

多嚢胞性卵巣症候群の卵巣線維化における小胞体ストレスの役割

高橋 望, 原田 美由紀, 廣田 泰, 小池 洋, 國富 千智, 吉野 修
泉 玄太郎, 平田 哲也, 甲賀 かをり, 平池 修, 大須賀 穰, 藤井 知行
東京大学産婦人科学教室

はじめに

多嚢胞性卵巣症候群 (polycystic ovary syndrome; PCOS) は排卵障害, 高アンドロゲン血症, 多嚢胞性卵巣を認める症候群である。生殖可能年齢の6~10%に認め, 排卵障害をきたす不妊の主な原因となっている[1]。PCOSは複合的な病態を示し, ゴナドトロピン分泌異常, 高アンドロゲン, インスリン抵抗性, 卵巣機能障害, 卵胞発育停止などのさまざまな因子の相互作用によって起きている[2]。PCOSの卵巣では, コラーゲンと線維組織の沈着により, 卵巣皮膜の肥厚化を認める[3]。しかし, PCOSにおける線維化の機序は明らかとなっていない。近年の研究で, 顆粒膜細胞における Transforming growth factor (TGF)- β 1とその下流で作用する connective tissue growth factor (CTGF) が卵巣における細胞外マトリックスのリモデリングに関与し, また, PCOS患者の血清中ならびに卵巣における TGF- β 1の発現が増加している[4,5]ことから, TGF- β 1がPCOSの病態に関与している可能性が示唆されている。

炎症や酸化ストレスなどの卵巣内の局所因子のPCOSの病態への関与が報告されているが, 局所因子の1つとして小胞体ストレス応答が種々の臓器における細胞の恒常性維持ならびに病態に深くかかわることが知られている。小胞体はタンパク質合成・成熟を行う細胞内器官であるが, さまざまな因子や環境要因などのストレス負荷により, 折りたたみ不全なタンパク質が蓄積される。小胞体の処理能力を超えて異常タンパク質が蓄積した状態を小胞体ストレス, それに対する細胞の適応反応を小胞体ストレス応答と呼ぶ。糖尿病において小胞体ストレスが活性化し, 耐糖能障害の原因となっていることが示され, 以降, 神経変性疾患, 癌, 胎盤機能などさまざまな病態に関与していることが明らかとなった[6]。一方

で, 卵巣における小胞体ストレスの役割はほとんど示されていない。われわれの研究室ではマウスの卵巣において, 2次卵胞以降の顆粒膜細胞に活性化された小胞体ストレスセンサータンパク質 (inositol requiring enzyme 1 (IRE1), double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase (PERK)), 小胞体ストレス応答因子である spliced-form of X-box-binding protein 1 (XBP1(S)), Heat shock protein 5 (HSPA5) mRNAの発現を認めることを明らかにした[7]。しかし, その細胞機能に与える影響は不明である。近年, 小胞体ストレスが組織の線維化を誘導することが示されてきた[8,9]。本研究では, 卵巣の線維化に着目し, 小胞体ストレスがPCOSの卵巣で活性化し, TGF- β 1を介して卵巣線維化を誘導しているかどうかを検討した。さらにヒトで安全性が確かめられている小胞体ストレス阻害剤のPCOS卵巣における卵巣線維化改善効果を検討した。

PCOS患者の顆粒膜細胞で小胞体ストレスは活性化し, TGF- β 1の発現が増加している

PCOSの卵巣で小胞体ストレスの活性化および線維化を認めているかを調べた。小胞体ストレスが活性化すると小胞体ストレスセンサータンパク質であるIRE1とPERKはリン酸化を認め, 小胞体ストレス応答因子を誘導する。図1Aに示すように, PCOS卵巣の顆粒膜細胞において, phospho-IRE1, phospho-PERKの発現は有意に増加し, TGF- β 1の発現も増加を認めた。また, Masson's trichrome染色において, PCOS患者では卵巣間質における線維組織の増生を認めた(図1A)。

次に, 体外受精を施行したPCOS患者(n=11)とControl患者(n=10)のヒト黄体化顆粒膜細胞(GLCs)における小胞体ストレス応答因子および線維化誘導因子のmRNA発現を調べた。小胞体ストレス応答因子であるXBP1(S), HSPA5, activating transcription factor 4(ATF4), ATF6, C/EBP homologous protein(CHOP)のmRNA発現は, Control患者に比べてPCOS患者のGLCsで有

