

PCOS の病態生理と臨床

(2) PCOS の排卵障害ならびにインスリン抵抗性に関する研究 —ラットモデルによる排卵障害, OHSS の研究と adiponectin からみたインスリン抵抗性の臨床研究—

札幌医科大学産科・周産期科
助教授 遠 藤 俊 明

Ovulation Failure and Insulin Resistance in Polycystic Ovary Syndrome

Toshiaki ENDOH

Department of Obstetrics and Gynecology, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo

Key words : Ovulation ・ Insulin resistance ・ Adiponectin ・ OHSS ・ PCOS

多嚢胞性卵巣症候群の診断で日本産科婦人科学会の生殖・内分泌委員会の基準でも¹⁾, Rotterdam の基準²⁾でも共通するのは, 月経不順(排卵障害)と超音波による多嚢胞の確認である。それ以外の重要な臨床的徴候としては, 高アンドロゲン血症あるいは高アンドロゲン徴候(男性化徴候)と, インスリン抵抗性である。アンドロゲンに関しては日本では参考値であるが, Rotterdam の基準では, 3 大徴候の一つとされている。近年合併徴候としてその重要性が注目されていながらインスリン抵抗性は Rotterdam の基準の中にも取り入れられていない。

欧米婦人の PCOS の特徴として多毛(70%)や男性化徴候(20%)は頻度が高く, また歴史的経緯からも重要視されている。一方インスリン抵抗性は PCOS の合併頻度としては高アンドロゲン血症よりもむしろ高い臨床徴候である。

そこで我々は, 排卵障害に関連して高アンドロゲンとインスリン抵抗性の 2 つの重要事項を, 動物モデルを用いた基礎実験と, 多数の臨床症例からその意義の解析を試みた。さらに PCOS 症例に対する排卵誘発の際に副作用として問題となる卵巣過剰刺激症候群 ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) に関しても動物モデルにより卵巣の血管透過性の亢進のメカニズムを検討した。

臨床研究としては, 当科および関連病院を受診した PCOS 症例を内分泌学的にあるいは臨床徴候から分析し, 今回新たに判明した知見を報告する。

1) 高アンドロゲンの排卵障害への関与

われわれは, 高アンドロゲン状態の排卵現象への影響をラットモデルを用いて検討した。Lee et al. の方法に準じ, 22 日齢の幼若雌ラットに dehydroepiandrosterone (DHEA) を 15 日間連日投与して PCO モデルを作成する方法である³⁾。この方法で, 15 日目に得られた卵巣を組織学的に検討すると, コントロールラットの卵巣には排卵を示す黄体が多数認められるが, PCO ラットでは, 黄体の数が有意に少なく, 腫大した卵胞が多数認められた。血中ホルモンでも, 血中アンドロゲンは testosterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) のいずれもコントロールラットに比べて有意に高く高アンドロゲン状態を呈していた。また PCO ラットでは有意に血中 progesterone が低下していた。このことから高アンドロゲン状態は排卵障害を惹起することが形態学的にも, 内分泌学的にも証明された。そこで排卵障害のメカニズムを, タンパク分解酵素と卵胞壁を縁どる collagen の観点から検討した。われわれは, collagen type IV を破壊する matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) に着目しその発現を mRNA, タンパク発現量, タン

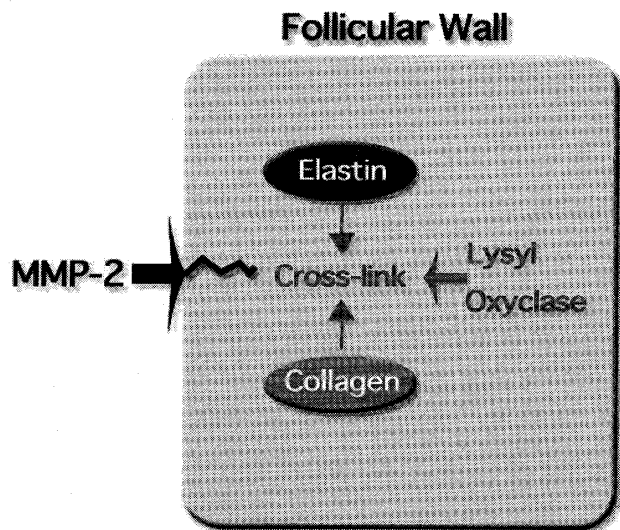


図1 卵胞壁破壊のメカニズム

MMP-2は68-kDaで分泌され62-kDaの活性型に processing され, Lysyl oxidaseは50-kDaで分泌され32-kDaの活性型に processing される

