 α	aromatase
非主席卵胞	G	+ or -	-	-	-
	T	+	+	+	-
主席卵胞 or 成熟卵胞	G	+	+	-	+
	T	+	+	+	-
多嚢胞性卵巣 卵胞	G	+ or -	-	-	-
	T	+	+	+	-

G: 顆粒膜細胞, T: 莢膜細胞

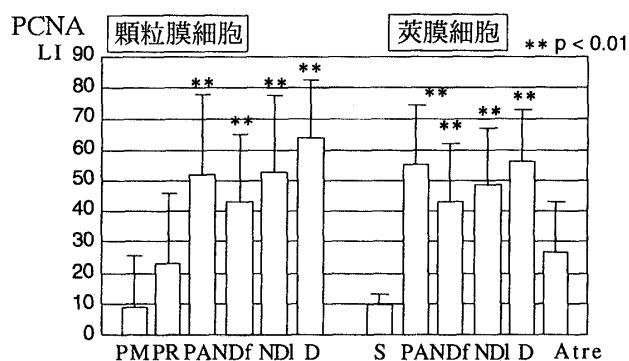


図7 卵胞発育と Ki67, PCNA labeling index

PM; primordial follicle, PR; primary follicle, PA; preantral follicle, NDf; non-dominant follicle (follicular phase), NDI; non-dominant follicle (luteal phase), D; dominant follicle, S; struma, Atre; atretic follicle

席卵胞の間に有意差を認めなかった。

PCNAの結果は、図7に示した。顆粒膜細胞におけるPCNAのLIは主席卵胞で最高となり、LI間の有意差を認めるのは、原始卵胞に対してpreantral follicle、卵胞期 antral follicle、黄体期 antral follicle、主席卵胞であった ($p < 0.01$)。莢膜細胞においては、閉鎖卵胞と preantral follicle、主席卵胞の間に有意差が認められた ($p < 0.01$)。

卵胞におけるAgNORsは卵巣のすべての細胞で認められ、顆粒膜細胞におけるLIは卵胞期 antral follicleで最高となり、LI間の有意差を認めるのは、preantral follicleと卵胞期 antral follicle、黄体期 antral follicle、主席卵胞であった ($p < 0.01$)。莢膜細胞においては、閉鎖卵胞と preantral follicle、主席卵胞の間に有意差が認め

表6 多嚢胞性卵巣卵胞における17 α とKi67の陽性率

	17 α	Ki67
Type A	7/7(100%)	4/4(100%)
Type B	8/12(67%)	5/5(100%)
Type C	2/19(11%)	3/10(30%)

Type A: 顆粒膜細胞層が4層以上ある卵胞

Type B: 顆粒膜細胞層が3層以下の卵胞

Type C: 顆粒膜細胞層を欠く卵胞

られた ($p < 0.01$)。

c) 細胞死関連因子の発現

TUNEL陽性細胞は、退縮黄体に散在性に認められただけであった。さらに、Le^y陽性細胞は卵巣内のいずれの卵胞・黄体を観察しても認められなかった。

5. 多嚢胞性卵巣におけるステロイド合成酵素転写調節因子と合成酵素およびKi67の検索

ステロイド合成酵素転写調節因子であるAd4BPの多嚢胞性卵巣における局在は、顆粒膜細胞ならびに莢膜細胞に認められ、17 α , scc, 3 β HSDなどのステロイド合成酵素は莢膜細胞に認められた。これらの局在様式は、正常卵巣卵胞のantral follicleと同様であった。ARも同様に認められた。しかし、aromataseとERの局在は検索したすべての卵胞に認められず、主席卵胞としての性格を有する卵胞は、通常の状態では多嚢胞性卵巣には存在しないことが明らかとなった(表5)。

表6に、多嚢胞性卵巣卵胞をその顆粒膜細胞層の厚さにより分類し、17 α とKi67の発現様式を検索した結果を示した。顆粒膜細胞層の重層化に伴い、17 α とKi67の陽性率が増加し、多嚢胞性卵巣卵胞においても徐々に卵胞発育が進んでいること

