

インクレチンによる卵巣ステロイド産生系への影響と BMP の関与

西山 悠紀¹⁾, 大塚 文男²⁾

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¹⁾, 総合内科学²⁾

はじめに

インクレチンである GIP (glucose-dependent insulinotropic polypeptide, gastric inhibitory polypeptide) および GLP-1 (glucagon-like peptide-1) は、血糖依存性に膵臓からのインスリン分泌を促進する消化管ホルモンであり、多数の膵外作用を有するが、卵巣局所における作用はいまだ十分明らかでない。

多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) では、インスリン抵抗性が高アンドロゲン血症や排卵障害に関与することが知られているが、近年 PCOS 患者においてインクレチン分泌パターンの変化を認めるとの報告がいくつかあり、その変化が PCOS の病態や活動性に関与する可能性も示唆されている。われわれはインクレチンが卵巣ステロイド合成に与える影響とその機序について、ラット卵巣顆粒膜細胞の初代培養を用いて検討を行った。

今回の検討では、卵巣ステロイド産生や細胞分化増殖の調節に関与し黄体化抑制因子として働く BMP (bone morphogenetic protein) -6 に着目した結果、インクレチンの卵巣ステロイド産生における作用およびインクレチンと卵巣 BMP システムの新たな機能連関の存在が明らかとなった。

インクレチンの作用と性腺における役割

GIP は十二指腸に存在する K 細胞、GLP-1 は下部小腸および結腸に存在する L 細胞から分泌され、食後インスリン分泌の 50% 以上を担っているとされる [1]。近年この作用を応用した GLP-1 受容体作動薬や DPP-4 (dipeptidyl peptidase-4) 阻害薬は糖尿病治療の主力となっている。インクレチンは膵β細胞では、7 回膜貫通型 G 蛋白共役受容体に結合し、アデニル酸シクラーゼ

(AC) の活性化、細胞内 cAMP の上昇を介してインスリン分泌を促進する。

また、中枢神経・消化管・骨・脂肪細胞などさまざまな膵外組織での作用も明らかになってきたが [1]、性腺における作用については報告が少なく、GnRH 分泌培養細胞である GT₁₇ 細胞を用いた in vitro の検討において、GLP-1 が GT₁₇ 細胞からの GnRH 分泌を促進することや [2]、GLP-1 受容体ノックアウトマウスでは性腺重量の軽度減少や、雌における性成熟のわずかな遅延や発育卵巣数の減少を認めるが、生殖能に大きな影響は認めない [3] などの限られた報告のみである。

卵巣における BMP システム

卵巣の成長・成熟は、ゴナドトロピンと BMP を含むさまざまな卵巣局所因子の autocrine-paracrine 作用により促される。BMP は卵巣構成細胞特異的にリガンドや受容体を有し、卵巣ステロイド産生や細胞分化増殖を調節する [4]。そのなかでも BMP-6 は顆粒膜細胞および卵母細胞に発現し、顆粒膜細胞において AC 活性化の抑制による cAMP 産生低下を介して、FSH 誘導性 Progesterone 産生を抑制するが、Estradiol 産生には影響しない [5]。BMP-6 はこの黄体化抑制因子としての作用に加え、卵巣発育過程における優位卵巣の選択プロセスにも重要な役割を果たすと考えられる。

PCOS 患者における BMP の病態学的関与とインクレチン分泌

PCOS では BMP が病態学的に関与することが示唆されており、GDF-9 ノックアウトマウスの卵巣では PCOS 様の表現型を呈することや [6]、ヒト PCOS 卵巣では GDF-9 mRNA 発現の遅延・減少を認めること [7]、また PCOS 患者から単離した顆粒膜細胞では、正常な顆粒膜細胞と比較して BMP-6 発現の増加を認める [8-10] ことなどが報告されている。

連絡先：大塚 文男、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2 丁目 5 番 1 号
TEL : 086-235-7342
FAX : 086-235-7345
E-mail : fumiotu@md.okayama-u.ac.jp

