

# 卵巣機能低下および多胎発生における ヒト BMP-15/GDF-9変異の関与

稲垣 兼一<sup>1)</sup>, 大塚 文男<sup>2)</sup>, Shunichi Shimasaki<sup>3)</sup>

1) 岡山大学病院腎臓・糖尿病・内分泌内科

2) 岡山大学病院内分泌センター

3) University of California, San Diego, U.S.A.

## はじめに

Premature ovarian failure (POF) /primary ovarian insufficiency (POI) は年齢40歳未満での4~6ヵ月間の無月経期間(続発性・第2度無月経で第2次性徴がある), 高ゴナドトロピン値・低エストロゲン値を満たす症候群であり, 早期卵巣枯渇あるいは卵巣減少が病態として存在する一方, 加齢による閉経とは異なり卵巣機能が復活するケースもみられるなど幅広いスペクトラムを包含する。POF/POIは不妊を来す疾患として重要であるが, その病因について未だ十分に明らかにされていない。そのようななか, これまでに遺伝的要因を示唆するいくつかの報告があり, 近年 bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) と growth differentiation factor-9 (GDF-9) がその候補として注目されている。BMP-15 と GDF-9はともに TGF- $\beta$ スーパーファミリーの BMP サブファミリーに属し, そのなかでも相同性が非常に高い分子である。卵巣においては卵母細胞に特異的に存在することが知られ, 卵巣発育に重要な役割を果たしていると考えられている。今回われわれは POF/POI 患者と二卵性双生児の母親に発見・報告された BMP-15/GDF-9 遺伝子の変異が生理活性に及ぼす影響について検討し, 特徴的な生殖表現型を示すメカニズムについて考察した。

## ヒツジにおける BMP-15/GDF-9 遺伝子変異

2000年以降, ヒトと同じく少数排卵動物であるヒツジにおいて自然発症の BMP-15 および GDF-9 遺伝子変異

がヘテロ体で多胎・多産, ホモ体で不妊というユニークな表現型を示すことが相次いで報告され, この分野の研究のブレイクスルーとなった[1-3]ENREF 1. また BMP-15 および GDF-9 に対して能動・受動免疫された野生型ヒツジにおいても遺伝子変異ヒツジと同様に不妊と多産の表現型が再現される[4, 5]ことから, BMP-15 と GDF-9 の少数排卵動物の生殖における重要性が裏づけられた。一方でこのような BMP-15/GDF-9 の生殖表現型に対する作用はマウスやラットなどの多数排卵動物において認められないことから, BMP-15/GDF-9 は少数排卵動物と多排卵動物との排卵数の違いを調節する, すなわち生殖形質発現の種差を決定する因子とも考えられる。

## ヒトにおける BMP-15/GDF-9 遺伝子変異

ヒトの生殖における BMP-15/GDF-9 の重要性を示す初めての知見として, Di Pasquale らが2004年にイタリア人姉妹の原発性無月経症例に BMP-15 遺伝子変異 (Y235C) を発見し報告した [6]。姉妹はともに卵巣低形成で父親と姉妹はヘテロ変異を認めた。そして同グループが非家族性 POF/POI 患者における BMP-15 遺伝子変異スクリーニングにより数多くの遺伝子異常が POF/POI 患者に高頻度に存在することが明らかになった [7]。その後同様の報告が相次ぎ [8-10], GDF-9 遺伝子異常についても POF/POI 患者に高頻度に出現することが報告された [9, 11-13]。興味深いことに, BMP-15/GDF-9 遺伝子のこれらの変異のほとんどがプロ領域に集中していることも明らかとなった。また, ヒツジの多産に相当すると考えられる二卵性双生児の誕生について, 以前より一卵性双生児に比べ高頻度の家族内発生が指摘されてきたが, 二卵性双生児の母親に関するスクリーニングにて, やはり BMP-15/GDF-9 の変異が高頻度に認められることが報告された [14, 15]。特に GDF-9 の P103S 変異は POF/POI と二卵性双生児の母親の両

連絡先: 稲垣兼一, 岡山大学病院腎臓・糖尿病・内分泌内科  
〒700-8558 岡山県岡山市北区鹿田町2-5-1  
TEL: 086-235-7235  
FAX: 086-222-5214  
E-mail: kenina@md.okayama-u.ac.jp

