

ヒト卵胞液で産生されるリゾホスファチジン酸と
その卵丘膨化促進作用

2017 年

山本 淳平

目次

| | |
|---------------|----|
| 諸言..... | 3 |
| 第一章..... | 7 |
| 第一章 序論..... | 8 |
| 第1節・実験方法..... | 10 |
| 第2節・結果..... | 16 |
| 第3節・考察..... | 29 |
| 第二章..... | 31 |
| 第二章 序論..... | 32 |
| 第1節・方法..... | 33 |
| 第2節・結果..... | 37 |
| 第3節・考察..... | 44 |
| 総括..... | 46 |
| 論文目録..... | 48 |
| 参考文献..... | 49 |
| 謝辞..... | 59 |

| 略語 | 英名 | 和名 |
|----------|--|-------------------------|
| ATX | autotaxin | オートタキシン |
| BSA | bovine serum albumin | 牛血清アルブミン |
| COC | cumulus oocyte complex | 卵丘 - 卵母細胞複合体 |
| DMSO | dimethyl sulfoxide | ジメチルスルホキシド |
| EDG | endothelial differentiation gene | 内皮分化遺伝子 |
| EDTA | ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> - tetraacetic acid | エチレンジアミン 4 酢酸 |
| EGF | epidermal growth factor | 上皮細胞成長因子 |
| FBS | fetal bovine serum | ウシ胎児血清 |
| FF | follicular fluid | 卵胞液 |
| FSH | Follicle stimulating hormone | 卵胞刺激ホルモン |
| GLC | gas-liquid chromatography | ガスクロマトグラフィー |
| HA | hyaluronic acid | ヒアルロン酸 |
| HPPA | 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid | 3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸 |
| HRP | horseradish peroxidase | 西洋ワサビペルオキシダーゼ |
| IaI | inter-a-trypsin inhibitor | インター a-トリプシンインヒビター |
| IBMX | 3-Isobutyl 1-methylxanthine | 3-イソブチルメチルキサンチン |
| LC-MS/MS | liquid chromatography-tandem mass spectrometry | 液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計 |
| LCAT | lecitin-cholesterol acyltransferase | レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ |
| LH | luteinizing hormone | 黄体形成ホルモン |
| LPA | lysophosphatidic acid | リゾホスファチジン酸 |
| LPC | lysophosphatidylcholine | リゾホスファチジルコリン |
| lysoPLD | lysophospholipase D | リゾホスホリパーゼ D |
| mHTF | modified human tubal fluid | 培養ヒト卵管液 |
| PA | phosphatidic acid | ホスファジチン酸 |
| PC | phosphatidylcholine | ホスファチジルコリン |

| | | |
|------|----------------------------------|---------------|
| PG | prostaglandin | プロスタグランジン |
| PI | Phosphatidylinositol | ホスファチジルイノシトール |
| PKC | protein kinase C | プロテインキナーゼC |
| PMSG | pregnant mare serum gonadotropin | 妊馬血清性腺刺激ホルモン |
| TLC | thin-layer chromatography | 薄層クロマトグラフィー |

諸言

卵を体外に排出後に卵内の栄養で成長し孵化する卵胎生を行う魚類や鳥類とは異なり、哺乳類は、母胎内で卵を孵化させ胎内で栄養を供給する胎生を行う。妊娠とは、雌の胎生動物の受精卵が着床し、体外へ排出するまでの経過を意味する。妊娠が成立するまでには以下の過程を辿っていく。第一に、脳下垂体から分泌される卵胞刺激ホルモン（FSH）が卵巣内に存在する原始卵胞の成熟を促進する。その後、視床下部から卵胞ホルモン（エストロゲン）と黄体形成ホルモン（LH）が分泌され、成熟卵胞の排卵を誘発する（図 1）。第二に、卵子は卵管先端部卵管采に取り込まれた後、雄の生殖細胞である精子と結合して受精卵を形成する。第三に、受精卵は卵割を繰り返して胚盤胞へと成長しながら子宮へと移動する。その後、受精卵は子宮内膜に着床し、胚盤胞の内細胞塊は胎児へと生育し、外細胞塊は細胞性栄養膜細胞層（cytotrophoblast）と栄養膜合体層（syncytiotrophoblast）に分化しながら胎盤を形成するようになる。妊娠を成立させるために、上記の過程で様々な条件因子が介在する。そのため、妊娠成立後の流産や、不妊症では、多くの因子が重複してそれらの病態の発現に関与している。しかしながら、明らかな不妊の原因が見つからない場合もある¹⁾。