表1 PCOS 患者におけるインクレチン分泌の変化

| 対象 | 評価方法 | インクレチン分泌 | 報告年 | 筆頭著者 |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|---------------|
| 非肥満耐糖能正常の PCOS 患者21人 + 年齢・BMI マッチした健常女性13人 | 75gOGTT 時の インクレチン分泌評価 | PCOS 患者で糖負荷後の total-GIP が高 値、後期相で活性型 GLP-1が低値 | 2008 | Vrbikova, J |
| PCOS 患者 (非肥満19人・肥満21人) + 健常女性 (非肥満9人・肥満17人) | メトホルミン(1000mg) を8か月内服後、 75gOGTT 時の インクレチン分泌評価 | メトホルミン内服前：肥満 PCOS 患者 では体重マッチした健常女性・非肥満 PCOS 患者よりも total-GIP は低値 メトホルミン内服後：PCOS 患者では GIP・GLP-1が増加傾向 | 2009 | Svendsen, PF |
| PCOS 患者20人 + 年齢マッチした健常女性10人 | OGTT 時の インクレチン分泌と 作用を評価 | 肥満 PCOS 患者では健常女性と比べ糖 負荷後の total-GIP が低値だが、インク レチン作用は増強する | 2011 | Pontikis, C |
| PCOS 患者202人 + 健常女性47人 | 75gOGTT 時の インクレチン分泌評価 | メタボリスクのない PCOS 患者および 正常体重 PCOS 患者は、健常人より糖 負荷後の GIP が高値 | 2014 | Chang, CL |
| PCOS 患者30人 + BMI マッチした健常女性29人 | 75gOGTT 時の GLP-1分泌評価 | PCOS 患者で空腹時・糖負荷後の GLP-1 が高値 | 2015 | Lin, T |
| 非肥満女性77人 (妊娠糖尿病22人・PCOS19人 ・健常女性36人) | 75gOGTT 時の インクレチン分泌評価 | PCOS 患者で、妊娠糖尿病患者および健 常女性と比べ糖負荷後の GIP・空腹時・ 糖負荷後の GLP1が低値 | 2017 | Vejrazkova, D |

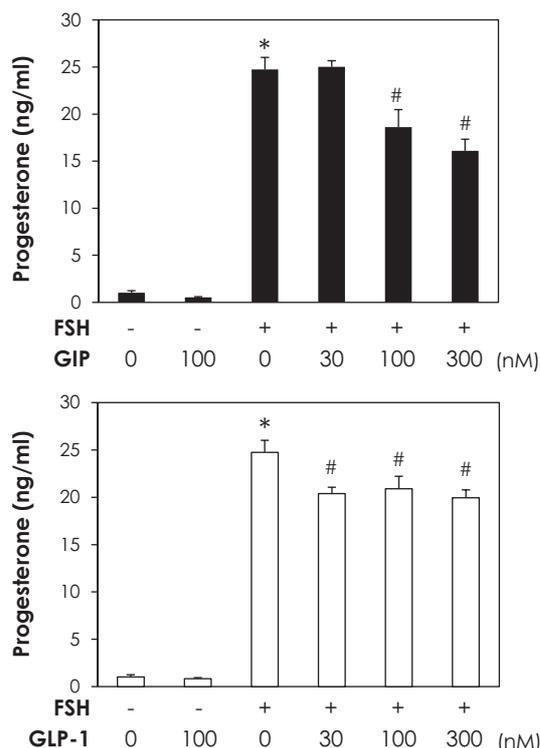


図1 顆粒膜細胞における Progesterone 産生に対するインクレチンの影響
ラット顆粒膜細胞を FSH (30ng/ml)・androstenedione (100nM) の存在下で無血清培地にて培養し、GIP・GLP-1 (30-300nM) 刺激後48時間で培養液中の Progesterone 値を CLIA 法にて測定した。結果は平均値±標準誤差により示し、各群の有意差は、ANOVA および t 検定によって解析し、 $P < 0.05$ を有意とした (* $P < 0.05$ vs. コントロール群, # $P < 0.05$ vs. FSH 処理群)。

