

シンポジウム 2 卵の発育・成熟・老化機構の解明と臨床応用

(1) 卵胞発育および卵子成熟に関する各種生理活性物質の意義：

新たな卵巣刺激療法をめざして

東京大学 吉 野 修

【目的】

質の高い多数の卵を安定して得ることが現代の生殖医療の進歩には必須の課題である。なかでも卵胞発育と卵子成熟は、卵の数と質を決める主要な因子である。このため、ヒトにおける卵胞発育から卵子成熟・排卵にいたる生理と病理のメカニズムを解明することが、より高度かつ有効な生殖医療に求められている。原始卵胞から排卵へといった卵胞発育の過程は、初期の卵胞刺激ホルモン(FSH)に依存しない時期とその後のFSH依存性の時期に分けられる。初期のFSHに依存しない卵胞発育は主に莢膜細胞に発現するBone Morphogenetic Protein 7 (BMP7)や卵子のみに発現するBMP15およびGrowth Differentiation Factor 9 (GDF9)などに依存しており、特にBMP15とGDF9の遺伝子異常はヒトの早発卵巣不全(POF)の原因となることが知られている。FSH依存性となった卵胞は、月経周期前半のFSH上昇に刺激され急速に増大するが、健常な卵胞発育には血管新生による栄養血管網の発達が不可欠である。一方、卵子成熟・排卵の過程では適切な卵核崩壊と卵丘膨化などの組織構築改変のために種々の生理活性物質の作用が必要である。本研究では、BMP7、BMP15、GDF9の卵胞発育における役割、卵胞発育における血管新生因子の制御機構、ならびに排卵期における生理活性物質の作用機序の解明を目指した。

【方法】

ヒトに関しては、患者の同意のもと、手術時ならびに体外受精採卵時に卵胞液および顆粒膜細胞を採取し、これを使用した。動物実験はマウスを用いて行った。

① BMP7, BMP15, GDF9 に関する検討

①-a. BMP15, GDF9 の発現(マウス, ヒト)：独自に作成した抗マウスおよび抗ヒト BMP15 抗体と、供与された抗マウスおよび市販の抗ヒト GDF9 抗体をもちいたウエスタンブロット法により、卵胞発育の様々な段階におけるマウス卵子およびヒト卵胞液中の BMP15, GDF9 の発現を検討した。

①-b. BMP7, BMP15, GDF9 の受容体発現(ヒト)：これら BMP ファミリーのヒト卵巣における受容体発現を in situ hybridization 法にて検討した。

①-c. BMP7, BMP15, GDF9 の顆粒膜細胞への作用(ヒト)：ヒト顆粒膜細胞を用いてリコンビナント蛋白の添加実験を行った。独自に作成した BMP15 および GDF9 蛋白によるアクチビンサブユニット遺伝子の発現作用を、また BMP7 蛋白による FSH 受容体発現作用を検討した。

①-d. BMP15 の卵子成熟および排卵への作用(マウス, ヒト)：ノックアウトマウスの解析により、マウスではヒトと異なり BMP15 は初期卵胞発育には必須ではない。一方で、マウス BMP15 の遺伝子欠損により排卵・卵子成熟障害が生じる。この機構の解明のため PMSG 処理マウスより採取した卵子卵丘複合体に BMP15 蛋白を添加培養し、卵核崩壊および卵丘膨化に対する作用、ならびに排卵に関与する EGF 様増殖因子などの遺伝子発現に与える影響を検討した。ヒト顆粒膜細胞培養系には BMP15 蛋白を添加し、同様に排卵に関する COX-2 および EGF 様増殖因子の遺伝子発現を検討した。

② IL8 の制御 (ヒト) 卵胞液中の血管新生因子

としてIL8に注目し、個別に採取した卵胞液中のIL8と酸素濃度、ステロイドホルモン濃度などの相関を検討した。ヒト顆粒膜細胞培養系で低酸素刺激、BMP15およびトロニン刺激におけるIL8産生能について検討を行った。

【成績】

①-a. マウス卵子において、GDF9蛋白は発育初期の卵胞から発現していたが、BMP15蛋白はLHサージ以前のマウス卵子には発現しておらず、内因性LHサージおよびhCG投与後の排卵直前の卵子にのみ発現および分泌を認めた。これに対し、ヒトではBMP15およびGDF9蛋白ともに、月経周期に関わらず卵胞液が採取できたすべての発育過程の卵胞液中にその存在を認めた。これらの結果から、ヒトと異なりマウスにおいてはBMP15の遺伝子異常が卵胞発育不全をきたさない理由が、マウスではBMP15蛋白が卵胞発育時に発現しないためであると考えられた。

①-b. ヒト卵巣においてBMPファミリーの受容体は初期卵胞から成熟卵胞まで主に顆粒膜細胞に発現していた。

①-c. ヒト顆粒膜細胞においてBMP15およびGDF9の両者がアクチビン β subunit mRNAを著明に誘導した。このことから、BMP15およびGDF9はヒト初期卵胞においてアクチビンの誘導を介して卵胞発育を促進していることが示唆された。また、BMP7はFSH受容体の発現を誘導した。

①-d. BMP15蛋白はマウス卵子卵丘複合体において卵核崩壊および卵丘膨化を誘導した。この作用は、EGF様増殖因子の発現およびEGFレセプターの活性化を介していることを明らかにした。また、ヒト顆粒膜細胞においてもBMP15がEGF様増殖因子の発現を誘導することを認め、ヒトにおいてもBMP15は卵胞発育だけでなくEGF様増殖因子を介した最終的な卵子の成熟および排卵にも関与している可能性が示唆された。

②卵胞液中の酸素濃度と卵胞液中IL8濃度は負の相関を示した。in vitroの系では低酸素刺激が

顆粒膜細胞からのIL8産生を増加させた。他家によるIL8の卵胞発育促進作用の報告もあわせて考えると、卵胞において低酸素刺激はIL8の産生を介して血管新生ならびに卵胞発育を促進していることが示唆された。顆粒膜細胞におけるIL8の発現はBMP15、トロニンによっても誘導され、IL8の発現は種々の制御を受けていることが明らかとなった。

【考察】

第一に、ヒトでは初期卵胞発育に必須のBMP15がマウスでは初期卵胞発育に関与せずLHサージ後の卵子成熟と排卵に重要である理由を明らかにし、卵胞発育に関する知見を生殖医療へ応用する場合にはヒトでのデータを重視する必要があることを再認識した。この観点に立脚し、ヒトから得られたデータを中心に解析した。そのなかで、卵子由来のBMP15とGDF9が顆粒膜細胞に作用し、アクチビン分泌促進を介してFSH非依存性の初期卵胞発育を促進し、またBMP7がFSH受容体の発現を誘導する可能性を示した。さらに、FSH依存性の時期において血管新生などにより卵胞発育に影響するサイトカインIL8の産生がBMP15、トロニン、低酸素など種々の因子に制御されていることを明らかにした。これらの知見により、FSH非依存性、依存性の時期に応じてFSH以外の各種生理活性物質を投与して卵巣刺激を補助するという新たな治療概念が提示可能であり、現行のFSHによる卵巣刺激では治療困難なpoor responderなどへの応用が期待される。さらに、BMP15やトロニンが最終的な卵子成熟・排卵を調節することが示唆されたことにより、未だ治療成績の不良な卵のin vitro maturation療法への適応が考えられた。一方で、酸素濃度も含めた卵胞液中物質のスクリーニングは現実的に十分可能であり、血管新生因子などのモニタリングにより良好卵子が採取不能な症例への個別的治療が展開できると考えられた。