不妊とは、生殖年齢の男女が妊娠を希望し、ある一定期間避妊することなく通常の性交を継続的に行っているにも関わらず、妊娠の成立を見ない場合を指す²⁾。不妊のための婦人科受診者数は、2007 年で 17 万 9 千人である³⁾。2009 年から、世界保健機構（World Health Organization、WHO）は不妊症を「1 年間の不妊期間を持つもの」と定義している^{2,4)}。女性の不妊症の原因には、排卵因子（排卵障害）、卵管因子（閉塞、狭窄、癒着）、子宮因子（子宮筋腫、子宮内膜ポリープ、先天奇形）、頸管因子（子宮頸管炎、子宮頸管粘液分泌異常）、免疫因子（抗精子抗体）等がある。現在では、原因に応じて薬物療法、人工授精（Artificial Insemination of Husband, AIH）の他、体外受精など生殖補助医療（Artificial Insemination of Donor, ART）を用いた治療が行われている^{1,5)}。ART は近年急速に進歩しており、経腔的に採卵した卵子を、体外で精子と共存または顕微的に受精させ、数日後に受精卵を子宮内に返す治療法である。また、女性は 35 歳以上になると、妊娠率の低下だけでなく流産率が増加することが知られている。これは、加齢による卵の染色体異常や受精後の胚発育の悪化により起こると考えられているが、それらの分子的機序は、まだ明らかになっていない¹⁾。

生体膜の二本鎖リン脂質は、生理活性脂質の前駆体としての役割を有する。生理活性脂質は脂質メディエーターとも呼ばれ、必要に応じて速やかに局所で産生され生理活性を示し、役目を終えると速やかに代謝分解される。多価不飽和脂肪酸は主として生体膜リン脂質のグリセロール骨格の sn-2 位に選択的に取り込まれており、細胞刺激下でホスホリパーゼ A2 により切り出され、シクロオキシゲナーゼやリポキシゲナーゼによる代謝を受けプロスタ

グランジンやロイコトリエンなどに転換される。これらはエイコサノイドと総称されており、ステロイドホルモンとともに第1世代の脂質メディエーターファミリーを形成している。アラキドン酸とともに産生する代謝物はリゾリン脂質であり、近年、第2世代の脂質メディエーターとして注目されている。その代表の一つはリゾホスファチジン酸 (LPA) であり、リゾホスファチジルセリン (LPS)、リゾホスファチジルイノシトール (LPI)、リゾホスファチジルコリン (LPC)、リゾホスファチジルエタノールアミン (LPE) やリゾホスファチジルグリセロール (LPG) が構成員として加わり、グリセロール骨格を有するリゾリン脂質メディエーターファミリーを形成している。また、LPA と同様、脂質リン酸モノエステル構造を有するスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) を中心とするスフィンゴシン骨格を有するリゾリン脂質ファミリーも存在する。これらは生殖系の組織や体液に微量存在し、重要な生理学的役割を果たしていると推定されている。

