

氏 名 伊東 雅美
いとう まさみ

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 353 号

学位授与年月日 令和 2 年 12 月 23 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

Bone morphogenetic protein-2 enhances
gonadotropin-independent follicular development
via sphingosine kinase 1
(BMP-2はsphingosine kinase 1 を介して、
ゴナドトロピン非依存性の卵胞発育を促進する)

論文審査委員

(主査) 教授 川口 善治
(副査) 教授 田村 了以
(副査) 教授 笹原 正清
(副査) 教授 北村 寛
(指導教員) 教授 中島 彰俊

論 文 要 旨

論 文 題 目

Bone morphogenetic protein-2 enhances gonadotropin-independent follicular development via sphingosine kinase 1

(BMP-2はsphingosine kinase 1を介して、ゴナドトロピン非依存性の卵胞発育を促進する)

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

産科婦人科学講座

氏 名 伊東 雅美

備考 ① 論文要旨は，2,000字程度とする。

② A4判とする。

【目的】 卵巣刺激に対する反応性が低い poor ovarian response (POR)女性が児を希望し、体外受精を行ったとしても得られる卵子数は少なく妊娠率は低い。このような患者の卵巣には多くの2次卵胞が存在するものの、卵胞刺激ホルモン(follicle stimulating hormone : FSH)投与によっては、これらの初期卵胞を排卵直前の成熟卵胞まで誘導することはほとんどできない。よって POR 患者には新たな治療戦略が必要である。Bone morphogenetic protein (BMP)は細胞外シグナル伝達分子であり、様々な細胞種で細胞増殖、細胞分化、アポトーシスを調節している。BMP は哺乳類雌の生殖生理にも関連しているが、BMP がどのようにゴナドトロピン(gonadotropin: Gn)非依存性の初期卵胞発育に影響するかは不明であった。一方、Sphingosine 1-phosphate (S1P)は Gn 非依存性に卵胞発育を誘導することが知られている。S1P は生理活性のある脂質メディエーターであり Hippo pathway を抑制する。S1P は sphingosine kinase 1 (SPHK1)が触媒する sphingosine のリン酸化によって産生されるが、初期卵胞における SPHK1 の制御は明らかになっていない。そこで、本研究では初期卵胞発育における BMP-2 の役割を明らかにするために、BMP-2 の SPHK1 に対する作用を検討した。さらに BMP-2 が顆粒膜細胞(granulosa cells: GCs)数増加を起こす機序として BMP-2 と Hippo pathway の関与について検討した。

【方法並びに結果】 以下の5つの実験を行った。結果を同時に示す。

1. ヒト初期卵胞に SPHK1 が発現している。

卵巣摘出患者の卵巣病理切片を免疫組織染色し、初期卵胞の SPHK1 の発現を調べた。ヒト卵巣において初期卵胞の GCs に SPHK1 の発現を認めた。

2. BMP-2 は、GCs において SPHK1 と FSH 受容体(FSH receptor : FSHR)の mRNA 発現を上昇させる。また、BMP-2 はウシ GCs 数を増加させる。

ウシ GCs とヒト非黄体化顆粒膜細胞株(human nonluteinized granulosa cell line : HGrC1)を用い、BMP-2 による SPHK1 と GCs 分化の契機となる FSHR の mRNA 発現を検討した。GCs 数増加作用を WST-8 assay で検討した。その結果、BMP-2 はウシ GCs と HGrC1 細胞において SPHK1 の mRNA 発現を有意に上昇させた。BMP-2 はウシ GCs 数を有意に増加させた。初代ウシ GCs において BMP-2 は FSHR mRNA 発現を有意に上昇させた。

