

# OocyteとBone Morphogenetic Proteinによる 卵胞顆粒膜細胞でのステロイド産生調節メカニズム

大塚 文男

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学

## はじめに

卵胞におけるステロイド合成は、FSH (follicle-stimulating hormone) および卵巣局所のさまざまな因子により調節されている。卵胞に発現するBMP (bone morphogenetic protein) 分子は共通して顆粒膜細胞でのFSHによるprogesterone: P4産生を抑制するが、estradiol: E2産生に対する作用はリガンドにより異なっている。われわれは、BMP-6とBMP-7の卵胞ステロイド産生への作用の違いに着目し、ラット顆粒膜初代培養細胞を用いてE2, P4産生に対するBMPの作用機序とoocyteの役割について検討した。今回の検討では、BMP分子による顆粒膜細胞でのE2産生調節に重要な細胞内シグナルとoocyte-granulosa cell communicationによる新たな機能連携の存在が明らかになった [1]。

## 卵胞におけるBMPシステム

発育卵胞におけるBMPはリガンド間で異なる分布を呈し、BMP-2, -6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oocyteに特徴的に発現が認められる [2-4]。一方、BMP受容体ではBMPのI型受容体 (ALK-2, -3, -6) とII型受容体 (BMPRII, ActRII) の発現が卵巣において証明されている [2, 5-7]。ラット卵巣ではI型受容体のうちALK-3がoocyteと顆粒膜細胞に分布し、とくにoocyteに強く発現する。ALK-6もoocyteとともに一次卵胞以降の顆粒膜細胞に分布を認める。II型受容体では、BMPRIIが顆粒膜細胞を主体に発現し、ActRIIはoocyteを主体に発現する [7]。これらの卵巣に存在するBMPリガンドと受容体に加えて、顆粒膜細胞に発現するfollistatinをはじめとするBMP結合蛋白 [8] を含め、BMPシステムとし

てautocrine-paracrine作用により卵胞を構成する細胞間での機能的連携を形成していると考えられる。

## BMP-6とBMP-7による卵胞ステロイド合成調節に対する作用の相違

Diethylstilbestrol (DES)-implanted 雌 Sprague Dawley (SD) ラットから単離したpreantral follicle由来の顆粒膜細胞・oocyteの共培養系を用いた検討において [9]、BMP-6, BMP-7は“Luteinizing Inhibitor”としての作用を発揮し、FSHによるP4産生を共通して抑制する (図1A)。StARの発現もP4産生調節と同様にFSHにより増強され、BMP-6, BMP-7はFSHによるStAR発現の誘導を抑制する。興味深いことにBMP-6, BMP-7ともに、FSHのみならずforskolinによるP4合成に対しても抑制するが、BtcAMPにより直接的にPKAを刺激した場合にはP4合成を抑制しない (図1B)。これらのP4産生刺激に対するBMP作用の相違に基づくと、BMP-6, BMP-7は顆粒膜細胞におけるcAMP産生を抑制することによりP4を抑制することが示唆される。確かに顆粒膜細胞でのcAMP産生レベルを測定すると、FSHおよびforskolinにより上昇したcAMP産生がBMP-6, BMP-7によって共通して抑制されること、またこの作用はoocyteにより影響されないことが明らかとなった (図2)。

BMP-6, BMP-7に共通するP4に対する作用とは異なり、BMP-6, BMP-7はFSHによるE2合成に対しては明確な作用の相違を呈する。つまりBMP-6はFSHによるE2産生には影響しないが、BMP-7はFSHによるE2産生を増加し、この作用はoocyteの存在下でさらに促進される (図3A)。ところがこれらのBMP-7の作用は、forskolinやBtcAMPを用いてFSH受容体作用をbypassした場合には、E2産生に影響を与えない (図3B)。すなわち、BMP-7はFSH-cAMP系以外のFSH受容体特異的なシグナルを調節してE2産生の促進をもたらす可能性、さらにそのBMP-7作用はoocyteの存在によって増強されることが示唆された。BMP-7はFSHにより誘導

連絡先：大塚文男，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
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