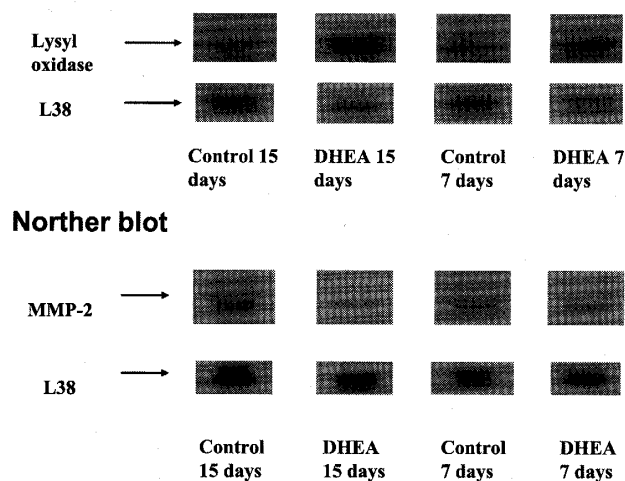


図2 卵巣の Lysyl oxidase と MMP-2 mRNA 発現
幼若ラットに DHEA を7日間, 15日間投与した PCO
ラットと非投与のコントロールラットの卵巣における
発現の比較

パク分解活性を zymography で検討した. いずれの方法でも PCO 卵巣では, コントロールに比べて発現が減少していることが明らかになった. 一方 collagen と elastin をクロスリンクし卵胞壁の強硬化を図る酵素と考えられる lysyl oxydase(図1)の発現を mRNA レベルで検討した. その結果, PCO ラットの卵巣では lysyl oxydase 発現が有意に増強していることが明らかになった(図2). このことは, 高アンドロゲン状態で

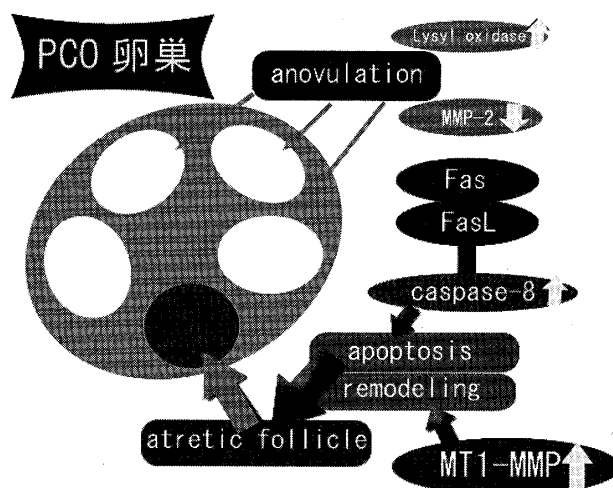


図3 PCO 卵巣の排卵障害, 卵胞閉鎖のメカニズム

は, 卵胞壁が強硬化することと, 排卵の際卵胞壁の破壊に關するタンパク分解酵素の発現低下が相俟って排卵障害が起こるものと推察された(図3)⁴⁾.

2) 高アンドロゲンの多嚢胞形成, 卵胞閉鎖への影響

ヒト PCOS の場合増加した小卵胞が特徴であり, その卵胞が排卵せずに閉鎖することも特徴である. アンドロゲンの卵胞生育への影響と卵胞閉鎖への関連を前記のモデルを用いて検討した. DHEA 投与による総卵胞数と閉鎖卵胞数, 閉鎖卵胞の割合について検討した.

DHEA 投与開始7日目と15日目の卵巣をコントロールラットと比較してみると7日目では DHEA 投与により総卵胞数は有意に増加していた. しかし15日目では, TUNEL 法で閉鎖卵胞数を検討してみると DHEA 投与で有意に閉鎖卵胞数ならびに閉鎖卵胞率が上昇していることが判明した(表1). つまり, DHEA 投与でつくった高アンドロゲン状態は短期的には小卵胞数を増加させ, 長期的には卵胞を閉鎖させる作用があることが判明した. このことは PCOS の病態を考えるうえで非常に重要な知見で, PCOS のうちで高アンドロゲンを呈する症例は多嚢胞を示しているも, その卵胞の中には閉鎖過程にある卵胞も含まれているものと推察される. われわれはまた, 卵胞閉鎖に導く apoptosis のメカニズムについても検討した. death family の関与を検討してみると, 卵巣全体の Fas 発現には差はないものの, FasLigand 発現は, mRNA ならびにタンパク発現がともに増加していた. また FasL-

表1 DHEA 処理による PCO ラットの総卵胞数と閉鎖卵胞数(率)

		Number of follicles	Number of atretic follicles	% of atretic follicles
Control	7days	52.67 ± 5.03	11.67 ± 2.01	22.01 ± 2.56
DHEA	7days	88.33 ± 6.51 *	22.33 ± 2.52	25.29 ± 2.24
Control	15days	46.20 ± 4.01	10.40 ± 2.41	22.29 ± 2.56
DHEA	15days	49.50 ± 6.86	15.50 ± 2.52	31.17 ± 2.74 **