LPA は、グリセロール骨格の *sn*-1 位または *sn*-2 位の炭素に脂肪酸側鎖が、*sn*-3 位の炭素にリン酸基が結合した最も単純な構造のリン脂質である^{6,7)}。LPA は、細胞表面に存在する特異的なG蛋白共役型受容体 (LPA 受容体) に結合することで、血小板凝集^{8,9)}、免疫応答¹⁰⁾、腸管平滑筋収縮¹¹⁾、細胞増殖¹²⁾、ニューロン退縮¹³⁾、がん細胞浸潤促進¹⁴⁾、創傷治癒¹⁵⁾などの生理活性を発現することが明らかになっており、生命活動に深く関与している。Gタンパク共役型LPA受容体は、EDG (endothelial cell differentiation gene) ファミリーに属するEDG2/LPA₁、EDG4/LPA₂、EDG7/LPA₃の3種が存在し、それらと共役するシグナル伝達機構の解析が進んでいる¹⁶⁻²¹⁾。それ以外にもEDGファミリーには属さないGPR23/LPA₄やGPR92/LPA₅、GPR87/LPA₆の存在が明らかとなっており¹⁸⁻²³⁾、現時点ではLPA受容体は6種であるとされている。

LPAは生殖細胞を含む動物の細胞に対して多種多様な生理学的作用を示す。以前、筆者が所属する研究室は、LPAがマウス胚生育やマウス胚輸送を促進すること³²⁾、並びに*in vitro*でマウスやハムスターの卵丘細胞に囲まれた卵母細胞の核と細胞質の成熟をLPAが促進することを明らかにしている^{30,31,46,47)}。LPA₃欠損マウスでは着床の遅れや胚スペーシングの乱れや発育不良が観察されることが、青木らのグループに報告されている⁴⁸⁾。さらにLPAがLPA₃を介してマウス子宮収縮を促進し、正常な胚スペーシングや、卵着床に関与することも報告している⁴⁹⁾。また、正常受胎患者に比べ反復性着床不全患者の子宮内膜円窓におけるLPA₃の発現量が有意に低いことが明らかとなっている⁵⁰⁾。さらに、ウシ子宮静脈血中のLPA濃度は20-30 μMとウシ頸部静脈血漿中濃度よりも高値であり、ウシ子宮組織内LPA濃度も卵胞期よりも妊娠期において総LPA濃度が高いと報告されている⁵¹⁾。以上述べてきたように、受精後の胚生育、胚卵管輸送や胚着床への局所LPA産生の役割はかなり明らかになってきた。筆者は卵巣内においてもLPAが卵成熟から排卵までの過程で生理学的役割を果たしているのではないかと考えた。しかし、ヒト卵巣組織を用いる詳細な実験は、倫理的に不可能であるので体外受精を行う不妊治療患者から採卵時に残存する卵胞液を入手し、LPAがどの程度存在するのか、またどのような経路で生成・分解されているのかを液体クロマトグ

ラフィー/タンデム質量分析法(LC-MS/MS)や酵素アッセイ法などを用いて検討しようと考えた。

LPAは前述の通り、リン酸-グリセロール-脂肪酸という構造単位が連結した複合リン脂質であるが、その合成経路は複数存在する。第1の細胞外経路では、細胞膜外層に触媒部位を向いているホスホリパーゼD(PLD)が、細胞膜外層に局在するリン脂質、主にホスファチジルコリン(PC)からホスファチジン酸(PA)が生成され、続いて、この膜表面のPAが膜結合型ホスホリパーゼA1(PLA1)またはA2(PLA2)により分解を受けてLPAが産生される。第2の細胞外経路^{6,15-27)}では、細胞膜外層やリポ蛋白質に存在するPCが分泌性PLA1あるいはPLA2によりリゾホスファチジルコリン(LPC)へと変換され、さらに分泌性リゾホスホリパーゼD(lysoPLD)による変換を受けてLPAが産生される^{6,28,29)}。細胞内では、グリセロリン脂質の*de novo*合成経路により中間体として産生される第3の経路や、モノアシルグリセロールのリン酸化により生成される第4の経路が存在する^{6,7,24)}(図2)。卵巣組織内および卵胞液中のLPAは、血清や血漿と同じく体液中に遊離しているLPCまたは細胞外層に結合しているPCからLPC分解を経て生成されると筆者らは考え、まずヒト卵胞液中のLPAとLPC濃度を定量するとともに、主要なLPA合成・代謝酵素活性を測定した。血清や血漿などの体液中に存在するLPAは主に分泌性lysoPLDでLPCから生成される。この酵素は、メラノーマの培養上清で見出された腫瘍細胞運動性刺激作用を有する分泌型酵素であり、オートタキシン(*autotaxin*, ATX)と命名されていた。筆者が属する研究室は、ヒト血漿から、別の研究グループは、ウシ胎児血清から分泌性lysoPLD活性を頼りに高度に精製し、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法(LC-MS/MS)でその部分的アミノ酸配列を決定し、この酵素をATXと同定した。そこで、本研究において筆者は卵胞液のLPA合成酵素がATXである可能性を試験しようと考えた。

