

# 卵巣ステロイド分泌における成長ホルモンの影響： 顆粒膜細胞における BMP と IGF-I のクロストーク

中村 絵里<sup>1)</sup>, 大塚 文男<sup>2)</sup>

1) 岡山大学病院内分泌センター, 2) 岡山大学大学院総合内科学

## はじめに

卵巣における正常な卵発育には、視床下部・下垂体などの上位内分泌器官での神経内分泌系の統御機構と、卵巣の機能ユニットである卵胞の発育・分化、排卵までの一連の生理現象が正常に生じることが必要である。下垂体腫瘍・頭蓋内炎症・外傷などさまざまな病因で生じる成長ホルモン (growth hormone: GH) 分泌異常では、GH の分泌過剰・低下ともに排卵機能や妊孕性の低下をもたらす。

成長ホルモン (GH) は、肝臓での IGF-I (insulin-like growth factor-I) の産生を促し、身体の成長促進だけでなく、糖・蛋白・脂質の代謝調節や水・電解質の調節、細胞増殖・分化など多彩な作用を發揮する。また生殖内分泌機能においては、GH は IGF-I と協調してゴナドトロピン (LH, FSH) の分泌・応答や卵巣ステロイド合成、卵子形成、性腺分化に関与する [1]。1996年に報告された IGF-I 欠損マウスでは [2]、胞状卵胞早期の段階で卵胞発育が停止して排卵障害をきたすことが示された。1997年の Bondy らの研究により [3]、IGF-I の欠落が顆粒膜細胞の FSH 受容体の発現を抑制すること、この変化は外因性 IGF-I により回復することが明らかとなり、顆粒膜細胞の IGF-I は卵胞における FSH 応答性の鍵であることが示された。

一方で、1997年に Kopchick らにより報告された GH 受容体/GH 結合蛋白欠損雌マウスでは [4]、著明な IGF-I 低値を伴う成長遅延を呈するほか、妊孕性の低下 (wild: 6.9 pups > KO: 2.7 pups) が認められた。その後2002年に報告された Binart らによる GH 受容体欠損雌マウスの解析から [5]、この妊孕能の低下が排卵数の減少によることが示された。GH 受容体の欠如により胞状卵胞以降の成熟卵胞への発育が抑制され、健全卵胞

の減少とともに閉鎖卵胞が増加する特徴を有していた。興味深いことに、これらの変化は、IGF-I の補償により改善を認めないことから、GH 自体が卵胞の成熟や分化に関与する可能性が示唆された。

しかしながら、GH が直接卵巣機能や卵胞発育に与える影響について未だ十分に解明されていない。今回の研究では GH の卵巣ステロイド合成系への作用に着目し、GH および GH の下流で作動する IGF-I が卵巣 steroidogenesis に与える影響とそのメカニズムについて、卵胞発育調節の key molecule である BMP 分子との機能関連の側面からラット顆粒膜細胞の初代培養を用いて解析した [6]。

## ラット顆粒膜細胞における卵巣ステロイド合成 に対する GH の影響

生後22日齢の雌ラットに DES (10mg) カプセルを皮下に埋め込み、4日後に卵巣を摘出して顆粒膜細胞および卵母細胞の懸濁液を段階的に分離し、顆粒膜細胞単離培養あるいは卵母細胞との共培養条件にて解析を行った。ラット顆粒膜細胞と卵母細胞の両者に、GH 受容体と IGF-I 受容体の発現を認めた。GH は FSH により活性化された顆粒膜細胞の aromatase 発現を抑制して estradiol (E2) の産生を減少し、一方で progesterone (P4) 産生と P4 合成酵素 (StAR, P450scc, 3 $\beta$ HSD) の発現を促進した (図1)。GH 作用とは異なり、IGF-I は E2 と P4 産生をともに促進した (図1)。GH・IGF-I は、ともに forskolin 誘導性のステロイド産生や cAMP 合成に影響を与えないことから、cAMP-PKA 以外の経路の関与が示唆された。ウエスタンブロットによる細胞内シグナルの解析から、GH は STAT3 を直接活性化すること、また FSH による ERK1/2 リン酸化を増幅することが示された。また顆粒膜細胞を ERK 阻害剤 (U0126) で処理すると、FSH により誘導される E2 産生が促進され P4 産生が抑制されることから、GH がもたらす FSH 刺激下での E2 減少と P4 増加は ERK 経路を介することが示唆された。さらに、GH は GH 受容体シグナルである JAK