* p < 0.01 vs control

** p < 0.05 vs control

Western blot analysis

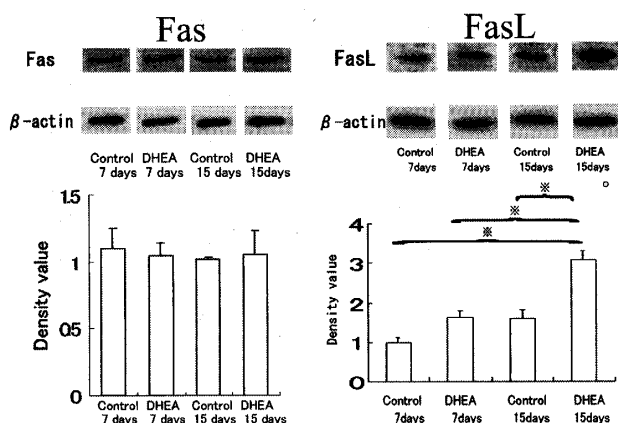


図4 DHEA 処理による PCO ラットの卵巣の Fas ならびに FasLigand のタンパク発現

Fas が確かに apoptosis を起こすシグナルとして流れているかどうかを caspase 8 の processing から検討した。Western blotting では pro-caspase 8 のバンドの caspase 8 への shift が DHEA 投与で明らかに増加しており、この系を介した apoptosis が卵胞閉鎖を起こしているものと思われた(図 4, 5)。また別に membrane type 1-MMP (MT1-MMP) の発現も検討した。われわれは既に黄体の退行現象には細胞外マトリックスのリモデリングを伴うことを報告しており、その際 MT1-MMP が重要な働きをしていることを明らかにしている⁵⁾⁶⁾。MT1-MMP は collagen type I, III, V を分解することが知られている。また他の組織でも apoptosis との関連が示唆されるタンパク分解酵素である。mRNA ならびに zymography でその発現を検討すると DHEA 投与で明らかに MT1-MMP の発現が増加していた。MT1-MMP は pro-MMP-2 の活性化作用があることが知られているが、前記のように DHEA 投与で MMP-2 活性は低下しており、この MT1-MMP は pro-MMP の活性化に働くのではなく、

Western blot analysis

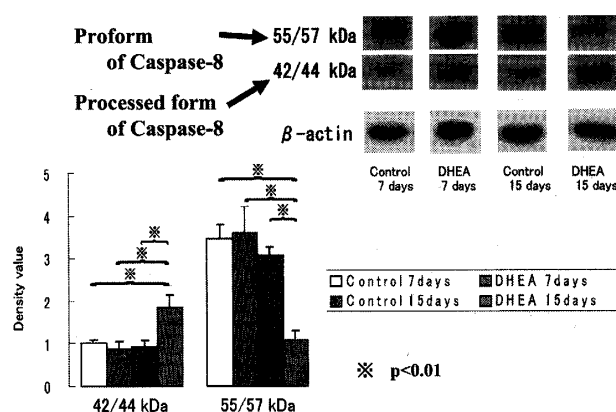


図5 DHEA 処理による PCO ラットの卵巣の caspase-8 の processing

Gelatin zymography

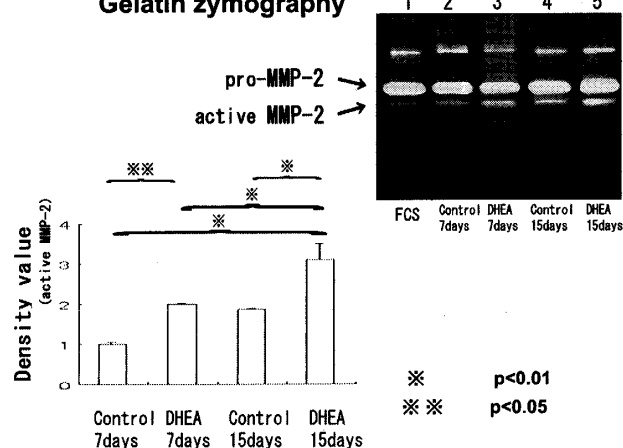


図6 DHEA 処理による PCO ラットの卵巣の MT1-MMP 発現

FCS(fetal calf serum)を基質として卵巣の膜分画の MMP 活性を gelatin zymography で検討した

主に細胞外マトリックスのリモデリングあるいは apoptosis との関連で作用しているものと思われる

(図6). DHEA に関して重要な特徴は耐糖能の改善作用のあることである. 実際 DHEA 投与ラットでは, 血糖はむしろ低下傾向にあった. つまりこの DHEA の作用は, 耐糖能の異常に起因するものではなく, 高アンドロゲンそのものによる効果を確認できたと考えられる(図3)⁷⁾.