本論文第一章では、ヒト卵胞液中のリゾホスホリパーゼD(lysoPLD)、ならびにリゾホスホリパーゼA活性を測定して、ヒト卵胞液中のLPA代謝経路の特定に関する成果を示す。さらにLPA代謝酵素活性の基質特異性と体外受精処置患者の臨床データ(胚盤胞形成と妊娠成立)との関連性を評価する。次に、第二章ではヒト卵巣組織を用いることが困難なため、マウスの卵丘・卵細胞複合体(COC)を取り出し、LPAを処理することでヒアルロン酸産生による卵丘膨化が進むかどうかを調べた結果を示す。また、LPAが排卵誘発に寄与する可能性について考察する。

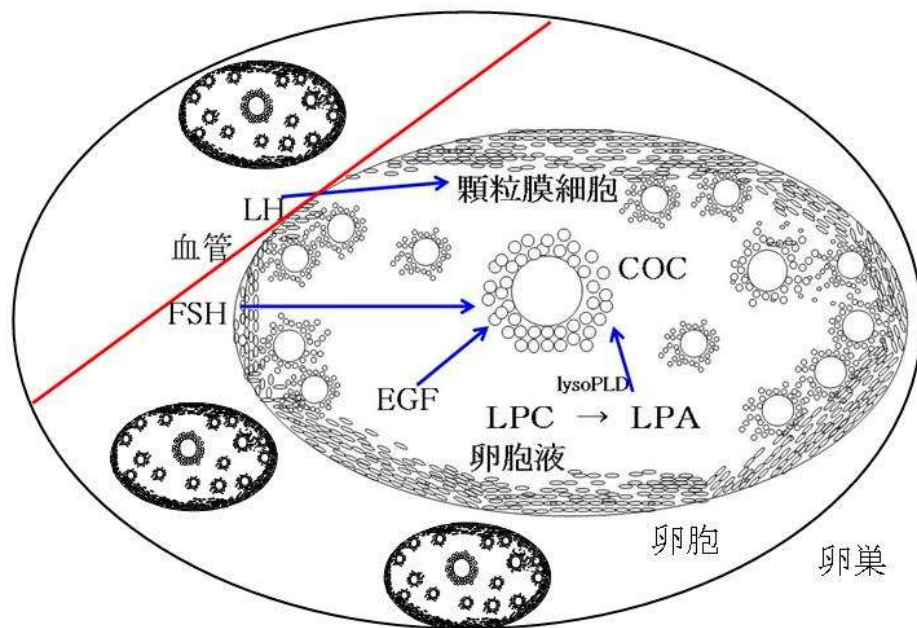


図1 卵巣内の卵胞に関する模式図

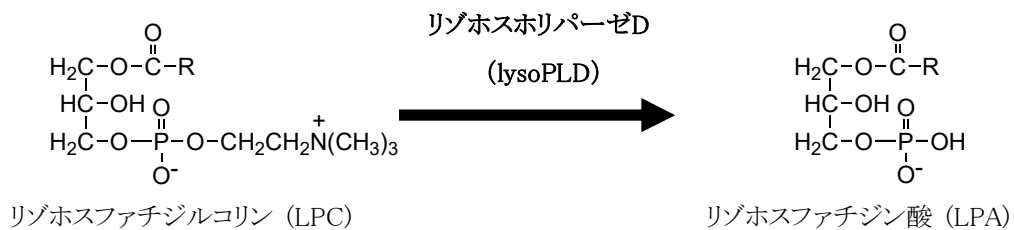


図2 lysoPLDによるLPA産生経路

第一章

ヒト卵胞液中に高濃度存在するリゾホスファチジン酸の
産生および代謝経路と生理的役割

第一章 序論

哺乳類の卵巣では、前胞状卵胞は、ゴナドトロピン制御下で卵胞液 (follicular fluid, FF) で浸された卵丘-卵母細胞複合体 (cumulus-oocyte complex, COC) を有する成熟卵胞へと成熟する。この成熟卵丘細胞は、ギャップ結合のネットワーク構成や卵胞液中でのパラクリン因子分泌を介し、卵丘細胞同士だけでなく、卵母細胞とも交信している。したがって、卵胞液は胞状卵胞中での卵母細胞にとって特別な環境を作り出していると言える³³⁾。ヒト卵胞液は、体外受精と卵母細胞成熟³⁴⁾並びに卵丘膨化³⁵⁾などに有益な作用を示すことが報告されている。哺乳類において卵胞液成分の一部は、血漿由来のものであり、顆粒および卵胞膜細胞を含む濾胞細胞によって分泌される他の成分と共存している。ヒト卵胞液は、卵胞の成長及び卵母細胞の成熟に影響を与える上皮成長因子様活性³⁶⁾を有するアンフィレグリンなどの上皮成長因子様タンパク質を含有している³⁷⁾。遊離脂肪酸³⁸⁾や血小板活性化因子³⁹⁾、リゾリン脂質^{40,41)}およびスフィンゴシン-1-リン酸⁴²⁾などの疎水性長鎖を持つ脂質結合タンパクは種々の生理活性を示すことがわかっている。