3. S1P はウシ GCs 数を増加させる。

S1P をウシ GCs に作用させると day 2 の時点で 300 nM の S1P を投与することで day 0 に比べ約 1.14 倍細胞数が増加した。

4. S1P は Hippo pathway を抑制する。

Hippo pathway の下流転写調節分子に Yes-associated protein (YAP)があるが、Hippo pathway の抑制効果について、Western blot における phosphorylated YAP (pYAP)の発現と、免疫細胞染色における YAP の局在を検討した。YAP の標的遺伝子である connective tissue growth factor (CTGF)の mRNA 発現を確認した。ウシ GCs に 300 nM S1P を作用させたところ、pYAP を 48%減少させ、YAP の核内移行を観察した。また、S1P はウシ GCs において CTGF mRNA 発現も有意に上昇さ

せた。

5. BMP-2 も Hippo pathway を抑制する。


BMP-2 による Hippo pathway 抑制効果について S1P を用いた実験と同様の手法で検討した。阻害実験には YAP 阻害剤である verteporfin (VP) を用いた。BMP-2 はウシ GCs において pYAP を 25%減少させ、YAP の核内移行も促進させた。また、VP 投与により BMP-2 誘導性ウシ GCs 数増加作用は打ち消された。

【総括】

- 1) ヒト初期卵胞の GCs において SPHK1 の発現が認められる。
- 2) BMP-2 はウシ GCs と HGrC1 細胞において SPHK1 mRNA 発現を上昇させ、ウシ GCs の細胞数を増加させる。
- 3) BMP-2 と S1P による Hippo pathway 抑制作用については、BMP-2 の作用は S1P に比べて弱く、作用発揮までに時間がかかる(pYAP 減少 : S1P は 48%、BMP-2 は 25%。YAP の核内移行 : S1P は 1 時間、BMP-2 は 16 時間)。BMP-2 の Hippo pathway に対する微弱な作用は長時間を要する生理的な初期卵胞発育過程に合致すると考えられた。
- 4) BMP-2 は初代ウシ GCs において、FSHR mRNA 発現も上昇させる。

以上より、SPHK1が触媒するS1Pレベルの上昇を介してBMP-2がGn非依存性GCs数の増加を誘導することを初めて明らかにした。また、BMP-2は初期卵胞発育において、GCs数増加作用だけでなく細胞分化にも関与していることを明らかにした。

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	伊東 雅美
論文審査委員	職 名 (主査) 教授 (副査) 教授 (副査) 教授 (副査) 教授	氏 名 川口 善治 笹原 正清 田村 了以 北村 寛	
指導 (紹介) 教員	中島 彰俊		
Bone morphogenetic protein-2 enhances gonadotropin-independent follicular development via sphingosine kinase 1 (BMP-2 は sphingosine kinase 1 を介して、ゴナドトロピン非依存性の卵胞発育を促進する)			(判定) 合格
<p>【目的】 卵巣刺激に対する反応性が低い poor ovarian response (POR) 女性が挙児を希望し、体外受精を行ったとしても得られる卵子数は少なく妊娠率は低い。このような患者の卵巣には多くの 2 次卵胞が存在するものの、卵胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone : FSH) 投与によっては、これらの初期卵胞を排卵直前の成熟卵胞まで誘導することはほとんどできない。よって POR 患者には新たな治療戦略が必要である。Bone morphogenetic protein (BMP) は細胞外シグナル伝達分子であり、様々な細胞種で細胞増殖、細胞分化、アポトーシスを調節している。BMP は哺乳類雌の生殖生理にも関連しているが、BMP がどのようにゴナドトロピン (gonadotropin: Gn) 非依存性の初期卵胞発育に影響するかは不明であった。一方、sphingosine 1-phosphate (S1P) は Gn 非依存性に卵胞発育を誘導することが知られている。S1P は生理活性のある脂質メディエーターであり Hippo pathway を抑制する。S1P は sphingosine kinase 1 (SPHK1) が触媒する sphingosine のリン酸化によって産生されるが、初期卵胞における SPHK1 の制御は明らかになっていない。そこで、本研究では初期卵胞発育における BMP-2 の役割を明らかにするために、BMP-2 の SPHK1 に対する作用を検討した。さらに BMP-2 が顆粒膜細胞 (granulosa cells: GCs) 数増加を起こす機序として BMP-2 と Hippo pathway の関与について検討した。</p> <p>【方法並びに結果】 以下の 5 つの実験を行った。結果を同時に示す。</p> <p>1. ヒト初期卵胞に SPHK1 が発現している。 卵巣摘出患者の卵巣病理切片を免疫組織染色し、初期卵胞の SPHK1 の発現を調べた。ヒト卵巣において初期卵胞の GCs に SPHK1 の発現を認めた。</p> <p>2. BMP-2 は、GCs において SPHK1 と FSH 受容体 (FSH receptor : FSHR) mRNA の発現を上昇させる。また、BMP-2 は GCs 数を増加させる。</p>			

