

主論文の要旨

CYP51A1 Induced by Growth Differentiation Factor 9 and Follicle-Stimulating Hormone in Granulosa Cells is a Possible Predictor for Unfertilization

〔 顆粒膜細胞において増殖分化因子 9 や卵胞刺激ホルモンにより
誘導される CYP51A1 は非受精の指標となりうる 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

中村 智子

【緒言】

卵とその周囲の顆粒膜細胞の間に存在する双方向性シグナル伝達は卵胞発育に重要である。中でも、増殖分化因子 9 (GDF9) は、卵から顆粒膜細胞に対する重要なシグナル因子であると報告されている。また、卵胞刺激ホルモン (FSH) も卵胞発育に重要な因子である。しかし顆粒膜細胞および卵胞発育における GDF9 と FSH の作用の詳細は明らかになっていない。マウス顆粒膜細胞において、GDF9 はコレステロール合成経路を活性化させると報告されている。卵はコレステロールを合成することができず、顆粒膜細胞で合成されたコレステロールの一部が卵の発育に関与している。また、同じく顆粒膜細胞で合成されるコレステロールの中間代謝物、FF-MAS は、卵の減数分裂を再開させることや卵の受精率を改善することが知られている。FF-MAS を合成する酵素、CYP51A1 は、マウスやブタ顆粒膜細胞で FSH により増加することが報告されている。従って、ヒト顆粒膜細胞におけるコレステロール合成経路、とくに CYP51A1、と卵胞発育や受精との関連を調べた。このような顆粒膜細胞での作用は、ヒト以外の動物種では多数報告があるものの、ヒトの検体が極めて希少であるため、ヒトでの報告はほとんどない。その為我々がこれまでに報告した、不死化非黄体化顆粒膜細胞株 HGrC1 を用いて実験を行った。

【方法と結果】

不死化非黄体化顆粒膜細胞株 HGrC1 は、壁側顆粒膜細胞由来であり、GDF9 や FSH への反応性を含め顆粒膜細胞の性質を保持していることが確認されている。HGrC1 を用い、GDF9 添加 (2 ug/mL) と FSH 添加 (5 IU/mL) による変化を調べた。

まず予備実験として行った、GDF9 にて刺激したことによる遺伝子発現の変化を調べた microarray の結果 (Table 2) をもとに、Table 1 に示すプライマーを用いて real-time RT-PCR を行った。Microarray と同様に real-time RT-PCR にて、コレステロール合成に関与する 6 つの酵素 (HMGCS、FDFT1、SQLE、LSS、CYP51A1、NSDHL) は GDF9、FSH および GDF9+FSH 添加により有意に発現が上昇した (Figure 1, 3)。コレステロール合成経路上、CYP51A1 より上流の酵素で上昇が多く見られた一方、下流の酵素では変化は少なかった。特に HMGCS と CYP51A1 では、GDF9 と FSH の相加的効果が認められ、この効果は免疫染色においても確認された (Figure 2)。

次に、不妊治療において得られるヒト黄体化顆粒膜細胞を用いた実験に移った。卵胞穿刺と採卵の際、得られた卵に個別の識別番号をふり、卵の成熟度を確認した。識別番号ごとに卵胞液量を卵胞の大きさとして記録し、卵から剥離された顆粒膜細胞の mRNA を回収して識別番号ごとに保存した。成熟が確認された卵には引き続き顕微授精を行い、その後の受精の有無を観察した。2009 年 8 月から 2011 年 4 月の間に名古屋大学病院で顕微授精を受け、同一患者から同日に採卵し同一精液検体で顕微授精した成熟卵のうち、受精したものと受精しなかったものを少なくとも 1 つずつ有する患者で、本研究に同意が得られた患者 20 人を対象とした。それぞれの患者において、受精卵と非受精卵を一つずつランダムに選択し、それぞれに付随していた顆粒膜細胞

を組み合わせた。これら、計 20 の受精卵に付随していた顆粒膜細胞と非受精卵に付随していた顆粒膜細胞の組において CYP51A1 と SC4MOL の mRNA 発現レベルを調べた。本研究は名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得ている。結果として、卵の質に関与するとされている、卵胞の大きさは、受精群と非受精群の間に有意差は認められなかった (Table 1)。一方で CYP51A1 は非受精群において有意に発現の上昇を認めた (Figure 4)。

【考察】

卵と顆粒膜細胞間の相互作用は双方の正常な働きに重要であり、ひいては卵胞の正常な発育に不可欠である。このような相互作用の一例としてコレステロール合成がある。顆粒膜細胞で合成されたコレステロールの一部は卵に輸送される。また、コレステロールの中間代謝物 FF-MAS は卵の質を改善することが報告されている。ヒト以外の動物種では多数報告があるものの、ヒト卵胞発育におけるコレステロール合成経路の関与は明らかになっていない。

HGrC1 において、GDF9 添加によりコレステロール合成系酵素 HMGCS と、FF-MAS を直接産物とする酵素 CYP51A1 は発現が上昇し、FSH との共添加により相加的効果が認められた。これらの発現上昇の意義として、卵胞内におけるコレステロール合成および FF-MAS の産生が考えられた。顆粒膜細胞由来のコレステロールとその中間代謝物は卵の成熟に関与するとの報告がある。また、最終産物コレステロールと中間代謝物 FF-MAS はマウス卵巣では異なる制御を受けると報告されている。臨床検体を用いた我々の結果では、非受精群において CYP51A1 が有意に上昇していた。我々は卵胞液中の FF-MAS の測定を行わなかったが、CYP51A1 の上昇は、卵胞内のコレステロール不足によるネガティブフィードバックを受けた結果と考えられる。同時に、卵胞内のコレステロール不足は卵の質の低下に関与している可能性がある。CYP51A1 と受精並びに FF-MAS の関連に関してはさらなる研究が必要であるが、今回の我々の研究は CYP51A1 の mRNA 発現レベルが顕微授精の受精成績の指標となりうることを示した。

【結論】

ヒト顆粒膜細胞において、GDF9 はコレステロール合成経路を活性化させた。GDF9 と FSH により相加的効果が認められた。FF-MAS を直接産物とする CYP51A1 は、受精卵に付随する顆粒膜細胞と非受精卵に付随する顆粒膜細胞において異なる発現を示した。従って、GDF9 と FSH により活性化されるコレステロール合成は、正常な卵胞の発育と成熟に関与している可能性がある。