3) インスリン抵抗性の卵巣(卵胞)への影響

前記したようにわれわれは高アンドロゲンが排卵障害や小卵胞の増加, 閉鎖卵胞の増加を起こすことをラットモデルを用いて明らかにした. この高アンドロゲンとインスリン抵抗性の関係に関して, インスリン抵抗性が上流にあるとする考え方がある. この考えはコンセンサスが得られているのであろうか? われわれは必ずしも一方向性の関係ではないと考えている. そこでわれわれはインスリン抵抗性のモデルとして Zucker (fa/fa) ラットを用いた. このラットは生後3週齢から肥満し始め, 内臓脂肪が蓄積してインスリン抵抗性を呈してくるラットである. fa はレプチン受容体変異遺伝子であり, fa のホモ固体のみが肥満を発症し, インスリン抵抗性を示すが, 糖尿病にはならない. また雄雌とも不妊になることが知られている. 5週齢のラットとコントロールとしての Zucker (+/+) を比較すると, インスリン抵抗性ラットでは総卵胞数は有意に増加し, 一方閉鎖卵胞数・閉鎖卵胞率も増加している. またこのラットは高アンドロゲン血症は示さない. つまり高アンドロゲンを伴わないインスリン抵抗性単独の状態でも卵胞数の増加, 閉鎖卵胞数の増加が起こることが判明したのである. つまり, 以上から PCOS の重要な臨床徴候である多嚢胞と閉鎖卵胞の増加は, 高アンドロゲン血症単独でも, あるいはインスリン抵抗性単独でも起こることが明らかになった. これは極めて重要な知見である. またこのラットは肥満の進行とともに血中 adiponectin が低下し, 同時に卵巣組織中の adiponectin も低下しているという興味ある知見を得ている.

4) 臨床研究として PCOS 症例の内分泌学的特徴

今回, 当科および関連病院を含めて PCOS をスクリーニングした結果約 150 名が日本産科婦人科学会の診断基準を満たす症例であった. これらのうち BMI > 25 の肥満タイプは約 1/3 で, BMI < 22 の非肥満タイプは約 2/3 と非肥満タイプの PCOS の方が約 2 倍で有意に多かった. コントロールは BMI < 22 の内分泌異常のない非 PCOS 症例 40 名とした. この 3 群

とも平均年齢は 30 歳前後で有意差はなかった. グループとしてみた場合, コントロールに比べて, PCOS 症例は testosterone, DHEAS, androstenedione のいずれも有意に高値だった. しかし個々人としてみた場合いずれかのアンドロゲンが上昇している高アンドロゲン血症の頻度は約 3 割弱程度であった. これ以外の症例は, LH 高値, 月経不順, 超音波で多嚢胞を示している. Rotterdam の基準の高アンドロゲン以外の 2 つの基準を満たす PCOS ということになる. 各項目の重要性に比重はついていないが, これは対象症例の中身の違いとして反映されてくる可能性がある. つまり高アンドロゲン血症を示す症例と示さない症例は別々の病因が働いている集団をみている可能性がある. 高アンドロゲンを示さなくても多嚢胞を含めて PCOS の徴候は示すのである. 日本人の PCOS ではこういう症例の方が多いといえる.

5) PCOS 症例の 2 型糖尿病の家族歴, インスリン抵抗性の合併頻度

インスリン抵抗性と関連する 2 型糖尿病について問診した. 2 親等以内の 2 型糖尿病の合併頻度は, 約 35% に認められ, 成人の 7 人に一人が糖尿病あるいは糖尿病予備軍といわれる現代においても明らかに高頻度である. そこでインスリン抵抗性の観点から PCOS 症例を検証してみた. 一般にいわれているようにインスリン抵抗性の存在は将来的には, メタボリック・シンドロームの発症につながることはコンセンサスが得られているので, 内科領域でいうインスリン抵抗性の存在は生活習慣病の観点からも重要な徴候である. この視点からインスリン抵抗性を検証する場合は, その診断法としてはグルコース・クランプ法が最も適切と考えられる. しかし, これはあくまでも糖尿病を中心とした内科的な見地からの話である. PCOS に合併するインスリン抵抗性の婦人科内分泌学的病態への関与のメカニズムが確定していない現在, グルコース・クランプ法が最も適切な診断法とまではいえないのではないかと. この件に関しては, 欧米の報告をもってしても, グルコース・クランプ法, OGTT, HOMA-IR, 空腹時インスリン値などのうち最も婦人科内分泌学的病態と相関しているのはいずれかということに関してきちっとした検証はされていない. 今回, われわれは簡便で一般汎用されている HOMA-IR を用いてインスリン抵抗性を検討した. 各グループ間の HOMA-IR を比較すると肥満タイプ

PCOS>非肥満タイプPCOS>コントロールの順である。また今回 HOMA-IR>2.0 を異常値として検討したところ肥満タイプの PCOS のグループでは約 80% が上昇していた。一方非肥満タイプの PCOS のグループでも約 40% が HOMA-IR が上昇していた。さらに今回の症例で HOMA-IR と関連する因子の検討をしたところ、肥満グループでは BMI と最も強く正の相関が認められ、ついで血中 adiponectin と負の相関が認められた。一方非肥満グループでは最も相関係数が高かったのは血中 DHEAS 値で、ついで BMI と腹囲(臍高)がほぼ同等の相関係数だった。つまり HOMA-IR は肥満度と相関するが、非肥満タイプ PCOS では副腎性のアンドロゲンの高い症例が HOMA-IR が高くなる傾向があることが判明した。