中でも LPA は、生殖器系における生理的役割について最も良く研究されてきたグリセロール骨格を有するリゾリン脂質メディエーターである^{43,44)}。LPA の生理作用について、筆者が所属している研究室は、以前、LPA がラット子宮平滑筋の収縮を誘発することを *in vivo* および *in vitro* の実験で報告している⁴⁵⁾。さらに、*in vitro* で着床前マウス胚の着床前発育促進⁴⁶⁾や、*in vitro* でマウス卵管内の卵子輸送促進⁴⁷⁾、およびゴールデンハムスターとマウスの卵母細胞の成熟を活性化させることを報告している^{30,31)}。次に LPA 産生経路について、著者が所属している研究室は TLC を用いてヒト卵胞液の脂質抽出物から LPA を精製し、LPA から誘導される脂肪酸を GLC 用いて解析することによりヒト卵胞液を 37°C でインキュベーションすることで LPA 濃度が有意に上昇することを発見し、卵胞液中のリゾホスホリパーゼ D (lysophospholipase D、lysoPLD) により LPA が産生されていることを推定した。この仮説を著者たちは放射性 LPC を用いた実験を行い、裏付けを行っている⁵²⁾。しかし、卵胞液中で LPA が示す生理作用および産生経路の完全な解明には至っていない。これまで組織体液中の lysoPLD 酵素について、ヒト血漿中に lysoPLD が存在する事を見出し、LC-MS/MS によって血漿の LPA 産生酵素をエクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ (ENPP) ファミリーに属するオートタキシン (ATX/ENPP-2) と同定した⁵⁴⁾。ATX は、ヒトメラノーマ細胞株 A2058 によって放出される腫瘍細胞運動性刺激タンパクとして発見され⁵⁵⁾、その活性により血漿中の LPA が産生されることが示唆された⁵⁶⁾。

近年、慢性疾患のバイオマーカーの解析に使用されるエレクトロスプレーイオン化などのソフトイオン化法を用いる LC-MS/MS が適用され、体内 LPA の分子種分析が急速に進んでいる⁵⁷⁾。特に多価不飽和脂肪酸アシル基を有する分子種の定量法として、これまでの TLC / GLC による LPA の間接的な定量化よりも LPA を直接定量化する LC-MS/MS の方