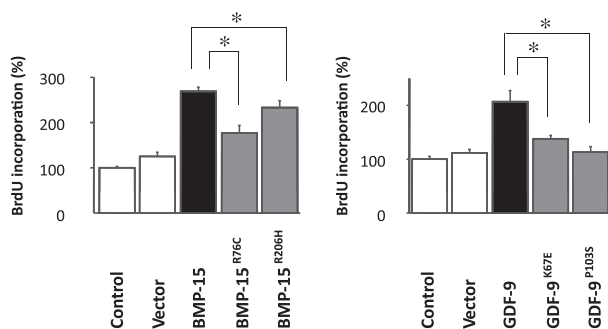


図1 BMP-15/GDF-9変異によるラット顆粒膜細胞増殖作用への影響

方に発見されている。

以上のように、POF/POI患者や二卵性双生児の母親に卵母細胞因子であるBMP-15/GDF-9遺伝子の変異が頻発することから、BMP-15/GDF-9がヒトの生殖表現型に大きく関与していることが示唆されるが、遺伝子変異が生物学的活性にどのように影響するかは*in vitro*による解析はこれまでほとんどされていない。

### POF/POIと二卵性双生児の母親に認められた変異型BMP-15/GDF-9の生物学的活性の検討

そこでわれわれはPOF/POIと二卵性双生児の母親に発見されたBMP-15とGDF-9の遺伝子変異のなかから高頻度に認められ、かつ対照群に全く認められない変異(BMP-15<sup>R76C</sup>, BMP-15<sup>R206H</sup>, GDF-9<sup>K67E</sup>, GDF-9<sup>P103S</sup>)を抽出し、その生理学的活性を評価した[8, 12, 13]。まずFlag tagをC末端に付加したヒトBMP-15/GDF-9発現プラスミドにsite-directed mutagenesisにより遺伝子変異を導入し、変異遺伝子発現プラスミドを作成した。次いでHEK293F細胞に上記の変異遺伝子を導入した後、変異がプロ領域に存在し成熟タンパクは野生型と同一であることが予想されるため、培養上清を用いてラット卵巣顆粒膜初代培養(GC)細胞の細胞増殖作用をBrdU取り込みアッセイにて検討した(図1)。ヒトBMP-15はラット顆粒膜細胞を増殖させることが知られているが、2種の変異BMP-15ではともにその増殖作用の低下を認めた。変異ヒトGDF-9の検討についても野生型に比較し細胞増殖作用の減弱を認めた。POF/POIまたは二卵性双生児の母親に発見された遺伝子変異により、BMP-15/GDF-9の本来有する顆粒膜細胞増殖作用が低下するメカニズムを探るため、次にBMP-15/GDF-9の細胞内シグナル伝達分子である受容体Smadのリン酸化をイムノブロットで検討した(図2)。変異型BMP-15では野生型BMP-15に比較しSmad1/5/8のリン酸化が

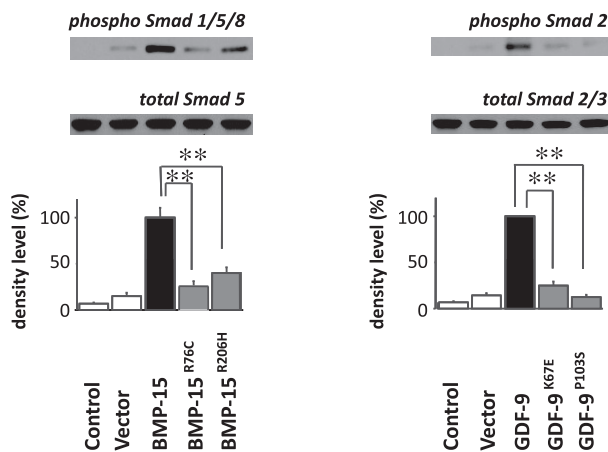


図2 BMP-15/GDF-9変異によるSmadリン酸化への影響

低下し、変異型GDF-9についても同様にSmad2/3のリン酸化の減弱を認めた。

### BMP-15/GDF-9遺伝子変異のタンパク産生・分泌への影響

BMP-15/GDF-9遺伝子変異を導入したHEK293F細胞の培養上清による細胞増殖作用が野生型に比較して減弱しており、それが受容体Smadのリン酸化減弱によることが示唆されるため、培養上清中に分泌されるBMP-15/GDF-9タンパクをFlag抗体によるイムノブロットにより検討した(図3)。BMPサブファミリーは共通してシグナルペプチド、プロ領域、成熟タンパクの結合したプロタンパクとして産生され、シグナルペプチド離脱後にダイマーを形成しプロ領域と成熟タンパクが切断されるプロセッシングが起こり、成熟タンパクが生理活性を発揮する。野生型BMP-15の成熟タンパクは経時的に培養液中への分泌が増加するが、変異型BMP-15では48h-96h培養条件のいずれにおいても野生型より成熟タンパクの分泌低下を認めた。またGDF-9においても変異型では野生型より成熟タンパクの分泌低下を認めた。次いで、細胞溶解液における成熟タンパクとプロタンパクの発現をイムノブロットにて検討し、翻訳および翻訳後プロセッシングへの遺伝子変異の影響を評価した(図4)。その結果、変異BMP-15および変異GDF-9導入細胞中の成熟タンパクが野生型に比べ減少しており、これは細胞培養液中の分泌タンパクと一致した結果であったが、それに加えてプロタンパクが変異型では野生型より有意に多く存在し、さらに成熟タンパク/プロタンパク比は変異型において顕著に低下していることが明らかとなった。変異型導入細胞においても野生型と同等の導入効率

