

卵母細胞因子 FGF-8と BMP による 新たな卵胞ステロイド分泌調節の検討

三好 智子, 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

近年, 卵巣における卵胞発育は下垂体からのゴナドトロピンだけでなく, 卵巣局所因子によっても制御されていることがわかってきた。これまでに, われわれは卵巣顆粒膜細胞の増殖・分化・成長に重要な細胞増殖因子, 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 スーパーファミリーメンバーに属する分子である。卵巣における BMP は, 現在までに BMP-2, -4, -3b (-3), -6, -7, -15 と GDF-9 の発現が明らかになっている。卵母細胞に存在する BMP-15 は顆粒膜細胞において FSH 受容体の発現を低下させることにより, FSH によるプロゲステロン産生を抑制する [1]。卵巣顆粒膜細胞より分泌される BMP-2, -6 および莢膜細胞より分泌される BMP-4 は, FSH による cAMP 産生を抑制することによりプロゲステロン産生を抑制する [2, 3]。一方で, BMP はエストロゲン産生においてはリガンドにより異なる作用を呈することが知られている。さらに, 顆粒膜細胞と卵母細胞とを共培養することにより, BMP-Smad シグナルの増強, FSH による MAPK の増強, エストロゲンと協調し FSH 受容体シグナルの活性化, といった卵母細胞の働きもわかってきた [2, 3]。つまり, 卵巣では卵母細胞と顆粒膜細胞の細胞間コミュニケーションが存在すると考えられる。

卵巣と FGF ファミリー

この卵母細胞と顆粒膜細胞の細胞間コミュニケーションのなかで, BMP は一律にプロゲステロン産生を抑制する黄体化抑制因子として作用するが, エストロゲン特

異的に作用する因子の存在は不明であった。1992年にアンドロゲン誘導因子としてクローニングされた線維芽細胞増殖因子 Fibroblast growth factor-8 (FGF-8) [4] は, BMP-15 とともに卵丘細胞の解糖系を調節し, 排卵過程に関与していると報告され [5], 卵巣にも重要な役割を担っていることが明らかとなった。

FGF はヒトで22種類の分子からなる FGF ファミリーを形成しており, 線維芽細胞の増殖因子としてだけでなく, さまざまな細胞に対する細胞増殖や分化活性を有している。FGF はレセプター型チロシンキナーゼファミリーに属する細胞膜上の FGF 受容体 (FGFR) と結合し, FGFR には FGFR1~4 が存在する。

胎芽発育において FGF は細胞の分化増殖・遊走を調節することにより, 形態発生に重要な役割を担っており, FGF-8 ノックアウトマウスは胎生致死となる。卵巣では FGF-8 は FGFR-4 および FGFR-3C と結合し [6], FGFR-3 あるいは FGFR-4 のノックアウトマウスは妊孕能を有するが, FGFR-3 の変異 (G374R) や FGFR-3/-4 両者のノックアウトマウスでは不妊となる [7, 8]。成熟マウスでは卵巣と精巣のみに FGF-8 mRNA が発現しており, 特に卵巣では成熟マウスの antral follicle の卵母細胞 FGF-8 が発現している [9]。一方, FGFR はこれまでの報告からラットを含む種々の哺乳類の卵巣顆粒膜細胞に発現が認められている [10]。

このように FGF-8 は卵巣顆粒膜細胞において重要な役割を担っていると考えられるが, 卵胞発育における FGF-8 の役割については解明されていない。そこでわれわれはラット初代顆粒膜細胞/卵母細胞培養系を使用し, FGF-8 と BMP による卵胞ステロイド合成調節作用とその機能的連関を明らかにすることを研究の目的とした。

顆粒膜細胞における卵母細胞因子 FGF-8 の作用

ラット顆粒膜細胞および卵母細胞の初代培養細胞を用いて検討した。はじめに, ラット卵巣における FGF-8 と FGFR の発現を確認した。RT-PCR にて, 卵母細胞に

連絡先: 三好智子, 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 岡山市北区鹿田町2-5-1
TEL: 086-235-7235
FAX: 086-222-5214
E-mail: tmiyoshi@md.okayama-u.ac.jp

