

## 討 論

佐藤和雄(日本大)：原始卵胞から一次卵胞への発育は c-myc が関係あるとの成績でしたが、それを動かす promotor は何ですか。その間の調節機構についてお話をしたい。

丸尾 猛：増殖シグナルに反応して誘導される c-myc の発現が原始卵胞と一次卵胞の卵細胞と顆粒膜細胞に限定してみられたことより、c-myc は必ずしも FSH に依存しない初期の autonomous な卵胞発育に関与すると推察したわけですが、今回の研究では何が c-myc の発現を調節しているかは調べておりません。

初期の卵胞発育調節機構についてはまだ不明な点が多いのは事実であります。卵細胞についてみてみますと、原始卵胞が形成されると共に第1減数分裂が開始し、出生時には prophase の段階で休止期 (meiotic arrest) に入り、思春期までは休眠 (dormant) 状態にあります。出生後に何が trigger となって原始卵胞の発育が開始するのかわかりませんが、卵細胞からの signal によるのかあるいは卵細胞を取り囲む顆粒膜細胞からの signal によるのかは大変興味ある問題であります。

今回の研究でわかった新知見は、原始卵胞の卵細胞では c-myc 蛋白以外に TGF $\alpha$ 、IGF-I、TGF $\beta$ 、TNF $\alpha$  が強い発現を示すという点であります。恐らく顆粒膜細胞の増殖、分化の up-regulator として働く IGF-I と TGF $\alpha$  は c-myc の発現に対して促進的に働くのに対し、顆粒膜細胞の増殖、分化の down-regulator として働く TGF $\beta$  と TNF $\alpha$  は c-myc の発現に対して逆に抑制的に働くのであろうと推察されます。つまり、up-regulator として働く IGF-I、TGF $\alpha$  (EGF) は卵胞発育の survival factor であるのに対して、down-regulator として働く TGF $\beta$ 、TNF $\alpha$  は atretogenic factor となるわけで、これらの up-regulator と down-regulator のバランスの方向性によって個々の原始卵胞は発育を遂げる方向すなわち recruitment の方向へ入るのかあるいは閉鎖の方向へ入るのかが決定されるのであろうと考えております。

伯野直美 (東京大)：① Fas は膜蛋白であり、

我々の用いている抗体では、パラフィン切片において膜表面に特異的な染色を検出しています。今回発表されたデータでは、卵の細胞質全体にわたり染色されていますが、染色の特異性の検討はされていますか。②原始卵胞では大多数が Fas 陽性かつ DNA 断片化陽性であったということですが、生体内においては apoptosis が起きると短期間にマクロファージなどにより除去されるはずであり、apoptosis を起こした原始卵胞が何周期にもわたり残存しているというのは考えにくいのではないのでしょうか。

丸尾 猛：Fas 抗原は NGF/TNF receptor ファミリーに属し、細胞死を誘導する膜蛋白であります。今回のパラフィン包埋切片を用いた免疫染色では卵胞発育との関係で stage-limited な Fas 抗原の局在を細胞質に認めました。この Fas 抗原の免疫染色に際してはマイクロウェーブを利用したパラフィン包埋切片の前処置を行っており、マイクロウェーブによる前処置が御指摘の問題点に影響を与えている可能性は否定できません。しかし、apoptosis の signal 伝達のうえで重要な Fas 抗原の stage-limited な卵巣内局在態度は in situ DNA 3'-end labeling 法による DNA 断片化 signal の発現態度とよく一致しておりますので、細胞レベルでの局在性という点では特に問題はないと考えております。

性成熟期卵巣では原始卵胞卵細胞の大多数において DNA 断片化 signal が陽性であり、これらの卵細胞は apoptosis に陥っていると考えられます。この知見は武谷教授が解説講演の中で示されたように、出生時200万個あった原始卵胞卵細胞の数が思春期前には7～8万個、40歳頃には約5,000個と年齢の進行と共に減少することと符合しております。

大多数の原始卵胞卵細胞は apoptosis に陥っていながらマクロファージに貪食されることなく長期間存在していると考えられるわけで、この現象は原始卵胞形成過程における組織発生学上の特殊性に起因すると思います。つまり、胎児期に卵巣が分化を開始すると同時に原始生殖細胞 (primordial germ cell) が出現して卵祖細胞 (oogonium) へと分化し、妊娠8～20週にかけて細胞分裂を繰り返して、卵母細胞 (primary oocyte) が形成され、続いて顆粒膜細胞と共に原始卵胞が形成され

す。この時期の卵には卵核 (germinal vesicle) が明瞭に認められ、この卵核をもった卵細胞は思春期以降発育卵胞として recruitment されない限り網状期で休止状態にあるわけで、卵細胞はマクロファージに貪食されにくい環境にあると推察されます。

したがって、卵巣には限られた少数の卵細胞を発育、成熟、排卵へと導くために他の大多数の卵細胞を細胞死 (apoptosis) へと誘導する機構が存在すると考えられ、極めて限られた少数の卵細胞に「生」を与えるべく大多数の卵細胞は apoptosis の機構を介して「死」へと自らを導く運命にあるのであろうと考えております。

