

氏 名 小林 睦  
こばやし むつみ

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 329 号

学位授与年月日 令和 2 年 3 月 24 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程  
東西統合医学 専攻

学位論文題目

**Inhibition of autophagy in theca cells induces CYP17A1 and PAI-1 expression via ROS/p38 and JNK signalling during the development of polycystic ovary syndrome.**

(多嚢胞性卵巣症候群における卵巣莢膜層でのオートファジー抑制は活性酸素-p38/JNKシグナル経路を介してCYP17A1およびPAI-1のmRNA発現を誘導する。)

論文審査委員

(主査)	教 授	戸 邊 一之
(副査)	教 授	田 村 了以
(副査)	教 授	森 寿
(副査)	教 授	齋 藤 淳一
(指導教員)	教 授	足 立 雄一

論 文 要 旨

学 位 論 文

**Inhibition of autophagy in theca cells induces CYP17A1 and PAI-1 expression via ROS/p38 and JNK signalling during the development of polycystic ovary syndrome.**

(多嚢胞性卵巣症候群における卵巣莢膜層でのオートファジー抑制は活性酸素-p38/JNKシグナル経路を介してCYP17A1およびPAI-1のmRNA発現を誘導する。)

富山大学大学院  
医学薬学教育部 (博士課程) 東西統合医学専攻  
産科婦人科学教室

氏 名 小林 睦

備考 ① 論文要旨は，2,000字程度とする。

② A4判とする。

#### 〔目的〕

多嚢胞性卵巣症候群 (polycystic ovary syndrome: PCOS) は高アンドロゲン、低/無排卵、多嚢胞卵巣を主徴とする臨床症候群である。生活習慣病を基礎としたインスリン過剰が病態の一因と報告されているが、詳細な病態メカニズムは未だ不明である。PCOSと関連のある2型糖尿病や非アルコール性脂肪肝炎では細胞内分解・消化機構であるオートファジーの機能障害が多数報告されているが、PCOSとオートファジーの関連性についての報告は少ない。

上記より我々は、PCOSの病態形成におけるオートファジーの関与を明らかにするべく研究を行った。

#### 〔方法並びに成績〕

多嚢胞性卵巣症候群の患者から得られた卵巣組織を用いて、細胞内凝集タンパク結合タンパクであるp62およびubiquitinに対する免疫染色を行ったところ、PCOS群において莢膜層にp62およびubiquitinが有意に発現していた。この結果からPCOSでオートファジー障害の関与が示唆された。PCOSの副兆候である卵巣線維化についてもAzan染色を用いて評価したところ、PCOS群において有意に線維化が認められた。

次に *In vitro* でオートファジーとPCOSの病態を評価するためにウシ卵巣組織を使用した。生活習慣病で関与が指摘されているオートファジーを障害する生理活性物質として、飽和脂肪酸であるパルミチン酸をウシ卵巣莢膜細胞に添加したところ、ウェスタンブロッティングでp62およびubiquitinの発現上昇とオートファゴソームマーカーであるMicrotubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3) -II/LC3-I比の上昇が認められた。上記結果からパルミチン酸添加によって後期オートファジー障害が示唆された。同様のパルミチン酸添加実験を行いqPCRにてアンドロゲン産生酵素であるCYP17A1、線維化マーカーであるplasminogen activator inhibitor -1 (PAI-1) のmRNAの上昇、ELISA法においてアンドロゲンホルモンであるAndrostenedione (ASD)の上昇が認められた。これらの結果からオートファジー後期障害は莢膜細胞においてアンドロゲン産生上昇および線維化の促進作用があることが示唆された。さらに代表的な後期オートファジー抑制薬であるクロロキンをウシ莢膜細胞に添加したところ、同様の結果が得られ上記仮説が支持された。

オートファジーが抑制されると、活性酸素が上昇することが知られている。そのため活性酸素に対する蛍光プローブであるCellROXを用いてパルミチン酸、クロロキンを添加したウシ莢膜細胞で活性酸素の標識を試みた。同実験においてパルミチン酸、クロロキン添加細胞群で明らかな蛍光シグナルの増強が認められた。また活性酸素種の増強はストレス関連キナーゼであるp38やJNKを活性化することが知られている。ウェスタンブロッティングを用いてリン酸化p38およびJNKを評価したところ、パルミチン


酸、クロロキン添加細胞でリン酸化p38およびJNKが有意に上昇していた。このことからパルミチン酸およびクロロキンは活性酸素を誘導し、p38、JNKを活性化させる作用があることが判明した。

最後にp38、JNKを選択的に抑制する低分子標的薬を用いてパルミチン酸、クロロキン添加細胞におけるCYP17A1、PAI-1のmRNAの上昇を抑制することができるか評価した。P38およびJNKの抑制薬を前投薬した後に、パルミチン酸、クロロキンを添加したところ劇的にCYP17A1、PAI-1のmRNAの上昇が抑制され、ASDの分泌も低下した。

〔総括〕

PCOS患者の卵巣莢膜層ではオートファジー障害が示唆された。ウシ卵巣莢膜細胞を用いた薬剤添加によるオートファジー抑制細胞モデルにおいて、ROS/p38/JNKシグナル経路を介してCYP17A1およびアンドロゲンの上昇、線維化誘導酵素のPAI-1 mRNA上昇が認められた。P38およびJNKの抑制はCYP17A1、PAI-1 mRNAの発現低下作用を介して、PCOSの治療標的となり得ることが示唆された。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

