

小胞体ストレス応答の卵胞発育・成熟過程における意義の解明と 良好胚選択マーカーとしての有用性の検討

研究者氏名□□教授 大須賀 穰

日本所属機関□□東京大学医学部産科婦人科学

共同研究者名□□原田 美由紀

中国研究者氏名□□教授 趙 琳

中国所属機関□□中国大連医科大学附属第二病院

要 旨

我が国における女性の挙児の高年齢化に伴い、不妊症患者は増加の一途をたどっている。不妊治療においてはしばしば調節卵巣刺激が行なわれるが、その重大な合併症の一つとして卵巣過剰刺激症候群（OHSS）が挙げられる。一方、最近糖尿病、がんなど種々の病態において、小胞体ストレスが重要な役割を果たすことが明らかになってきた。本研究においては、卵巣顆粒膜細胞における小胞体ストレスがOHSSの病態形成に関わるという仮説のもと検討を行なった。体外受精治療時に得られたヒト卵丘細胞における小胞体ストレス応答因子spliced XBP1（sXBP1）mRNA発現は、中等症以上のOHSS発症群で非発症群に比し有意に亢進していた。ヒト顆粒膜培養細胞（GC）を用いた検討により、小胞体ストレス誘導剤Tunicamycin(Tm)刺激はGCにおける血管内皮増殖因子（VEGF；OHSSの病態の中心的因子）発現を増強した。また、hCGはGCにおけるVEGF発現を誘導することが知られているが、TmでGCを前処理することにより、すなわち小胞体ストレス存在下では、hCG応答性のVEGF発現は亢進し、さらにこの効果は小胞体ストレス阻害剤により減弱した。本研究により、OHSSの病態に、卵巣顆粒膜細胞における小胞体ストレス過剰発現、それに伴うhCG応答性のVEGF発現亢進が関与していることが示された。すでに他疾患で臨床応用されている小胞体ストレス阻害剤がOHSS予防に使用できる可能性が示唆された。

Key Words 小胞体ストレス， 顆粒膜細胞， 卵巣過剰刺激症候群， 血管内皮増殖因子

緒 言：

最近の我が国における女性の挙児の高年齢化に伴い、不妊症患者は増加の一途をたどっている。不妊治療においてはしばしば調節卵巣刺激が行なわれるが、その重大な合併症の一つとして卵巣過剰刺激症候群（OHSS）が挙げられる。OHSSの病態においては、卵胞発育に伴い卵巣顆粒膜細胞から分泌される血管内皮増殖因子（VEGF）が中心的役割を果たすことが知られている（1）。しかし、VEGF発現制御メカニズムについては未だ不明な点が多く、不妊治療中にひとたび多数の卵胞発育が認められた場合にOHSSを予防するには、卵胞成熟を誘導するhCG投与の中止を含めた治療の中断を選択せざるを得ないのが現状である。

一方、最近糖尿病、がんなど幅広い疾患の病態において、小胞体ストレスが重要な役割を果たすことが知られてきた（2，3）。小胞体は、タンパク質の修飾、折りたたみなどの品質管理を行なう細胞内器官であるが、細胞におけるタンパク質合成の需要が小胞体の品質管理能力を越えるような状況下では、異常な折りたたみ構造のタンパク質が小胞体内に蓄積する。この状態を小胞体ストレスと呼び、細胞増殖、低酸素、炎症など様々な生理的病理的状況下で惹起されることが知られている。小胞体ストレスに対し、細胞内では小胞体ストレス応答と呼ばれる一群の細胞内伝達経路が活性化される。小胞体ストレス応答は、

最初は細胞の恒常性を回復させるべく働き、それが不可能である場合には細胞死を惹起する、すなわち生と死の両方向スイッチとして働く、細胞に備わった非常に巧妙な仕組みであるといえる（4，5）。

我々は、調節卵巣刺激中の卵胞発育過程における卵巣局所環境の劇的な変化に伴い小胞体ストレスが惹起されOHSSの病態に関与するのではないかと考え、これを明らかにすべく以下の検討を行なった。