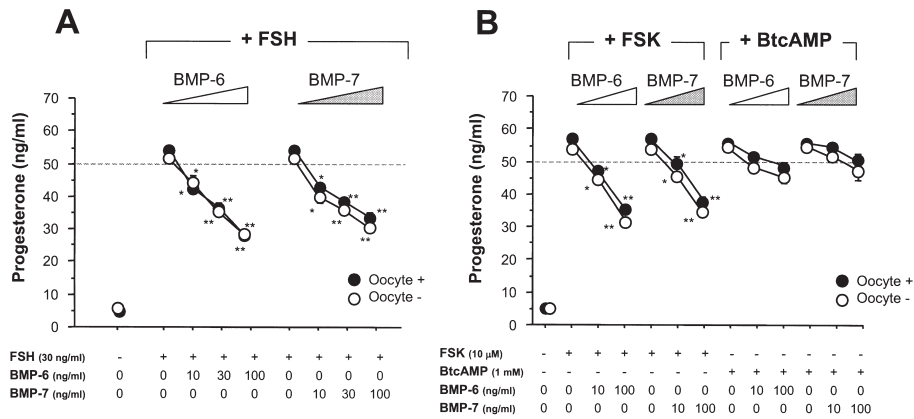


Fig 1 Effects of oocytes and BMPs on FSH-induced progesterone production  
 Rat granulosa cells ( $1 \times 10^5$  viable cells in  $200 \mu\text{l}$ ) were cultured with or without oocytes (100 oocytes/ml). The cells were treated with (A) FSH (30 ng/ml), (B) forskolin (FSK;  $10 \mu\text{M}$ ) or BtcAMP (1 mM) in the culture medium with either alone or combination of BMP-6 and BMP-7 (10 to 100 ng/ml). After 48-h culture the culture media was collected and progesterone levels were determined by radioimmunoassay. Results show the mean  $\pm$  SEM of data performed with triplicate treatments; \*\*,  $P < 0.01$  and \*,  $P < 0.05$  vs. basal levels treated with FSH or FSK.

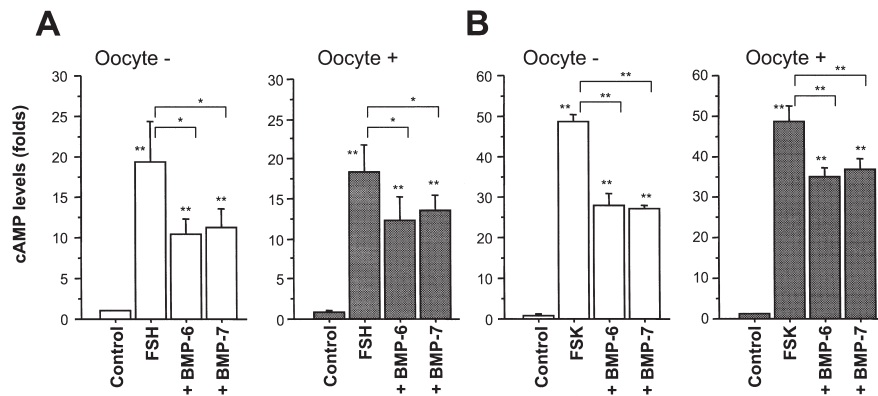


Fig 2 Effects of oocytes and BMPs on FSH-induced cAMP production  
 Rat granulosa cells were cultured with or without oocytes in serum-free medium containing 0.1 mM of IBMX. Cells were treated with (A) FSH (30 ng/ml) or (B) FSK ( $10 \mu\text{M}$ ) with either alone or combination of BMP-6 and BMP-7 (100 ng/ml). After 48-h culture the conditioned medium was collected and the extracellular contents of cAMP was determined by EIA. Results show the mean  $\pm$  SEM of data performed with triplicate treatments; \*\*,  $P < 0.01$  and \*,  $P < 0.05$  vs. control or between the indicated groups.

