

主論文の要旨

**Molecular mechanism of FSHR expression induced
by BMP15 in human granulosa cells**

〔 ヒト顆粒膜細胞における BMP15 による FHR 誘導機序 〕

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

(指導：吉川 史隆 教授)

清水 顕

【緒言】

正常な卵胞発育には卵胞を構成する顆粒膜細胞が FSH（卵胞刺激ホルモン）への反応性を獲得することが必要不可欠である。顆粒膜細胞は FSHR（卵胞刺激ホルモン受容体）を発現することで FSH への反応性を獲得する。正常な卵胞発育において顆粒膜細胞の FSHR の発現は緻密に制御されているが、その制御機構は未だに明確になっていない。

下垂体から分泌される性腺刺激ホルモンには FSH と LH（黄体形成ホルモン）があり、LH の受容体 LHR についてはエピジェネティックな制御機構の関与が報告されている。FSHR と LHR は DNA レベルで相同性が高く、同様な制御機構の関与があるのではと考えた。ヒストン修飾はエピジェネティックな遺伝子制御機構の一つであり、ヒストンのアセチル化は様々な遺伝子誘導に関与していることが示されている。Trichostatin A (TSA) はヒストン脱アセチル化阻害剤であり、ヒストンのアセチル化を起こす。顆粒膜細胞以外の細胞ではあるが、TSA 添加により LHR が誘導された報告がある。

一方、卵胞を構成する卵子からの制御も考えられる。Bone morphogenetic protein 15 (BMP15) は卵子由来の卵胞発育促進因子であり FSHR の発現制御にも関与していると考えられる。しかしこれまで BMP15 による FSHR の発現制御についてその詳細な機序は示されていない。BMP はこれまでに 20 以上のサブタイプが報告されており、いくつかのサブタイプで Smad1/5/8 のリン酸化およびヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性（HAT 活性）を促進することが示されている。

我々はヒト顆粒膜細胞における FSHR の発現制御の解明を目的とした。はじめに FSHR における TSA によるヒストン修飾がもたらす影響を調べ、その後 BMP15 による FSHR の誘導機序をヒストン修飾の関与も含めて調べた。

【方法】

不死化ヒト非黄体化顆粒膜細胞である HGrC1 に TSA を添加し、FSHR の誘導効果を定量 PCR で確認し、プロモーター領域のヒストンアセチル化および転写因子結合への影響を ChIP assay で行った。同様の実験を BMP15 添加でも行った。

次に HGrC1 に BMP15、LDN193189 (ALK 阻害剤)、SB203580 (p38 MAPK 阻害剤) を添加し、BMP15 により FSHR の発現が亢進することおよびその制御機構における細胞内シグナルを Western blot にて確認した。さらに BMP15 による HAT 活性を介した転写誘導についても検討するため、HAT 活性の測定も行った。

また、BMP15 が FSHR を誘導したその下流への影響を調べるために、HGrC1 に BMP15 と FSH を共刺激し定量 PCR による CYP19A1 の発現および電気化学発光免疫測定法による培養上清の Estradiol 測定を行った。

【結果】

HGrC1 への TSA 刺激によって FSHR の発現が亢進し、プロモーター領域の転写因

子 (USF1、USF2) の結合亢進およびヒストンのアセチル化を認めた (Figure 1)。同様の効果を BMP15 刺激でも確認した (Figure 2)。蛋白レベルでも BMP15 による FSHR の発現の亢進を確認した (Figure 3a)。BMP15 は Smad1/5/8 のリン酸化および HAT 活性を促進し、LDN193189 はその効果を抑制したが、SB203580 では抑制効果を示さなかった (Figure 3b、3c)。また、BMP15 は p38 MAPK および USF1 のリン酸化を促進し、LDN193189 はその効果を抑制したが、SB203580 は USF1 のリン酸化のみ抑制効果を示した (Figure 3d、3e)。

さらに HGrC1 への BMP15 刺激で CYP19A1 の発現が亢進し、estradiol の生成も増加していた (Figure 4)。

【考察】

顆粒膜細胞における FSHR の発現制御については十分に解明されていない。今回卵子との協調作用、エピジェネティックな制御機構の観点から BMP15 に注目して FSHR の発現制御を調べた。

Smad 経路の HAT 活性によるヒストンアセチル化はこれまで示されてきているが、今回 BMP15 は Smad 1/5/8 のリン酸化、HAT 活性を亢進し、FSHR プロモーター領域のアセチル化および USF1/2 の結合を亢進していた。この結果から、BMP15 は Smad 1/5/8 経路による HAT 活性からプロモーター領域のヒストンをアセチル化し転写因子の結合を促進する機序が示唆される。

これまでに p38 MAPK は BMP の下流経路であること、p38 MAPK のリン酸化が転写因子である USF1 をリン酸化し転写を誘導することが示されている。今回 BMP15 は p38 MAPK および USF1 のリン酸化を促進していた。この結果から BMP15 は p38 MAPK の経路により転写因子 USF1 のリン酸化を促進し転写誘導する機序が示唆される。

以上により BMP15 による Smad および non-Smad 経路による FSHR 誘導の機序が示された (Figure 5)。今後の展望としては、現在当研究室で行われている卵巣組織培養への応用を考えている。

【結論】

ヒト顆粒膜細胞において BMP15 は Smad および non-Smad 経路による FSHR 誘導効果を示した。今回のヒト顆粒膜細胞での BMP15 による FSHR の制御効果の解明が、将来的に生殖医療における卵胞発育のコントロールに寄与することに期待したい。