ウシGCsとヒト非黄体化顆粒膜細胞株(human nonluteinized granulosa cell line : HGrC1)を用い、BMP-2によるSPHK1 mRNAとGCs分化の契機となるFSHR mRNAの発現を検討した。GCs数増加作用をWST-8 assayで検討した。その結果、BMP-2はウシGCsとHGrC1細胞においてSPHK1のmRNA発現を有意に上昇させた。BMP-2はウシGCs数を有意に増加させた。ウシGCsにおいてBMP-2はFSHR mRNAの発現を有意に上昇させた。

3. S1PはウシGCs数を増加させる。

S1PをウシGCsに作用させるとday 2の時点で300 nMのS1Pを投与することでday 0に比べ約1.14倍細胞数が増加した。

4. S1PはHippo pathwayを抑制する。

Hippo pathwayの下流転写調節分子にYes-associated protein (YAP)があるが、Hippo pathwayの抑制効果について、Western blotにおけるphosphorylated YAP (pYAP)の発現と、免疫細胞染色におけるYAPの局在を検討した。YAPの標的遺伝子であるconnective tissue growth factor (CTGF)のmRNA発現を確認した。ウシGCsに300 nM S1Pを作用させたところ、pYAPを48%減少させ、YAPの核内移行を観察した。また、S1PはウシGCsにおいてCTGF mRNAの発現も有意に上昇させた。

5. BMP-2もHippo pathwayを抑制する。

BMP-2によるHippo pathway抑制効果についてS1Pを用いた実験と同様の手法で検討した。阻害実験にはYAP阻害剤であるverteporfin (VP)を用いた。BMP-2はウシGCsにおいてpYAPを25%減少させ、YAPの核内移行も促進させた。また、VP投与によりBMP-2誘導性ウシGCs数増加作用は打ち消された。

【総括】以上から、伊東雅美君は以下のことを明らかにした。

1) ヒト初期卵胞のGCsにおいてSPHK1の発現が認められる。 2) BMP-2はウシGCsとHGrC1細胞においてSPHK1 mRNA発現を上昇させ、GCsの細胞数を増加させる。 3) BMP-2とS1PによるHippo pathway抑制作用についてはBMP-2の作用は、S1Pに比べて弱く、作用發揮までに時間がかかる(pYAP減少：S1Pは48%、BMP-2は25%、YAPの核内移行：S1Pは1時間、BMP-2は16時間)。以上よりBMP-2のHippo pathwayに対する微弱な作用は長時間を要する生理的な初期卵胞発育過程に合致すると考えられた。 4) BMP-2はウシGCsにおいて、FSHR mRNA発現も上昇させる。

本研究は、SPHK1が触媒するS1Pレベルの上昇を介してBMP-2がGn非依存性GCs数の増加を誘導することを初めて明らかにした。また、BMP-2は初期卵胞発育において、GCs数増加作用だけでなく細胞分化にも関与していることを明らかにした。このことはPOR患者の新たな治療戦略として重要な基礎的知見である。従って本研究結果は学術的重要性が高く、今後の臨床的発展性を期待させるものである。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。