が優れている。本研究においては、卵胞液中の lysoPLD 活性を LPC 分解産物のコリン量から測定するとともに、LC-MS/MS を用いて各分子種ごとの LPA 量を測定し、新鮮ヒト卵胞液中の LPA 組成を解析した。さらに、卵胞中の lysoPLD 活性の特性について解析を行い、ヒト卵胞液中の lysoPLD 活性が ATX に由来するかどうかを調べた。

第1節・実験方法

2.1. リン脂質および実験試薬

1-カプロイル (6:0)-リゾホスファチジルコリン (lysophosphatidylcholine、LPC)、1-カプリロイル(8:0)-LPC、1-ラウロイル(12:0)-LPC、1-ミリストイル(14:0)-LPC、1-パルミトイル (16:0)-LPC、1-オレオイル(18:1)-LPC、1-リノレオイル(18:2)-LPC と 1-リノレノイル(18:3)-LPC、1-*O*-ヘキサデシル(alkyl-LPC サブクラス)型と牛心臓由来のプラズマローゲン (alkenyl-LPC サブクラス)型 LPC はフナコシ (Tokyo, Japan) から購入し、1-ブチリル (4:0)-LPC、1-カプロニル(10:0)-LPC、1-ヘプタデカノイル(17:0)-LPC、1-ステアロイル (18:0)-LPC はシグマーアルドリッチ (セントルイス、ミズーリ州、米国) より購入した。アラキドノイル基 (20:4)-LPC はジアラキドノイルホスファチジルコリン (phosphatidylcholine、PC)から蜂毒由来ホスホリパーゼ A₂ 処理によって調製した²⁸⁾。ジブチリル(4:0/4:0)、ジカプリル(6:0/6:0)、ジカプリリル (8:0/8:0)、ジカプリノル(10:0/10:0)、ジラウロイル(12:0/12:0) やジミリストイル (14:0/14:0) 等の分子鎖を持つ PC 標品は Sigma-Aldrich にて購入した。ヘプタデカノイル-*sn*-グリセロール-3-リン酸 (17:0-LPA) と パルミトイル-*sn*-グリセロール-3-リン酸 (16:0-LPA) は 17:0-LPC と 16:0-LPC からストレプトミセス・クロモフスカス由来のホスホリパーゼ D 処理²⁹⁾ によって調製された。

10:0-LPC、1-ペンタデカノイル (15:0)-LPC 17:0-LPC、18:0-LPC、4:0/4:0-PC、1,2-ジリノレオイル (18:2/18:2)-PC、は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, U.S.A) から購入した。1-ペンタデカノイル-2-ヒドロキシ-*sn*-グリセロール-3-リン酸(15:0-LPA)は 15:0-LPC をホスホリパーゼ D で処理して調製した。ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin、BSA)、4:0/4:0-PC、6:0/6:0-PC、8:0/8:0-PC、10:0/10:0-PC、12:0/12:0-PC、14:0/14:0-PC、L- α -グリセロホスホリルコリンと、ストレプトミセス由来ホスホリパーゼ D はシグマーアルドリッチ から購入した。18:2-LPC はジリノレオイル (18:2/18:2)-PC のホスホリパーゼ A₂ 処理によって調製された。セモリブデン酸六アンモニウム四水和物 (粉末)、マラカイトグリーン、塩化コリン、塩化ナトリウム NaCl、塩化カリウム KCl、塩酸 HCl、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、塩化コリン、60% 過塩素酸は関東化学 (東京) から購入した。3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸(HPPA)は東京化成(東京)から購入した。塩化カルシウム (無水) CaCl₂、塩化マグネシウム六水和物 MgCl₂·6H₂O、モリブデン酸アンモニウムは和光純薬工業 (大阪) から購入した。ペルオキシダーゼ (西洋ワサビ、グレードIII) はフナコシ (東京) から購入し、コリンオキシダーゼと Tween 20 はナカライテスク (京都) から購入した。有機溶媒は関東化学 (東京) から一級品を購入し、蒸留して使用した。改良ヒト卵管液(modified human tubal fluid、mHTF)は日本医科機械製作所(大阪)から購入した。RNAlater は QIAGEN Japan (東京) から購入した。