連絡先: 中村絵里, 岡山大学病院内分泌センター  
〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1  
TEL: 086-235-7235  
FAX: 086-222-5214  
E-mail: nakanaka\_e820@yahoo.co.jp

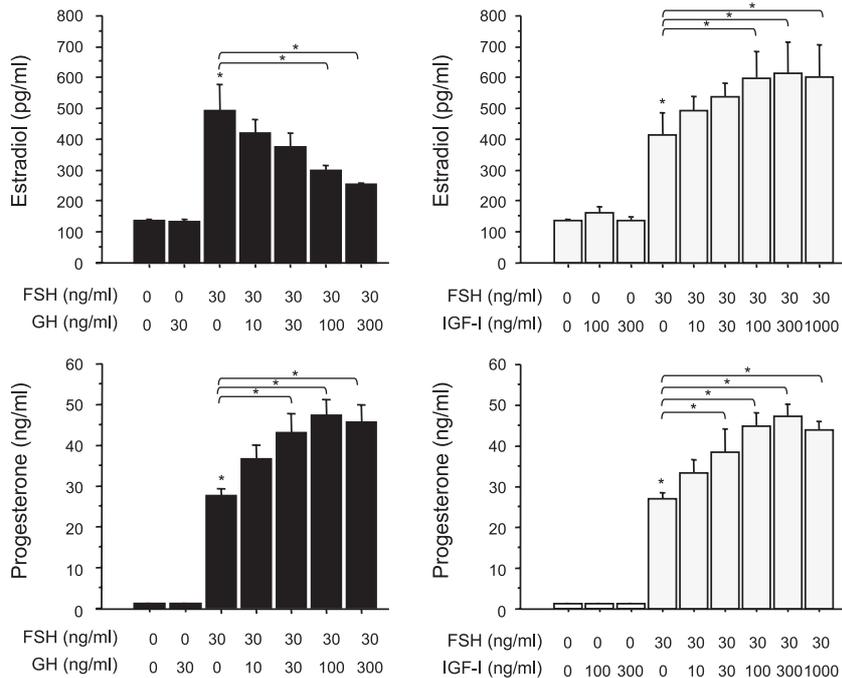


図1 FSHによる卵巣ステロイド産生におけるGHおよびIGF-Iの影響  
 ラット顆粒膜細胞初代培養細胞におけるステロイド産生において、GHはFSH刺激によるestradiol (E2)合成を濃度反応性に抑制し、progesterone (P4)合成を増加した。IGF-IはFSH刺激によるE2合成とP4合成をともに促進した (平均値±SEM, \*P<0.05にて有意)。

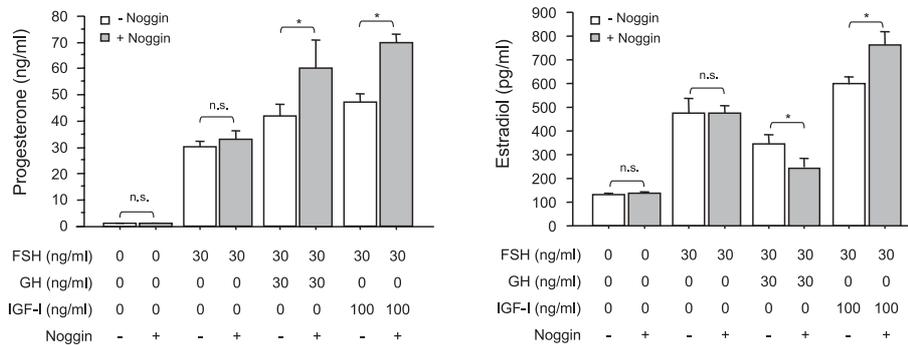


図2 GHおよびIGF-Iによるステロイド産生調節に対するNogginの影響  
 ラット顆粒膜細胞初代培養細胞において、内因性BMP作用を中和するNogginの存在下では、GH/IGF-Iによるステロイド合成調節作用が増幅された。(平均値±SEM, \*P<0.05にて有意)