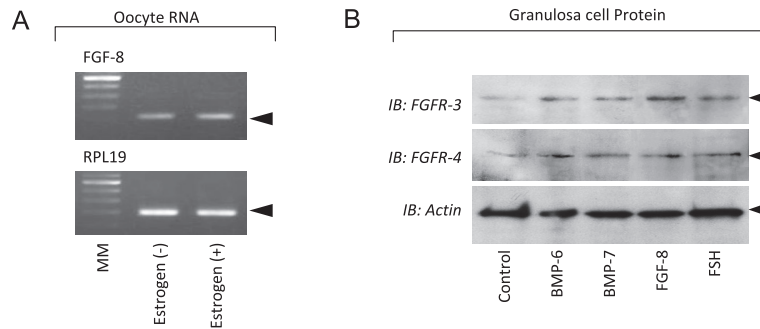


図1 卵母細胞および顆粒膜細胞における FGF-8 と FGF 受容体の発現
 A) Isolated oocytes (2×10^3 viable cells) were cultured in serum-free McCoy's 5A medium with or without DES (5×10^{-8} M). After 48-h culture, oocyte RNA was extracted and RT-PCR were performed for detecting the expression of FGF-8 and RPL19.
 B) The expression of FGF receptor (FGFR)-3 and -4 was examined by SDS-PAGE/immunoblotting analysis using anti-FGF receptor and anti-actin antibody in cell lysates derived from rat granulosa cells (5×10^5 viable cells) treated with BMP-6, -7, FGF-8, and FSH for 1 h. The results shown are representative of those obtained from three independent experiments.

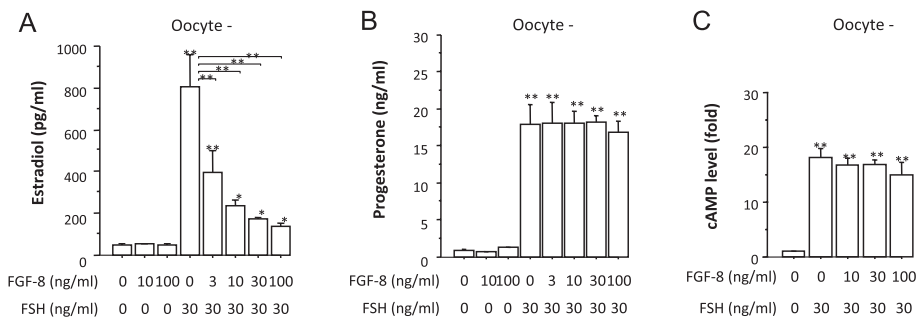


図2 顆粒膜細胞におけるステロイド産生に対する FGF-8 の影響
 A), B) Rat granulosa cells (1×10^5 viable cells in 200 μ l) were cultured in serum-free McCoy's 5A medium containing 100 nM of androstenedione (a substrate for aromatase). FSH (30 ng/ml) was added to the culture medium with either alone or in combination with FGF-8 (3 to 100 ng/ml). After 48-h culture, the levels of estradiol (A) and progesterone (B) in the medium were determined by CLIA.
 C) Granulosa cells (1×10^5 viable cells in 200 μ l) were cultured in serum-free McCoy's 5A medium containing 0.1 mM of IBMX. FSH (30 ng/ml) was added to the culture medium with either alone or in combination with FGF-8 (10 to 100 ng/ml). After 48-h culture, the levels of cAMP in the medium were determined by EIA after the acetylation of each sample. Results are shown as mean \pm SEM of data from at least three separate experiments, each performed with triplicate samples; **, $P < 0.01$ and *, $P < 0.05$ vs. control or between the indicated groups.

はエストロゲンの有無にかかわらず、FGF-8の発現が検出された(図1A)。また、顆粒膜細胞にはFGF-8の受容体として報告されているFGFR-3、-4だけでなく、FGFR-1、-2も蛋白レベルで検出し、これらのFGF受容体の発現はFSH・FGF-8・BMPにより影響を受けなかった(図1B)。次にFGF-8によるステロイド合成への影響を検討したところ、興味深いことにFGF-8はFSHによるエストラジオール合成およびaromataseの発現を

濃度反応性に特異的に抑制した(図2A)。一方で、FGF-8はプロゲステロン産生およびStARの発現には影響を与えなかった(図2B)。そこでFSH受容体のセカンドメッセンジャーcAMPについて検討したところ、FGF-8はFSHによるcAMP産生に対して、直接的には影響しなかった(図2C)。つまり、FGF-8はFSHシグナルのcAMP-PKA経路以外の経路でエストラジオール産生を抑制することが示唆された。