**水沼英樹 (群馬大) :** ① 原始卵胞における  $TNF\alpha$ ,  $TGF\beta$  が原始卵胞の閉鎖を促進するというお話ですが、むしろ逆にこれらの活性物質はその卵胞が recruit へ入るのを抑制しているとは考えられませんか。②  $TNF\alpha$  や  $TGF\beta$  陽性と DNA の断片化は常に共存していたのですか。

**丸尾 猛 :** ①  $TNF\alpha$  と  $TGF\beta$  が共に顆粒膜細胞の apoptosis を促進することは、培養顆粒膜細胞の DNA 断片化 signal が  $TNF\alpha$  あるいは  $TGF\beta$  添加によって増加することより明らかですが、他方  $TNF\alpha$  と  $TGF\beta$  は共に顆粒膜細胞での IGFBP-4 蛋白の産生を高めることより卵胞閉鎖に対して促進的に働くといえます。卵胞閉鎖は apoptosis による生理的な細胞死であると考えられますので、原始卵胞の閉鎖を促進するという事は、すなわち卵胞が recruitment に入るのを抑制するという事になると考えます。

② ヒト卵巣組織切片での  $TNF\alpha$  局在態度は in situ DNA 3'-end labeling 法による DNA 断片化 signal の発現態度とよく一致し、未熟な卵細胞、黄体細胞、閉鎖卵胞の顆粒膜・莢膜細胞で強陽性でありました。しかし、 $TGF\beta$  のヒト卵巣内局在態度は未熟な卵細胞での局在は別として DNA 断片化 signal の発現パターンと異なることを認めています。これらの成績から考えると、 $TNF\alpha$  が卵胞の apoptosis により密に関与していると推察されます。

**重根俊彦 (和歌山県立医大) :** ヒト卵巣の原始卵胞の多数に、卵細胞における DNA 断片化が認められるという報告ですが、そのような原始卵胞はその後ごく早期に卵胞閉鎖に陥るのか。あるいは

発育過程を経たうえで卵胞閉鎖に陥るのでしょうか。

**丸尾 猛 :** in situ DNA 3'-end labeling 法によって DNA 断片化が認められた卵細胞を有する原始卵胞は早期に卵胞閉鎖に陥ると考えます。Fas 抗原は apoptosis の signal 伝達のうえで重要であり、Fas 抗原発現は必ずしも細胞死を意味しませんが、DNA 断片化は apoptosis が起こった細胞に共通の process として起こる現象でありますので、DNA 断片化 signal が検出された原始卵胞がその後発育過程を経て閉鎖に陥るということはないと考えます。しかし、Fas 抗原発現を認めた卵細胞を有する原始卵胞の場合には、先生が御指摘のごとくその後発育過程を経たうえで閉鎖に陥ることは十分に考えられるかと存じます。

**田辺清男 (慶応大) :** local factor として IGF-I が最も重要であると主張されていますが、その根拠は。

**丸尾 猛 :** 卵胞発育にとって不可欠な endocrine 因子は FSH であり、卵胞での FSH 作用増幅のうえで重要な卵巣内局所因子は IGF-I であると考えております。発表の中では最も重要な因子とは述べなかつたつもりですが、意識的には FSH 作用の biological amplifier として働く多くの卵巣内局所因子の中で IGF-I が最も重要であろうと考えているのは御推察の通りであります。なぜならば、IGF の作用のみならず IGF binding protein (IGFBP) の役割が明らかになっており、IGFBP に結合していない遊離型の IGF-I が FSH 作用の mediator として働くと考えられるからであります。つまり、IGF-I は卵胞発育にとって不可欠な FSH の作用を媒介する co-gonadotropin (ゴナドトロピン協調物質) と考えられますので、IGF-I は卵胞発育に関わる最も重要な局所因子であるということができるとは思いませんか。

**田辺清男 :** activin の分泌調節機序は、activin を in vivo で捕えているのですか。

**峯岸 敬 :** activin は、卵胞液を材料にして精製単離されたので、FSH の調節を受けて顆粒膜細胞から分泌されると考えられていますが、その詳細は不明です。

in vivo の activin の測定は、結合蛋白である follistatin の存在や、inhibin との交差の問題があり、測定が困難ですが今後各サブユニットに特異

的な抗体を用いて検討する予定です。

**佐藤和雄**：Insulin,  $T_3$ のような卵胞外からの作用物質については血中レベルとの関係で、いわゆる卵胞内で産生される局所因子としては違うと思われるかもしれませんが、その点についてご意見を頂きたい。

**丸尾 猛**：今回の symposium は卵胞発育の調節を局所因子を中心として論ずることが課題であることは承知しておりますが、甲状腺ホルモン ( $T_3$ ) と insulin の卵巣作用を調べたところ、顆粒膜細胞には  $T_3$  ならびに insulin に対する特異的受容体が存在し、 $T_3$  核受容体数は小卵胞顆粒膜細胞で高いのに対し、insulin 膜受容体数は大卵胞顆粒膜細胞で高いという興味深い知見を得ました。つまり、卵胞でのこれら両ホルモンの作用の場を中心は甲状腺ホルモンでは未熟な小卵胞顆粒膜細胞であるのに対して、insulin では分化した大卵胞顆粒膜細胞であることがわかり、卵胞発育に伴いこれら二つの成長因子の間で作用の役割分担があるように見受けられました。