/STAT経路を介して顆粒膜細胞でのIGF-IおよびIGF-I受容体発現を促進した。また、IGF-I受容体シグナル阻害剤 (AG1024, AG538) はFSHによるP4産生を抑制し、FSHによるP4産生刺激に対するGHの増幅作用はIGF-I中和抗体により抑制された。つまりFSHによるP4産生がGHにより増幅される機序には、顆粒膜細胞由来のIGF-I発現の増強が関与することが明らかとなった。

### ラット顆粒膜細胞におけるGH/IGF-IとBMPシステムとの相互作用

卵巣に発現するBMP分子は卵母細胞・顆粒膜細胞・莖膜細胞にそれぞれ特異的なBMPリガンドが存在し、autocrine/paracrine機序により卵巣発育を調節している[7-9]。特にBMPリガンドは共通してFSHによるP4産生を抑制するluteinizing inhibitorとしての作用をもつ。興味深いことに、GHによる卵巣ステロイド合成調節は、BMPリガンドを中和する結合蛋白Nogginの存在下で増幅されたことから (図2)、GHとBMPシステムが相

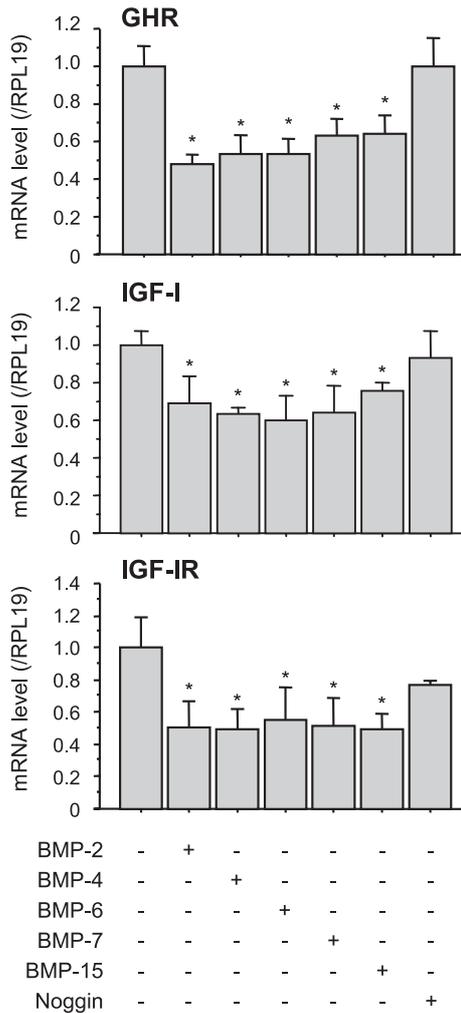


図3 BMPによるGH/IGF-I受容体およびIGF-I発現への影響  
ラット顆粒膜細胞初代培養細胞において、BMPリガンド(BMP-2, -4, -6, -7, -15)の処理によりGH受容体(GHR)、IGF-I受容体(IGF-IR)およびIGF-I mRNAの発現レベルが減少した(平均値±SEM, \*P<0.05にて有意)。

互に機能連関している可能性が示唆された。BMPリガンド(BMP-2, -4, -6, -7, -15)の処理により、顆粒膜細胞のGHおよびIGF-I受容体とIGF-Iの発現が減弱し(図3)、IGF-IによるE2産生の増幅作用は、これらBMPリガンドの存在下で抑制された(図4)。反対に、GH・IGF-I処理により、顆粒膜細胞のBMP受容体(ActRII, BMPRII, ALK-6)の発現が抑制され、抑制性SmadであるSmad6, 7の発現は亢進した。したがって、GH/IGF-IとBMPシステムは互いに拮抗することが明らかとなった。特に、GHよりもIGF-Iが、Smad1/5/8のリン酸化とBMPの標的遺伝子であるId-1転写活性を直接抑制することから(図5)、両者の拮抗関係はBMP vs. IGF-Iの間で成立していることが示唆された。この