連絡先: 高橋 望, 東京大学産婦人科学教室
〒113-8654 東京都文京区本郷7-3-1
TEL: 03-3815-5411
FAX: 03-5800-9799
E-mail: nozotakahashi@hotmail.co.jp

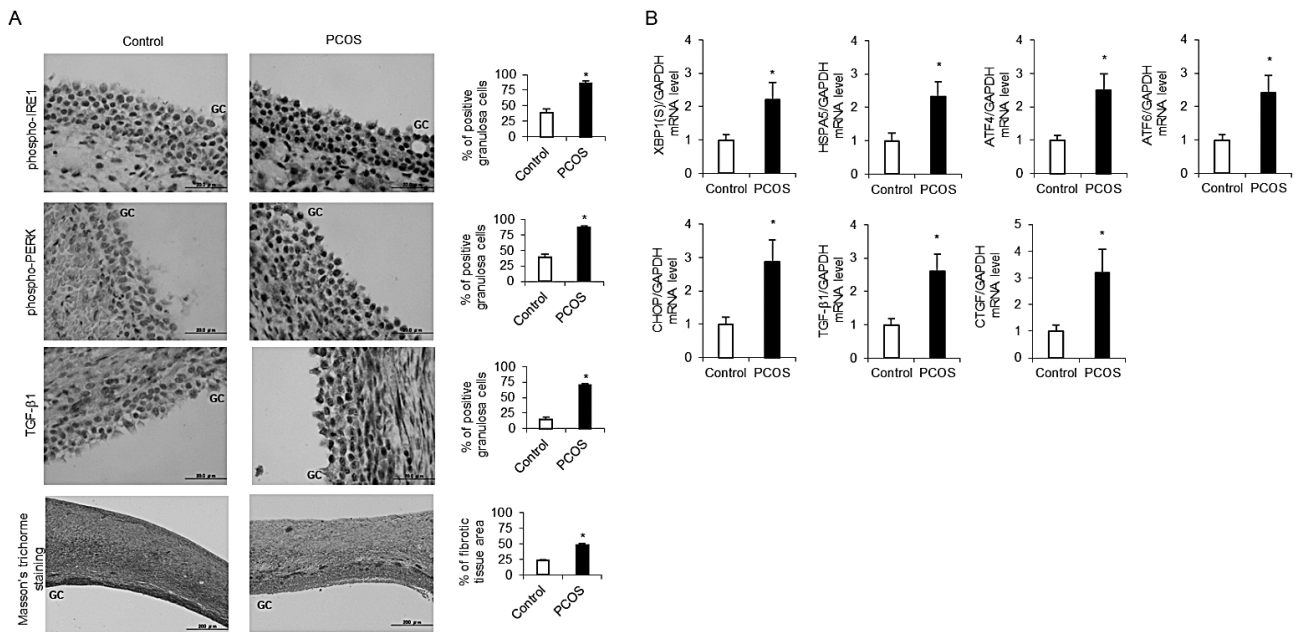


図1 Control患者とPCOS患者における小胞体ストレスの活性化と卵巣線維化および線維化誘導因子の発現
 A. Control患者 (n=3) とPCOS患者 (n=3) の卵巣における phospho-IRE1, phospho-PERK, TGF- β 1 のタンパク発現を免疫染色で、卵巣の線維化を Masson's trichrome 染色で評価した。グラフは定量的評価を示す。* $P < 0.05$ GC, 顆粒膜細胞層。
 B. Control患者 (n=10) とPCOS患者 (n=11) のヒト黄体化顆粒膜細胞 (GLCs) における小胞体ストレス応答因子と線維化誘導因子の mRNA 発現を定量的 PCR を用いて評価した。Internal control として GAPDH を用いた。* $P < 0.05$

意に発現が上昇していた。また、線維化誘導因子である TGF- β 1, CTGF の mRNA 発現も、PCOS 患者の GLCs で有意に増加していた (図 1 B)。PCOS 患者の顆粒膜細胞において小胞体ストレスが活性化し、線維化誘導因子の発現が増加していることが示された。