甲状腺ホルモンならびに insulin の血中値と卵胞発育との関連では、まず甲状腺ホルモンの場合、各種無月経の中で体重減少性無月経患者では血中  $T_3$  値と共に血中 free  $T_3$  値、血中 free  $T_4$  値が正常対照群に比して有意に低く、体重減少性無月経患者でのクロミフェンによる排卵誘発率は血中 free  $T_3$  値が異常低値の場合は 0% であるのに対して、血中 free  $T_3$  値が正常上限値に近い場合は 80% に達することを認めました。この臨床知見は適量の甲状腺ホルモンの存在が排卵につながる卵胞発育にとって極めて重要であることが物語っているといえます。

他方、insulin の血中値と卵胞発育との関連では、未治療の insulin 依存性糖尿病 insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) の場合には低 insulin 血症によって原発性無月経、排卵障害、早発閉経などの卵巣機能異常がもたらされることが知られており、またこれとは対称的に insulin resistance に伴う高 insulin 血症の場合には莢膜細胞ならびに間質細胞の insulin 受容体との結合を介して、卵巣が過剰に刺激され高アンドロゲン状態が招来されることがわかっております。実際、PCOS 患者には insulin resistance と高アンドロゲン状態がしばしば観察され、上述の基盤的知見とよく符合しております。

**植村次雄**(横浜市大)：ヒトにおける単一排卵の機構について、卵巣内局所における調節であると考えていますが、先生のご意見を伺いたい。

次に先生は、ラットとヒトの顆粒膜細胞の activin に対する反応性の違いを述べておられますが、このような種差がヒトでの単一排卵に関与している可能性はあるのでしょうか。

**峯岸 敬**：卵巣内局所因子として activin を例にとりますと、activin の作用により FSH receptor の誘導が強くなり、activin と FSH の共同作用でさらに卵の成熟が促進されることが考えられます。一方 activin や FSH の作用により follistatin の合成が促進されるので、この合成された follistatin が他の卵胞における activin の作用を抑制し、FSH の receptor の誘導が遅延され卵胞の閉鎖化が進むと考えると、activin の合成量が卵の選択に関与する可能性があります。

activin receptor の発現調節の実験で、ラットでは排卵後も receptor が増加するのに対して、ヒトでは黄体の receptor 量が減少していることが判明しました。ヒトでは成熟卵胞のみで receptor の強い誘導がかかっていたことになり、今後 activin, activin receptor, follistatin の相互関係が解明されることにより単一排卵の機序との関連が明らかとされていくと考えられます。

**寺川直樹**(鳥取大)：本 symposium の趣旨からも、卵胞閉鎖の機序について少しは discussion 願いたい。お二人の apoptosis に関する成績が異なるが、その点にも触れて頂きたい。

**丸尾 猛**：1. 卵胞の閉鎖は apoptosis による生理的な細胞死であると考えます。apoptosis を起こした細胞では共通の process としてヌクレオソーム単位の DNA 断片化が起こることが知られておりますので、in situ DNA 3'-end labeling 法によりヒト卵巣組織切片上で DNA 断片化 signal の検出を試みたところ、閉鎖卵胞のほとんどすべての顆粒膜・莢膜細胞の核に極めて強い DNA 断片化 signal が認められました。私共が用いた方法は Hsueh et al. の方法に準じたもので、terminal transferase によって DNA 3'-end に digoxigenin-ddUTP を付加し、抗 digoxigenin antibody-alkaline phosphate conjugate と反応させ、NBT にて発色させる方法であり、最も信頼できる DNA 断片化検出法であると考えております。特

に本法を用いて培養顆粒膜細胞のDNA断片化を調べたところ、培養顆粒膜細胞の核のみがblue blackに発色するDNA断片化signalはFSHあるいはIGF-I添加によって著しく減少するのに対し、TNF $\alpha$ あるいはTGF $\beta$ 添加では逆に著しく増加することを認めました。この培養顆粒膜細胞での成績が本法でのDNA断片化の検出に強い自信を与えてくれました。発表の中で述べましたように、FSHとIGF-Iはapoptosisを抑制してfollicleのsurvival factorとして働くのに対し、TNF $\alpha$ とTGF $\beta$ はapoptosisを促進し、atretogenic factorとして働くわけで、これら卵胞発育に対して正と負の方向に働く両群因子間のバランスが正に傾く場合その卵胞はrecruitへと動き、負の方向に傾く場合その卵胞は閉鎖へと動くのであろうと推察しております。

2. Le<sup>y</sup>抗原の卵巣内発現をみるということにはdifucosylated type 2 chainの糖鎖抗原の発現態度をみるという面で意義があるかと存じますが、Le<sup>y</sup>抗原の発現をapoptosisに直結した事象として捕えるには無理があるのではないのでしょうか。また私共が用いましたDNA断片化検出法は、TUNEL法ではなくdigoxigenin-ddUTPをterminal transferaseで組織切片のDNAに取り込ませ、抗digoxigenin抗体alkaline phosphate conjugateと反応させNBTにて発色させる方法であります。