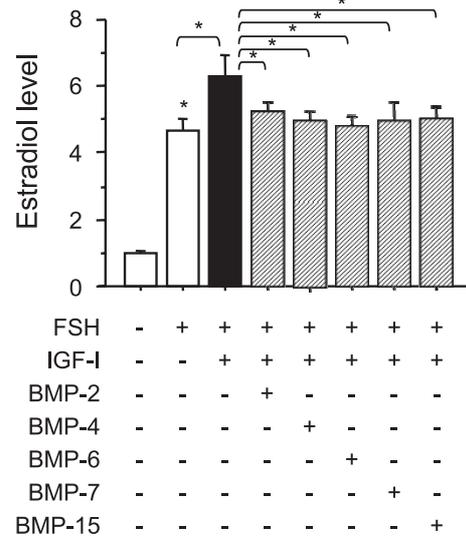


図4 IGF-Iによるエストロゲン産生調節に対するBMPの影響  
ラット顆粒膜細胞初代培養細胞において、BMPリガンド(BMP-2, -4, -6, -7, -15)は、IGF-IによるFSH誘導性estradiol(E2)の増幅反応に拮抗した(平均値±SEM, \*P<0.05にて有意)。

ように、GHは卵巣に存在する内因性IGF-IとBMP活性の均衡を制御しながら、卵巣発育調節に寄与している可能性が示唆された(図6)。

### GH多寡による生殖内分泌機能への影響

これらの結果を踏まえて、GHの多寡が生殖内分泌機能に与える影響について、われわれの仮説を図7に示す。GH/IGF-IとBMP活性が同等である状態を健全な卵巣発育と仮定すると、GH分泌不全の状態では、GH/IGF-I作用の低下により内因性BMP活性が増強する結果、FSH受容体発現の抑制と顆粒膜細胞の増殖が亢進し、閉鎖卵胞の増加と健全卵胞の減少を起こしうる。この表現型は、これまでに報告されたGH受容体欠損マウス[5]やBMP-15過剰発現マウスでの生殖表現型[10]と類似する。また、GH過剰状態では内因性のBMP活性の抑制により顆粒膜細胞の増殖が抑制され、FSH受容体発現の正常な制御が生じず、また下垂体に存在するBMP機能へも影響してゴナドトロピン分泌にも干渉する可能性がある。このようなGH/IGF-IとBMP活性のアンバランスが遷延する場合、結果としてさまざまな程度の卵巣機能障害へと繋がる可能性があろう。