ヒト顆粒膜培養細胞において小胞体ストレスは TGF- β 1 と CTGF の発現を誘導する

顆粒膜細胞における小胞体ストレスの TGF- β 1 発現への影響を調べるため、ヒト GLCs に小胞体ストレス刺激剤である tunicamycin を投与した。tunicamycin 投与により TGF- β 1 と CTGF の mRNA 発現の増加を認め、小胞体ストレス応答因子である XBP1 (S) も同様に増加を認めた (図 2 A)。小胞体ストレス阻害剤の TUDCA 投与により、tunicamycin によって誘導される TGF- β 1 と CTGF の発現の抑制を認めた。ELISA の結果より、tunicamycin で活性型 TGF- β 1 タンパクの分泌が上昇し、TUDCA によって抑制されることが示された (図 2 B)。小胞体ストレスによる TGF- β 1 の発現上昇の分子学的機序を調べるため、XBP1 (S) を siRNA でノックダウンした。XBP1 (S) の mRNA 発現は siRNA により 41% の減少を認め、TGF- β 1 mRNA の発現は 36% の減少を認めた (図 2 C)。小胞体ストレス刺激により顆粒膜細胞に

おける TGF- β 1 の分泌が亢進し、XBP1 (S) の経路が発現調節に関与していることが示された。

小胞体ストレス阻害剤は、PCOS モデルマウスの卵巣における線維化誘導因子の発現を低下し、卵巣線維化を改善する

小胞体ストレス阻害剤の生体内における卵巣線維化への効果を調べるため、PCOS モデルマウスに 2 種類の小胞体ストレス阻害剤を投与した。PCOS モデルマウスは先行研究で確立されている dehydroepiandrosterone (DHEA) 投与モデルを用いた [10-12]。3 週齢の Balb/C 雌マウスを使用し、DHEA (6 mg/100g body weight/day) を 20 日間皮下投与した。小胞体ストレス抑制剤として、TUDCA (50mg/100g body weight/day) または BGP-15 (3 mg/100g body weight/day) を 20 日間経口投与した。

図 3 A に示すとおり、Masson's trichrome 染色で PCOS モデルマウスの卵巣間質では線維組織の増加を認めた。また、PCOS マウスの卵巣では間質部分における collagen type I, 基底膜における collagen type IV の発現増加を認めた。TUDCA または BGP-15 の経口投与により、線維組織・collagen type I と type IV 発現の低下を認めた。さらに、TGF- β 1 発現は、PCOS マウスの顆