が明らかになった。

考 察

卵胞は、下垂体からの FSH の刺激により原始卵胞より発育が開始し、形態学的には primary follicle, preantral follicle, antral follicle, mature follicle と発育し、最終的に preovulatory follicle となり、下垂体からの luteinizing hormone (LH) の刺激により排卵へ至る。この卵胞の発育および排卵に対しては、視床下部下垂体からのゴナドトロピン刺激と卵巣からの性ステロイドホルモンの密接な内分泌調節機構が、大きな役割を果たしていることはいうまでもない。しかし、ヒト卵巣局所において、発育卵胞の選択機序、あるいは発育卵胞群からの主席卵胞としての成熟機序がどのように調節されているかは明らかではない。

本研究では、ヒト卵巣卵胞発育に関与する局所調節機構、とくにステロイド合成酵素、成長因子、細胞増殖あるいは細胞死関連因子が卵胞発育と共にどのように局在するかを主として免疫組織化学的に検討し、ヒト卵胞発育機構の解明を試みた。

ステロイド合成酵素転写調節因子 Ad4BP は、すべての P450系ステロイド合成酵素遺伝子の転写活性に必要な Ad4配列と結合する蛋白である。現在まで、種々の臓器において Ad4BP が発現していることが報告されると共に³⁾、ステロイド合成酵素機能の調節では副腎皮質⁴⁾⁵⁾などにおける意義が報告されている。卵巣においても、この調節蛋白が卵胞発育と共に機能してくるステロイド合成酵素に対して何らかの意義を有していると推定される。すなわち、卵巣におけるステロイド合成酵素の発現は、卵胞発育の局所因子として重要であり、これを initiate する Ad4BP の局在は卵巣ステロイド産生の最初のステップと考えられる。今回の結果では、preantral follicle の顆粒膜細胞の核に Ad4BP の局在が開始し、卵胞成熟に伴い、ステロイド合成が活発である antral follicle および成熟卵胞の顆粒膜細胞、莢膜細胞に強く局在が確認された。しかも、ステロイド合成酵素に先行して局在が開始し、ステロイド合成酵素より長期間卵巣に局在していた。この結果より、Ad4BP は卵胞発育に伴うステロイド合成酵素機

能発現に重要な意義を有していると共に、Ad4BP の発現は preantral follicle として発育するための卵巣局所における条件の一つであると考えられた。

また、黄体においてもステロイド産生が活発と考えられる機能黄体において局在が強く認められると共に、Ad4BP の消失とステロイド合成酵素の消失が一致した。以上のことから、Ad4BP はステロイド合成酵素機能発現とその機能調節に重要な意義を有していると推定された。

卵胞発育と密接に関連する、ステロイド合成酵素は原始卵胞では局在を認めず、preantral follicle に発育してから cholesterol から androgen までの代謝をつかさどる scc, 3β HSD, 17α が、主として莢膜細胞に発現が開始し、androgen の産生が始まる。androgen の卵胞発育に対する意義は不明であるが、少なくとも初期の卵胞発育にとり positive な作用を有することが示唆される。antral follicle に至ると、すべての卵胞の莢膜細胞において scc, 3β HSD, 17α の免疫組織化学的な染色性が著明になり、androgen までのステロイド合成能が活発になっていることが判明した。特に、最終的に androgen 合成をすすめる 17α は莢膜細胞に認められ、androgen 合成の際は莢膜細胞であることが明らかになった。合成された androgen が機能を発揮するためには、AR の発現が必要となる。今回の研究において、AR は antral follicle の顆粒膜細胞に強く発現していることが確認され、この androgen 産生および AR の発現様式より、antral follicle においては莢膜細胞および顆粒膜細胞間で、paracrine 調節機構を介してステロイドによる機能調節が作動していることが示唆される。すなわち、莢膜細胞から移送された androgen が顆粒膜の AR に結合し、androgen の生物学的作用が発揮する条件が満たされることとなり、この条件を獲得した卵胞が機能的にも antral follicle として定義されると考えられる。今回の検討では、黄体期に認められる antral follicle も、卵胞期と同様でありこの時期の antral follicle が将来主席卵胞として成熟する可能性が考えられた。

