

生殖内分泌学への新たな重要因子：BMP-15

大塚 文男

岡山大学大学院医歯学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学

はじめに

近年、卵巣自体で産生される局所因子がゴナドトロピンを中心とする元来の内分泌調節系と協調的に卵巣成長・成熟を修飾していることが明らかとなり、卵巣における生殖内分泌の動態はいっそう複雑なものであることが分かってきた。卵巣の発育過程において、顆粒膜細胞の増殖・分化・成長のいずれもが重要な要素といえるが、われわれはこれらの機能を合わせもつ細胞増殖因子、骨形成蛋白Bone Morphogenetic Protein (BMP) に着目して研究を進めてきた。BMPは、TGF- β ・インヒビリン・アクチビン・Vg1・ミューラー管抑制物質 (MIS/AMH) などを含むTGF- β スーパーファミリーメンバーに属する分子であり、初期胚の器官形成や中胚葉誘導にも重要な役割を果たしている。

卵巣におけるBMPの発現パターン

BMPリガンドの卵巣での発現には種差がみられるが、

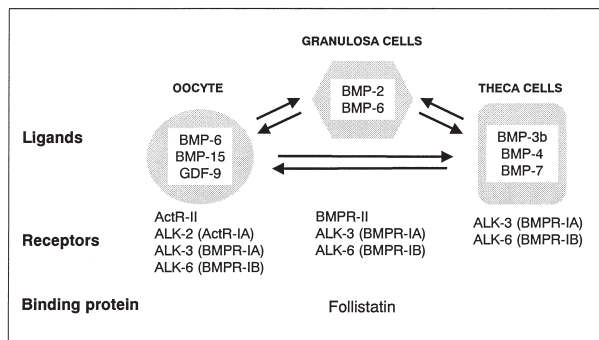


図1 卵巣におけるBMPシステム：卵巣を構成する卵母細胞・顆粒膜細胞・莖膜細胞にはBMPリガンドとBMPのI型・II型受容体およびその結合蛋白フォリスタチンが存在し、オートクライン・パラクライン機序により卵巣成長を調節していると考えられる。

連絡先：大塚文男，岡山大学大学院医歯学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学，〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1
TEL: 086-235-7235
FAX: 086-222-5214
E-mail: fumiotsu@md.okayama-u.ac.jp

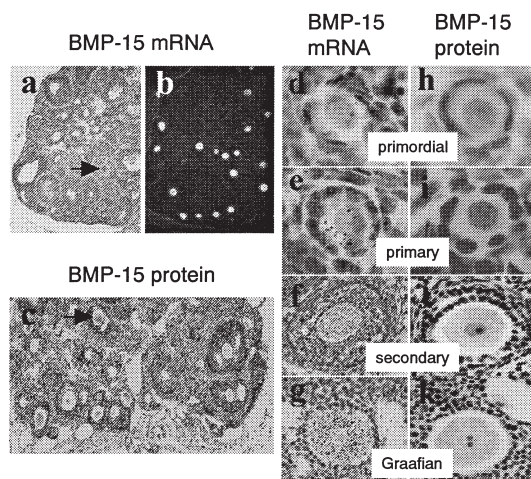


図2 卵巣におけるBMP-15 mRNAおよび蛋白の発現パターン：ラット卵巣における組織学的検討から、BMP-15のmRNAおよび蛋白が卵母細胞特異的に発現しており、一次卵胞から排卵前の成熟卵胞まで発現が維持されている（→：卵母細胞）。

現在までにBMP-2, -3, -3b, -4, -6, -7, -15とGDF-9の発現が明らかとなっている [1, 2]. 分布のパターンはリガンド間で異なっており、BMP-2は顆粒膜細胞に、BMP-4, -7は莖膜・間質細胞に、BMP-6, -15, GDF-9は卵母細胞に特徴的に発現している (図1). このうちBMP-15の発現パターンは、より卵母細胞に特異的であり、マウス・ラット・ヒトの卵巣において卵母細胞にのみ強く発現している [3]. マウスの検討では、卵母細胞のBMP-15 mRNAは一次卵胞から出現し、その発現は卵巣成長に伴い増強する。ラットでの検討では、BMP-15のmRNAとともに蛋白も同時に卵母細胞に検出され、一次卵胞から排卵前の成熟卵胞まで発現が維持される (図2).