2.2. 検体の採集

筆者らは前述⁴⁰⁾の通り、体外受精を行う不妊治療患者から検体使用の同意を得て、ヒト卵胞液と卵丘細胞集合体を採取した。ヒト卵胞液と卵丘細胞の使用は、徳島大学の臨床研究倫理治験審査委員会により承認を受け、ヘルシンキ宣言を遵守し行った。卵胞刺激ホルモン又はヒト閉経期性腺刺激ホルモンが患者に投与されてから、1分後に超音波ガイド下で臍側から卵巣を穿刺し卵胞液とともに卵丘-卵母細胞複合体(COC)を採取した。新鮮卵胞液は採取できた容量(2 mL未満、2 mL以上 8 mL未満、8 mL以上)によってS群(10患者、36.7 ± 1.2歳)、M群(16患者、35.9 ± 0.9歳)、L群(15患者、36.0 ± 1.3歳)の3群に分けた。採取後、直ちに1分間10,000×gで遠心分離し、その上清を得、使用するまで-80℃で保存した。健常人の志願者7人(年齢23 ± 0.3歳)の肘正中静脈から、ヘパリン添加ありと無しの2本のプラスチック管内に血液を採取した。ヘパリンを添加した血液を4℃、1000×gで10分間遠心分離して血漿サンプルを調製した。また、ヘパリン無添加の血液を室温で3時間インキュベーションした後に、4℃、1000×gで遠心分離して血清サンプルを調製した。

2.3. 新鮮卵胞液のLPA、LPC濃度測定

2.3.1. Bligh と Dyer 法によるリゾリン脂質(LPC, LPA)の抽出

未希釈卵胞液100 μL、もしくは卵胞液30 μLを生理食塩水に混和し全量を100 μLとした3.3倍希釈試料を使用した。試料中のタンパク質をパッキングするために20 mg KClを溶解した蒸留水700 μLを試料に加えよく攪拌した後、内部標準物質として17:0-LPC(10,000 pmol)、17:0-LPA(200 pmol)を加え30分静置した。その後、クロロホルム、メタノール、水を1:1:0.9の割合になるように再度クロロホルム1 mL、蒸留水1 mLを加えよく攪拌した。Bligh と Dyer 法⁶⁶⁾に従い、まず、20%NH₃を加え水層のpHを8~9に調整し遠心分離(1000×g、10分間、4℃)後、パスツールピペットを用いて有機層の脂質画分(LPC画分)を分取した。残りの水層にクロロホルム/メタノール(17:3)混液を2 mL加え同様の操作を繰り返して脂質画分(LPC画分)を再度分取した。残りの水層にクロロホルム/メタノール(17:3)混液を2 mL加えた後、5N HClを加えて水層pH 2.0-2.5に調整し遠心分離(1000×g、10分間、4℃)した。パスツールピペットを用いて有機層の脂質画分(LPA画分)を分取し、残りの水層にクロロホルム/メタノール(17:3)混液を2 mL加え同様の操作を繰り返して脂質画分(LPA画分)を再度分取した。

2.3.2. 液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計 (LC-MS/MS)

2.3.1. で回収した有機層を窒素気流下で留去後、5 mM ギ酸アンモニウム含有 メタノール:水 95:5(v/v)の混液に溶かし LC-MS/MS で分析した³⁰⁾。メタノールと蒸留水は LC/MS 用の市販品を使用した。LPC 分析に用いた LC カラムと移動相は ZORBAX Eclipse XDB-C 逆相カラム(50 × 1 min i.d.)と水/メタノール[5:95 (v/v), 5 mM ギ酸アンモニウム含有]であり、後者の流速を 200 μ L/min とした。トリプル四重極リニアイオントラップ機能を搭載したハイブリット型質量分析装置 4000QTRAP に LC を直結して、正モード(multiple reaction monitoring、MRM)で LPC を測定した。MRM の条件として Q1 にプレカーサーイオン ($[M+H]^+$)を、Q3 にプロダクトイオン (m/z 184) を設定した。