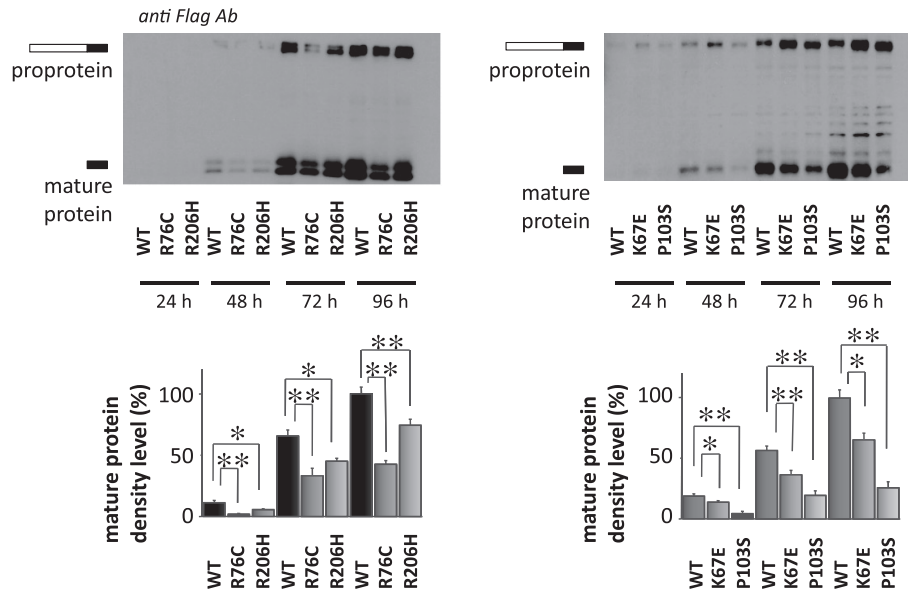


図3 遺伝子変異が BMP-15/GDF-9タンパク産生・分泌に与える影響

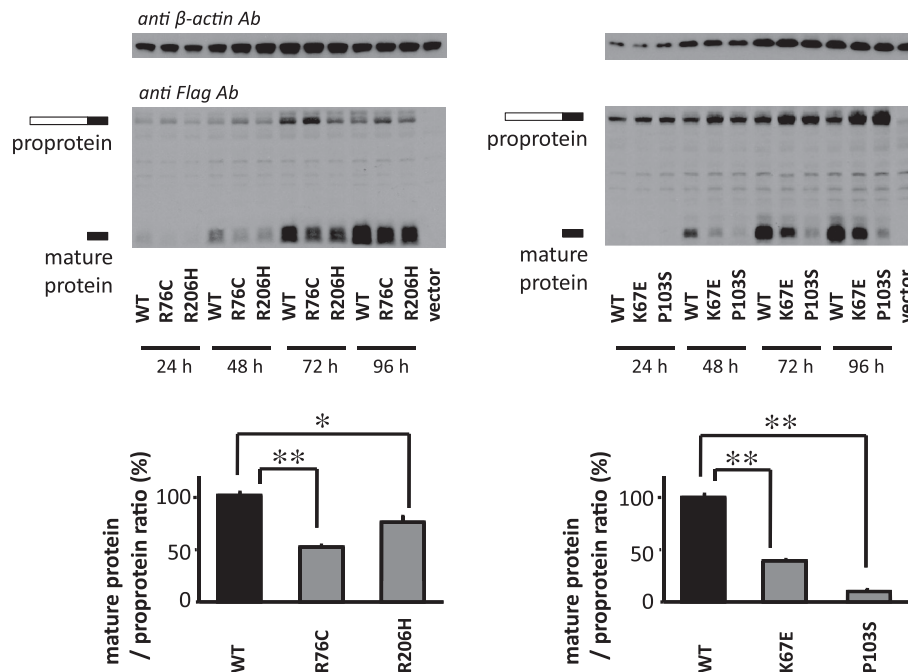


図4 遺伝子変異が BMP-15/GDF-9タンパク産生・分泌に与える影響

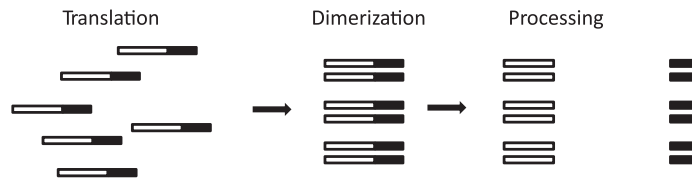
が得られたことが PCR でも確認されており，以上の結果より変異 BMP-15 および GDF-9 における成熟タンパク分泌低下はプロタンパクのプロセッシング障害によることが示唆された．BMP ファミリーではプロタンパクのダイマー形成に続きプロセッシングが起こり，このダイマー形成にはプロ領域が不可欠であることが以前から知られている．今回の 4 種の変異では極性の異なるアミノ酸への変換によるプロタンパク上の 3 次元構造変化や新

たな S-S 結合の追加などが生じ，正常なダイマー形成が損なわれた可能性があると考えられた．

以上のように，POF/POI 患者と二卵性双生児の母親に発見された BMP-15/GDF-9 遺伝子変異はプロタンパクのダイマー形成・プロセッシングのステップを障害することにより成熟タンパクの産生・分泌を低下させることが明らかとなった（図 5）．

卵母細胞因子 BMP-15/GDF-9 の卵巣顆粒膜細胞に対

wt BMP-15 / wt GDF-9



mutant BMP-15 / mutant GDF-9