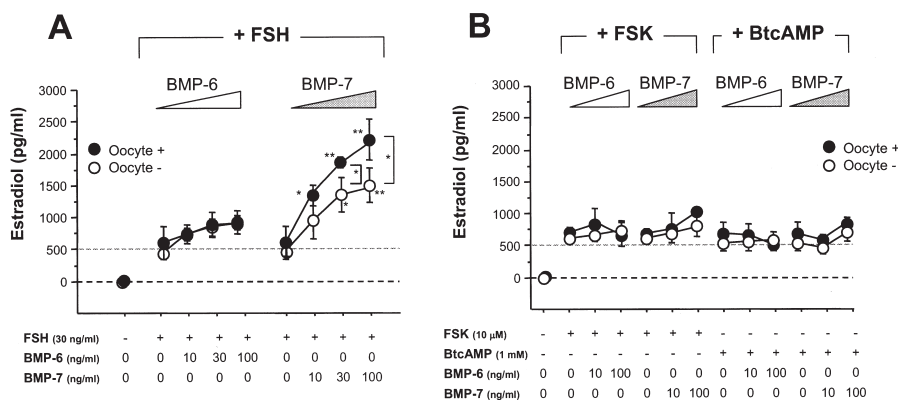


Fig 3 Effects of oocytes and BMPs on FSH-induced estradiol production  
 Rat granulosa cells were cultured with or without oocytes. The cells were treated with (A) FSH (30 ng/ml), (B) FSK ( $10 \mu\text{M}$ ) or (FSK;  $10 \mu\text{M}$ ) or BtcAMP (1 mM) in serum-free medium containing 100 nM of androstenedione with either alone or combination of BMP-6 and BMP-7 (10 to 100 ng/ml). After 48-h culture the culture media was collected and estradiol levels were determined by radioimmunoassay. Results show the mean  $\pm$  SEM of data performed with triplicate treatments; \*\*,  $P < 0.01$  and \*,  $P < 0.05$  vs. basal levels treated with FSH or between the indicated groups.

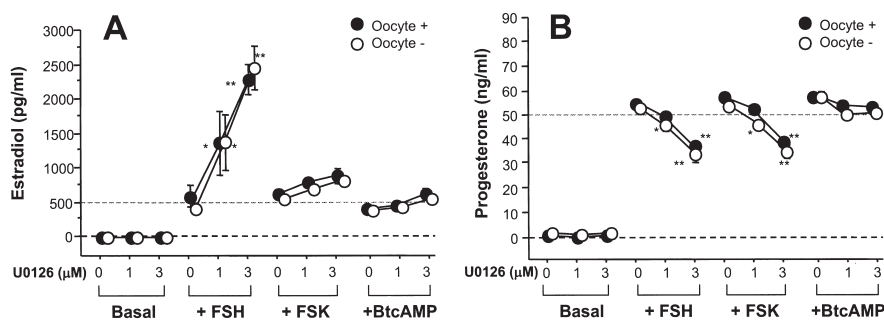


図4 Effects of ERK1/ERK2 inhibition on steroidogenesis  
Rat granulosa cells cultured with or without oocytes in serum-free medium containing 100 nM of androstenedione. Cells were treated with FSH (30 ng/ml), FSK (10  $\mu$ M) or BtcAMP (1 mM) in the presence or absence of U0126 (1 and 3  $\mu$ M) for 48 h. The levels of (A) estradiol and (B) progesterone in the media were determined by radioimmunoassay. Results show the mean  $\pm$  SEM of data performed with triplicate treatments; \*\*,  $P < 0.01$  and \*,  $P < 0.05$  vs. basal levels treated with FSH or FSK.