報 告 番 号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	小 林 睦
論文審査委員	職 名	氏 名	
	(主査) 教授	戸 邊 一 之	
	(副査) 教授	田 村 了 以	
	(副査) 教授	森 寿	
(副査) 教授	齋 藤 淳 一		
指導(紹介) 教員	教授	足 立 雄 一	
(論文題目 英文の場合は、和訳を付記すること。) Inhibition of autophagy in theca cells induces CYP17A1 and PAI-1 expression via ROS/p38 and JNK signalling during the development of polycystic ovary syndrome. (多嚢胞性卵巣症候群における卵巣莢膜層でのオートファジー抑制は活性酸素-p38/JNKシグナル経路を介してCYP17A1およびPAI-1のmRNA発現を誘導する。)			(判定)  合 格
[目的] 多嚢胞性卵巣症候群(polycystic ovary syndrome: PCOS)は、高アンドロゲン血症・低/無排卵・多嚢胞卵巣を主徴とする臨床症候群である。生活習慣病を基礎としたインスリン過剰が病態の一因と報告されているが、詳細な病態メカニズムは未だ不明である。PCOSと関連のある2型糖尿病や非アルコール性脂肪肝炎では細胞内分解・消化機構であるオートファジーの機能障害が多数報告されているが、PCOSとオートファジーの関連性についての報告は少ない。上記より小林睦君は、PCOSの病態形成におけるオートファジーの関与を明らかにするべく以下の研究を行った。			
[方法並びに成績] 多嚢胞性卵巣症候群の患者から得られた卵巣組織を用いて、細胞内凝集タンパク結合タンパクであるp62およびubiquitinに対する免疫染色を行ったところ、PCOS群において莢膜層にp62およびubiquitinが有意に発現していた。この結果からPCOSでオートファジー障害の関与が示唆された。PCOSの副兆候である卵巣線維化についてもAzan染色を用いて評価したところ、PCOS群において有意に線維化が認められた。 次に <i>In vitro</i> でオートファジーとPCOSの病態を評価するためにウシ卵巣組織を使用した。生活習慣病で関与が指摘されているオートファジーを障害する生理活性物質として、飽和脂肪酸であるパルミチン酸をウシ卵巣莢膜細胞に添加したところ、ウェスタンブロッティングでp62およびubiquitinの発現上昇とオートファゴソームマーカーであるMicrotubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3) -2/LC3-1比の上昇が認められた。上記結果からパルミチン酸添加によって後期オートファジー障害が示唆された。同様のパルミチン酸添加実験を行いqPCRにてアンドロゲン産生酵素であるCYP17A1、線維化マーカーであるplasminogen activator inhibitor -1 (PAI-1) のmRNAの上昇、ELISA法においてアンドロゲンホルモンであるAndrostenedione (ASD)の上昇が認められた。			



これらの結果からオートファジー後期障害は莢膜細胞においてアンドロゲン産生上昇および線維化の促進作用があることが示唆された。さらに代表的な後期オートファジー抑制薬であるクロロキンをウシ莢膜細胞に添加したところ、同様の結果が得られ上記仮説が支持された。

オートファジーが抑制されると、活性酸素が上昇することが知られている。そのため活性酸素に対する蛍光プローブであるCell ROXを用いてパルミチン酸、クロロキンを添加したウシ莢膜細胞で活性酸素の標識を試みた。同実験においてパルミチン酸、クロロキン添加細胞群で明らかな蛍光シグナルの増強が認められた。また活性酸素種の増強はストレス関連キナーゼであるp38やJNKを活性化することが知られている。ウェスタンブロッティングを用いてリン酸化p38およびJNKを評価したところ、パルミチン酸、クロロキン添加細胞でリン酸化p38およびJNKが有意に上昇していた。このことからパルミチン酸およびクロロキンは活性酸素を誘導し、p38、JNKを活性化させる作用があることが判明した。

最後にp38、JNKを選択的に抑制する低分子標的薬を用いてパルミチン酸、クロロキン添加細胞におけるCYP17A1、PAI-1のmRNAの上昇を抑制することができるかを評価した。P38およびJNKの抑制薬を前投薬した後に、パルミチン酸、クロロキンを添加したところ劇的にCYP17A1とPAI-1のmRNAの上昇が抑制され、ASDの分泌も低下した。

#### 〔総括〕

PCOS患者の卵巢莢膜層ではオートファジー障害が示唆された。ウシ卵巢莢膜細胞を用いた薬剤添加によるオートファジー抑制細胞モデルにおいて、ROS/p38/JNKシグナル経路を介してCYP17A1およびアンドロゲンの上昇、線維化誘導酵素のPAI-1 mRNA上昇が認められた。P38およびJNKの抑制はCYP17A1、PAI-1 mRNAの発現低下作用を介して、PCOSの治療標的となり得ることが示唆された。

以上のことから、本論文は、PCOS患者の卵巢莢膜層でのオートファジー障害が卵胞形成障害の発症に重要であることを初めて明らかにした点は新規性があり、p38 および JNK の抑制はCYP17A1、PAI-1 mRNA の発現低下作用を介して、PCOS の治療標的となり得ることを示した点で、医学における学術的重要性も高い。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。