

## 学位論文の要旨

※ 整理番号		ふりがな 氏名	はつとり 服部 かつしげ 克成
学位論文題目	<p>Luteinizing Hormone Facilitates Antral Follicular Maturation and Survival via Thecal Paracrine Signaling in Cattle (黄体化ホルモンは莢膜細胞由来のパラクライン作用を介してウシ胞状卵胞の成熟と生存に寄与する)</p>		

**【目的】** 卵巣刺激により一つでも多くの良質な卵子を獲得できるか否かが、体外受精や顕微授精など生殖補助医療（assisted reproductive technology, ART）の成功率を大きく左右する。成熟した卵子を得るためにには円滑な卵胞の発育・成熟が不可欠であり、従来その制御は卵胞刺激ホルモン（follicle stimulating hormone, FSH）を中心に研究されてきた。一方で、近年、卵巣機能が低下している（poor ovarian response, POR）女性に卵巣刺激を試みる際、FSH に黄体化ホルモン（luteinizing hormone, LH）刺激を加えることで、妊娠継続率が向上することが明らかとなり、卵胞の発育・成熟プロセスにおける LH の重要性が注目を集めている。

ヒトやウシといった単一排卵動物における卵胞成熟の指標は、①エストラジオール（E2）産生能の亢進、②インスリン様成長因子（IGF）系の活性化、③LH 受容体の発現（LH 依存性の獲得）、④顆粒膜細胞のアポトーシス抑制、が 4 大徴候とされる。本研究では、ウシ卵胞細胞を用いて人工卵胞壁モデルを作成し、卵胞におけるステロイドホルモン産生、IGF システム、ゴナドトロピン（FSH・LH）受容体、顆粒膜細胞アポトーシスを、LH が如何に制御しているか解析を試みた。

**【方法】** 単一排卵モデルであるウシの小胞状卵胞より顆粒膜細胞と莢膜細胞を単離し、従来の単層培養系を用意した。さらには、卵胞の基底膜に見立てたコラーゲン膜の表側に顆粒膜細胞を、裏側に莢膜細胞を培養することで、ウシ人工卵胞壁モデルを作成した。これら単層培養系と人工卵胞壁モデルを、FSH や LH で刺激したときの、ステロイドホルモン産生因子、IGF システム、FSH・LH 受容体発現、顆粒膜細胞アポトーシスの変化を、生化学的手法を用いて検討した。

**【結果】**

1) 単層培養系において、顆粒膜細胞を FSH や LH で刺激しても、顆粒膜細胞に何ら変化は生じなかつた。一方で、莢膜細胞を LH 刺激すると、莢膜細胞におけるステロイド産生因子（STAR, CYP11A1, CYP17A1）および IGF システム（IGF1, IGF1R）の mRNA 発現が誘導され、アンドロゲン産生が亢進した。

2) コラーゲン膜の表側に顆粒膜細胞を、裏側に莢膜細胞を培養して、人工卵胞壁モデルを作成した。莢膜細胞存在下で顆粒膜細胞を FSH で刺激すると、顆粒膜細胞における LH 受容体、IGF1、IGF2 の mRNA 発現が誘導され、顆粒膜細胞側の培養液中の E2 と IGF1 の濃度が上昇した。

次に、莢膜細胞を LH で刺激すると、パラクライン作用を介して、対側の反対側の顆粒膜細胞でアロマターゼ、LH 受容体、IGF1 の発現が誘導され、顆粒膜細胞側の培養液中の E2 と IGF1 の濃度が上昇した。したがって FSH と LH はともに、卵胞のエストロゲン産生と IGF システムを活性化すると考えられた。

3) 人工卵胞壁モデルにおいて、莢膜細胞を LH 刺激すると、対側の顆粒膜細胞で機能性のアロマターゼと LH 受容体が発現し、これらの反応はアンドロゲン受容体やエストロゲン受容体の特異的阻害剤により抑制された。単層培養系において、E2 は顆粒膜細胞の LH レセプターとアロマターゼの発現を直接誘導した。これらの事実は、莢膜細胞から顆粒膜細胞へのパラクラインシグナルが、アンドロゲンとエストロゲンであることを示唆する。

4) セラミド誘導性の顆粒膜細胞アポトーシスに、FSH や LH が及ぼす影響を、人工卵胞壁モデルを用いて検討した。顆粒膜細胞を FSH 刺激しても、顆粒膜細胞のアポトーシスは変化を認めなかつた。一方で、莢膜細胞を LH 刺激すると、対側の顆粒膜細胞でアポトーシスが抑制された。この LH によるアポトーシス抑制効果は、IGF 受容体の阻害剤でブロックされた。さらには、単層培養系において、IGF1 が顆粒膜細胞のアポトーシスを抑制し、増殖を促進した。これらの結果より、莢膜細胞を LH 刺激すると、卵胞局所の IGF システムが活性化し、顆粒膜細胞のアポトーシスが抑制されるメカニズムが推測された。

5) 顆粒膜細胞を低濃度 FSH で刺激しても、何ら変化は生じない。ところが、莢膜細胞を LH 刺激しながら、同時に顆粒膜細胞を FSH 刺激すると、顆粒膜細胞が低濃度 FSH に反応できるようになり、FSH 受容体・LH 受容体・アロマターゼの発現が誘導された。すなわち、莢膜細胞への LH 刺激は、顆粒膜細胞の FSH 感受性を上昇させると考えられた。

【考察】ウシ人工卵胞壁モデルを用いて、莢膜細胞への LH 刺激が、①莢膜細胞のアンドロゲン産生と、顆粒膜細胞のエストロゲン産生を促進すること、②顆粒膜細胞において機能的な LH 受容体の発現を誘導すること、③顆粒膜細胞の IGF システムを活性化すること、④莢膜細胞の IGF1 産生を誘導し、パラクライン的に顆粒膜細胞のアポトーシスを抑制し増殖を促進すること、⑤顆粒膜細胞の FSH 感受性を上昇させること、を明らかにした。これらの結果は、(a) LH 刺激が、卵胞局所のエストロゲン生合成を活性化することで、卵胞のゴナドトロピン感受性を上げる、(b) LH 刺激が、卵胞局所の IGF システムが活性化することで、顆粒膜細胞アポトーシスと卵胞閉鎖を抑制し、胞状卵胞の生存と発育を促進するメカニズムが推測された。

【結論】LH-莢膜細胞系は、卵胞局所（顆粒膜細胞および莢膜細胞）の IGF システムを活性化することで、卵胞の発育・成熟と生存に寄与している。POR 女性を卵巢刺激する際に、LH 刺激を加えることで、(a) 卵胞局所のエストロゲン活性が上昇し、卵胞のゴナドトロピン感受性が上昇すること、(b) 卵胞局所の IGF システムが活性化し、卵胞閉鎖が抑制されることによって、複数の卵胞が発育・成熟でき、結果として良好卵子を獲得できる可能性が推測された。今後 ART 成績の向上を目指すにあたり、最適な LH 刺激プロトコールの確立が必要と思われる。

備考 1 ※印の欄は、記入しないこと。

- 2 学位論文の要旨は、和文により研究の目的、方法、結果、考察、結論等の順に記載し、2,000 字程度にまとめタイプ等で印字すること。
- 3 図表は、挿入しないこと。