またBMP受容体として、BMPのI型受容体 (BMPRIAとBMPRIIB) とII型受容体 (BMPRII) の発現が卵巣において証明されている [4]. ラット卵巣ではI型受容体のうちBMPRIA (ALK-3) が卵母細胞と顆粒膜細胞に分布し、とくに卵母細胞に強く発現する。BMPRIIB (ALK-6) も卵母細胞とともに一次卵胞以降の顆粒膜細胞に分布を認める (図1). 一方、BMPRIIの発現パタ

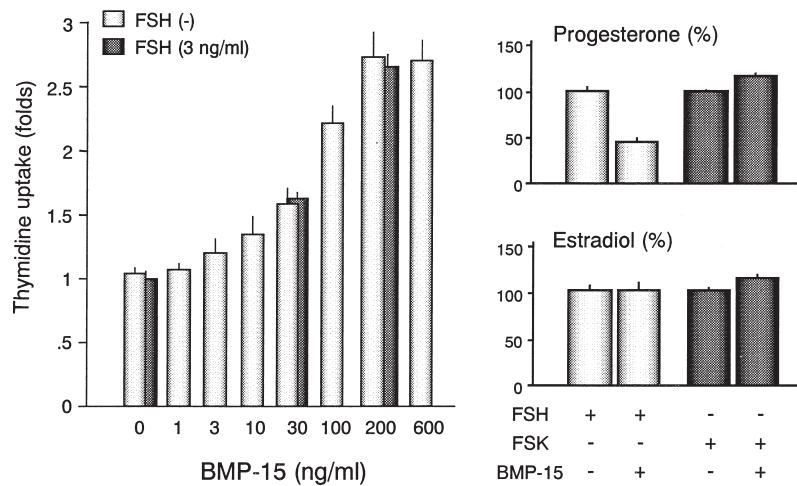


図3 BMP-15の顆粒膜細胞における作用：ラット顆粒膜初代培養細胞において、BMP-15はFSH非依存的にDNA合成（thymidine取り込み）と細胞増殖を促進する。顆粒膜細胞によるステロイド産生において、BMP-15はFSH刺激によるプロゲステロン合成を抑制するがエストラジオール合成には影響しない。またBMP-15は、forskolin（FSK）により誘導されるステロイド合成には影響しない。

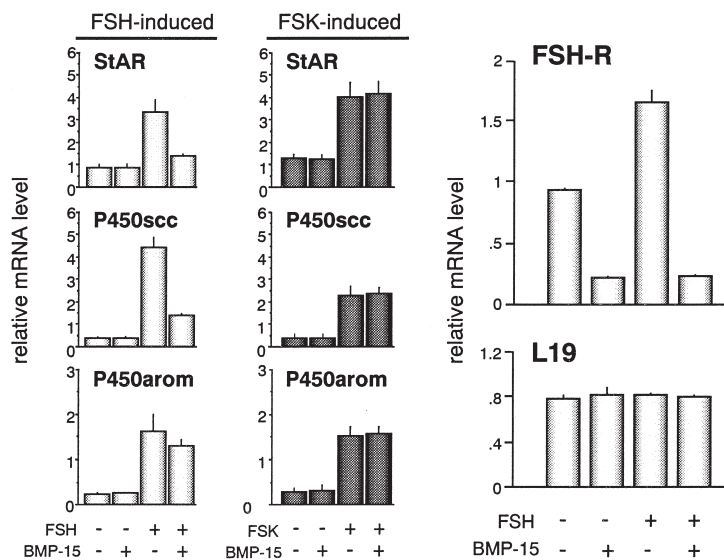


図4 BMP-15によるステロイド合成酵素およびFSH受容体発現の調節：ラット顆粒膜初代培養細胞において、BMP-15はFSHによって増加したStAR・P450sccのmRNAレベルを抑制するがP450aromには影響しない。またforskolin（FSK）により誘導されるStAR・P450sccの発現はBMP-15によって抑制されない。BMP-15は顆粒膜細胞におけるFSH受容体（FSH-R）のmRNAレベルを直接抑制することにより、FSHの作用を広く抑制する。

ーンはほとんど顆粒膜細胞に局限しており、二次卵胞の最初の段階から強く発現する。またヒツジの卵巣でもBMPRIA（ALK-3）、BMPRIB（ALK-6）、BMPRIIのすべてのBMPレセプターが一次卵胞から成熟卵胞に至るまでの顆粒膜細胞に発現しており、一部は卵母細胞・莖膜細胞および黄体にも発現する。これらの卵巣に存在するBMPリガンドとレセプターが、オートクライン・パラクライン機序によって卵胞を構成する細胞間でのコミュニケーションを形成していると考えられる（図

1)[1, 2].