対象と方法：

1) ヒト卵丘細胞を用いた検討

体外受精患者のうち顕微授精を施行される患者においては、顕微授精時に、卵丘細胞（顆粒膜細胞のうち卵子周囲を取り巻くもの）を卵子から剥離するが、この卵丘細胞を卵子毎に分けて回収し保存した。卵丘細胞におけるspliced XBP1（sXBP1；小胞体ストレス応答因子の一つ）mRNA発現を、OHSS非発症群、中等症以上のOHSS発症群とで比較した。また、回収卵子数と卵丘細胞でのsXBP1mRNA発現との関連も併せて検討した。通常回収卵子数が多いほどOHSSの発症リスクが高いことが知られている。

2) ヒト顆粒膜細胞（GC）培養系を用いた検討

体外受精時に回収した卵胞液よりGCを分離培養して以下の実験に供した。

i) 小胞体ストレス誘導剤Tunicamycin（Tm）を添加し、sXBP1，VEGFmRNA発現を検討した。

ii) GCにおけるVEGF発現促進因子として、hCGが知られている。小胞体ストレス下でのGCのhCGに対する反応性の変化を検討するため、以下の実験を行なった。GCをあらかじめTm処理し、これにhCGを添加した際のVEGFmRNA発現を、Tmによる前処理をしない場合と比較した。

iii) ii)において、Tm処理をする前に小胞体ストレス抑制剤（TUDCA）処理を行なった際に、hCG応答性のVEGF発現に変化が認められるか検討した。

結 果：

1) ヒト卵丘細胞を用いた検討

卵丘細胞におけるspliced XBP1（sXBP1；小胞体ストレス応答因子の一つ）mRNA発現は、中等症以上のOHSS発症群において、非発症群に比し有意に増加していた（図1）。さらに、回収卵子数とsXBP1発現量の間には正の相関がみられた（図2）。

図 1. OHSS の有無による卵丘細胞における sXBP1 発現の相違

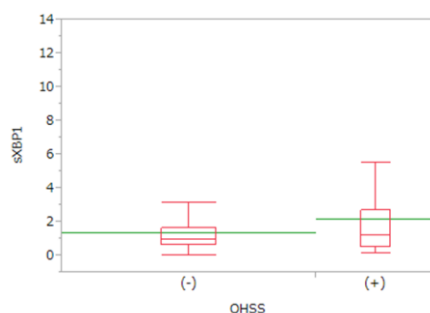
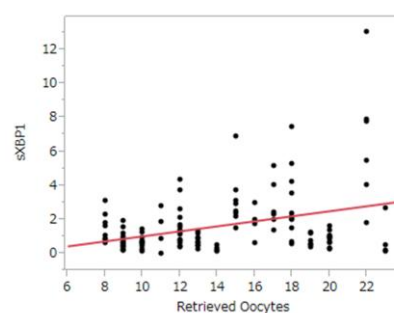


図 2. 回収卵子数と卵丘細胞における sXBP1 発現の関連



2) ヒト顆粒膜細胞（GC）培養系を用いた検討

i) 小胞体ストレス誘導剤Tunicamycin（Tm）添加により、GCにおいて6時間後よりVEGFmRNA発現が誘導された（図3）。また同実験系において3時間後よりsXBP1mRNA発現が誘導された（図4）。

ii) Tm前処理をしたGCにおいては、コントロール群に比し、hCG反応性のVEGFmRNA発現が増強していた（図5）。

iii) ii)において、Tm処理をする前に小胞体ストレス抑制剤（TUDCA）処理を行なった場合、Tm下、すなわち小胞体ストレス下での、hCG応答性のVEGF発現は抑制された（図6）。

図 3. Tunicamycin 刺激による顆粒膜細胞における VEGFmRNA 発現の変化
(白 : cont, 赤 : Tm 刺激)

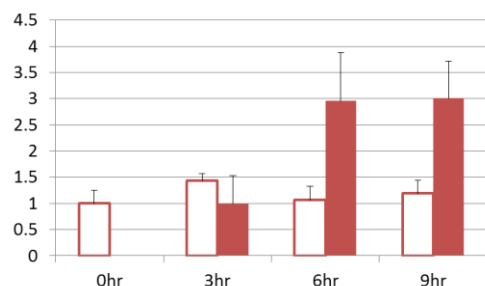


図 4. Tunicamycin 刺激による顆粒膜細胞における sXBP1mRNA 発現の変化
(白 : cont, 青 : Tm 刺激)