6) インスリン感受性サイトカインである血中 adiponectin について

近年脂肪細胞は、さまざまな分子を分泌する重要な内分泌組織として捉えられている。その中でも脂肪細胞から分泌される adiponectin はインスリン感受性に重要な働きをすることが明らかになっているアディポサイトカインである。Adiponectin は 244 のアミノ酸からなる分泌タンパク質で、コラーゲンドメインを中心とした 3 量体を形成し、これがさらに多量体を形成する。ヒト血清中には 5~20 μ g/ml と高濃度に存在している。この adiponectin は骨格筋や肝臓の AMP キナーゼを活性化することで脂肪の燃焼を促進し、骨格筋の糖の取り込みの増加、肝臓での糖新生を抑制する作用がある⁸⁾。この adiponectin と PCOS の関係については欧米を中心に論文が出始めている。PCOS での adiponectin 低下は単なる肥満によるもの⁹⁾、ステロイド産生と関連している¹⁰⁾、インスリン抵抗性との関連を示唆する報告などがある¹¹⁾。Adiponectin の生理作用として、抗炎症作用、抗 apoptosis などさまざまな作用もあることから、一概に肥満やインスリン抵抗性との関連性のみで考えることはできない。今回の症例では集団として各グループの血中 adiponectin を比較するとコントロール>非肥満 PCOS>肥満 PCOS の順に有意に低下する。個人レベルではコントロールが 12.71 $\pm$ 2.21 μ g/ml であることから、今回は mean-2SD $\div$ 8 μ g/ml 以下を adiponectin 低下症例とした。

肥満タイプ PCOS では約 80% に adiponectin 低下が認められ、非肥満タイプでも約 40% に低下が認められた。しかし今回の症例では低 adiponectin を示し

た例のうち HOMA-IR が上昇していたのは半数に過ぎなかった。血中 adiponectin と最も相関していたのは、内臓脂肪の指標とされている腹囲(臍高)である。このことは adiponectin の低下の一部は内臓脂肪の増加で説明できることが判明したが、今後はそれ以外の因子についての検討も必要である。

7) OHSS ラットモデルを用いた血管透過性亢進のメカニズムについて

PCOS の HMG-HCG 療法による排卵誘発の際に起こる副作用として最も注意を要するのは、卵巣過剰刺激症候群 OHSS である。OHSS の最大の特徴は卵巣の血管透過性の著しい亢進である。その結果腹水貯留、血液濃縮、血栓形成など深刻な事態に陥る。われわれは Ujioka et al. のラットモデルを用いて血管透過性のメカニズムを検討した。これは幼若メスラットに連続して大量のゴナドトロピンを投与して OHSS の病態を作成する方法である¹²⁾。この OHSS ラットでは卵巣の血管に関して、Evans blue を使った実験から確かに血管外にこの色素が漏出していることが確認でき血管透過性が亢進していることが明らかになった。また内分泌学的には estradiol と progesterone が極端な高値を示し、ヒト OHSS の状態に近似している。また、血中アンドロゲンもすべて高値を示しており、これもヒト OHSS と似ている。まずわれわれは血管透過性に働く重要分子である VEGF とそのリセプターである VEGFR1 と VEGFR2 の発現について検討した。この実験から判明したことは、卵巣顆粒膜細胞に過剰発現した VEGF が血管内皮に発現しているそのリセプターと結合して血管透過性が亢進する機序があるものと思われた(図 8)。また血管内皮細胞の間をシールする tight junction タンパクである claudin-5 の発現を検討してみると、OHSS ラットの卵巣の血管内皮ではその発現が低下していることが判明した。これが血管透過性亢進の主なメカニズムの一つであると思われる(図 9, 10)。ここで重要なことは、用いたラットは本来はヒト PCOS と似た病態を持つ種類のものではないことである。つまり OHSS は臨床と同じように PCOS ではない症例にも起こり得る。PCOS の場合に OHSS が起こりやすいのは小卵胞が多数存在し、VEGF を産生する顆粒膜細胞が物理的に多数存在することに起因しているものと考えられる。