深谷孝夫：卵胞閉鎖とapoptosisに関して。

胎生期から新生児期にかけて多数存在している原始卵胞が、生殖年齢に達するまでに相当数が減少してしまう機序としてapoptosisが重要な意義を有していると考えられますが、われわれの今回の対象では該当症例がなく、今後の課題と考えられます。しかし、antral follicleまで発育した卵胞が閉鎖した場合には、今回の検討のごとくapoptosis関連因子の発現が認められず、ほかの因子が関係している可能性も考えられます。すなわち、卵巣においては十分に発育しないままに閉鎖する卵胞と、発育後に閉鎖する卵胞の二つの異なる閉鎖機序が存在することが考えられます。

鈴木秋悦（慶応大）：atresiaのprocessにおける局所因子の経過について、geneticsにovaryの中で、すでにatresiaが始まっているのではないですか。

深谷孝夫：卵胞の閉鎖は各発育段階の卵胞で起こりますが、preantral stageの原始卵胞と一次卵胞の閉鎖の場合は卵細胞の変性と消失が最初に起こるのに対し、antral stageの二次、三次卵胞の閉鎖の場合には顆粒膜細胞の変性、消失が最初に起こることがわかっております。したがって、卵胞閉鎖の分子メカニズムはapoptosis機構を介するという点で同一でありましても、卵胞の発育段階によってatresiaに伴う変化がどの卵胞構成細胞に最初に起こるかは一様ではありません。また、antral follicleにatresiaが開始した時を捕えるのは容易ではありませんが、正常な発育卵胞ではlow pyknotic index, high mitotic indexを示すのに対し、atretic follicleではhigh pyknotic indexを示すことが、atresiaの初期のsignであると考えます。

古谷健一（防衛医大）：①卵細胞apoptosisの過程では、出生直後の消失と思春期以降の卵胞発育過程でのatresiaの2種類が存在するのではないかと述べられました。そこで、幼若ラットに排卵刺激を行った場合、同時に2種のapoptosisの所見が認められるのでしょうか。それともagingのfactorが影響するのでしょうか。ご教授下さい。

②卵巣内局所因子を臨床に応用する可能性につき何かお考えがありますか。

丸尾 猛：①atresiaの起こり方に二つのタイプがあると申ししたのは、出生直後と卵胞発育過程で異なるといったのではなく、卵胞内で細胞死が最初にかかる細胞が卵胞の発育段階によって異なると申したのです。すなわちprimordial follicleとpreantral follicleの閉鎖では卵細胞の消失が最初にみられるのに対して、antral follicleの閉鎖では顆粒膜細胞の消失が最初に起こり卵細胞の消失は二次的な変化として起こります。このようにatresiaの起こり方に二つのタイプがありますが、その分子機構はapoptosisであり両者に共通であると考えます。

幼若ラットに排卵刺激を行った際のapoptosisの起こり方については確かではありませんが、卵胞の発育段階が多様である限り当然二つのタイプのatresiaが起こるものと考えます。

②今回の研究で明らかとなった卵巣の局所因子の作用の臨床への応用は大変興味深い問題です。PCOS卵巣では、正常卵巣に比較して、顆粒

膜細胞でのIGFBP-4蛋白の発現が強く、この顆粒膜細胞で増加したIGFBP-4がIGF-I作用のinhibitorとして働き、FSH作用の発現が障害されると考えられます。他方、顆粒膜細胞でのIGFBP-4発現に対してIGF-Iは抑制的に働くのに対し、GnRH, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ は促進的に働くことを認めておりますので、この基礎的知見に基づけば、PCOS 卵巣へのIGF-Iの卵胞内局所投与あるいはTGF $\beta$ 拮抗剤、TNF $\alpha$ 拮抗剤の卵胞内局所投与がIGFBP-4蛋白の発現を抑えるうえで有効なアプローチとなる可能性を考えております。いずれにしても、局所因子はparacrine/auto-crine機構で働くわけですので、臨床応用に際しては局所投与が原則になると考えます。

**船越 徹**(神戸大)：顆粒膜細胞よりプロテアーゼが分泌され、IGFBP-3が分解されるというデータをお示しされましたが、その結果free IGF-Iが増加し、IGF活性が増加すると思います。プロテアーゼは多種類存在しますが、プロテアーゼに関する検索はなされましたか。

**吉村泰典**：先生の御指摘のとおり、顆粒膜細胞より分泌されるプロテアーゼの活性が高まると、IGFBP-3やBP-Iが分解され、結果としてBP総量が減少致します。その結果、内因性のIGF-I活性が高まり、卵胞発育に対して促進的に作用すると思われれます。卵胞発育過程では、plasminogen activatorやプラスミン活性が高まっており、これらがIGFBPのプロテアーゼとして機能すると考えております。しかし、IGFBPに対するプロテアーゼは数種類あると考えられており、しかも分解するIGFBPがプロテアーゼによって異なることも知られており、詳細については今後の詳細の検討が必要であると思えます。