される顆粒膜細胞でのP450arom (aromatase) 発現レベルを増加するが、これはoocyteの共存によりさらに増強されることも示された。

#### 卵巣ステロイド合成系におけるMAPKシグナルの関与

以上のように、BMP-6, BMP-7による卵巣顆粒膜細胞でのE2とP4の調節作用には明らかな違いが認められる。この相違を生じるメカニズムとして、FSH受容体シグナルの1つである顆粒膜細胞のMAPKシグナル活性化に着目した [10-12]。われわれも以前に報告したが、ラット顆粒膜細胞ではFSH刺激によりMAPKの1つERK1/ERK2蛋白のリン酸化が速やかに促される [10]。この反応はcAMP刺激ではほとんどみられないことより、FSH受容体を介したcAMP-PKA cascadeとは異なる系によると考えられる。ERK1/ERK2シグナルの活性化を選択的に阻害するU0126を用いて検討すると、ERKの阻害によりFSHによるE2合成が著明に増強される (図4 A) 一方で、FSHによるP4合成に対しては抑制効果を発揮する (図4 B)。ERK阻害によるP4の抑制はforskolinでの刺激下においても生じるが、これはBtcAMP刺激下では再現されないことから、ERKの抑制によるcAMP産生の減弱を介する機序と考えられた。事実、FSHおよびforskolinにより上昇する顆粒膜細胞のcAMPレベルはU0126処理により減少した。しかしERKの抑制によるE2合成の促進作用は、forskolinやBtcAMPでは再現されないことから (図4 A)、cAMP系とは独立したFSH受容体特異的な作用と考えられる。これらERKシグナルの阻害によって生じる卵巣ステロ

イド合成への影響は、前述したBMP-7の作用と近似している。そこでERK1/ERK2シグナルに対するBMPの影響について検討したところ、FSHによるERK1/ERK2のリン酸化は、BMP-6では影響をうけないが、BMP-7により強く抑制されることが明らかとなった (図5 A)。つまり、顆粒膜細胞でのFSH依存性のERKカスケードの活性化はE2抑制的かつcAMP・P4には促進的に作用しているが、BMP-7はその作用を抑制することによりE2, P4の異相性の調節をなすと考えられる。

#### OocyteのBMPシグナルおよびFSH作用に対する影響

これまで述べたように、BMP-6, BMP-7が顆粒膜細胞でのFSH受容体以下のcAMP-PKAあるいはERK1/ERK2 pathwayを制御してE2とP4の産生を異相性に変化することが示された。この顆粒膜細胞でのBMP作用は、oocyteの存在によりさらに効率よく発揮されることになる。つまり、BMP-7はFSHによるE2合成を促進するが、これはoocyteの存在によりさらに増強する (図3 A)。またFSHによる顆粒膜細胞でのERKのリン酸化も、oocyteの存在により強力なものとなる (図5 A)。興味深いことに、BMP-6, BMP-7によるSmad1,5,8のリン酸化はFSHにより増強され、さらにoocyteの存在によりFSHと相加的にBMPシグナル伝達が促進される (図5 B)。BMPの標的遺伝子であるId-1 promoter assayによる検討でも、FSH+oocyteはBMP転写活性を増強する。FSHによる顆粒膜細胞でのBMPシグナルの増幅効果は、ラット顆粒膜細胞のみならずヒト顆粒膜細胞株KGNを用いた検討においても認められる [13]。この