次にわれわれは臨床的応用を踏まえて、GnRH agonist の投与効果を検討した。結果は、GnRHa を VEGF

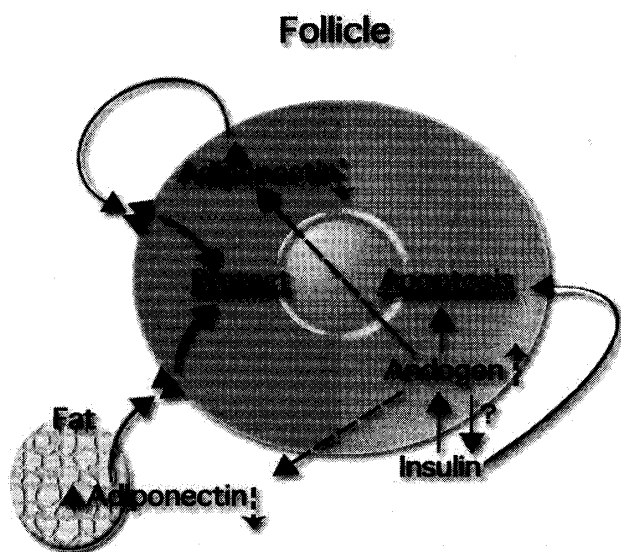


図7 卵胞における androgen とインスリン抵抗性, adiponectin

Androgen は apoptosis を惹起する。一方 Insulin 感受性とも関連する adiponectin は脂肪由来, 卵巣自身由来の両者が卵胞に保護的に働いている可能性がある(仮説)

の発現が最も高まる排卵期を越えて継続投与することが重要であることが明らかになった。この方法で卵巣の腫大が抑制され, ホルモン産生も抑制された。また卵巣の VEGF ならびにリセプター発現の増強も抑制された。さらに claudin-5 の発現減少も食い止められた。つまり, この動物実験から GnRHa が臨床的にも OHSS 発症を阻止できる可能性を示唆する結果が得られた¹³⁾¹⁴⁾。

8) 血管透過性亢進のメカニズムを応用した GnRH アゴニストの臨床応用

OHSS の発症予防, 治療にはさまざまな工夫が必要であるが, われわれは OHSS 発症のハイリスクグループに long protocol または short protocol で GnRHa の投与を開始し, 採卵時を越えてさらに 1 週間投与し続けた。対象症例は, hCG 投与時に estradiol が高値(平均約 5,000pg/ml), 多数の卵胞(平均約 20 個)の OHSS のハイリスクグループで全胚凍結した症例である。GnRH agonist 投与継続症例では hCG 投与時に GnRH agonist を中止していたグループに比べて有意に重症

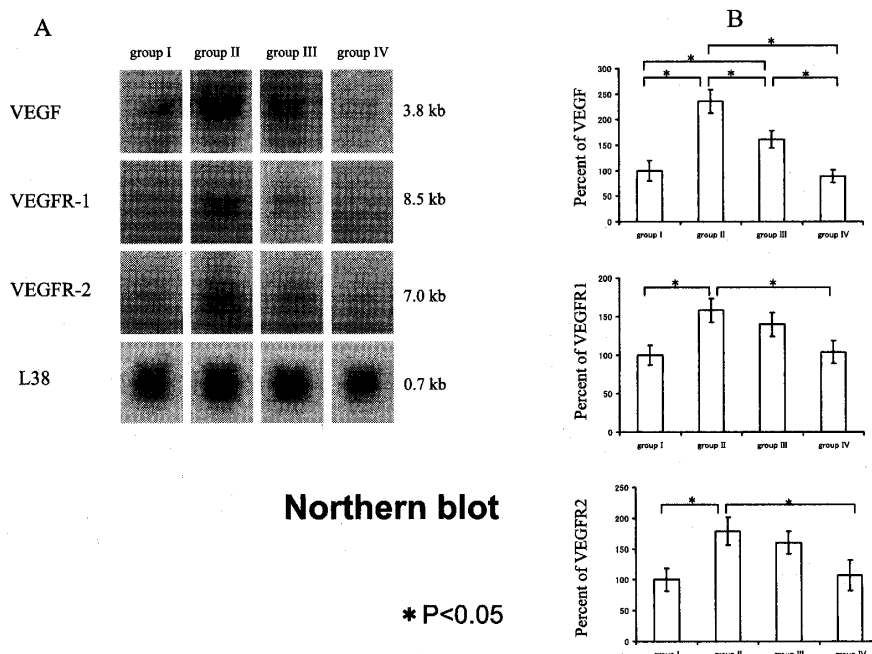


図8 OHSS 処理, GnRH agonist 投与後の VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 の mRNA 発現

幼若雌ラットに少量の PMSG-hCG 投与による排卵誘発(group I), 大量の PMSG を 4 日間連日投与した OHSS ラット(group II), OHSS 処理に加えて GnRHa を hCG 投与とともに開始し 2 日間投与(group III), OHSS 処理に加えて GnRHa を PMSG 開始時から hCG 投与後 2 日後まで投与(group IV)の 4 グループの VEGF, VEGFR 発現の比較