**松本恒和**(京都大)：angiotensin IIによるprostaglandin産生はAT<sub>1</sub>受容体を介したものが知られているが、排卵においてもAT<sub>2</sub>受容体によるprostaglandin産生があるなら、その産生に対する受容体の役割の違いはどのように考えておられるのか。

**吉村泰典**：angiotensinを家兎卵巣に投与致しますと、卵巣より分泌されるPGF<sub>2 $\alpha$</sub> 、PGE<sub>2</sub>量は著明に増加します。このangiotensin IIによるPG産生の亢進は、AT<sub>2</sub>受容体拮抗剤によって有意に抑制されます。さらにgonadotropinによるPG

産生の亢進もAT<sub>2</sub>受容体拮抗剤によって抑制されることより、卵巣におけるPG産生にはAT<sub>2</sub>受容体が深く関与しているものと思われれます。またAT<sub>2</sub>受容体拮抗剤によってPG産生のみならず、排卵も抑制されることより、顆粒膜細胞におけるAT<sub>2</sub>受容体は、PG産生の亢進を介して排卵に対して促進的に作用するものと考えられます。

**佐藤和雄**：① plasminogen activatorの活性が上がったのはFSH投与後ですか、LH投与後ですか。② angiotensin IIによるPG産生増加のメカニズムは。③ PGはhepatocyte growth factor (HGF)誘導のpromotorといわれていますが、HGFが卵胞発育に関係あると思われれますが、その点についてのご意見を。

**吉村泰典**：① 今回お示ししたplasminogen activator (PA)活性の上昇は、LH (hCG)投与後です。FSHによっても顆粒膜細胞におけるPA活性は亢進致しますが、hCG投与後の最終的な卵胞発育過程でもPA活性の有意な上昇が観察されます。

② 卵巣におけるangiotensin IIは、顆粒膜細胞や莢膜細胞で生合成され、paracrine/autocrine機序により顆粒膜細胞のAT<sub>2</sub>受容体を介してPG産生が刺激されるものと考えられます。AT<sub>1</sub>受容体の細胞内情報伝達はphospholipase Cを介したphosphatidyl inositolの活性化、Caの動員、adenyl cyclaseの抑制によると考えられます。AT<sub>2</sub>受容体のsignal伝達機構に関しては、現在のところ不明です。しかしangiotensin IIによる卵成熟、PG、排卵は、protein kinase C (PKC)の阻害剤であるstaurosporineによって抑制されることより、恐らくPKCを介しているものと考えられます。

**深谷孝夫**：③ HGFは、肝細胞の修復に重要な成長因子であることが報告されて以来、近年種々の臓器においてもmotogen, mitogen, morphogenとしての意義が検討されつつあります。卵胞発育過程においても何らかの関与が推定されますが、今後の課題と考えております。

**望月真人**(神戸大)：①なぜIGFBPの種類によって、IGF-IのBiological activityが異なるのですか。② IGF-II産生分泌調節をhGHのみを強調されているが、蛋白代謝などの関与をどのように考えるのか。実地臨床でみられる神経性無食欲

症患者では hGH レベルは正常で、IGF-I はきわめて低値であります。

吉村泰典：① ヒト卵胞液中には、IGFBP-1～4 が検出されますが、IGFBP の種類によりその生理作用が異なっております。閉鎖卵胞中の卵胞液では、IGFBP-2 と IGFBP-4 のレベルが高く、 $E_2$  の上昇と共に卵胞内の IGFBP-2 と、BP-1 は減少致します。このような IGFBP の量的変動のみならず、その種類により IGF-I や IGF-II との親和性が異なることによる質的な違いも IGFBP の生理作用の相違に関与しているものと思われま

す。② IGF-I は糖アミノ酸代謝を活性化し、IGFBP-I が抑制することが知られておりますが、今回は検討しておらず、結果をお示しすることはできません。先生の御指摘のとおり、神経性食思不振症では、血清 GH 値は正常で、IGF-I 値は低値を示すことが知られておりますし、IGFBP のみならず、IGF-I の制御因子として GH 以外の要因を考えることが今後の研究課題の一つであると考

えております。五十嵐正雄（群馬）：先生は最初のスライドで IVF の時、血中 GH が増加したデータを示されましたが、これは連日 GnRH agonist を投与したための非生理的な状態だから GH が増加したのではないかと思います。生理的な正常月経周期においても排卵前に GH 分泌は増加するのでしょうか。

吉村泰典：ヒト GH レベルに関しては、GnRH agonist 投与時のデータを示させて頂きましたが、卵胞発育がみられない時期では、agonist の投与の有無にかかわらず GH レベルに有意な変動は認められませんでした。hMG を投与し、卵胞発育が認められるようになると、GH の上昇がみられるようになってきます。また10例前後の生理的な月経周期においても、卵胞期中期から後期にかけて血清 GH 値の上昇がみられます。これは恐らく血中の  $E_2$  値の上昇に基づく現象と考えられます。