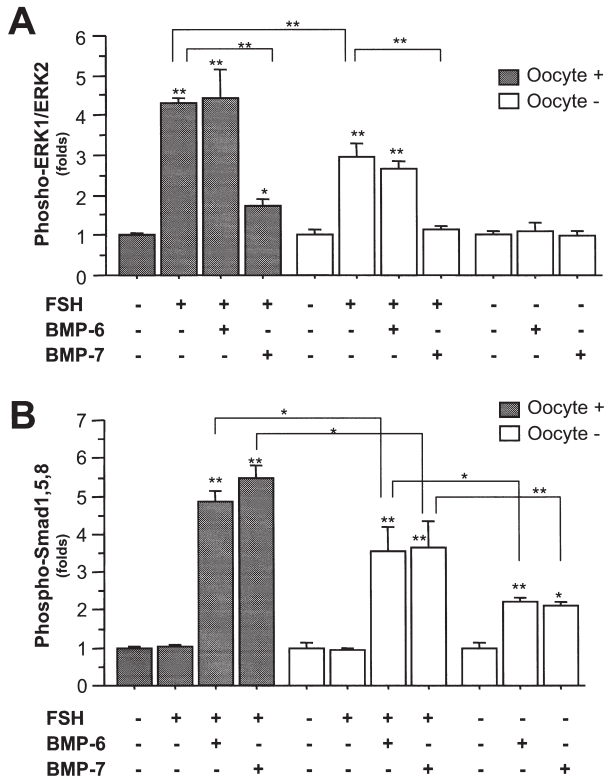


図5 Mutual effects of BMPs, FSH and oocytes on FSH-induced ERK activation and BMP-Smad signaling by granulosa cells. Rat primary granulosa cells cultured with or without oocytes were treated with FSH (30 ng/ml) in combination with BMP-6 or BMP-7 (100 ng/ml) for 1 h. The cell lysates were then subjected to SDS-PAGE immunoblotting analysis using (A) anti-phospho ERK1/2, anti-total ERK1/2 antibodies and (B) anti-phospho Smad1, 5, 8 antibody. Results show the mean  $\pm$  SEM of data performed with triplicate treatments; \*\*,  $P < 0.01$  and \*,  $P < 0.05$  vs. control or between the indicated groups.

FSHおよびoocyteによるBMPシグナルのupregulationには、抑制性Smad (Smad6,7)の発現抑制や受容体Smad (Smad1,5,8)の発現増加などが寄与すると考えられる。

Oocyteによる卵巣ステロイド合成への影響に関して、VanderhydenらはoocyteがFSHによるE<sub>2</sub>産生を増加させる一方でFSHによるP<sub>4</sub>産生を抑制することをマウス顆粒膜細胞において明らかにした [14]。またAdashiらはestrogenの存在がFSHによる顆粒膜細胞の分化を促進することを示した [15]。われわれはFSHによる顆粒膜細胞でのE<sub>2</sub>産生およびP450aromの発現レベルが、oocyte作用に外因性estrogenが加わることでさらに増加することを報告した [16]。このestrogenとoocyteの協調作用 (図6) はforskolinや8-Br-cAMPによるE<sub>2</sub>産生においては認められないことから、estrogenが何らかのFSH受容体シグナルの増強に寄与するoocyte-derived factorの分泌を促すことによりFSH依存性のE<sub>2</sub>合成を促進している可能性が示唆された [16]。今回

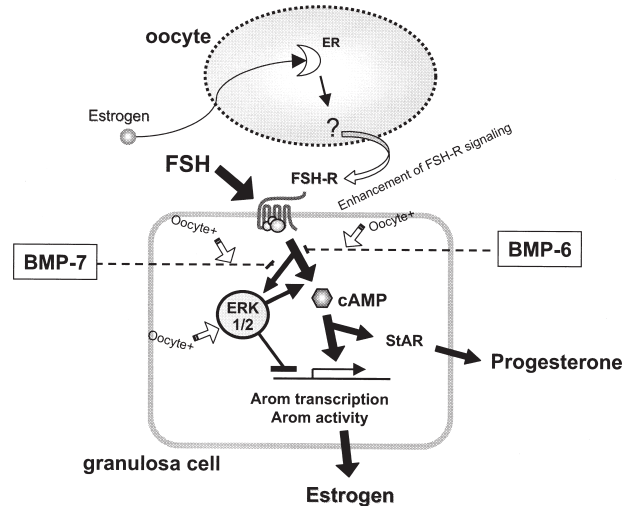


図6 A possible mechanism by which BMPs differentially regulate steroidogenesis in granulosa cells and functional roles of oocytes. ERK1/2 activation induced by FSH receptor (FSH-R) signaling is directly linked to inhibition of estradiol synthesis and amplification of cAMP. BMP-7 inhibits FSH-induced ERK1/2 phosphorylation, leading to upregulation of estradiol production [1]. A common signaling between BMP-6 and BMP-7 is the inhibition of cAMP synthesis linked to progesterone production. The presence of oocytes facilitates i) BMP-Smad signaling and ii) FSH induction of ERK signaling pathway in granulosa cells. In addition, iii) oocytes enhance FSH-induced estradiol production via upregulating FSH-R signaling in the presence of estrogen [16].