顆粒膜細胞におけるBMP-15の作用と卵胞成長における役割

卵母細胞に発現する新しいBMP分子、BMP-15については1998年のクローニング以降その作用は卵巣のみならずまったく不明であった。われわれはHEK293細胞を用いてBMP-15のstable transformantを作成し、リコンビ

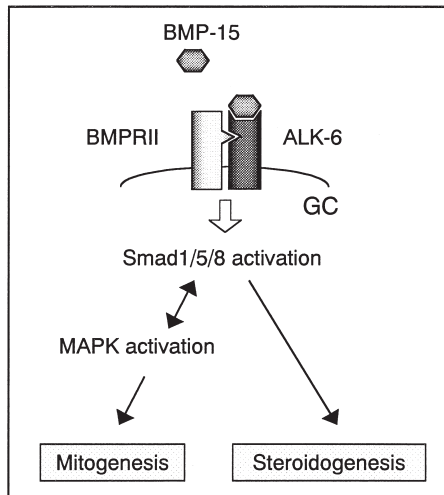


図5 BMP-15受容体とシグナル伝達機構：BMP-15は顆粒膜細胞においてBMPRII (ALK-6) とBMPRIIに結合し、Smad1/5/8のリン酸化を介してsteroidogenesisとmitosisへの作用を發揮する。とくにBMP-15の細胞増殖作用にはMAPK (ERK) の活性化も寄与していると考えられる。

ナントBMP-15蛋白を精製してその機能解析を行った [3]. ラット顆粒膜細胞の初代培養系を用いた bioassayの結果 (図3), ①BMP-15はFSH非依存的に顆粒膜細胞のDNA合成・細胞増殖を刺激すること, また②BMP-15はFSHによるプロゲステロン産生を抑制するがエストラジオール産生には影響しないこと, さらに③FSHによって誘導されるステロイド合成酵素, LH受容体, インヒビン・アクチビンなどの発現もBMP-15で強く抑制されることを明らかにした [3, 5]. しかし forskolinで誘導された因子についてはBMP-15により抑制されない点から (図4), BMP-15の作用点がadenylate cyclase (AC) よりも上流に位置していることが示唆された. ついで行われたFSH受容体の発現・転写レベルの検討により, ④BMP-15が直接的にFSH受容体の発現を抑制することが判明し, これによってBMP-15がすべてのFSH作用を抑制することが示唆された (図4) [5]. BMP-15は顆粒膜細胞上のBMPRII (ALK-6) とBMPRII受容体に結合すること, Smad1/5/8のリン酸化シグナルが惹起されることも明らかとなった [6]. しかしBMP-15による顆粒膜細胞の増殖作用はMAPK (ERK) の阻害によって抑制されることから, BMP-15の顆粒膜細胞での生理活性にはSmadに加えてMAPKの活性化も関与しており, 新しいBMPシグナルのクロストークとして興味深いと考えられた (図5). このERKの抑制はBMP-15によるFSH作用の抑制には影響しないことから, 顆粒膜細胞における

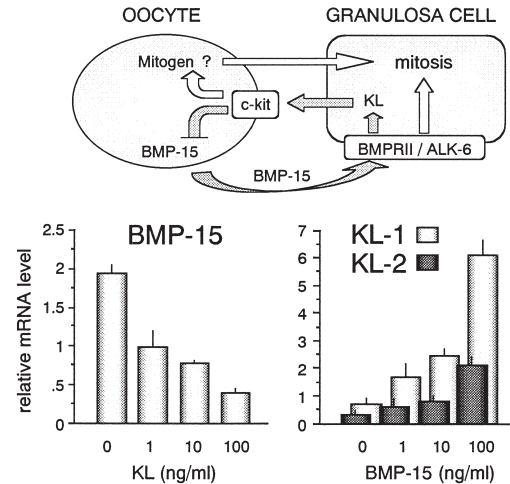


図6 BMP-15による顆粒膜細胞の増殖メカニズム：BMP-15は顆粒膜細胞からのkit ligand (KL)-1, 2の発現を刺激する一方で, KLは卵母細胞からのBMP-15の発現レベルを減少させる. さらに卵母細胞のc-kit作用を中和抗体によって抑制するとBMP-15の細胞増殖作用が抑制されることから, 卵母細胞と顆粒膜細胞間でのKL/c-kitシグナルの活性化が顆粒膜細胞増殖のキープ・ファクターであると考えられる. しかしそれには卵母細胞から顆粒膜細胞へのなんらかのmitogen “?” の存在が必要である.

steroidogenesisとmitosisにおいて, BMP-15は異なるシグナル伝達系を活性化する可能性がある.