青野敏博（徳島大）：(gonadotropin 療法で排卵誘発した際に、多数の卵胞が発育してくるが、その際の局所因子の動きについて) 峯岸先生に activin と follistatin について、吉村先生に IGF-I、renin-angiotensin についてどのような変動があり、どのような意義をもっているかを教えて頂

きたい。

峯岸 敬：現在まで activin と follistatin の測定法の欠如のため、お答えできません。

吉村泰典：gonadotropin 療法で排卵誘発をした際にも、特に hCG 投与後、renin 活性や angiotensin II 濃度は有意に上昇致します。この renin 活性や angiotensin II 濃度と  $E_2$  との間には有意な正の相関も認められ、卵巣内の renin・angiotensin 系 (RAS) は卵胞発育に対して促進的に作用すると思われま

す。① 卵胞での autocrine として steroidogenesis は大切な点ですが、代謝酵素の誘導や局在とその活性と同様に考えてよいのですか。② また、androgen の生成に必要な C17-20 lyase はどうなっているのでしょうか。③ また、代謝酵素の調節に卵胞内の steroid environment がどのように関連していますか。

IGF-I の機能調節はその BP が関連、BP は FSH で制御されているが、生体内では estrogen、androgen と BP は関わっている。卵胞内でのステロイドの関与はどうでしょうか。

深谷孝夫：① 今回の検討は主として免疫組織化学的手法を用いておりますので、dynamic な生物学的変化に関しては不明であります。しかし、aromatase に関しましては、in vitro で免疫組織化学の染色強度と酵素活性は比例することが今回の研究で明らかにしました。

② P450C17の発現に関しては、本研究で明らかになったように、antral follicle までの androgen 代謝に重要な現象と考えられます。P450C17が関与する C17-20 lyation に関しては、本研究では検討しておりませんので詳細は明らかではありません。

③ 本研究では検討しておりませんので、詳細は

明らかではありません。

**吉村泰典**：本日は結果を御提示できませんでしたが、卵胞発育の初期では、IGF-Iは莢膜細胞に作用し、androgenの分泌を亢進させます。PCO患者では、IGFBP-1が低下しており、その結果内因性IGF-I活性が高まり、androgen高値を呈すると考えられています。卵胞発育が進み、排卵直前になるとIGF-Iは卵巣におけるE<sub>2</sub>生合成を亢進させ、IGFBPは逆に抑制致します。このように卵胞発育の過程でIGF-Iの作用にも変化がみられます。しかしながらステロイドのIGF-IやIGFBPに対する作用に関しては、十分な検討がヒトではなされておられません。E<sub>2</sub>優位卵胞ではIGFBP-2やBP-1が減少し、androgen優位卵胞ではBP-2やBP-4が増加しておりますが、steroidによってBPが変動したのか、BPの変動により卵胞の運命が決定され、その結果steroidに変化がみられたのかについてはいまだ結論が得られておりません。下垂体除去ラットではdiethylstilbesterol (DES) 投与によりIGF-I mRNAレベルが上昇することが知られています。

**斎藤 裕 (昭和)**：①顆粒膜細胞は本来estrogen産生臓器と目されておりますが、estrogen receptorが発現されるということです。卵胞になると顆粒膜細胞に対するestrogenの作用をお考えになっておりますか。②顆粒膜細胞に出現するandrogen receptorはアロマテースを受ける前段階として莢膜細胞より供給されるandrogenの核内取り込みに関与するとお考えでしょうか。③PCOSでandrogen receptorが発現するということですが、androgenの顆粒膜細胞に対する作用は何かお考えですか。

**深谷孝夫**：①estrogenの産生部位である顆粒膜にestrogen receptorが存在することは、顆粒膜においてautocrine調節が行われていると考えられます。今回の検討ではestrogenの産生に関するaromataseとestrogen receptorの発現は、主席細胞として選択された卵胞のみであり、estrogenは局所因子として考えられるestrogen receptorを介して主席卵胞のさらなる成熟に関与すると考えております。

②androgen receptorの意義の一つとして、莢膜卵胞より供給されるandrogenの取り込みに関与することは論議があるところですが、近年an-

drogenそのものが卵胞発育に関連するという報告もあり、androgen receptorはこのandrogenのbiological effectを発揮させるために重要であるとも考えられます。

③今回の研究において、PCOの卵胞は正常卵胞におけるantral follicleに類似していることが明らかになりました。したがって、PCOにandrogen receptorが発現することは、正常卵巣における卵胞発育と同様な機序がPCOにも存在することが推定されます。しかし、正常卵巣に認められるようなaromataseの発現がなく、よりandrogen richな局所環境が起こっているものと考えられます。