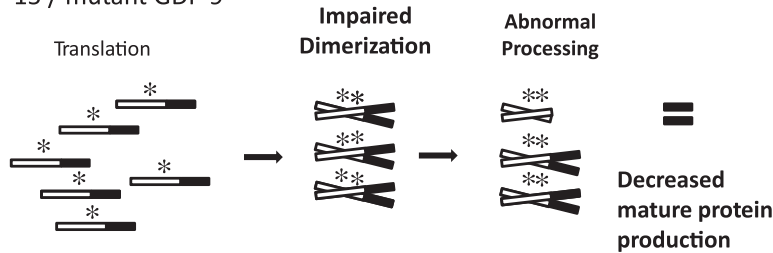


図5 Propeptideの変異が mature protein 分泌に与える影響

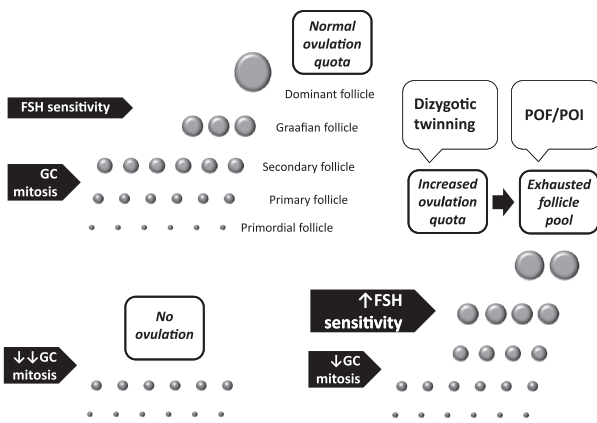


図6 BMP-15/GDF-9活性低下と生殖表現型の関連

する作用についてのこれまでの *in vitro* 研究における知見は、以下のようにまとめられる [16-18].

- ①BMP-15は FSH 非依存的に顆粒膜細胞の細胞増殖を刺激する,
- ②FSH 受容体発現を減少させることなどにより顆粒膜細胞でのプロゲステロン産生を抑制する,
- ③FSH によって誘導される顆粒膜細胞でのステロイド合成酵素系(StAR, P450scc, 3 $\beta$ HSD など), LH 受容体, インヒビン・アクチビンサブユニット( $\alpha$ ,  $\beta A$ ,  $\beta B$ )の発現を抑制する,
- ④GDF-9は FSH 非依存的にプロスタグランジン E2 / EP2受容体系を介してマウス顆粒膜細胞のプロゲステロン分泌を調節するなどの BMP-15に認められない生理活性も有するが, BMP-15と同様に FSH 非依存性

に顆粒膜細胞の細胞増殖を刺激し, FSH 受容体発現抑制により顆粒膜細胞でのプロゲステロン産生を抑制する.

これらの知見を踏まえて, BMP-15/GDF-9の生理活性低下と生殖表現型の関連についての仮説を図6に示す.