の検討では、これらのBMPシグナルとFSH作用の増幅に直接関わるoocyte factorについてはまだ解決していない。同じ培養系におけるFSH依存性のE<sub>2</sub>合成において、BMP-15やBMP-6は影響を与えず [3, 17, 18]、GDF-9はむしろ抑制的に作用することから [19]、これらのoocyte-derived BMP分子の直接的な寄与は少ないと考えられる。しかしGDF-9はcumulus顆粒膜細胞におけるMAPKの活性化を促す作用をもつことから [20]、FSHによるMAPKの活性化にはGDF-9による影響も少なからず関与していると推測される。今後、BMPおよびFSHシグナルを統御するoocyte-derived factorについてさらなる検討が必要である。

まとめ

このように、卵巣に発現するBMP-6とBMP-7は共通してFSHによるcAMPシグナルを制御するが、BMP-7はBMP-6と異なりFSHによるERK1/ERK2の活性化を抑制してE<sub>2</sub>産生の増加とP<sub>4</sub>の減少を促す (図6)。さらにFSHおよびoocyteが、顆粒膜細胞のBMP-Smadシグナルを増強してBMP作用を支持するという新たな相互作用の存在も示された。Oocyteと顆粒膜細胞の細胞間communicationとして、FSHとoocyteによるBMPシグ



ナルの増強, estrogenとoocyteによるFSH受容体シグナルの促進などが, 細胞間の機能的ネットワーク (図6)として効率のよい顆粒膜細胞からのE<sub>2</sub>産生を促していると言えよう.

## 文 献

- Miyoshi T, Otsuka F, Inagaki K, Otani H, Takeda M, Suzuki J, Goto J, Ogura T, Makino H (2007) Differential regulation of steroidogenesis by bone morphogenetic proteins in granulosa cells: involvement of extracellularly regulated kinase signaling and oocyte actions in follicle-stimulating hormone-induced estrogen production. *Endocrinology* 148, 337-345.
- Erickson GF, Shimasaki S (2003) The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 9.
- 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.
- Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM (1999) Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 13, 1035-1048.
- 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 U S A* 96, 7282-7287.
- Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF (2004) The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 25, 72-101.
- Drummond AE, Le MT, Ethier JF, Dyson M, Findlay JK (2002) Expression and localization of activin receptors, Smads, and beta glycan to the postnatal rat ovary. *Endocrinology* 143, 1423-1433.
- 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.
- 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.
- Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S (2001) Role of ERK1/2 in the differential synthesis of progesterone and estradiol by granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 796-800.
- Seger R, Hanoch T, Rosenberg R, Dantes A, Merz WE, Strauss JF, 3rd, Amsterdam A (2001) The ERK signaling cascade inhibits gonadotropin-stimulated steroidogenesis. *J Biol Chem* 276, 13957-13964.
- Dewi DA, Abayasekara DR, Wheeler-Jones CP (2002) Requirement for ERK1/2 activation in the regulation of progesterone production in human granulosa-lutein cells is stimulus specific. *Endocrinology* 143, 877-888.
- Miyoshi T, Otsuka F, Suzuki J, Takeda M, Inagaki K, Kano Y, Otani H, Mimura Y, Ogura T, Makino H (2006) Mutual regulation of follicle-stimulating hormone signaling and bone morphogenetic protein system in human granulosa cells. *Biol Reprod* 74, 1073-1082.
- Vanderhyden BC, Cohen JN, Morley P (1993) Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology* 133, 423-426.
- Adashi EY, Hsueh AJ (1982) Estrogens augment the stimulation of ovarian aromatase activity by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *J Biol Chem* 257, 6077-6083.
- Otsuka F, Moore RK, Wang X, Sharma S, Miyoshi T, Shimasaki S (2005) Essential role of the oocyte in estrogen amplification of follicle-stimulating hormone signaling in granulosa cells. *Endocrinology* 146, 3362-3367.
- 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.
- 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.
- Vitt UA, Hayashi M, Klein C, Hsueh AJ (2000) Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod* 62, 370-377.
- Su YQ, Denegre JM, Wigglesworth K, Pendola FL, O'Brien MJ, Eppig JJ (2003) Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex. *Dev Biol* 263, 126-138.