

70. リプロダクティブモデレーターとしての BMP の応用開発

大塚 文男

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 総合内科学

Key words : 卵巣, ホルモン, 生殖内分泌, 骨形成蛋白, 不妊

緒言

日本では高齢化に加えて少子化が急速に進行し、健全な社会を維持するには深刻な状態と言える。卵巣機能は種々の疾患や様々な原因によって障害されうるが、代表的な一病態として早発卵巣不全あるいは早期閉経による不妊では、傷害された卵母細胞は不可逆性であるために現状では妊孕性を回復する治療はない。これらの卵巣機能不全の解決が困難となる理由として、視床下部・下垂体・卵巣 (HPO) からなる生殖内分泌調節系で統御される卵胞の発育と機能分化、そして排卵までの生命現象の分子機構が完全に掌握されていないことが指摘できる。

我々は、卵巣に発現し卵胞発育を調節する BMP (Bone Morphogenetic Protein) 分子に着目して研究を進め、BMP が卵胞内の細胞間コミュニケーションとして機能的システムを形成して作動し、正常な卵胞発育・ステロイド合成に寄与することをこれまで報告してきた。本研究では、BMP の組織特異的な多機能性を卵巣から解析し、全身内分泌系へと拡大し、生殖内分泌の病態解析ツールや創薬への応用として発展すべく新たな研究を展開した。

方法および結果

1. 卵胞内 BMP 分子群による細胞間コミュニケーションの解析から

卵胞 BMP システムに着目し、顆粒膜細胞から卵、卵から顆粒膜細胞の双方向シグナルに着目して研究を進めた。まず、顆粒膜細胞転写因子 Foxl2 (Forkhead box L2) の機能に着目した。Foxl2 は発育過程の眼瞼組織・顆粒膜細胞および下垂体前葉 Gonadotrope 選択的に発現し、欠損では眼瞼欠損や周産期致死と原始卵胞形成からの減数分裂停止、セルトリ分化や卵巣機能不全 (POF) が生じる。Gonadotrope 特異的 Foxl2 欠損では FSH β の下垂体発現や Activin による FSH 誘導が減弱することから、Foxl2 は卵胞機能と FSH 分泌の両者に重要である。Foxl2 変異 (*FOXL2^{CI34W}*) は顆粒膜細胞腫瘍発生に関連するが、BMP/activin との機能連関があり、Smad2/3 シグナルの存在下で顆粒膜細胞における Aromatase 転写調節に寄与することが明らかとなった。

また、代表的な卵巣における病態として多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) を想定し、PCOS に見られる高 Androgen と IGF-I による BMP シグナルと卵胞ステロイド合成への影響を、ラット卵胞顆粒膜細胞の初代培養系を用いてアプローチした。IGF-I および Dihydrotestosterone (DHT) の存在下では Estradiol・Progesterone 産生能は濃度反応性に増加し、BMP により誘導される Smad リン酸化および Id-1 転写活性が減弱すること、その機序として BMP 受容体の発現レベルが減弱することが明らかとなった。IGF-I が Androgen receptor (AR) 発現を増強する一方で、DHT は IGF-IR の発現を抑制するフィードバック機構の存在も認められた。PCOS の環境形成に関わる IGF-I・Androgen 濃度の上昇は相互に作用し、共通して卵胞 BMP 受容体シグナルを抑制することで、FSH により誘導される顆粒膜細胞での Estradiol・Progesterone 産生を協調的に促すことが分かり、PCOS に見られるステロイド合成変調が明らかとなった。

さらに PCOS のインスリン抵抗性に対する治療という観点から、Melatonin 作用と比較して、Metformin や Incretin (GIP/GLP-1) 分子による卵胞ステロイド産生への影響について検討を進めた。その結果として、Metformin は Melatonin 同様に内因性 BMP 作用を減弱して Progesterone 産生を増強する方向に、GIP などの Incretin は卵胞 BMP シグナルを増幅することにより Progesterone 合成を減少させる作用が明らかとなり、インスリン抵抗性及び卵巣機能改善に見られる共通機転についてアプローチを進めている。

現在、Kit ligand (KL) /c-kit を介した卵胞成長機序、Estrogen の存在下で KL/c-kit が卵母細胞因子 BMP/FGF システムに及ぼす影響、PTEN/PI3K/AKT 抑制系の関与、PI3K 下流で BMP-15 発現の抑制など卵胞成長抑制的に作動する Forkhead 転写因子 Foxo3a について検討中である。