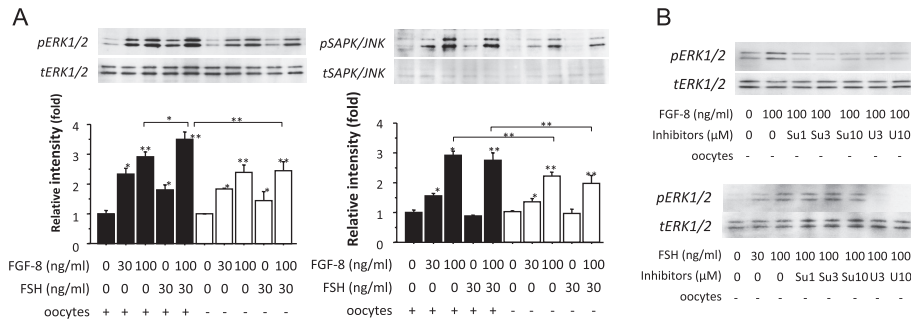


図3 FGF-8のMAPKリン酸化に対する影響

A) Rat granulosa cells (5×10^5 viable cells in 1 ml) with or without oocytes (100 oocytes/ml) were cultured in serum-free McCoy's 5A medium. After preculture, FGF-8 (30 to 100 ng/ml) and FSH (30 ng/ml) were added to the cultured media for 60 min. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE/immunoblotting for ERK1/ERK2 and SAPK/JNK analysis. The results shown are representative of those obtained from three independent experiments. The relative integrated density of each protein band was digitized. The results shown are representative of those obtained from three independent experiments. **, $P < 0.01$ and *, $P < 0.05$ vs. control or between the indicated groups. B) Granulosa cells (5×10^5 viable cells in 1 ml) were treated with FGF-8 (100 ng/ml) and FSH (30 to 100 ng/ml) in the presence or absence of various inhibitors including SU5402 (Su; 1 to 10 μM) and U0126 (U; 3 to 10 μM) for 60 min. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE/immunoblotting analysis for ERK1/ERK2 analysis.