**武谷座長**：PCOSはFSH作用が十分に発現しないことがその病態の中核と考えられています。FSHの作用発現のmodulatorとしてlocal factorを捕えるとPCOSの病態はどのように説明されますか。

**丸尾 猛**：FSHの卵巣作用はIGF-Iをmediatorとして発現すると考えられますので、PCOSを特徴づける卵巣でのFSH作用の障害は卵巣でのIGF-I作用の障害として捕えられます。

事実、PCOS卵巣では、正常卵巣に比較して顆粒膜細胞でのIGF-I受容体の発現が低くIGF-Iに対する反応性が低下するのに対し、莢膜細胞と間質細胞でのIGF-I受容体の発現は逆に高いことを認めております。その結果、顆粒膜細胞でのFSHによるaromatase誘導が起こらず、間質細胞でのandrogen産生が高まると考えられます。しかも、PCOS卵巣では、正常卵巣に比較して顆粒膜細胞でのIGFBP-4蛋白の発現が高く、増加したIGFBP-4がIGF-I作用のinhibitorとして働き、顆粒膜細胞でのFSH作用を障害するのであろうと考えております。

つまり、PCOS卵巣では、顆粒膜細胞でのIGF-I受容体低下とIGFBP-4発現増加によって顆粒膜細胞でのIGF-I作用が十分に発現しないためFSH作用が障害され、PCOSに特徴的な内分泌プロフィールの成立をみると推察しております。

**麻生座長**：原始卵胞が排卵に向かう過程において、内分泌因子であるgonadotropinと共に、paracrine/autocrine機構を介した局所因子の役割が注目され、多くの研究成果が発表されております。ヒト女性が胎内において授かった数百万個の卵母

細胞の中で排卵に至るのはごく限られた数であり、通常の自然排卵周期では唯一つの卵しか排卵に至らないのはなぜか。この命題はヒトの生殖に関する研究での古くて新しい重要なテーマであります。本 symposium では局所因子を中心とした、この問題の解決への新しい試みと成果が発表され、討論がなされたといえましょう。以下にその主な点を要約してみたいと思います。

卵胞の発育を最も直接的に規定するのは顆粒膜細胞の増殖・分化であり、これに関連する局所因子は、IGF-I, TGF $\alpha$  などの増殖・分化を促進する up-regulator と、これらを抑制する TGF $\beta$ , TNF $\alpha$  などの down-regulator に大別されます。これら局所因子には endocrine factor である FSH の biological amplifier としての作用が認められました。

生体现象を発現・維持するために一定の数の細胞を効率よく存続させ、大多数の細胞の生命を絶つ programmed cell death: apoptosis が卵細胞の発育、そして閉鎖の過程において起こっていることが示唆されてきました。卵巣での apoptosis としては、原始卵胞と一次卵胞の閉鎖では卵細胞の変性と消失が先に起こり、二次、三次卵胞の閉鎖では顆粒膜細胞の変性と消失が先行するとされており、性成熟卵巣の原始卵胞卵細胞、閉鎖卵胞の顆粒膜細胞が莢膜細胞において apoptosis を示す DNA 断片化 signal や Fas 抗原が発現しており、局所因子として TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , IGFBP などの関与が明らかにされました。

卵胞成熟過程において顆粒膜細胞の FSH receptor を誘導する activin と、この activin 作用をコントロールする follistatin の作用が証明され、前胞状卵胞・胞状卵胞での P450 $\text{sc}$ , 3 $\beta$ HSDs, P450 $\text{c17}$  と androgen receptor の存在、発育の進行した卵胞での P450 aromatase と estrogen receptor の発現など、発育の各段階に特徴的なステロイド代謝酵素の誘導や局在と酵素活性の関連がまとめられました。さらに顆粒膜細胞から分泌されるプロテアーゼが IGFBP を分解し、その結果内因性 IGF-I 活性の上昇することが卵胞発育を促進することも示されました。

成熟卵胞の排卵機構において重要な役割をもつ prostaglandin の卵巣顆粒膜細胞や莢膜細胞での産生を angiotensin II が AT $_2$  受容体を介して刺激

し、卵巣からの PGF $_{2\alpha}$ , PGE $_2$  分泌が増加する。AT $_2$  受容体の細胞内情報伝達系は phospholipase C を介した phosphatidylinositol の活性化、Ca の動員、adenyl cyclase の抑制によることが報告されました。また、排卵前における IGF-I と IGFBP の dynamic 変化についても討論されました。

さて、今回の発表・討論の成果を臨床へ feedback することも、本 symposium の目的の一つですが、いくつかの月経異常の病態を理解し、新しい治療法を開発するうえで重要な知見が得られたといえましょう。例えば、体重減少性無月経や神経性食欲不振症、低 insulin 血症などの全身代謝異常が卵胞発育に関係する局所因子に及ぼす影響、多嚢胞卵巣症候群: PCOS 卵巣での局所因子の特異的な変化を踏まえての治療法の可能性などがあげられます。卵巣内の renin・angiotensin 系が異常に亢進している卵巣過剰刺激症候群: OHSS 症例に対する angiotensin 変換酵素阻害薬による治療などは、一部ですで行われており、今後さらに広い臨床応用が期待できると考えられます。また activin と follistatin の測定法が確立され、排卵誘発時の変動が明らかになれば、より適切な排卵誘発療法への道をひらく手がかりになると思われます。