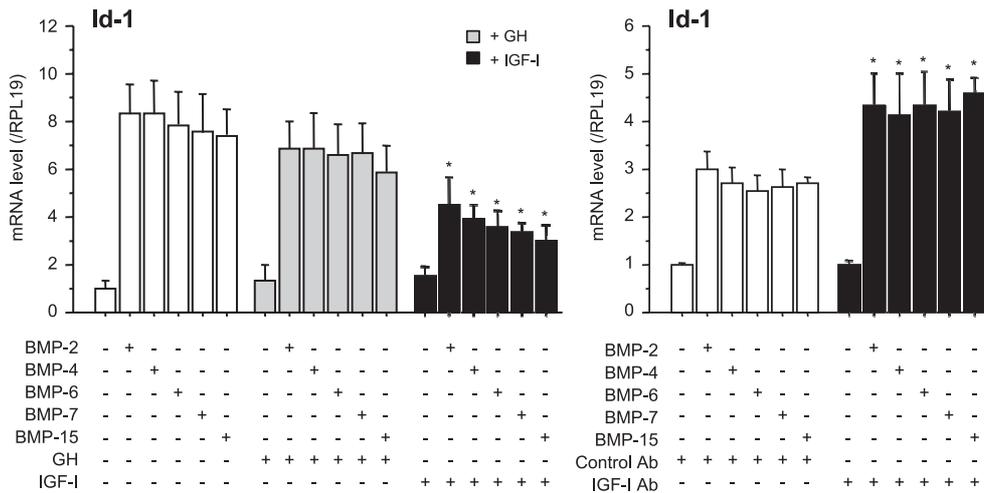


図5 GH/IGF-IのBMPシグナルへの影響  
 ラット顆粒膜細胞初代培養細胞において、BMPの標的遺伝子であるId-1の転写活性は外因性のIGF-Iにより抑制され、IGF-I中和抗体により内因性IGF-I作用を抑制するとId-1の発現抑制が解除された(平均値±SEM, \*P<0.05にて有意)。

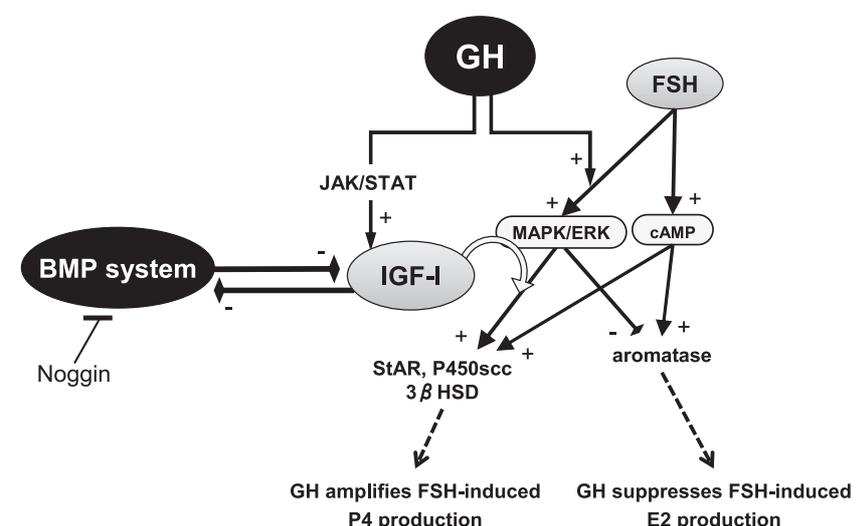


図6 卵胞ステロイド合成調節におけるGH/IGF-IとBMPシステムの機能連関  
 GHは、FSH受容体シグナルのうちMAPK/ERK経路を介してFSHによるestradiol (E2)産生を抑制する。また、GHはIGF-I作用を介してBMPシステムに拮抗し、FSHによるprogesterone (P4)の産生を促進する。卵胞に内在するBMPシステムとIGF-Iは相互に拮抗作用を呈する。

おわりに

われわれはラット顆粒膜細胞・卵母細胞を用いて、卵胞発育に重要なBMPシステムに着目し、GHが卵巣機能に与える影響について明らかにした。GHはゴナドトロピンと協調して卵胞成長を支持するが、卵巣ではIGF-IとBMP分子間の拮抗作用を通じて、卵胞ステロイド分泌能の恒常性を維持するという新たなメカニズムが明らかとなった。先端巨大症や成長ホルモン分泌不全症(AGHD)は、間脳下垂体疾患として新たに2009年10月より厚生労働省の特定疾患として追加された難病の1

つとなっている。患者のQOLの向上のために、これら下垂体疾患による性腺系・生殖内分泌系へのインパクト[6, 11]とその機序を解明することは重要な課題であると考えている。

謝辞

本稿は平成23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。本稿を執筆する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 青原 稔先生、第16回学術集会会長 宮本 薫先生、ならびに本誌編集委員 筒井和義先生に深謝申し上げます。