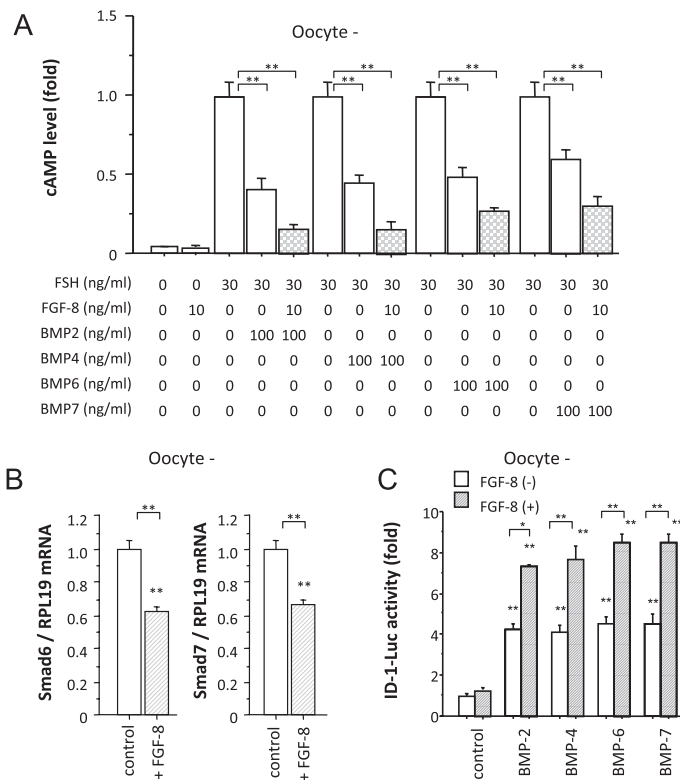


図4 BMPシグナルに対するFGF-8の影響

A) Rat granulosa cells (1×10^5 viable cells in 200 μl) were cultured in serum-free McCoy's 5A medium containing 0.1 mM of IBMX. Cells were treated with FSH (30 ng/ml) in combination with FGF-8 (10 ng/ml) and BMPs including BMP-2, -4, -6 and -7 (100 ng/ml). After 48-h culture, the levels of cAMP in the medium were determined by EIA after the acetylation of each sample. B) Rat granulosa cells (5×10^5 viable cells in 1 ml) were cultured in serum-free McCoy's 5A medium with FGF-8 (100 ng/ml). After 48-h culture, total cellular RNA was extracted and Smad6 and Smad7 mRNA levels were determined by quantitative real-time RT-PCR. The expression levels of Smad6 and Smad7 were standardized by RPL19 level in each sample. C) After preculture, granulosa cells (5×10^5 viable cells in 1 ml) were transiently transfected with 500 ng of ID-1-Luc reporter plasmid and 50 ng cytomegalovirus- βgal plasmid (pCMV- $\beta\text{-gal}$). After transfection, cells were treated with FGF-8 (100 ng/ml) in combination with BMP-2, -4, -6 and -7 (100 ng/ml) for 24 h, and then luciferase activity and βgal activity of the cell lysate were measured. The data were shown as the ratio of luciferase to βgal activity. Results are shown as mean \pm SEM of data from at least three separate experiments, each performed with triplicate samples; **, $P < 0.01$ and *, $P < 0.05$ vs. control or between the indicated groups.

近年、卵巣での FSH 受容体と MAPK 経路の関与が報告されており、ラット顆粒膜細胞において、FSH は FSH 受容体を介し ERK を活性化することによりエストラジオール産生を抑制し、一方で FSH は p38 経路を活性化してエストラジオール産生の増加に寄与する [2, 3]. そこで FSH と FGF-8 による MAPK 経路の活性化について検討したところ、FGF-8 は顆粒膜細胞において ERK および SAPK/JNK を FSH の有無に関わらずリン酸化したが、p38 には影響を与えなかった(図 3 A). また、FGF シグナル阻害剤である SU5402 は FSH による ERK のリン酸化には影響を与えないことから (図 3 B), FGF は FSH シグナルと異なる経路で ERK を活性化すると考えられた.

BMP システムと FGF シグナルの相互作用

次に、FGF-8 と BMP の相互作用について検討したところ、FGF-8 は FSH による cAMP 産生には影響を与えなかった (図 2) が、BMP による cAMP 抑制作用をさらに増強した (図 4 A). そこで、BMP シグナルに対する FGF の影響を検討した. FGF-8 は抑制型 Smad6/7 の発現を減少することにより (図 4 B), BMP シグナルである ID-1 転写の活性化を増強することが示唆された (図 4 C). さらに、BMP シグナルを増強させる FGF-8 と MAPK の関与について検討するために、SP600125 を用いて SAPK/JNK を抑制すると FGF-8 によって増強された ID-1 転写の活性が低下した (図 5 A). つまり、FGF-8 は SAPK/JNK 活性化を介して BMP シグナルを増強することが示唆された. また、SAPK/JNK を抑制することにより、FSH 誘導性のエストラジオールおよびプロゲステロン産生の低下を認めることより、SAPK/JNK 活性化は FSH によるエストラジオールおよびプロゲステロン産生の増加に関与することも示唆された (図 5 B).

このような BMP システムと FGF シグナルの連関は卵巣だけでなく、他の臓器においても証明されている. 骨組織では FGF-2 が BMP 阻害因子である noggin の発現を抑制することで、BMP-4 の働きを支持している [11]. また、軟骨形成においては FGF-18 が noggin の発現を抑制することで、BMP-2 の働きが増強する [12]. 同様の FGF と BMP シグナル相互作用は神経や異所性骨化でも認められており、BMP システムと FGF シグナルは生体内で密接に関連していることが示唆された.