卵巣におけるステロイド最終産物は estradiol であり、これは aromatase により合成される。今回の検討では、aromatase は antral follicle の一部と mature follicle の顆粒膜細胞に局在した。しかも、この aromatase の発現は、標本中に確認された数個の antral follicle 以降の卵胞群の中で一個のみで、ステロイド最終産物である estradiol 産生の条件を備えた卵胞は主席卵胞であると考えられる。ヒトにおいては通常、主席卵胞は一個のみであり、aromatase の発現は主席卵胞の選択に重要な局所因子であることが明らかになった。さらに、aromatase の発現した卵胞では、ER が顆粒膜細胞に局在しており、主席卵胞顆粒膜細胞では estrogen が autocrine 的に機能していることが判明した。しかし、今回の研究は免疫組織化学的手法による検討であり、どのような局所因子が aromatase と ER を initiate しているかは不明である。

CAS による aromatase 活性値の変化の検討結果では、卵胞期における顆粒膜細胞一個あたりの aromatase 免疫強度は、著明な変化を認めなかった。しかし、血清 estradiol 値は卵胞期後期では有意に増加しており、成熟が進んでいる主席卵胞においては、顆粒膜細胞増殖が著明に亢進することにより全体としての aromatase 活性が増加していると推測され、卵胞においては細胞の増殖を促す成長因子の関与が示唆される。

今回検討した成長因子は、EGF, TGF α とその受容体である EGFR, さらに近年卵胞発育に関連して注目されている成長ホルモンの受容体 (GHR) である。EGF は卵胞発育過程において、mRNA および蛋白レベルでの発現は認められず、局所因子としての意義は不明であった。TGF α , EGFR の免疫組織化学結果では、原始卵胞および preantral follicle においては、局在が認められなかった。しかし、antral follicle 以降では莢膜細胞に TGF α が mRNA および蛋白レベルで局在し、その受容体である EGFR は顆粒膜細胞に局在した。この結果より、TGF α は antral follicle 以降に莢膜細胞に発現し、顆粒膜細胞に局在する受容体である EGFR と共同して細胞増殖を

営む paracrine 調節機構が作動していることが判明した。

一方、GHR は今回検討した発育過程の卵胞ではほとんど発現が認められず、むしろ活発な機能を有している黄体に著明に局在した。この結果より、GHR はヒト卵胞発育に関しては積極的な意義を認めず、黄体における何らかの機能調節機構が推測された。

CAS による aromatase 発現量や成長因子の結果、さらに形態的にも、卵胞の発育過程においては細胞の増殖能が著明であると考えられる。この細胞増殖能の検討は、卵胞期、黄体期さらには多嚢胞性卵巣卵胞が細胞生物学的にどのような viability を有するかを解明するうえで重要である。Ki67 の発現は、preantral follicle の顆粒膜細胞に認められ、発育すべく選択された卵胞では細胞増殖が開始することが明らかになった。antral follicle および主席卵胞では、Ki67 が莢膜細胞と顆粒膜細胞に著明に認められ、細胞増殖がより活発である結果を得た。この増殖能は PCNA, AgNORs の検索でも同様に確認された。増殖能の時間的変化の解析のために検討した LI では、これら因子は antral follicle, 主席卵胞で差を認めず両者とも活発な増殖能を示していた。しかも、黄体期の antral follicle においても卵胞期と同じであり、ステロイド合成酵素の結果とあわせ考えると、卵巣周期のいかなる時期の antral follicle でも、将来主席卵胞として成熟する可能性が示唆される。

細胞死関連因子の発現では、今回の検討ではヒト卵胞のどの時期においても確認できなかった。われわれは、卵胞閉鎖機序に programmed cell death が関与している可能性を推定していたが、この機序は生殖能が活発である時期のヒト卵巣では発現していないと考えられた。しかし、顆粒膜細胞の apoptosis については、ラットなどで報告され⁶⁾、今後の研究が必要である。

多嚢胞性卵巣における局所調節因子についての検討結果では、正常卵巣の antral follicle とステロイド合成酵素転写調節因子、ステロイド合成酵素とステロイドホルモン受容体の発現様式と同様であった。さらに、細胞増殖能の指標である Ki67