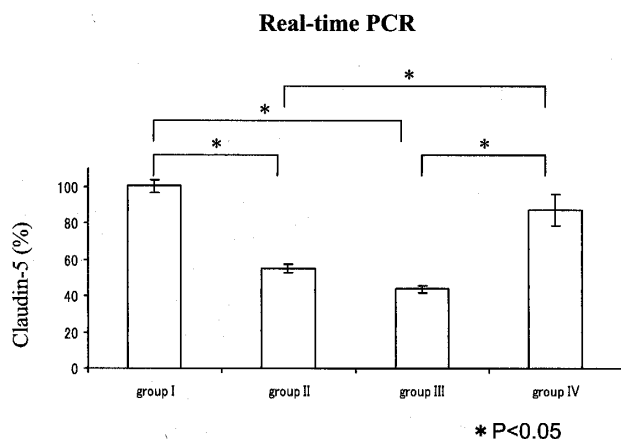


図9 OHSS 処理, GnRH agonist 投与後の卵巣の Claudin-5 mRNA 発現

4グループのtight junctionタンパクであるclaudin-5 mRNAの卵巣における発現をreal time PCRで検討

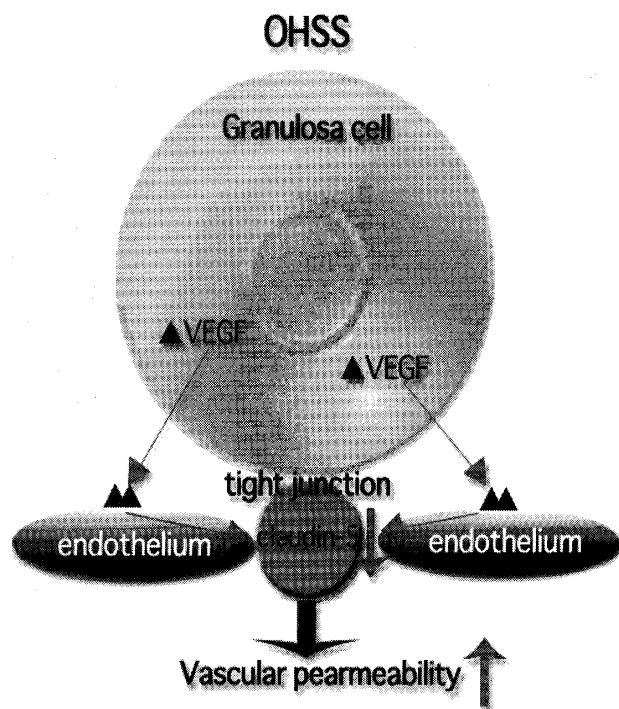


図10 OHSS発症時の卵巣の血管透過性のメカニズム
血管内皮の間をシールしている Claudin-5 は 21-kDa のタンパクで 24 種類からなる claudin family の 1 つ

OHSS 症例の発生頻度が低かった。このように動物実験から得られた結果が臨床でも有用性が示された¹⁵⁾。

おわりに

今回の研究から PCOS では高アンドロゲンあるいはインスリン抵抗性が単独でも排卵障害や卵胞閉鎖を起こしうることが明らかになった。さらに血中 adiponectin がインスリン抵抗性を介してあるいは単独でも PCOS の病態に関わっている可能性が示唆された。また OHSS の卵巣の血管透過性亢進のメカニズムとして、VEGF-VEGFR の発現の亢進と、claudin-5 発現の減少が関与している可能性が示された。また、これらの変化は GnRHa の継続投与でブロックできることも示された。

謝 辞

最後に今回のデータを得るにあたり、多大なる協力を得ました共同研究者、教室員、同門会、恩師諸先生に深謝致します。

(共同研究者)

本間寛之, 馬場 剛, 北島義盛, 長澤邦彦, 林 卓宏, 伊東英樹, 石岡伸一, 金谷美加, 木谷 保, 山崎清大, 千田学, 真名瀬賢吾, 逸見博文, 東口篤司, 藤井美穂, 神谷博文, 森若 治

(他施設協力者)

佐田文宏, 山田秀人, 堂地 勉

(研究顧問)

田中昭一, 工藤隆一

(研究指導)

齋藤 豪

文 献

1. 杉本 修, 他. 生殖・内分泌委員会報告 [本邦婦人における多嚢胞性卵巣症候群の診断基準設定に関する小委員会 (平成2年度—平成4年度) 検討結果報告]. 日産婦誌 1993; 45: 1359—1367
2. The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). Hum Reprod 2004; 19: 41—47
3. Lee MT, Anderson E, Lee GY. Change in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone. Anat Rec 1991; 231: 185—192
4. Henmi H, Endo T, Nagasawa K, Hayashi T, Chida M, Akutagawa N, Iwasaki M, Kitajima Y, Kiya T, Nishikawa A, Manase K, Kudo R. Lysyl oxidase and MMP-2 expression in dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary in rats. Biol Reprod 2001; 64: 157—162

