

主 論 文

Incretins modulate progesterone biosynthesis by regulating bone morphogenetic protein activity in rat granulosa cells

(インクレチンによる卵巣ステロイド合成への影響とその機序の検討)

【緒言】

インクレチンである GIP, GLP-1 は血糖依存性に膵臓からのインスリン分泌を促進する消化管ホルモンであり、骨、中枢神経系、脂肪組織、心臓など多数の膵外作用を有する。多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) 患者ではインスリン抵抗性が高アンドロゲン血症や排卵障害に関与することが知られているが、近年 PCOS 患者においてインクレチン分泌パターンの変化を認めることが報告され、病態への関与が示唆されている。しかしながら、インクレチンの卵巣における作用や PCOS におけるインクレチン分泌変化の病態学的意義については未だ十分明らかでない。

卵胞の成長、成熟は、ゴナドトロピンと骨形成蛋白 BMP (bone morphogenetic protein) を含む様々な卵巣局所因子の autocrine-paracrine 作用により生ずる。BMP は卵胞構成細胞特異的にリガンドや受容体を有し、卵巣ステロイド産生や細胞分化増殖を調節するが、共通して顆粒膜細胞における FSH 誘導性 Progesterone 産生を抑制することから黄体化抑制因子として働くと考えられている。また BMP-6 はラット顆粒膜細胞を用いた検討において、主席卵胞の選択過程で発現が減少することから卵胞発育過程における選択に重要な役割を果たす可能性が示唆されており、さらに PCOS 患者の顆粒膜細胞においては BMP-6 の過剰発現を認めることも明らかになってきた。以上の背景をもとに、今回我々はラット卵胞顆粒膜細胞の初代培養系を用いて、インクレチンの卵巣ステロイド合成に与える影響について BMP-6 に着目して検討を行った。

【材料と方法】

試薬と材料

実験動物として雌 Sprague-Dawley rats (Charles River) を、初代培養培地として Medium 199, McCoy 5A, HEPES (Invitrogen社)、penicillin-streptomycin solution (Sigma-Aldrich社) を使用した。培養試薬として Diethylstilbestrol (DES), ovine pituitary FSH, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1) human, Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP) human, 4-androstene-3,17-dione (Sigma-Aldrich社)、human BMP-6 (R&D system)を使用した。

ラット卵胞顆粒膜細胞の初代培養

22日齢の雌 SD ラットに DES (10 mg) カプセルを皮下に埋め込み、3-4 日後に卵巣を摘出して 27Gauge-syringe needle を用いて卵母細胞 (oocyte) と顆粒膜細胞 (granulosa cell) を採取した。卵母細胞・顆粒膜細胞懸濁液を段階的に cell strainer (100 μ m および 40 μ m ; BD Falcon 社) を用いて分離し、顆粒膜細胞のみを抗生剤を混じた McCoy 5A による無血清培地にて培養した。

Estradiol・Progesterone および cAMP 測定

顆粒膜細胞 (1×10^5 cells/200 μ l) を androstenedione (100 nM) と FSH (30 ng/ml) を混じた McCoy 5A の medium に GIP や GLP-1 を加え、96-well plate にて 37°C 5%CO₂ 条件下で培養した。48 時間培養後に培養液を回収し、培養液中の Estradiol と Progesterone を CLIA 法 (Cayman Chemical 社) にて測定した。培養液中の cAMP は IBMX (0.1mM) を混じて 48 時間の培養後 ELISA 法 (Enzo Life Sciences 社) にて測定した。

RNA 抽出・RT-PCR と定量リアルタイム PCR 解析

顆粒膜細胞 (5×10^5 cells/1 ml) を McCoy 5A 培地で培養し、FSH, GIP, GLP-1 を加え、12-well plate にて 48 時間培養後、TRIzol (Invitrogen 社) を用いて細胞中の total RNA を抽出した。RNA (1 μ g) より cDNA を作成し、GIP, GLP-1 受容体について RT-PCR を行い、電気泳動を行った。P450scc, StAR, 3 β HSD, P450arom, BMP 標的遺伝子 Id-1, FSH 受容体, GIP/GLP-1 受容体, BMP 受容体, Smad の mRNA 発現レベルはリアルタイム PCR 法にて定量し (Roche Diagnostics

社)、各データは ribosomal protein L19 (RPL19) 発現量で標準化した。

ウェスタンブロット解析

顆粒膜細胞 (2.5×10^5 cells/500 μ l) を GIP あるいは GLP-1 を添加した McCoy 5A 培地で 24-well plate にて 24 時間培養後、BMP-6 を添加し 1 時間刺激した。その後 RIPA lysis buffer (Upstate Biotechnology) で細胞を溶解し、SDS-PAGE にて展開した後、抗 pSmad1/5/8(9)抗体 (Cell Signaling Technology 社)、抗 actin 抗体 (Sigma-Aldrich 社) を用いてイムノブロット解析を行った。各シグナル強度は C-DiGit Blot Scanner System (LI-COR Bioscience) により解析した。

統計解析

すべての結果は少なくとも異なる 3 回以上の実験データの平均値と標準誤差 (SEM) により示した。各群の有意差は、ANOVA および t 検定によって解析し、 P 値 < 0.05 を有意とした。