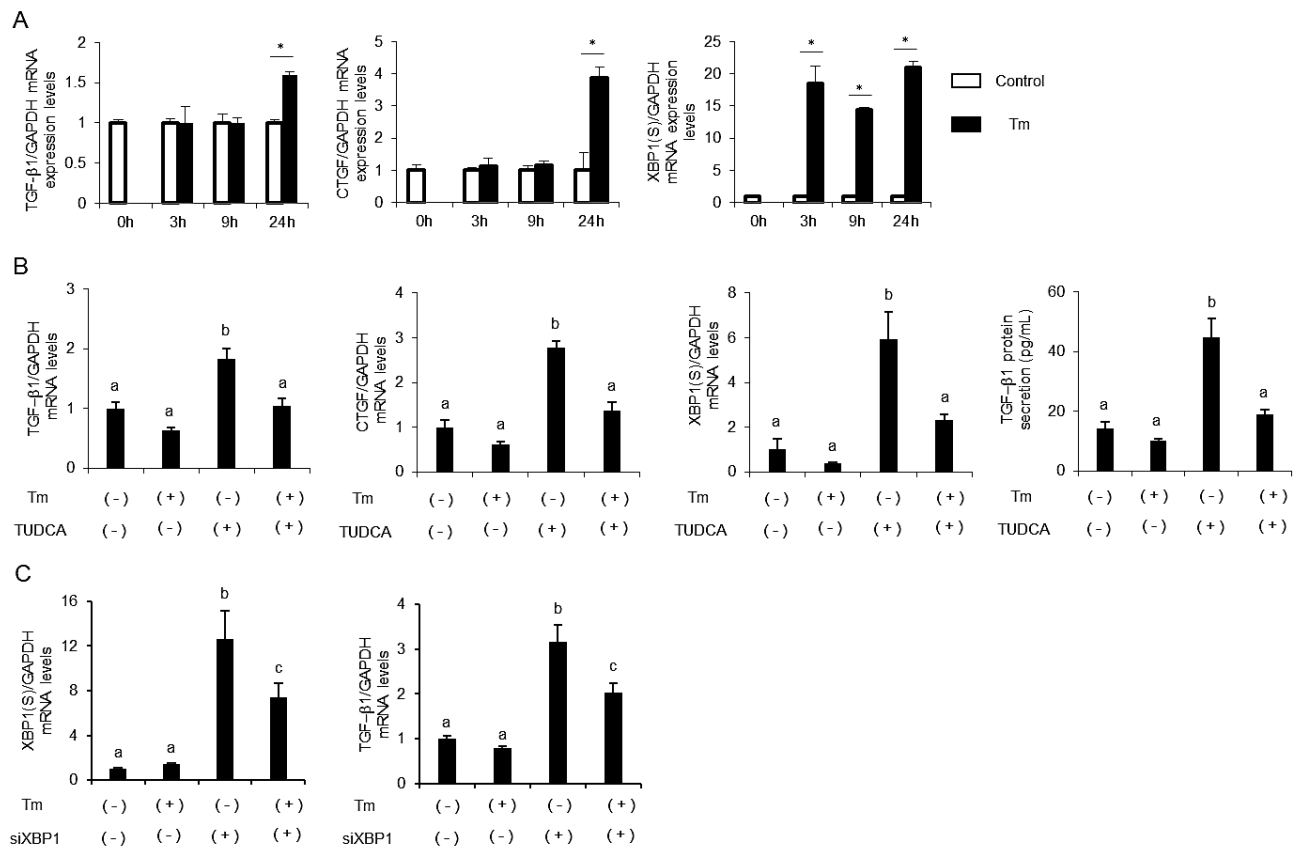


図2 小胞体ストレスはヒト GLCs における線維化誘導因子の発現を促進する

A. ヒト GLCs に 2.5 μg/ml tunicamycin を 3~24 時間投与した。

B. ヒト GLCs に TUDCA 1 mg/ml を 24 時間投与後、2.5 μg/ml tunicamycin を 24 時間投与した。

C. ヒト GLCs に XBP1 siRNA 50nM を 24 時間投与後、2.5 μg/ml tunicamycin を 24 時間投与した。線維化誘導因子 (TGF-β1, CTGF) と XBP1 (S) の mRNA 発現を定量的 PCR で評価した。Internal control として GAPDH を用いた。活性化 TGF-β1 のタンパク分泌を ELISA で評価した。

*異符号間で、P<0.05を示す。Tm, tunicamycin; TUDCA, tauroursodeoxycholic acid.

粒膜細胞で発現上昇を認め、TUDCA または BGP-15 投与により、減少を認めた。また、PCOS の顆粒膜細胞で増加していた phospho-IRE1 のタンパク発現、XBP1 (S) の mRNA 発現は、TUDCA・BGP-15 投与により抑制を認めた。定量的 PCR の結果により、XBP1 (S)・TGF-β1・CTGF の卵巣全体における mRNA 発現は、PCOS マウスで上昇し、TUDCA・BGP-15 投与によって減少を認めた (図 3 B)。

おわりに

小胞体ストレスは、さまざまな生理的因子や酸化ストレスおよび炎症などの病的因子により惹起され、変性タンパク質の蓄積または小胞体処理能力の低下をきたす [13, 14]。一方で小胞体ストレスは酸化ストレス・炎症を誘導する因子でもあり、酸化ストレスもまた炎症を誘導する。したがって、小胞体ストレス・酸化ストレス・

炎症は互いに密接に影響していると考えられる。近年の研究で、全身の軽度炎症状態および顆粒膜細胞における局所の炎症状態が、PCOS の病態に関与していることが示されてきた [2, 15, 16]。さらに、PCOS で認める過剰アンドロゲン状態も局所炎症との関連を認め、炎症刺激は莖膜細胞からのアンドロゲン産生を刺激し、また高アンドロゲン状態は顆粒膜細胞で炎症性サイトカインの産生を誘導する [16, 17]。PCOS の卵胞液中において酸化ストレスマーカーの上昇を認め [18]、酸化ストレスが PCOS の病態に関与していることが示唆される。これらの知見より、小胞体ストレス・酸化ストレス・炎症が、PCOS の卵巣における卵胞内の微小環境に悪影響を与えていると考えられる。また、PCOS の特徴であるインスリン抵抗性が、直接的または間接的に小胞体ストレスの活性化に寄与する可能性が考えられる。脂肪細胞において、糖毒性は小胞体ストレスを活性化していることから、インスリン抵抗性が顆粒膜細胞における小胞体ストレス