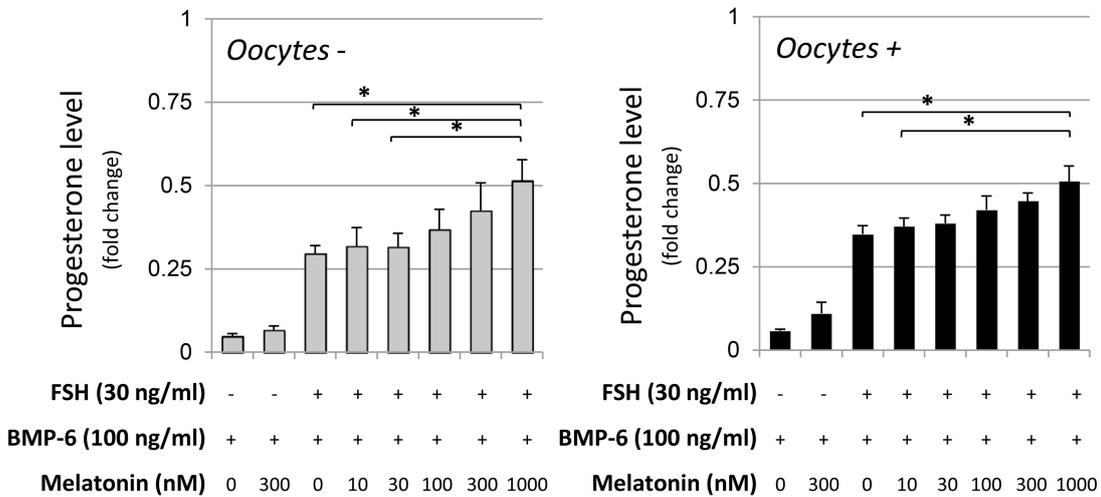


図 1. Melatonin による Progesterone 合成の促進と BMP の関与 (Rat granulosa cells)

ラット顆粒膜細胞初代培養を用いた実験において、卵母細胞 (Oocytes) の有無に関わらず、Melatonin 添加は BMP-6 による FSH 誘導性 Progesterone 合成の抑制作用に拮抗することが明らかとなった。* $P < 0.05$ by ANOVA.

2. 視床下部・下垂体を含む HPO 制御系における BMP 生理活性の探索から応用へ

卵巣での BMP 作用のみならず、中枢を含めた HPO 系において、Kisspeptin 作用が GnRH ニューロンに発現する BMP により制御されること、時間調節ホルモン Melatonin が下垂体前葉機能を抑制することに加え BMP の黄体化抑制に拮抗すること、また Melatonin は神経伝達物質カテコラミン分泌を副腎皮質ステロイドと BMP の影響化で制御することなど¹⁾、広汎でユニークな作用を突き止めた。

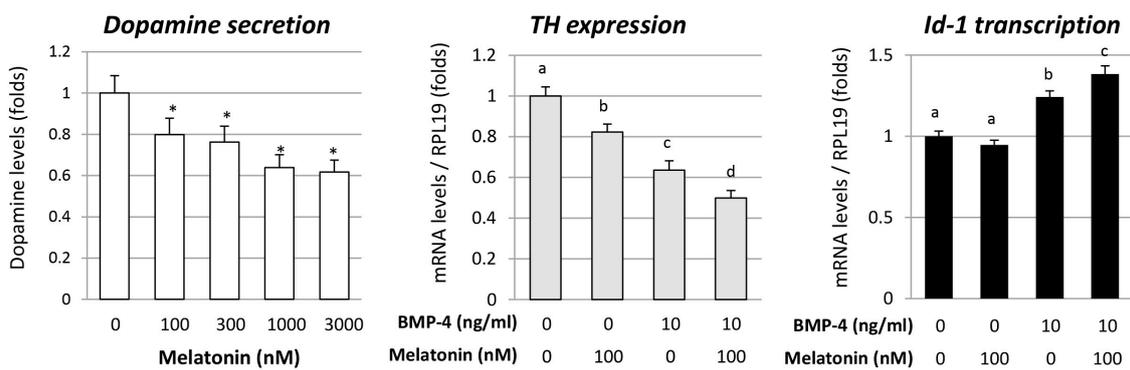


図 2. Melatonin による副腎髄質カテコラミン分泌への影響と BMP の関与 (PC12 cells)

ラット褐色細胞腫 PC12 細胞において、Melatonin は BMP-4 受容体シグナル (Id-1 転写活性) を増強して Dopamine 産生および Dopamine 合成酵素 (TH) の発現を抑制した。* $P < 0.05$ vs. control; and different alphabets indicate statistical difference by ANOVA.