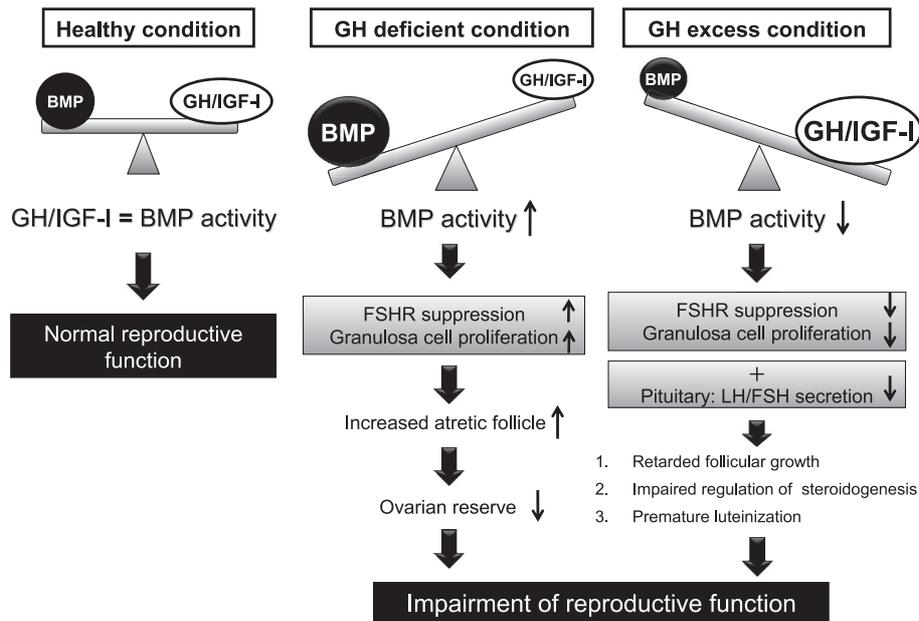


図7 GH多寡によるBMPシステムへの影響と生殖内分泌機能における仮説

## 引用文献

1. Silva JR, Figueiredo JR, van den Hurk R (2009) Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology* 71, 1193-1208.
2. Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellve AR, Efstratiadis A (1996) Effects of an *Igf1* gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 10, 903-918.
3. Zhou J, Kumar TR, Matzuk MM, Bondy C (1997) Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol Endocrinol* 11, 1924-1933.
4. Zhou Y, Xu BC, Maheshwari HG, He L, Reed M, Lozykowski M, Okada S, Cataldo L, Coschigamo K, Wagner TE, Baumann G, Kopchick JJ (1997) A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 13215-13220.
5. Bachelot A, Monget P, Imbert-Bollere P, Coshigano K, Kopchick JJ, Kelly PA, Binart N (2002) Growth hormone is required for ovarian follicular growth. *Endocrinology* 143, 4104-4112.
6. Nakamura E, Otsuka F, Inagaki K, Miyoshi T, Matsumoto Y, Ogura K, Tsukamoto N, Takeda M, Makino H (2012) Mutual regulation of growth hormone and bone morphogenetic protein system in steroidogenesis by rat granulosa cells. *Endocrinology* 153, 469-480.
7. Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF (2004) The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 25, 72-101.
8. Otsuka F, McTavish K, Shimasaki S (2011) Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Mol Reprod Dev* 78, 9-21.
9. Otsuka F, Inagaki K (2011) Unique bioactivities of bone morphogenetic proteins in regulation of reproductive endocrine functions. *Reprod Med Biol* 10, 131-142.
10. McMahon HE, Hashimoto O, Mellon PL, Shimasaki S (2008) Oocyte-specific overexpression of mouse bone morphogenetic protein-15 leads to accelerated folliculogenesis and an early onset of acyclicity in transgenic mice. *Endocrinology* 149, 2807-2815.
11. Nakamura E, Otsuka F, Inagaki K, Miyoshi T, Yamanaka R, Tsukamoto N, Suzuki J, Ogura T, Makino H (2010) A novel antagonistic effect of the bone morphogenetic protein system on prolactin actions in regulating steroidogenesis by granulosa cells. *Endocrinology* 151, 5506-5518.