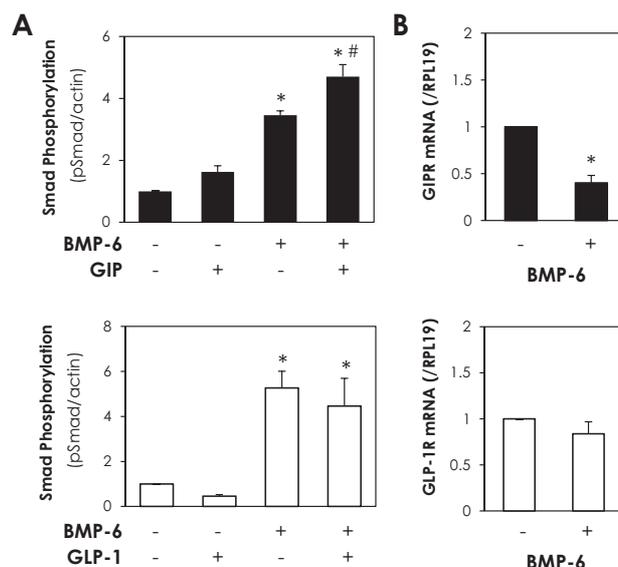


図2 顆粒膜細胞における BMP シグナルに対するインクレチンの影響とインクレチン受容体発現に対する BMP の影響：
A) ラット顆粒膜細胞を GIP・GLP-1 (300nM) の存在下で無血清培地にて24時間培養し、BMP-6 (30ng/ml) 刺激後1時間で細胞溶解液を採取し pSmad1/5/9抗体と actin 抗体を用いて Western blot を行った。シグナル強度の評価には pSmad/actin 比を用いた。
B) ラット顆粒膜細胞を BMP-6 (30ng/ml) の存在下で24時間培養後 total RNA を抽出し、GIP・GLP-1受容体 mRNA レベルをリアルタイム PCR 法にて定量した。各データは ribosomal protein L19 (RPL19) 発現量で標準化した。結果は平均値±標準誤差により示し、各群の有意差は、ANOVA (A) および t 検定 (B) によって解析し、 $P < 0.05$ を有意とした (* $P < 0.05$ vs. コントロール群, # $P < 0.05$ vs. BMP-6処理群)。

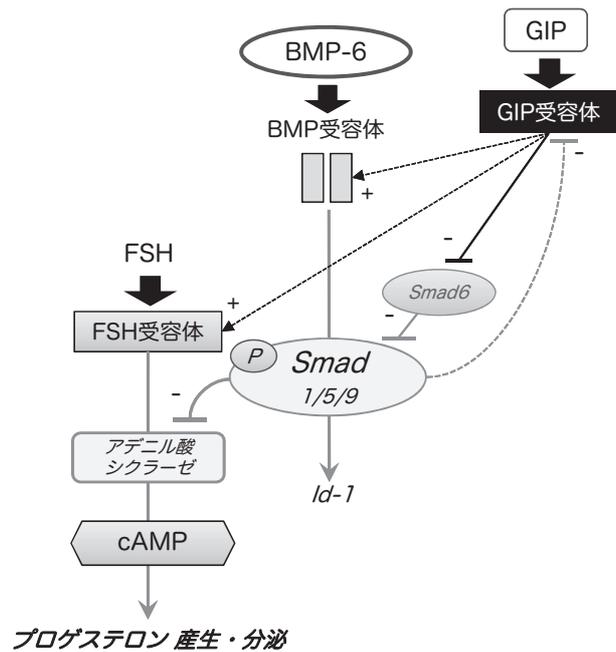


図3 インクレチンとBMPによる卵巣ステロイド合成調節
GIP・GLP-1はともにFSH誘導性Progesterone産生を抑制し、GIPではより強い抑制効果がある。GIPはBMP-I型受容体の発現増強および抑制性Smad6の発現抑制を介して、BMP-6誘導性Smad1/5/9シグナルを増強する。GIPはFSH受容体発現を増強する一方で、BMP-6はGIP受容体発現を抑制する相互作用も存在する。

PCOS患者のインクレチン分泌については、健常者と比べ糖負荷後のGIPレベルの上昇および後期相のGLP-1レベルの低下を認めるという報告[11]や、糖負荷後のGIP・GLP-1レベルはいずれも上昇するという報告[12, 13]がある。一方で、肥満PCOS患者では健常者あるいは妊娠糖尿病患者と比べ糖負荷後のGIPレベルの低下を認めるという報告[14-16]もあり、一定した結果は得られていない(表1)。

しかし、インクレチン分泌パターンの変化がPCOSの病態や活動性に影響を与えている可能性があり、PCOS患者に対する治療において、GLP-1受容体作動薬とメトホルミンの併用群が各単剤使用群よりも体重やインスリン感受性など代謝面での改善効果に加えて、月経周期や妊娠率の改善効果を示したという報告[17]もある。

インクレチンによる卵巣ステロイド産生への影響の検討

ラット卵巣におけるGIP・GLP-1受容体の発現をRT-PCRにより確認した[18]。Diethylstilbestrol (DES)を植え込んだ22日齢のメスSprague-Dawley (SD) ラット

より単離した顆粒膜細胞を用いて検討した結果、GIP・GLP-1はともにFSHによるProgesterone産生を抑制し、その抑制作用はGLP-1と比べGIPの方が強いことが明らかとなった(図1)。

Progesteroneへの作用とは異なり、GIP・GLP-1はFSH誘導性のEstradiol産生には影響を与えず、単独ではProgesterone・Estradiolの基礎値に変化を認めなかった[18]。また、GIP・GLP-1はFSH誘導性のcAMP産生を抑制するとともに、FSH誘導性のStAR・P450scc・3βHSDを含むProgesterone合成酵素系の発現を抑制したが、P450aromには影響を与えなかった。次にBMP-6との関連を検討したところ、GIPはBMP-6によるSmad1/5/8リン酸化とBMP標的遺伝子Id-1の転写を増強した。一方、BMP-6刺激によりGIP受容体発現が抑制されたことから、BMP・GIPシグナル間のフィードバックの存在が示唆された(図2)。GIP・GLP-1によるBMP受容体への影響を検討した結果、GIP・GLP-1はともにBMP-I型受容体のうちALK-3の発現を増強し、抑制性SmadのうちSmad6発現を抑制すること、GIPではさらにALK-6発現を増強することが示された[18]。