現在、GnRH 制御因子である Kisspeptin・GnIH、そして概日リズム因子と卵巣 BMP の関連を網羅的に探索し、時計遺伝子と FSH/LH 分泌制御および卵巣内分泌系の三者の関連が明確になりつつある。時計遺伝子として正の因子 *Clock/Bmal* と負の因子 *Per/Cry* により形成される概日リズムにおいて、組織特異的の活性をもつ BMP が HPO 系へ及ぼす影響とその時相を把握し、BMP 作動性の解明に迫り、その臨床応用を目指したいと考えている。

下垂体からの Gonadotropin 分泌には視床下部 GnRH と下垂体局所因子の作用が関与するが、GnRH 誘導性の LH 分泌に着目し、BMP-6 と Somatostatin の相互作用について $L\beta$ T2 細胞を用いて検討したところ、BMP-6 存在下で Somatostatin による GnRH 誘導性の LH の抑制作用が増強され、BMP-6 による Somatostatin 受容体の増加を伴っていた²⁾。Somatostatin は卵巣ステロイド産生を抑制するが、その機序に内因性 BMP が寄与すること、Somatostatin は GnRH 誘導性の LH 分泌を抑制するが、下垂体 BMP が Somatostatin 反応性を調節して LH 分泌を調整することから、さらに概日リズム因子との関与についても検討中である。

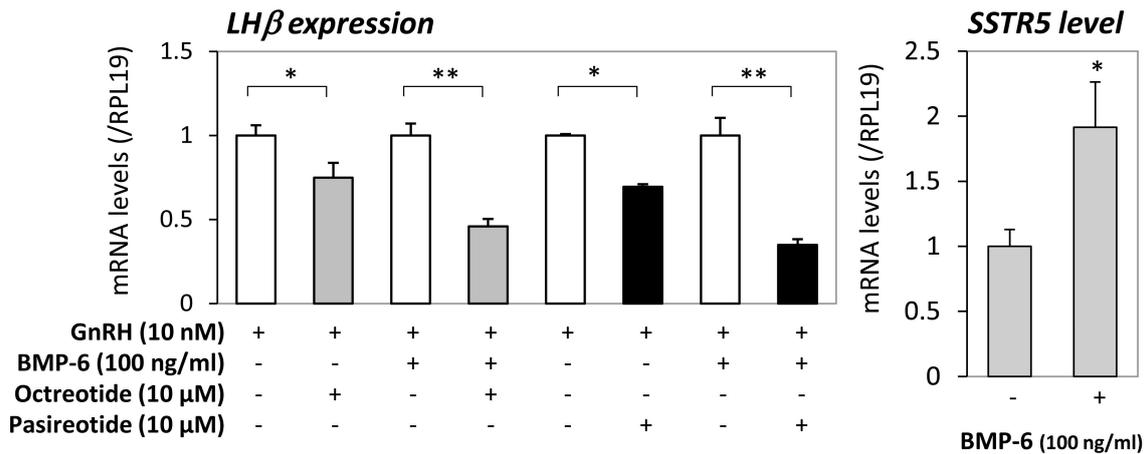


図 3. Somatostatin による下垂体 LH 分泌への影響と BMP の関与 ($L\beta$ T2 cells)

下垂体 Gonadotrope 由来 $L\beta$ T2 細胞を用いた実験において、BMP-6 が Somatostatin の SSTR5 受容体の発現を増加すること、Gonadotrope に発現する SSTR5 の upregulation によって、Octreotide よりも Pasireotide による LH 抑制反応を増強する可能性が示唆された。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ by unpaired *t*-test.

