

シンポジウム1 (生殖)

卵巣のダイナミックな変化の神秘に迫る—臨床へのフィードバックを目指して—

1) 卵胞発育における卵子～顆粒膜細胞～莢膜細胞間のクロストーク

福井大学 折 坂 誠

【目的】

原始卵胞から前胞状卵胞への発育過程は、ゴナドトロピンに依存せず、卵巣の局所調節機構が主導する。それに対して、胞状卵胞以降の発育・成熟過程はゴナドトロピン（特にFSH）に強く依存する。すなわち前胞状卵胞から胞状卵胞への移行期は、発育制御のメインシステムが“卵巣内局所調節”から“ゴナドトロピン”に切り替わる重要なターニングポイントといえる。もしこの時期に卵胞がFSH依存性をうまく獲得できないと、発育は停止し閉鎖に陥ってしまう。我々は、この前胞状卵胞から胞状卵胞への移行期における卵巣内局所調節システムのうち、特に卵胞を構成する卵子～顆粒膜細胞～莢膜細胞の細胞間クロストークに注目し、その解析を進めてきた。我々の最終目標は、「排卵誘発に抵抗性を示す poor responder や多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) に対して、卵胞内の細胞間クロストークを修復し、卵胞によるFSH依存性の獲得を誘導することで、排卵誘発に対する反応性を回復させる」ことにある。

【方法】

卵子～顆粒膜細胞～莢膜細胞間のクロストーク解析に不可欠なのは、卵胞の生体内構造を再現する in vitro 実験モデルである。我々は、ラット前胞状卵胞の体外培養系と、卵胞内の遺伝子ノックダウンシステムを組み合わせ、卵子～顆粒膜細胞～莢膜細胞間のコミュニケーションを保ちつつ、卵胞内の遺伝子解析を可能にする「卵胞培養モデル」を開発した。また、ゴナドトロピン依存性を獲得する直前のウシ小胞状卵胞から、顆粒膜細胞と莢膜細胞を単離しコラーゲン膜の対側に培養することで、基底膜を介した顆粒膜細胞～莢膜

細胞間のクロストーク解析を可能にする「人工卵胞壁モデル」も確立した。本研究では、これらの実験モデルを用いて、卵胞細胞間のクロストークが正常な卵胞発育プロセスで担う役割と、その破綻がもたらす卵胞の発育停止メカニズムについて検討した。

【成績 1】《卵胞発育プロセスにおける卵子～顆粒膜細胞～莢膜細胞間クロストークの役割》

1. 莢膜細胞層の形成：前胞状卵胞の発育プロセスにおける3大イベントは、①卵子の発育と②顆粒膜細胞の増殖、そして③莢膜細胞層の出現である。このうち莢膜細胞層の出現は、卵胞がゴナドトロピン反応性を獲得するうえで、極めて重要なイベントと考えられている。

①顆粒膜細胞～卵巣間質細胞（莢膜前駆細胞）間のクロストーク

人工卵胞壁モデルにおいて、卵巣皮質の間質細胞が、顆粒膜細胞との共培養により、莢膜細胞様にトランスフォームし、LH受容体発現やアンドロゲン産生が誘導された。この事実は、莢膜細胞がその前駆細胞からリクルートされるプロセスを、顆粒膜細胞由来の液性因子が制御する可能性を推測させる。

②卵子～莢膜細胞間のクロストーク

卵子～莢膜細胞間のクロストークについて、卵子で特異的に産生される成長分化因子 growth differentiation factor 9 (GDF9) を例に、卵胞培養モデルを用いて検討した。GDF9は莢膜細胞の増殖やアンドロゲン産生を促進するが、卵子内のGDF9発現をノックダウンするとこれらの反応は抑制された。この結果は、莢膜細胞層を形成する過程で、卵子由来のGDF9が能動的かつ促進的な