- (A) BMP-15/GDF-9は FSH 感受性を有さない卵胞形成初期段階から細胞増殖作用により卵胞成長 (recruitment) に寄与し, FSH 受容体の発現する FSH 依存期において FSH 感受性を負に制御することで主席卵胞の選別 (selection) と卵胞成熟 (maturation) の過程を調節していると考えられる.
- (B) BMP-15/GDF-9活性が高度に障害されると初期から卵巣発育が得られず, 表現型として原発性無月経のイタリア人姉妹例やヒツジの遺伝子変異ホモ接合体にみられる不妊の病態を呈する.
- (C) BMP-15/GDF-9活性の障害が軽度の場合, 細胞増殖作用の低下により卵胞発育が抑制されるが, いったん FSH 感受性を有する段階まで成長すると BMP-15/GDF-9による FSH 感受性の負の制御が减弱するため, 主席卵胞の選別や卵胞成熟が十分に得られぬままに複数の未成熟排卵を生じると考えられる. そして複数の排卵は二卵性双生児の誕生やヒツジのヘテロ変異にみられる多産を, また卵胞発育不全と過剰排卵は早期の卵プールの枯渇, すなわち POF/POI の病態形成に寄与しているのかもしれない.

## おわりに

われわれは POF/POI と二卵性双生児の母親に発見された BMP-15/GDF-9 遺伝子変異 (BMP-15<sup>R76C</sup>, BMP-15<sup>R206H</sup>, GDF-9<sup>K67E</sup>, GDF-9<sup>P103S</sup>) に着目し, その生理活性に与える影響について明らかにした. 4 種の変異はすべてプロ領域に存在し, プロタンパク翻訳後のプロセシングのステップを障害し, 生理活性を有する成熟タンパクの分泌を減少させた. BMP-15/GDF-9 の成熟タンパクの減少がヒツジにおける排卵数増加や多産と関連することから, ヒトにおいて今回の遺伝子変異が排卵数増加に伴う二卵性双生児の誕生や, 過排卵の結果としての卵プール枯渇による不妊 (POF/POI) を引き起こす可能性が示唆された [19].

## 謝辞

本稿は2010年度日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞した研究内容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 峯岸 敬先生, 第15回同学会大会長 並木幹夫先生, ならびに広報理事 筒井和義先生に感謝いたします.

## 引用文献

- Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, et al (2000) Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP 15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 25, 279-283.
- Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, et al (2004) Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod* 70, 900-909.
- McNatty KP, Smith P, Moore LG, et al (2005) Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate. *Mol Cell Endocrinol* 234, 57-66.
- Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, et al (2002) Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol Reprod* 67, 1777-1789.
- Juengel JL, Hudson NL, Whiting L, McNatty KP (2004) Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes. *Biol Reprod* 70, 557-561.
- 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.
- Di Pasquale E, Rossetti R, Marozzi A, et al (2006) Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 1976-1979.
- Dixit H, Rao LK, Padmalatha VV, et al (2006) Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet* 119, 408-415.
- Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, et al (2006) Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol* 154, 739-744.
- Rossetti R, Di Pasquale E, Marozzi A, et al (2009) BMP 15 mutations associated with primary ovarian insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Hum Mutat* 30, 804-810.
- Zhao H, Qin Y, Kovanci E, Simpson JL, Chen ZJ, Rajkovic A (2007) Analyses of GDF9 mutation in 100 Chinese women with premature ovarian failure. *Fertil Steril* 88, 1474-1476.
- Dixit H, Rao LK, Padmalatha V, et al (2005) Mutational screening of the coding region of growth differentiation factor 9 gene in Indian women with ovarian failure. *Meno-pause* 12, 749-754.
- Kovanci E, Rohozinski J, Simpson JL, Heard MJ, Bishop CE, Carson SA (2007) Growth differentiating factor-9 mutations may be associated with premature ovarian failure. *Fertil Steril* 87, 143-146.
- Zhao ZZ, Painter JN, Palmer JS, et al (2008) Variation in bone morphogenetic protein 15 is not associated with spontaneous human dizygotic twinning. *Hum Reprod* 23, 2372-2379.
- Palmer JS, Zhao ZZ, Hoekstra C, et al (2006) Novel variants in growth differentiation factor 9 in mothers of dizygotic twins. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 4713-4716.
- 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.
- Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S (2002) Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 275, 39523-39528.
- 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.
- Inagaki K, Shimasaki S (2010) Impaired production of BMP-15 and GDF-9 mature proteins derived from proproteins with mutations in the proregion. *Mol Cell Endocrinol* 328, 1-7.