また、睡眠覚醒パターンや摂食行動・自律神経系の調節に関与する Orexin の Prolactin (PRL) 分泌への影響について検討した。Forskolin 刺激下では Orexin は PRL の発現を抑制したが、Orexin が BMP 受容体シグナルである Id-1 発現を減弱することから、Orexin が BMP に対して抑制的に作用する可能性も示唆された。

今後、卵より分泌される BMP 蛋白を卵母細胞機能の診断ツールとして利用するため、ELISA を確立し各病態での BMP 濃度変化を血中・局所で決定することを目指して検討を進めている。局所に存在する卵巣 BMP 分子と異なり ng/ml の高濃度で血液中を循環する BMP-9 が、全身的なステロイド合成系に及ぼす影響について検討し³⁾、Progesterone に加えて副腎皮質ホルモン産生にも抑制的に働くことも、新たに明らかとなった。

考 察

本研究の延長から、BMP を利用した卵発育促進、卵保存や体外卵成熟時の生殖医療、卵巣閉鎖や閉経発来を調節して骨粗鬆症を抑止への応用を期待している。医学・農学・繁殖学・発生学にシームレスに関与する生殖内分泌 BMP システムとしての新たな展開が目標である。卵と BMP 分子群により形成される複雑な卵巣内伝達系について、卵巣細胞共培養システムを用いて分子生物学的に詳細に紐解くとともに、BMP とリンクする卵巣内シグナルを見出すことで、卵と BMP により形成される卵巣細胞間コミュニケーション機構を探索する。

中枢から末梢まで網羅する BMP ネットワークとして時計遺伝子や松果体ホルモンなどのリズム形成因子との関連に着目し、HPO 系における BMP 作動系の機能解析を行い、生殖内分泌モデュレーター BMP として臨床応用へと発

展させたい。本研究の達成により、卵とそれを取り巻く内分泌環境に関して妊孕能と生殖病態を非侵襲的かつ簡易に診断できる検査として応用できる可能性を秘めるほか、異分野にも拡大できる付加価値を持つと思われる。

全身の組織で多彩な機能 [4, 5](#)) をもつ BMP を臨床の場へと応用し、卵巣や視床下部・下垂体機能低下による生殖内分泌機能障害の病態解析ツールや、不妊治療への創薬として開発すべく研究を継続・展開する予定である。

共同研究者

本研究は、本学の岩田菜穂子、細谷武史、西山悠紀、小松原基志、当真貴志雄、長谷川徹、藤田志帆、藤澤諭、木村耕介、勝山隆之らと遂行し継続中である。最後に、財団への謝辞を以下の論文 1), 2), 4) において申し添えました。

文 献

- 1) Komatsubara M, Hara T, Hosoya T, Toma K, Tsukamoto-Yamauchi N, Iwata N, Inagaki K, Wada J, Otsuka F. Melatonin regulates catecholamine biosynthesis by modulating bone morphogenetic protein and glucocorticoid actions. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017 Jan;165(Pt B):182-189. doi:10.1016/j.jsbmb.2016.06.002. PubMed PMID: 27267863
- 2) Toma K, Otsuka F, Oguni K, Terasaka T, Komatsubara M, Tsukamoto-Yamauchi N, Inagaki K, Makino H. BMP-6 modulates somatostatin effects on luteinizing hormone production by gonadotrope cells. *Peptides.* 2016 Feb;76:96-101. doi: 10.1016/j.peptides.2016.01.011. PubMed PMID: 26779985
- 3) Hosoya T, Otsuka F, Nakamura E, Terasaka T, Inagaki K, Tsukamoto-Yamauchi N, Hara T, Toma K, Komatsubara M, Makino H. Regulatory role of BMP-9 in steroidogenesis by rat ovarian granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015 Mar;147:85-91. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.12.007. PubMed PMID: 25527306
- 4) Kimura K, Terasaka T, Iwata N, Katsuyama T, Komatsubara M, Nagao R, Inagaki K, Otsuka F. Combined Effects of Androgen and Growth Hormone on Osteoblast Marker Expression in Mouse C2C12 and MC3T3-E1 Cells Induced by Bone Morphogenetic Protein. *J Clin Med.* 2017 Jan 5;6(1). pii: E6. doi: 10.3390/jcm6010006. PubMed PMID: 28067796
- 5) Katsuyama T, Otsuka F, Terasaka T, Inagaki K, Takano-Narazaki M, Matsumoto Y, Sada KE, Makino H. Regulatory effects of fibroblast growth factor-8 and tumor necrosis factor- α on osteoblast marker expression induced by bone morphogenetic protein-2. *Peptides.* 2015 Nov;73:88-94. doi: 10.1016/j.peptides.2015.09.007. PubMed PMID: 26409788