BMP-15の顆粒膜細胞におけるmitogenとしての作用には, 卵母細胞と顆粒膜細胞間の細胞間シグナルが重要と考えられる. Kit ligand (KL) は初期卵胞の卵母細胞発育に必須の因子であるが, BMP-15はこの顆粒膜細胞のKL発現を増強し一方でKLは卵母細胞由来のBMP-15の発現を抑制する (図6). さらにKLの受容体である卵母細胞側のc-kitシグナルを阻害すると, BMP-15による顆粒膜細胞の増殖が抑制される. このようにBMP-15とKL/c-kitには細胞間レベルで負のフィードバック機構が形成されており, この機能連携 “oocyte-granulosa cell communication” によって顆粒膜細胞の増殖刺激が調節されていることが示唆された [7].

これらのBMP作用は, 細胞外の結合蛋白によっても間接的に制御されている (図1). 顆粒膜細胞で産生されるフォリスタチンはアクチビンに強く結合してアクチビン作用を抑制する結合蛋白であるが, BMPについてもBMP-2,-4,-7,-4/7に対する活性阻害作用が示されている. BMP-15もフォリスタチンと比較的高い親和性で結合し, BMP-15の細胞増殖活性やステロイド合成調節能が中和されることが明らかとなった [8]. 今後, Noggin・Chordinなど他のBMP結合蛋白の存在と作用についても検討を加える必要がある. さらにBMP-15は卵母細胞のみならず下垂体前葉ゴナドトロープにおいて

も発現しており、FSHの β 鎖の転写を増強してFSHの産生を促進する [9]。この作用はFSHに特異的であり、LH産生やGnRH受容体の発現には影響しない。卵巢でのFSH受容体の発現調節に加えて、下垂体ゴナドトロープではFSH分泌を調節するBMP-15は、下垂体—卵巢内分泌系を全身的に制御する非常に興味深い分子であると考えられた。

卵母細胞由来BMP-6との相違点

卵母細胞から分泌される他のBMP、BMP-6の作用についてBMP-15と比較検討した。ラット顆粒膜初代培養細胞において、BMP-6はFSHによるプロゲステロン産生を抑制するがエストラジオール産生には影響しない [10]。顆粒膜細胞のStARやP450_{scc}、インヒビン・アクチビン、LH受容体などの種々のFSH依存因子の発現についてもBMP-6は抑制的に作用する。BMP-6はadenylate cyclase (AC)を直接活性化するforskolinによって誘導した因子についても抑制するが、8-Br-cAMPによってPKAを直接刺激した場合には作用しないことから、このBMP-6の作用点はAC活性化からcAMP産生の段階であることが示唆された [10]。またBMP-6は、BMP-15や莖膜細胞由来のBMP-7 [11]とは異なり、顆粒膜細胞の増殖には影響しないことも特徴的である。このようにBMP-15は、顆粒膜細胞のsteroidogenesisにおいてBMP-6と重複した役割をもつにもかかわらずその作用点が違うこと、また顆粒膜細胞の増殖作用をもつ点においてBMP-6と異なっている。

生殖内分泌におけるBMP-15の意義

自然発症的に不妊となるヒツジ (Inverdale・Hanna種) が存在するが、この原因遺伝子 (FecX¹・FecX^H) はX染色体にリンクしており、ホモ体では不妊をヘテロ体では多胎・多産という生殖表現型を呈する。この遺伝子の本体が*bmp-15*遺伝子であるという発見は、生殖内分泌におけるBMP-15研究のブレイクスルーとなった [12]。このInverdale種では成熟活性型BMP-15の31番目のアミノ酸がバリンからアスパラギン酸 (V31D) に変異しており、Hanna種では成熟活性型BMP-15の23番目のアミノ酸が停止コドンへと変異している。いずれの変異もBMP-15活性を損なう重要な変異と考えられる。これまでの検討結果から考察すると、InverdaleやHanna種のホモ体では、活性型BMP-15が完全欠損となるためにKL/c-kit系の活性化が中断され顆粒膜細胞の