5. Goto T, Endo T, Henmi H, Kitajima Y, Kiya T, Nishikawa A, Manase K, Sato H, Kudo R. Gonadotropin-releasing hormone agonist has the ability to induce increase matrix metalloproteinase (MMP)-2 and membrane type 1-MMP expression in corpus lutea, and structural luteolysis in rats. *J Endocrinol* 1999; 161: 393—402
6. Manase K, Endo T, Henmi H, Kitajima Y, Yamazaki K, Nishikawa A, Mitaka T, Sato H, Kudo R. The significance of membrane type 1 metalloproteinase in structural involution of human corpora lutea. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 742—749
7. Honnma H, Endo T, Henmi H, Nagasawa K, Baba T, Yamazaki K, Kitajima Y, Hayashi T, Saito T. Altered expression of Fas/Fas ligand/caspase 8 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in atretic follicles within dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries in rats. Apoptosis (in press).
- 8 下村伊一郎, 松澤佑次, 編. メタボリックシンドローム. 病態の分子生物学 東京: 南山堂, 2005: 77—90
9. Orio F Jr, Palomba S, Cascella T, Milan G, Mioni R, Pagano C, Zullo F, Colao A, Lombardi G, Vettor R. Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2619—2623
10. Panidis D, Kourtis A, Farmakiotis D, Mouslech T, Rouso D, Koliakos G. Serum adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2003; 18: 1790—1796
11. Ducluzeau P-H, Cousin P, Malvoisin E, Bornet H, Vidal H, Laville M, Pugeat M. Glucose-to-insulin ratio rather than sex hormone-binding globulin and adiponectin levels is the best predictor of insulin resistance in nonobese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3626—3631
12. Ujioka T, Matsuura K, Kawano T, Okamura H. Role of progesterone in capillary permeability in hyperstimulated rats. *Hum Reprod* 1997; 12: 1629—1634
13. Kitajima Y, Endo T, Manase K, Nishikawa A, Shibuya M, Kudo R. Gonadotropin-releasing hormone agonist administration reduced vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors, and vascular permeability of the ovaries of hyperstimulated rats. *Fertil Steril* 2004; 81 (Suppl 1): 842—849
14. Kitajima Y, Endo T, Nagasawa K, Manase K, Honnma H, Baba T, Hayashi T, Chiba H, Sawada N, Saito T. Hyperstimulation and a gonadotropin-releasing hormone agonist modulate ovarian vascular permeability by altering expression of the tight junction protein claudin-5. *Endocrinology* 2006; 147: 694—699
15. Endo T, Honnma H, Hayashi T, Chida M, Yamazaki K, Kitajima Y, Azumaguchi A, Kamiya H, Kudo R. Continuation of GnRH agonist administration for 1 week, after hCG injection, prevents ovarian hyperstimulation syndrome following elective cryopreservation of all pronucleate embryos. *Hum Reprod* 2002; 17: 2548—2551

Abstract

Although the criteria JSOG is a little bit different from Rotterdam criteria, 2 major symptoms such as hyperandrogenemia and insulin resistance attracts doctor's attention. In our study, we examined the effects of hyperandrogenemia on follicular development, ovulation process and follicular atresia. Animal model studies were performed concerning these effects which are shown below. Clinical studies are also shown below.

We gave DHEA to immature female rats for 15days following Lee's paper. We assessed the expressions of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and lysyl oxidase in DHEA-treated rats. MMP-2 is well known to degrade the collagen of follicular walls. Lysyl oxidase is reported to crosslink collagen and elastin and to strengthen them. DHEA-treated rats have elevated all androgen such as testosterone, androstenedione and DHEAS, and actually have hyperandrogenemia. At day 15 MMP-2 activity was significantly reduced and lysyl oxidase mRNA was significantly increased in the ovaries of DHEA-treated rats compared to control rats. This data suspects that hyperandrogenemia might contribute to ovulation failure.

DHEA treatment for 7days caused an increase in the total number of follicles. However, DHEA treatment for 15 days increased the number of atretic follicles and caused the activation of Fas-FasLigand-Caspase-8. These results showed that apoptosis is one of the major mechanisms follicular atresia under hyperandrogenemia.

We utilized Zucker (fa/fa) rats as an insulin resistance model. These rats have insulin resistance, but do not have DM. These rats have an increased total number of follicles and atretic follicles compared to control rats.

Using Evans blue study, hyperstimulation treatment by PMSG-HCG following Ujioka's model caused an increase in vascular permeability to the ovary. These model rats have elevated expressions of VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2 in the ovaries compared to control rats. Continuing long treatment of GnRH agonist combined with hCG injection blocked the increase in vascular permeability and VEGF-VEGFR expressions. These results showed the possibility that prolonged treatment by GnRH agonist clinically may prevent the occurrence of OHSS. Moreover, OHSS treatment caused a decrease in claudin-5, tight junction protein, which seals endothelial cells. Therefore, vascular permeability was elevated in this situation. Prolonged GnRHa treatment blocked the decrease in claudin-5, and the increase in vascular permeability.

Eighty percents of obese PCOS patients have insulin resistance. Forty percents of lean PCOS patients have insulin resistance. Almost all patients with insulin resistance have reduced serum adiponectin in obese PCOS. On the other hand, just 50% of patients with insulin resistance have reduces serum adiponectin. Taken together, the pathophysiology of obese PCOS appears to be different from that of non-obese PCOS regarding to insulin resistance and serum adiponectin level.