役割を担う可能性を示唆する。

2. 前胞状卵胞の発育と閉鎖：生体内で卵胞閉鎖が最も高頻度に生ずるのは、前胞状卵胞から胞状卵胞への移行期であり、この時期に卵胞がFSH依存性を獲得し生存し続けられるか否かが、その後の卵胞の運命（発育→排卵あるいは閉鎖）に極めて重要である。

①卵胞～顆粒膜細胞間のクロストーク

卵胞培養モデルにおいて、GDF9は、顆粒膜細胞の増殖と前胞状卵胞の発育を促進するだけでなく、卵胞の細胞アポトーシスや閉鎖を抑制した。卵子内のGDF9発現をノックダウンすると、顆粒膜細胞のアポトーシスが誘導され前胞状卵胞の発育は停止した。すなわち卵子由来のGDF9は、前胞状卵胞から胞状卵胞への移行期におけるアポトーシス抑制因子の一つであり、このステージの卵胞が生存・発育していくうえで不可欠なファクターである。さらには、GDF9をノックダウンすると顆粒膜細胞のFSH受容体発現が強く抑制されたことから、前胞状卵胞がFSH依存性を獲得するうえでGDF9は必須といえる。

②卵胞～莢膜細胞間のクロストーク

卵胞培養モデルにおいて、GDF9は前胞状卵胞の発育とアンドロゲン産生を促進するが、GDF9発現をノックダウンするとこれらの反応は抑制された。卵胞中のアンドロゲン機能を阻害するとGDF9誘導性の卵胞発育が抑制され、GDF9ノックダウンに伴う卵胞発育停止はアンドロゲン添加によってレスキューされた。以上の結果は、卵子由来のGDF9が、莢膜細胞のアンドロゲン産生量を調節することで、前胞状卵胞の発育を制御するという卵胞内メカニズムを推測させる。

③莢膜細胞～顆粒膜細胞間のクロストーク

人工卵胞壁モデルにおいて、莢膜細胞と共培養することで、顆粒膜細胞の①アポトーシスが抑制され、②増殖が促進されると同時に、③発育ステー

ジに応じた分化が誘導された。この事実は、顆粒膜細胞がさまざまな機能を発揮するうえで、莢膜細胞からのパラクライン調節が極めて重要であることを示唆する。

【成績2】《PCOSにおける卵子～顆粒膜細胞～莢膜細胞間クロストークの破綻と卵胞発育停止》

PCOSの本態を解明する目的で、高LH環境が前胞状卵胞に及ぼす影響を、卵胞培養モデルを用いて検討した。LHは前胞状卵胞から胞状卵胞への発育を促進するが、アンドロゲン機能を阻害するとLH誘導性の発育は抑制された。過剰なLH刺激は、莢膜細胞のアンドロゲン産生と17 α -hydroxylase発現を促進するが、卵子のGDF9と顆粒膜細胞のFSH受容体の発現は抑制された。高LH環境で前培養した前胞状卵胞をFSH刺激すると、FSH誘導性のcAMP産生と卵胞発育が減弱していた。以上の結果は、過剰なLH刺激によって莢膜細胞で産生された何らかの因子が、顆粒膜細胞のFSH受容体発現をパラクライン的に抑制する可能性を示唆する。すなわち、PCOSでは「過剰なLH刺激により卵子～顆粒膜細胞～莢膜細胞間のクロストークが破綻し、卵胞がFSH依存性をうまく獲得できない結果、卵胞発育が停止してしまう」という病態メカニズムが推測された。

【考察】

独自の実験モデルを用い、卵胞内の卵子～顆粒膜細胞～莢膜細胞間のクロストークを解析することで、①前胞状卵胞がFSH依存性を獲得するメカニズムと、②PCOSで卵胞発育が停止するメカニズムの一端を、それぞれ明らかにした。排卵誘発に抵抗性を示すpoor responderやPCOSを克服するためには、いったん破綻した卵胞のFSH依存性発育を回復させる必要がある。そのためには、卵巣内の莢膜細胞/アンドロゲン系を制御することが鍵になる可能性が示唆された。