増殖が停止する結果として不妊となるものと考えられる。一方ヘテロ体の表現型には、BMP-15のFSH受容体への作用が寄与している可能性がある。ヘテロ体の卵巢には特徴的にエストロゲン産生性の小型卵胞が多く存在し、その顆粒膜細胞でのLH反応性が亢進していること、形成された黄体も小型であることなどから、なんらかの異常によって卵胞発育の未成熟排卵 (precocious ovulation) が生じている。おそらくヘテロ体ではBMP-15活性の低下によって顆粒膜細胞のFSH感受性の抑制が不完全となり、発育早期の卵胞から十分なselectionやmaturationの過程を経ずに排卵が生じ、多産という表現型を引き起こすものと考えられる。またInverdale変異をもつBMP-15と正常なGDF-9をHEK293T細胞に共発現した場合に、GDF-9成熟蛋白の正常なプロセッシングが障害されることも明らかとなり [13]、Inverdaleホモ体の不妊の原因として活性型GDF-9の分泌低下も寄与しているようである。最近みつけた*bmp-15*遺伝子の新しい変異 (FecX^B) をもつBelclare・Cambridge種のヒツジの生殖形質もInverdale・Hanna種と同様であるが、この場合にもBMP-15成熟蛋白のアミノ酸置換 (S99I) の存在によりBMP-15とGDF-9両方の成熟蛋白の分泌が抑制されることが示された [14]。さらに最近になり、高ゴナドトロピン性卵巢不全のイタリア人姉妹例において*bmp-15*遺伝子のヘテロ変異の存在が報告された [15]。この変異では、BMP-15プロ蛋白部位のアミノ酸置換 (Y235C) が生じるためにBMP-15成熟蛋白のプロセッシングに異常をきたし、正常なBMP-15による細胞増殖作用に干渉する。この発見は、ヒトの原発性卵巢機能低下やゴナドトロピン分泌異常の原因にBMP-15の機能異常が関与する可能性を示唆する重要なものである。

おわりに

このように、哺乳類卵巢機能の調節に卵巢BMPシステムが非常に重要な役割を担っていることが徐々に明らかになりつつある。今後、BMPシステムがヒトの生殖生理や生殖病態にどのように関わるかを明らかにし、病態診断のための検査やその治療への臨床応用を試みたい。

謝辞

この度、本学会の学術奨励賞を受けるにあたり、本研究の総指揮・指導をしていただいたShunichi Shimasaki教授

(University California, San Diego, USA) に深く感謝の意を表します。

文 献

1. Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF (2004) The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 25, 72-101.
2. Shimasaki S, Moore RK, Erickson GF, Otsuka F (2003) The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. *Reproduction (Suppl)* 61, 323-327.
3. Otsuka F, Yao Z, Lee TH, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S (2000) Bone morphogenetic protein-15: Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 275, 39523-39528.
4. Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, Kim H, Iemura S, Ueno N, Sampath K, Chang RJ, Erickson GF (1999) A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 7282-7287.
5. Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S (2001) Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J Biol Chem* 276, 11387-11392.
6. Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S (2003) Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *J Biol Chem* 278, 304-310.
7. Otsuka F, Shimasaki S (2002) A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 8060-8065.
8. Otsuka F, Moore RK, Iemura S-I, Ueno N, Shimasaki S (2001) Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 961-966.
9. Otsuka F, Shimasaki S (2002) A novel function of bone morphogenetic protein-15 in the pituitary: selective synthesis and secretion of FSH by gonadotropes. *Endocrinology* 143, 4938-4941.
10. Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S (2001) Biological function and cellular mechanism of bone morphogenetic protein-6 in the ovary. *J Biol Chem* 276, 32889-32895.
11. Lee W, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S (2001) The effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod* 65, 994-999.
12. Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MPE, Juengel J L, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O (2000) Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genet* 25, 279-283.
13. Liao WX, Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S (2003) Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9. Implication of the aberrant ovarian phenotype of BMP-15 mutant sheep. *J Biol Chem* 278, 3713-3719.
14. Liao WX, Moore RK, Shimasaki S (2004) Functional and molecular characterization of naturally occurring mutations in the oocyte-secreted factors bone morphogenetic protein-15 and growth and differentiation factor-9. *J Biol Chem* 279, 17391-17396.
15. Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L (2004) Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet* 75, 106-111.