も発現しており、多嚢胞性卵巣卵胞は決して閉鎖卵胞の集団ではなく、主席卵胞に成熟する能力を有する卵胞、いいかえると antral follicle で停止している卵胞であることが推定された。しかし、主席卵胞としての条件と考えられる aromatase と ER の発現は認められず、通常的环境下では preovulatory follicle へ移行できないものと考えられる。多嚢胞性卵巣におけるこのような機序の局所的原因については本研究からは明らかにされなかったが、hMG による卵巣刺激を施行した際に、ほとんどすべての卵胞が一度に成熟してることが臨床的に認められ、何らかの局所的異常により卵胞成熟機構が欠如しているものと考えられる。さらに、hMG による過剰刺激症候群の出現は、正常卵巣より数多く antral follicle を有すると推定される多嚢胞性卵巣では、hMG 刺激により多数の卵胞が一度に主席卵胞へ移行するためと考えられる。また、多数の卵胞が androgen 産生までのステロイド合成系でとどまっており、この機序により androgen 豊富な環境をもたらしていると考えられる。

結 論

本研究により以下の結論を得た。1) ヒト卵胞発育には、ステロイド合成酵素転写調節因子の発現が重要であり、この調節因子の発現によりステロイド合成酵素が卵胞発育に伴って発現する。2) antral follicle では、androgen までのステロイド合成能が莢膜細胞で認められ、AR が顆粒膜細胞に発現すると、androgen の生物学的作用が出現し antral follicle として機能が完成する。この時点で、莢膜細胞および顆粒膜細胞間のステロイドホルモンの paracrine 調節機構が作動する。3) 最終的に aromatase と ER の発現により主席卵胞へ移行し成熟卵胞へ発育した後排卵する。4) 卵胞発育過程には細胞増殖能が亢進し、TGF α と EGFR が paracrine 調節機構を介して細胞増殖を support している。5) 黄体期の antral follicle は卵胞期の antral follicle と局所因子的には同様であり、次周期以降に主席卵胞へ移行する可能性がある。6) 多嚢胞性卵巣卵胞は、antral follicle で停止している卵胞と推定される。

謝 辞

稿を終わるに臨み、第47回日本産科婦人科学会学術講演会においてシンポジウムとして発表の機会をお与えくださいました会長友田 豊教授、並びに座長の労をおとりくださいました武谷雄二教授、麻生武志教授に深甚の謝意を表します。

また、終始ご指導頂きました矢嶋 聰教授に感謝申し上げます。本研究は、共同研究者の多大なる協力の賜であり、厚くお礼申し上げます。また、貴重な標本をご提供いただきました国立仙台病院高橋克幸先生、森塚威次郎先生、和田裕一先生、仙台市立病院東岩井久先生、斉藤 晃先生、永井病院永井 宏先生、東北労災病院舟木憲一先生、森 俊彦先生、仙台社会保険病院涌坂俊明先生、NTT 東北病院小沢信義先生に心からの感謝の意を表します。

共同研究者

戸沢秀夫、田村みどり、寺田幸弘、渡辺 正、高山和人、船山由有子、菅原準一、高屋りさ、吉田英宗、原谷博信、高橋 真、田村充利、笹野公伸、鈴木 貴、諸橋憲一郎、対木 章、村上 節、千田定則、陳 偉業

研究協力施設

国立仙台病院、仙台市立病院、永井病院、東北労災病院、NTT 東北病院、仙台社会保険病院

文 献

1. Morohashi K, Zanger UM, Honda S, Hara M, Waterman MR, Omura T. Activation of CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 1196—1204
2. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben SS. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493—501
3. Honda S, Morohashi K, Nomura M, Takeya H, Kitajima M, Omura T. Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. *J Biol Chem* 1993; 268: 7494—7502
4. Sasano H, Fukaya T, Takayama K, et al. Ad4BP in the human adrenal cortex and its disorders. *J Clin Endocrinol Metab* (in press)
5. Sasano H, Fukaya T, Takayama K, et al. Ad4BP as a marker of adrenocortical malignancy. *Human Pathology* (in press)
6. Francis MH, Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis (programed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinol* 1991; 129: 2415—2422