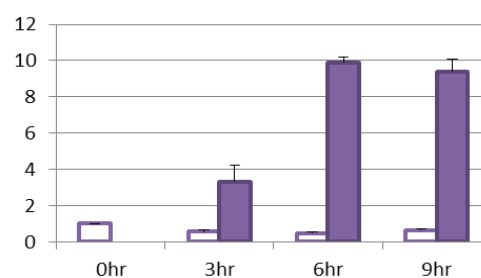


図 5. Tunicamycin 前処理による顆粒膜細胞における hCG 応答性 VEGFmRNA 発現の変化

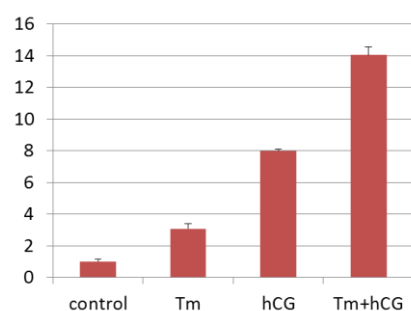
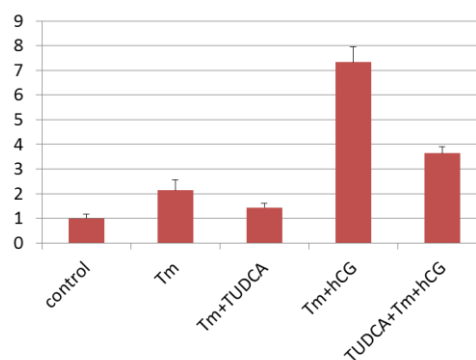


図 6. TUDCA 前処理による、小胞体ストレス存在下での顆粒膜細胞における hCG 応答性 VEGFmRNA 発現の変化



考 察 :

本研究により、卵巢顆粒膜細胞の小胞体ストレス応答因子発現が卵巢過剰刺激症候群患者において亢進していることが示された。さらに、顆粒膜細胞において小胞体ストレス応答刺激が血管内皮増殖因子VEGFの発現を亢進させること、またhCG応答性VEGF発現を増強することが示された。またこの反応経路にsXBP1経路が関与しており、小胞体ストレス阻害剤を投与することによりVEGF産生は抑制されることが示された。

以上の知見は、OHSSの病態に、卵巢顆粒膜細胞における小胞体ストレス過剰発現、それに伴うhCG応答性のVEGF発現亢進が関与していることを示すものであり、未だ不明である卵巢過剰刺激症候群の病態の一部を明らかにした。またこの結果は、すでに他疾患で臨床応用されている小胞体ストレス阻害剤がOHSS予防に使用できる可能性を示唆するものである。今後、卵巢過剰刺激症候群モデル動物に小胞体ストレス刺激剤、および阻害剤の投与を行ないその効果を検討することにより、臨床応用に向けた研究を進める予定である。

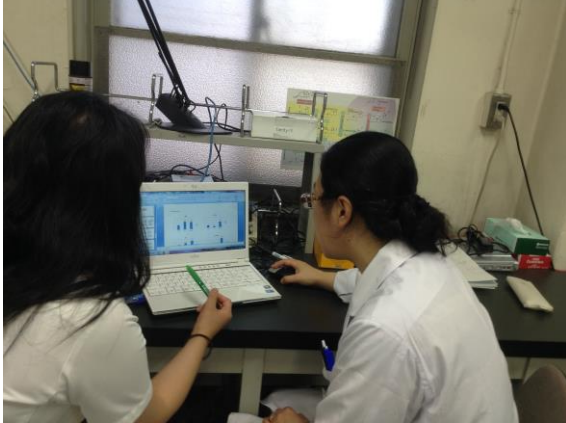
参考文献 :

1. Gomez R, Soares SR, Busso C, Garcia-Velasco JA, Simon C, Pellicer A. Physiology and pathology of ovarian hyperstimulation syndrome. Semin Reprod Med. 2010; 28: 448-57.
2. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. Science 2004; 306: 457-61.
3. Ma Y, Hendershot LM. The role of the unfolded protein in tumor development: friend or foe

? Nat Rev Cancer 2004; 4: 966-77.

4. Ron D, Walter P. Signaling integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 8: 519-29.

5. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decision. J Clin Invest 2005; 115: 2656-64.



中国側研究者（右）と日本側共同研究者によるミーティング風景

作成日：2015年 3月10日