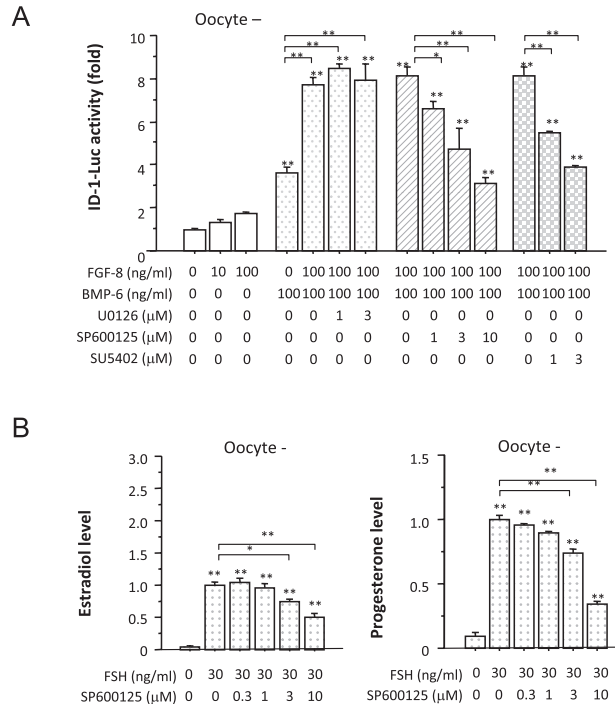


図 5 FGF-8 影響下における MAPK と BMP シグナルの関与

A) Cells (5×10^5 viable cells in 1 ml) were transiently transfected with ID-1-Luc reporter plasmid and pCMV-β-gal. After transfection, cells were treated with FGF-8 (10 to 100 ng/ml) and BMP-6 (100 ng/ml) in combination with U0126, SP600125 and SU5402 (1 to 10 μM) for 24 h, and then luciferase activity and βgal activity of the cell lysate were measured. The data were shown as the ratio of luciferase to βgal activity. B) Rat granulosa cells (1×10^5 viable cells in 200 μl) were cultured in serum-free McCoy's 5A medium containing 100 nM of androstenedione. FSH (30 ng/ml) was added to the culture medium with either alone or in combination with SP600125 (0.3 to 10 μM). After 48-h culture, the levels of estradiol and progesterone in the medium were determined by CLIA method. Results are shown as mean ± SEM of data from at least three separate experiments, each performed with triplicate samples; **, P<0.01 and *, P<0.05 vs. control or between the indicated groups.

おわりに

今回の研究を通じて、①卵母細胞因子 FGF-8 は ERK を活性化することにより FSH によるエストラジオール産生を抑制する、②FGF-8 は SAPK/JNK を活性化することにより BMP-Smad シグナル作用を増強する、という新たな“FGF-BMP 機能連関”が明らかとなった. この卵母細胞—顆粒膜細胞間コミュニケーションとしての BMP と FGF-8 の協調作用は、顆粒膜細胞でのステロイド合成に重要であると考えられた.

謝 辞

本稿は2009年度日本生殖内分泌学会学術奨励賞候補演題に選出された研究をまとめたものである。本稿の執筆の機会を与えてくださいました日本生殖内分泌学会理事長 峰岸 敬先生、第14回同学会大会長 倉智博久先生に御礼申し上げます。

引用文献

1. 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.
2. 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.
3. Inagaki K, Otsuka F, Miyoshi T, Yamashita M, Takahashi M, Goto J, Suzuki J, Makino H (2009) p38-Mitogen-activated protein kinase stimulated steroidogenesis in granulosa cell-oocyte cocultures: role of bone morphogenetic proteins 2 and 4. *Endocrinology* 150, 1921-1930.
4. Tanaka A, Miyamoto K, Minamino N, Takeda M, Sato B, Matsuo H, Matsumoto K. (1992) Cloning and characterization of an androgen-induced growth factor essential for the androgen-dependent growth of mouse mammary carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 8928-8932.
5. Sugiura K, Su YQ, Diaz FJ, Pangas SA, Sharma S, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Matzuk MM, Shimasaki S, Eppig JJ (2007) Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development*. 134, 2593-2603.
6. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M (1996) Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271, 15292-15297.
7. Amsterdam A, Kannan K, Givol D, Yoshida Y, Tajima K, Dantes A (2001) Apoptosis of granulosa cells and female infertility in achondroplastic mice expressing mutant fibroblast growth factor receptor 3 G374R. *Mol Endocrinol* 15, 1610-1623.
8. Weinstein M, Xu X, Ohyama K, Deng CX (1998) FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development* 125, 3615-3623.
9. Valve E, Penttilä TL, Paranko J, Härkönen P (1997) FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. *Biochem Biophys Res Commun* 232, 173-177.
10. Asakai R, Song SY, Itoh N, Yamakuni T, Tamura K, Okamoto R (1994) Differential gene expression of fibroblast growth factor receptor isoforms in rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 104, 75-80.
11. Warren SM, Brunet LJ, Harland RM, Economides AN, Longaker MT (2003) The BMP antagonist noggin regulates cranial suture fusion. *Nature* 422, 625-629.
12. Reinhold MI, Abe M, Kapadia RM, Liao Z, Naski MC (2004) FGF18 represses noggin expression and is induced by calcineurin. *J Biol Chem* 279, 38209-38219.