本講演の基礎となる論文を以下に記す。

1. Suzuki T, Sasano H, Tamura M, Fukaya T, Yajima A, Nagura H, et al. Temporal and spatial localization of steroidogenic enzymes in premenopausal human ovaries: in situ hybridization and immunohistochemical study. *Molecular Cellular Endocrinology* 1993; 97: 135–143
2. Tamura M, Sasano H, Suzuki T, Fukaya T, Watanabe T, Yajima A, et al. Distribution of tenascin in normal cycling human ovary. *Human Reproduction* 1993; 8: 2015–2018
3. Suzuki T, Sasano H, Kimura N, Tamura M, Fukaya T, Yajima A, Nagura H. Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and oestrogen receptors in the human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroidogenic enzymes. *Human Reproduction* 1994; 9: 1589–1595
4. Tamura M, Sasano H, Suzuki T, Fukaya T, Nagura H, Yamaji A. Immunohistochemical localization of growth hormone receptor in cycling human ovaries. *Human Reproduction* 1994; 9: 2259–2262
5. Suzuki T, Sasano H, Sasaki H, Fukaya T, Nagura H. Quantitation of P450 aromatase immunoreactivity in the human ovary during the menstrual cycle: relationship between the enzymatic activity and immunointensity. *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 1565–1573
6. Tamura M, Fukaya T, Yajima A, et al. Expression of the EGF family of the growth factors and EGFR in normal cycling human ovaries. *Human Reproduction* (in press)
7. Takayama K, Sasano H, Fukaya T, Yajima A, et al. Immunohistochemical localization of Ad4BP with correlation to steroidogenic enzyme expression in cycling human ovaries and sex-cord stromal tumors. *J Clin Endocrinol Metab* (in press)

Synopsis

It is well known that gonadotropin controls a major part of follicular development. However, the mechanism of local regulation under the control of gonadotropins is still unclear. In this study, we focused on the local regulation of steroidogenesis, growth factors and cell proliferation to evaluate the human follicular development.

To assess steroidogenesis, it is important to detect the expression of steroidogenic enzymes in the granulosa and theca cells during folliculogenesis. We initially tried to find out the transcription factor Ad4BP that binds the Ad4 site and regulates the function of steroidogenic enzyme. By immunohistochemistry, the expression of Ad4BP was confirmed spordically in preantral granulosa cells. In the antral follicles, the expression of Ad4BP was observed both in the granulosa and theca cell.

According steroidogenic enzyme, we evaluated temporal and spatial localization of cholesterol side chain cleavage (scc), 3β hydroxysteroid dehydrogenase (3β HSD), 17α hydroxylase (17α) and aromatase, and steroid receptors. In briefly, the localizations of scc, 3β HSD and 17α were observed in preantral follicles and the mRNA expressions of these enzymes were confirmed in the theca cell by in situ hybridization method. Expression of aromatase was generally observed in only one follicle (antral or mature follicle) per case in mid proliferative to premenstrual phase. The localization of androgen and estrogen receptor was observed in the antral follicle granulosa cells, and estrogen receptor was detected only in aromatase positive follicles.

These results suggested that Ad4BP initially controls the function of steroidogenic enzymes and steroidogenic enzymes gradually express from primary follicles to mature follicles. At antral follicle stage, steroid metabolism completes to produce testosterone. When aromatase and estrogen receptor express in antral follicle, this antral follicle develops as the dominant follicle and produces estradiol to promote follicle maturation. We therefore speculate that the expression of aromatase and estrogen receptor have an important role for the selection of dominant follicle in human.

According growth factors for follicular development, it has been demonstrated to be important in the biological activity in the ovary. In this study, we examined the localization of EGF, TGF α and their receptor (EGFR). The localization of EGF was not confirmed both mRNA and protein level through follicular development. On the other hand, the localization and expression of TGF α was confirmed in theca cells and EGFR in granulosa cells at antral stage. This finding suggested that TGF α is locally synthesized from theca cell and acts as a paracrine fashion through EGFR.

In cycling ovary, the number of theca and granulosa cell markedly increase and then decrease at atretic follicle. Hence, we examined cell proliferation and apoptosis. Ki67, PCNA and AgNORs which are the maker of cell proliferation were examined and the parentage of positive cells increased significantly from antral to dominant follicles. Moreover, in antral follicle of luteal phase, the parentage was similar as in follicular phase. These results demonstrate that cell proliferation reaches maximum at antral follicle and even antral follicle in luteal phase has a potency to develop as dominant follicle. We could not detect apoptosis during follicular development.

Finally we examined the local environment of polycystic ovary (PCO) syndrome. In briefly, the environments of steroidogenic enzymes, steroid receptors and ki67 were similar as antral follicle of normally cycling ovary. These results suggest that follicles in PCO have a capability to develop for dominant follicle.

In conclusion, Ad4BP is important for the expression of steroidogenic enzymes. The expression of aromatase and estrogen receptor in antral follicle may be one of a key for selection of dominant follicle.