【結果】

ラット卵巣に GIP・GLP-1 受容体の発現を確認した。GIP, GLP-1 (30-300 μ M) はともに FSH (30 ng/ml) による Progesterone 産生を抑制し、その抑制作用は GLP-1 (300 μ M) と比べ GIP (300 μ M) の方が強かった。一方、GIP, GLP-1 (30-300 μ M) は FSH 誘導性の Estradiol 産生には影響を与えず、GIP, GLP-1 単独 (100 μ M) では Progesterone 及び Estradiol 基礎値に変化を認めなかった。FSH 誘導性 Progesterone 産生を抑制するメカニズムについて検討するため cAMP を測定した結果、GIP, GLP-1 は FSH 誘導性の cAMP 産生を抑制した。また、ともに FSH 誘導性の StAR, P450scc, 3β HSD を含む Progesterone 合成酵素系の mRNA 発現レベルを抑制したが、P450arom には影響を与えなかった。次に、顆粒膜細胞における Progesterone 産生を特異的に抑制する BMP-6 との関連を検討したところ、GIP (300 μ M) は BMP-6 (30 ng/ml) による Smad1/5/8 リン酸化及び標的遺伝子 Id-1 の mRNA レベルを増強し、一方 BMP-6 刺激により GIP 受容体の mRNA 発現レベルが抑制されたことから、両者の間におけるフィードバックの存在が示唆された。GLP-1 による BMP 受容体シグナルへの影響は認めなかった。さらに GIP, GLP-1 による BMP 受容体活性への影響を検討した結果、GIP, GLP-1 はともに BMP-I 型受容体 (ALK-2,3,6) のうち ALK-3 発現を増強し、抑制性 Smad (Smad6,7) のうち Smad6 発現を抑制すること、GIP ではさらに ALK-6 発現を増強することが示された。

以上より、インクレチンが顆粒膜細胞における FSH 誘導性 Progesterone 産生を抑制すること、そのメカニズムの一つとして内因性 BMP-6 受容体シグナルの増強を介することが明らかとなった。

【考察】

PCOS では BMP が病態学的に関与することが示唆されており、GDF-9 ノックアウトマウスの卵巣では PCOS の表現型を呈することや、ヒト PCOS 卵巣では GDF-9 mRNA 発現の遅延、減少を認めること、また PCOS 患者から単離した顆粒膜細胞では体外受精を受けた患者の正常顆粒膜細胞と比較し BMP-6 発現の増加を認めることなどが報告されている。

また高アンドロゲン血症は PCOS における月経異常や排卵障害の要因の一つとされるが、非肥満 PCOS 患者における検討では血中アンドロゲンと GIP レベルが正の相関を示したという報告があり、アンドロゲンと GIP の相互作用が PCOS のインスリン抵抗性や生殖機能障害に関与していることも示唆されている。これに関連して我々は最近、ラット顆粒膜細胞を用いた研究でアンドロゲンと IGF-I が協調的に BMP を介して FSH 誘導性の Progesterone 合成を促進することを明らかにした。

インクレチンは膵 β 細胞においては主にアデニル酸シクラーゼ (AC) を活性化し、細胞内 cAMP を増加させることでインスリン分泌を促進することが知られているが、本研究ではインクレチンが顆粒膜細胞における FSH 誘導性 cAMP 産生を抑制する結果であった。以前我々は BMP-6 が AC を阻害し、cAMP を抑制することにより FSH 誘導性 Progesterone 合成を抑制することを報告しており、今回の結果はその影響が考えられた。インクレチンは組織により異なるシグナル伝達経路を有する可能性があり、今後の検討課題である。

PCOS 患者のインクレチン分泌については、健常者と比べ糖負荷後の GIP レベルの上昇及び後期相の GLP-1 レベルの低下を認めるという報告や、糖負荷後の GIP、GLP-1 レベルいずれも上

昇するという報告がある一方、肥満 PCOS 患者では健常者あるいは妊娠糖尿病患者と比べ糖負荷後の GIP レベルの低下を認めるという報告もあり一定した結果は得られていない。しかしながら、インクレチン分泌パターンの変化が PCOS の病態や活動性に影響を与えている可能性はあり、PCOS 患者に対する GLP-1 受容体アゴニストの投与が体重やインスリン感受性など代謝面での改善効果に加えて月経周期や妊娠率の改善効果を示したという報告もある。我々は以前に、PCOS の妊孕性改善に効果があるとされるメラトニンやソマトスタチンアナログのラット顆粒膜細胞における卵胞ステロイド合成系への影響について検討し、ソマトスタチンアナログはインクレチンと同様に BMP-6 活性を増強することにより FSH 誘導性 Progesterone 産生を抑制すること、一方メラトニンは BMP-6 活性を抑制することにより FSH 誘導性 Progesterone 産生を促進することを明らかにした。インクレチンを含めたこれらの薬剤は卵胞 BMP システムを介した卵胞発育や卵胞ステロイド産生の調節に有用である可能性がある。

【結論】

ラット卵巣には GIP 及び GLP-1 受容体の発現を認め、GIP, GLP-1 はともに顆粒膜細胞における FSH 誘導性 Progesterone 産生を抑制した。GIP は GLP-1 と比べより強い Progesterone 抑制作用を有し、その作用機序として BMPI 型受容体 (ALK3,6) の発現増強、抑制性 Smad6 の発現抑制を介して内因性 BMP-6 受容体シグナルを増強することが明らかとなった。また BMP-6 は GIP 受容体発現レベルを抑制したことから両者間のフィードバック機構の存在も示唆された。以上より卵胞ステロイド産生における GIP/BMP/FSH 分子間の新たな機能連関が明らかとなった。今後インクレチン製剤が PCOS で見られる卵巣機能障害に対する治療選択肢の一つになることが期待される。