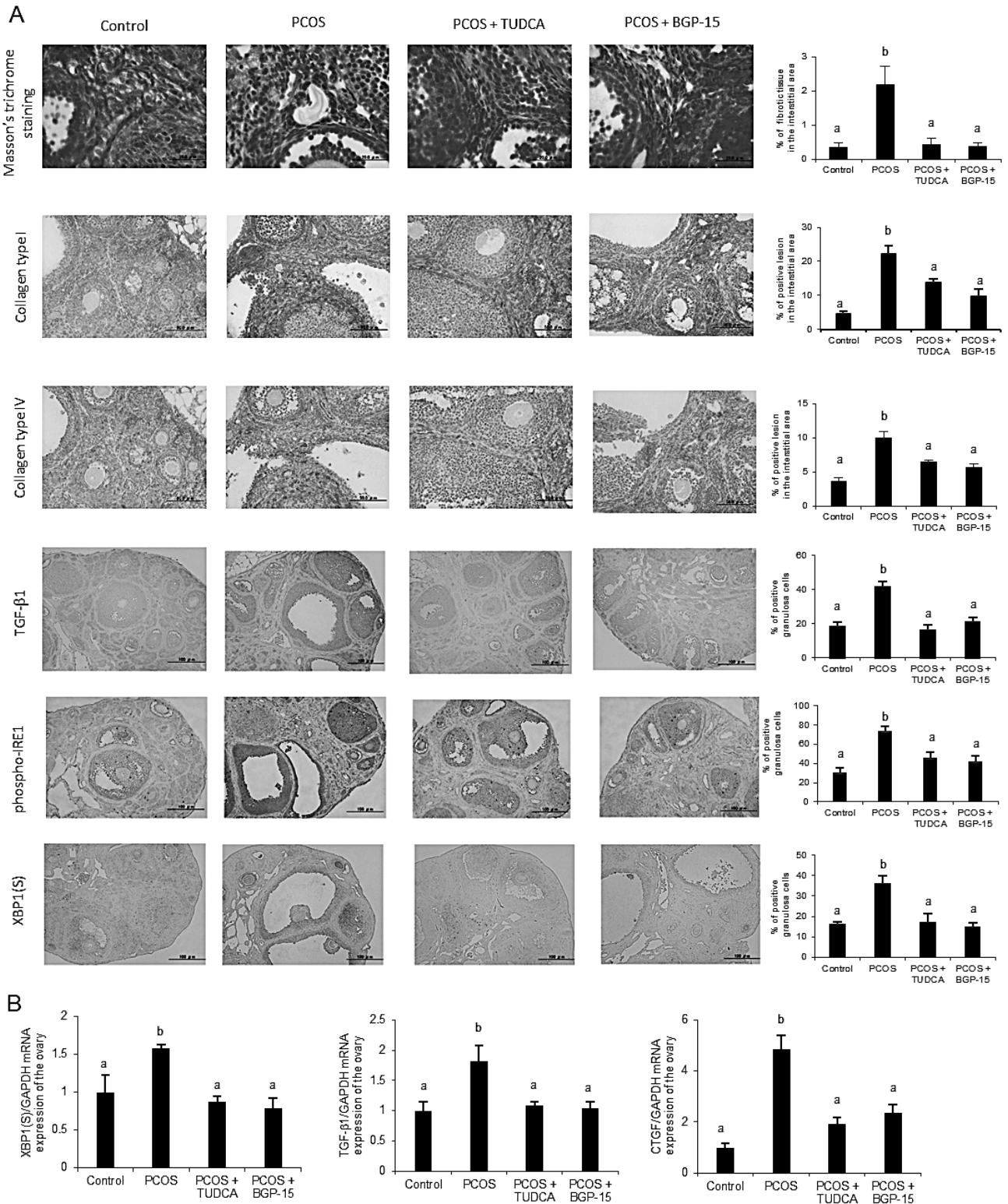


図3 小胞体ストレス阻害剤のPCOSマウスにおける卵巣線維化への影響

Control群 (n=5) は sesami oil を皮下投与し、生理食塩水を20日間経口投与した。PCOS群 (n=5) では、DHEA (6 mg/100g body weight/day) を皮下投与し、生理食塩水を20日間経口投与した。PCOS+TUDCA群 (n=5) では、DHEA を皮下投与し、TUDCA (50mg/100g body weight/day) を20日間経口投与した。PCOS+BGP-15群 (n=5) では、DHEA を皮下投与し、BGP-15 (3 mg/100g body weight/day) を20日間経口投与した。

A. 卵巣線維化を Masson's trichrome 染色で、collagen type I, collagen type IV, phospho-IRE1, TGF-β1 のタンパク発現を免疫染色で、XBP1 (S) mRNA 発現を in situ hybridization で評価した。グラフは定量的評価を示す。

B. 卵巣における XBP1 (S), TGF-β1, CTGF の mRNA 発現を定量的 PCR で評価した。Internal control として GAPDH を用いた。異符号間で、P<0.05 を示す。TUDCA, tauroursodeoxycholic acid.

を直接惹起している可能性, また, インスリン抵抗性が脂肪細胞を介して全身の炎症状態を引き起こす, あるいは局所のアンドロゲン産生を亢進することにより小胞体ストレスが間接的に惹起される可能性などが考えられる. 以上のように, PCOS の病態でみられる酸化ストレス・炎症・高アンドロゲン状態・インスリン抵抗性などのさまざまな卵巣局所環境異常によって, 卵巣で小胞体ストレスが惹起されているものと考えられる.