まとめ

以上より、インクレチンが顆粒膜細胞におけるFSH誘導性Progesterone産生を抑制すること、そのメカニズムとしてGIPでは内因性BMP-6受容体シグナルの増強を介することが明らかとなった(図3)。インクレチンは卵巣BMPシステムを介した卵巣ステロイド産生や卵巣発育の調節に有用である可能性があり、今後PCOSなどの卵巣機能障害への治療応用も期待される。

参考文献

1. Baggio LL, Drucker DJ (2007) Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132, 2131-2157.
2. Beak SA, Heath MM, Small CJ, Morgan DG, Ghatei MA, Taylor AD, Buckingham JC, Bloom SR, Smith DM (1998) Glucagon-like peptide-1 stimulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion in a rodent hypothalamic neuronal cell line. *J Clin Invest* 101, 1334-1341.
3. MacLusky NJ, Cook S, Scrocchi L, Shin J, Kim J, Vaccarino F, Asa SL, Drucker DJ (2000) Neuroendocrine function and response to stress in mice with complete disruption of glucagon-like peptide-1 receptor signaling. *Endocrinology* 141, 752-762.
4. Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF (2004) The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 25, 72-101.

5. 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.
6. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM (1996) Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383 531-535.
7. Wei LN, Liang XY, Fang C, Zhang MF (2011) Abnormal expression of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 in stimulated oocytes during maturation from women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 96 464-468.
8. Schmidt J, Weijdegard B, Mikkelsen AL, Lindenberg S, Nilsson L, Brannstrom M (2014) Differential expression of inflammation-related genes in the ovarian stroma and granulosa cells of PCOS women. *Mol Hum Reprod* 20 49-58.
9. Khalaf M, Morera J, Bourret A, Reznik Y, Denoual C, Herlicoviez M, Mittre H, Benhaim A (2013) BMP system expression in GCs from polycystic ovary syndrome women and the in vitro effects of BMP4, BMP6, and BMP7 on GC steroidogenesis. *Eur J Endocrinol* 168 437-444.
10. Kim JW, Kang KM, Yoon TK, Shim SH, Lee WS (2014) Study of circulating hepcidin in association with iron excess, metabolic syndrome, and BMP-6 expression in granulosa cells in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 102 548-554 e542.
11. Vrbikova J, Hill M, Bendlova B, Grimmichova T, Dvorakova K, Vondra K, Pacini G (2008) Incretin levels in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 159 121-127.
12. Lin T, Li S, Xu H, Zhou H, Feng R, Liu W, Sun Y, Ma J (2015) Gastrointestinal hormone secretion in women with polycystic ovary syndrome: an observational study. *Hum Reprod* 30 2639-2644.
13. Chang CL, Huang SY, Soong YK, Cheng PJ, Wang CJ, Liang IT (2014) Circulating irisin and glucose-dependent insulinotropic peptide are associated with the development of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 99 E2539-2548.
14. Pontikis C, Yavropoulou MP, Toulis KA, Kotsa K, Kazakos K, Papazisi A, Gotzamani-Psarakou A, Yovos JG (2011) The incretin effect and secretion in obese and lean women with polycystic ovary syndrome: a pilot study. *J Womens Health (Larchmt)* 20 971-976.
15. Vejrazkova D, Lischkova O, Vankova M, Stanicka S, Vrbikova J, Lukasova P, Vcelak J, Vacinova G, Bendlova B (2017) Distinct response of fat and gastrointestinal tissue to glucose in gestational diabetes mellitus and polycystic ovary syndrome. *Physiol Res* 66 283-292.
16. Svendsen PF, Nilas L, Madsbad S, Holst JJ (2009) Incretin hormone secretion in women with polycystic ovary syndrome: roles of obesity, insulin sensitivity, and treatment with metformin. *Metabolism* 58 586-593.
17. Elkind-Hirsch K, Marrisonaux O, Bhushan M, Vernor D, Bhushan R (2008) Comparison of single and combined treatment with exenatide and metformin on menstrual cyclicity in overweight women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 93 2670-2678.
18. Nishiyama Y, Hasegawa T, Fujita S, Iwata N, Nagao S, Hosoya T, Inagaki K, Wada J, Otsuka F (2018) Incretins modulate progesterone biosynthesis by regulating bone morphogenetic protein activity in rat granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 178, 82-88.