以上、本 symposium での発表と討論のまとめを、卵胞の発育・成熟・排卵の順に従って試みましたが、広範囲にわたる内容を網羅することはもとより不可能であり、また私の私見・印象が加味されていることも御了承願いたいと存じます。局所の機構を解明することの意義と重要性は極めて大であり、今後さらに細部にわたる検討が進められるべきですが、断片的な局所に関する知見を組み立てることで卵胞発育の全体像を明確にすることはできず、壮大な卵胞発育の流れを大局的にみる視点はもち続けることの重要性を強調したいと思います。本 symposium でもたらされた知見を、提起された数々の問題点がよく整理され、新たな挑戦の端緒となることを期待するものであります。

おわりに、本 symposium を企画された関係各位、シンポジストと共同研究者、そして学会会場で討論に参加された会員の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 学術企画委員会報告

第47回学術講演会シンポジウムについて、学術企画委員長(中野仁雄)、課題選考小委員長(富永敏朗)、演者選考小委員長(玉舎輝彦)、シンポジウム座長(武谷雄二、麻生武志)により事後評価が行われた。事後評価の内容を下記のチェックポイントに沿って報告する。

1) 構成において各演題は適切であったか。

今回のシンポジウムのテーマを選定した理由は、近年、分子生物学の著しい進歩によって排卵に関与する多くの局所因子の解析が可能となったが、これらの因子がオートクリン、エンドクリン、パラクリン機構を介して、どのように卵胞発育、排卵と関連をもっているかを会員として知りたい点にあった。その目的で卵胞発育をSTAGEごとに分けて整理し4人の演者に分担してもらったが、テーマ自体が最先端の分野であったため全体を総合的にカバーすることができず、やや消化不良になった感がある。また対象とした局所因子の数が多すぎることも、今回のシンポジウムの焦点をやや不鮮明なものにした原因であったと考えられる。逆にいえば、この領域では新しい知見がどんどん出ているということであり、そのような意味では、今回のテーマは産婦人科としては当然取り上げるべき内容であったし、構成も選考の過程から振り返って考えれば適切であったといえる。すなわち、今回のシンポジウムでは時代における件の主題の位置づけを明らかにするとともに、今後進めるべき方向を示したと考えられる。

2) 発表について、形式・内容・時間は適切であったか。

座長から最初に共通のスライドで説明することによって発表と討論の方向性を示した。各演者にはあらかじめ臨床に対するコメントを求めており、発表の形式および時間に関しては特に問題はなかった。また内容は講演要旨と異なる部分も認められたが、演者に選考されてから1年間の期間があるために多少研究結果が変更されることはやむを得ない。現在のシンポジウムは、演題選考か

ら発表まで一貫性を求めて3年度にわたって動かなければならないという構造になっているが、このように発表までの期間が長いのは、演題・演者・座長の選考が民主的な過程を経ているためでもある。加えてその間学問が進歩していることも意味している。

3) 討論について、形式・内容・時間は適切であったか。

卵胞発育をSTAGEごとに分けて4人の演者に分担してもらったが、前述のようにテーマ自体が最先端の分野であったため、討論においても全体をカバーすることができなかった。さらに、解析できるようになった局所因子の数が多すぎることも、今回の討論の焦点を拡散させる要因になったと考えられる。そもそも、卵胞発育は、胎児期から始まり閉経するまでの卵巣の大きな流れの中にあって、この中のごく一部分を論じるのは難しい。討論時間にも制限があり、どこに焦点を当てるかは難しいが、もう少し特定した切り口をみつける必要があると思われた。もとより、統合性と先端性とは互いに相容れないものであるし、シンポジウムの領域の広さに対して全体を討論することは困難であるが、一般会員が望むような明日からの臨床へつながるような討論を誘導するか、あるいは臨床との距離・接点を明らかにしていくことが、現在の形のシンポジウムでは座長としてできる次善の対応ではないかと思われる。

4) 会場からの質疑について問題点はなかったか。

会員は臨床にいかにか還元されるかを期待していると思われるが、基礎医学系の討論に終始しないように座長が指向性を示す必要がある。しかしながら、座長からの規制にも限界があり会場からの質疑に対して強権発動はできない。やはり全体として時間が非常に逼迫していたために、会場との質疑応答も充分に行われなかったようである。また、シンポジウムに応募したが選考にもれた会員からの質問がほとんどなかったために質問数の割に内容が乏しい感があり、討論形成への会員(発言者)の十分な認識と行動をも育成していくことが今後の検討課題と考えられる。

## 5) 全体を通じて今後の検討課題はないか。

今回のシンポジウムでは、テーマそのものが先端性を求めたため、全体としてやや統合性に欠ける結果となった。期待された内容は、分子生物学の臨床への開花が10年先とすれば現在局所因子がどこまで解明されているか、また将来の展望はどうなっていくのかということであったが、シンポジウムの時間内において討論し尽くすことができなかった。これには、各演者のデータを優先した

ということも関係していると思われるが、今後はシンポジウムそのものの構成や形態を従来の考え方とは異なった視点で見直してみる必要がある。すなわち、シンポジウムにすべてを盛り込むのではなく、テーマによってはワークショップ、パネルディスカッションなどのスタイルを用いてdebateの色彩を強調するなど、学会としての成果を出していくような方向を検討してもよいのではないかと思われる。