PCOS 患者の顆粒膜細胞において, 線維化誘導因子である TGF- β 1 と CTGF の発現が増加していた. しかし, PCOS 患者の卵巣における TGF- β 1 発現の調節メカニズムは明らかとされていない. 本研究結果では, 小胞体ストレス刺激剤により顆粒膜細胞における TGF- β 1 と CTGF の発現増加を認め, 小胞体ストレス阻害剤によって抑制を認めた. また, siRNA の実験結果により, 小胞体ストレス応答因子の 1 つである XBPI (S) が小胞体ストレス誘導下の TGF- β 1 の発現調節に関与していることが示唆された. 近年, 肝細胞や線維芽細胞において, 小胞体ストレスで TGF- β 1 の発現を誘導することが報告されている [19, 20]. PCOS の卵巣局所環境異常によって顆粒膜細胞で活性化した小胞体ストレスが, TGF- β 1 の発現を増加している可能性が示唆された.

本研究においてヒトへの臨床応用を想定し, PCOS モデルマウスに小胞体ストレス抑制剤 (TUDCA, BGP-15) を経口投与し, 卵巣線維化の抑制効果を評価した. TUDCA は熊の胆汁酸として漢方治療として何千年も使用されている薬剤であり, またイタリアでは Taurolite として肝障害, 胆石症の治療に用いられている. 近年, TUDCA はケミカルシャペロンとして, 変性タンパク質の蓄積を是正し, 小胞体ストレスを抑制する作用が明らかとなり, 2 型糖尿病などの小胞体ストレス関連疾患の治療薬として注目されている [21]. また, BGP-15 は, 糖尿病の治療薬として第 2 相臨床試験が済んでおり, HSP72 の発現を誘導し, 近年小胞体ストレス阻害剤として注目されている [22]. 本研究においてはヒトへの臨床応用を想定し, TUDCA と BGP-15 を経口投与し, 卵巣線維化の抑制効果を評価した. 小胞体ストレス阻害剤である TUDCA と BGP-15 の投与によって, 線維組織・コラーゲン沈着の抑制を認め, 顆粒膜細胞における TGF- β 1 の発現低下を認めた. *In vitro* の結果と合わせると, 小胞体ストレスにより, 顆粒膜細胞における TGF- β 1 の発現が誘導され, 卵巣の線維化を引き起こしている可能性が示唆された. C 型肝炎や遺伝性肝疾患においては, 小胞体ストレスにより肝細胞からの TGF- β 1 が誘導され, 肝線維化をきたしており, 本研究と同様のメカニズ

ムと考えられる [19]. 小胞体ストレスが卵巣線維化を誘導する詳細なメカニズムの解明にはさらなる研究が必要と考えられる.

本研究の結果より, 小胞体ストレスは PCOS の病態に関与し, 小胞体ストレス阻害剤は卵巣線維化を改善し, PCOS の治療薬になりうる可能性が示唆された.

謝 辞

本稿は, 平成 29 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. なお本研究内容は *Scientific Reports* 誌 [23] に掲載されているため, 詳細についてはそちらを参照されたい. 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緒方 勤教授, 第 22 回学術集會会長前多敬一郎教授, ならびに本誌編集委員の方々から感謝申し上げます.

引用文献

1. Bozdag G, Mumusoglu S, Zengin D, Karabulut E, Yildiz BO (2016) The prevalence and phenotypic features of polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 31, 2841-2855.
2. Dumesic DA, et al (2015) Scientific Statement on the Diagnostic Criteria, Epidemiology, Pathophysiology, and Molecular Genetics of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocr Rev* 36, 487-525.
3. Hughesdon PE (1982) Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called "hyperthecosis". *Obstet Gynecol Surv* 37, 59-77.
4. Fang Y, et al (2016) Transforming growth factor-beta1 increases lysyl oxidase expression by downregulating MIR29 A in human granulosa lutein cells. *Reproduction* 152, 205-213.
5. Raja-Khan N, Urbanek M, Rodgers RJ, Legro RS (2014) The role of TGF-beta in polycystic ovary syndrome. *Reprod Sci* 21, 20-31.
6. Hetz C, Chevet E, Harding HP (2013) Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov* 12, 703-719.
7. Harada M, et al (2015) Evidence of the activation of unfolded protein response in granulosa and cumulus cells during follicular growth and maturation. *Gynecol Endocrinol* 31, 783-787.
8. Lenna S, Trojanowska M (2012) The role of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in fibrosis. *Curr Opin Rheumatol* 24, 663-668.
9. Tanjore H, Lawson WE, Blackwell TS (2013) Endoplasmic reticulum stress as a pro-fibrotic stimulus. *Biochim Biophys Acta* 1832, 940-947.
10. Elia E, et al (2006) The mechanisms involved in the action of metformin in regulating ovarian function in hyperandrogenized mice. *Mol Hum Reprod* 12, 475-481.
11. Solano ME, et al (2006) Metformin prevents embryonic resorption induced by hyperandrogenisation with dehydroepi-

- androsterone in mice. *Reproduction, Fertility, and Development* 18, 533-544.
12. Lai H, et al (2014) High-fat diet induces significant metabolic disorders in a mouse model of polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod* 91, 127.
 13. Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 519-529.
 14. Walter P, Ron D (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334, 1081-1086.
 15. Schmidt J, et al (2014) Differential expression of inflammation-related genes in the ovarian stroma and granulosa cells of PCOS women. *Mol Hum Reprod* 20, 49-58.
 16. Adams J, et al (2016) Enhanced Inflammatory Transcriptome in the Granulosa Cells of Women With Polycystic Ovarian Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 101, 3459-3468.
 17. Gonzalez F (2012) Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome: underpinning of insulin resistance and ovarian dysfunction. *Steroids* 77, 300-305.
 18. Chattopadhyay R, et al (2010) Effect of follicular fluid oxidative stress on meiotic spindle formation in infertile women with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Obstet Invest* 69, 197-202.
 19. Chusri P, et al (2016) HCV induces transforming growth factor beta1 through activation of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Sci Rep* 6, 22487.
 20. Matsuzaki S, et al (2015) Physiological ER Stress Mediates the Differentiation of Fibroblasts. *PLoS One* 10, e0123578.
 21. Ozcan U, et al (2006) Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313, 1137-1140.
 22. Kennedy TL, et al (2016) BGP-15 Improves Aspects of the Dystrophic Pathology in mdx and dko Mice with Differing Efficacies in Heart and Skeletal Muscle. *Am J Pathol* 186, 3246-3260.
 23. Takahashi N, et al (2017) Activation of Endoplasmic Reticulum Stress in Granulosa Cells from Patients with Polycystic Ovary Syndrome Contributes to Ovarian Fibrosis. *Sci Rep* 7, 10824.