TOSOH の ODS(100Z)逆相カラム(150 × 2 min i.d.) をトリプル四重極にリニアイオントラップ機能を搭載したハイブリット型質量分析装置 4000QTRAP に直結して、LPA を負イオンモードの MRM で測定した。LPA 分析のために、LC 移動相としては水/メタノール [5:95 (v/v), 5 mM ギ酸アンモニウム含有]を用い、流速は 220 μ L/min とした。MRM の条件として Q1 にプレカーサーイオン($[M-H]^-$)を、Q3 にプロダクトイオン(m/z 153) を設定した。試料に加えておいた濃度既知の内部標準液由来のピーク面積を測り、それらに対する LPC と LPA 各分子種のピーク面積の割合から両リゾリン脂質の濃度を求めた。

2.4. リン脂質濃度の測定

有機リン含量の測定は、Chalvardjian と Rudnicki の方法に従った³¹⁾。リン脂質を含む試料液の一定量を試験管に分取し、窒素気流下で溶媒を蒸発除去した。これに蒸留水 0.1 mL 及び 60%の過塩素酸 0.1 mL を加え、150-160°C で 90 分間加熱した。室温まで冷却した後、蒸留水 1 mL、4.2%モリブデン酸アンモニウムマラカイトグリーン試薬 5 mL 及び 1.5%Tween20 溶液 0.2 mL を加えよく混合した後、島津 UV-1600 分光光度計で 660 nm の吸光度を比色定量した。

2.5. lysoPLD 活性の測定

Guo らが報告したコリン含有リン脂質の酵素的定量法⁵³⁾を参考にして当研究室で構築した 1 次アッセイ系を用いた⁵⁸⁾。2 次アッセイのコリンの定量は、Zaitso らの方法⁶¹⁾に基づいて行った。

2.5.1. 1 次アッセイ

0.25%BSA 含有生理食塩水に溶解した 16:0-LPC 溶液 (0.45 mM) 50 μ L と試料(ヒト卵

胞液)と生理食塩水を合計 150 μL となるように混合した。その後、37°C、24 時間インキュベートした。このときの基質の最終濃度は 150 μM である。インキュベートなしの 1 次アッセイ溶液は、2 次アッセイ終了まで -20 °C で冷凍保存しておいた。

2.5.2. 2 次アッセイ

7.5 mM HPPA 0.2 mL、0.1 M トリス塩酸緩衝液(pH8.5)2.6 mL、2.0 U/mL ペルオキシダーゼ 0.1 mL、1 次アッセイ液 0.1 mL、300 U/mL コリンオキシダーゼ 10 μL を試験管内で混合し、振とうしながら 37°C で 15 分間インキュベートした。この試験液の蛍光強度を測定した。塩化コリンを用いて検量線を作製し、この検量線(0、1、3、10、30、100 nmol/mL)と試料の蛍光強度からコリンを定量し、これに基づき試料の lysoPLD 活性を算出した。

《測定条件》

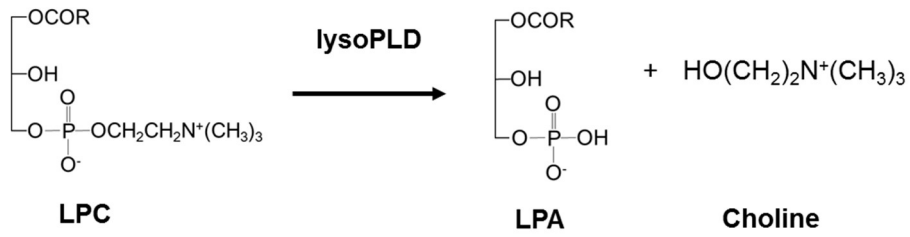
測定機器：Fluoroscan Ascent CF

励起波長：320 nm

発光波長：404 nm

スリット (励起/発光)：2.5 nm/10.0 nm

First assay



Second assay

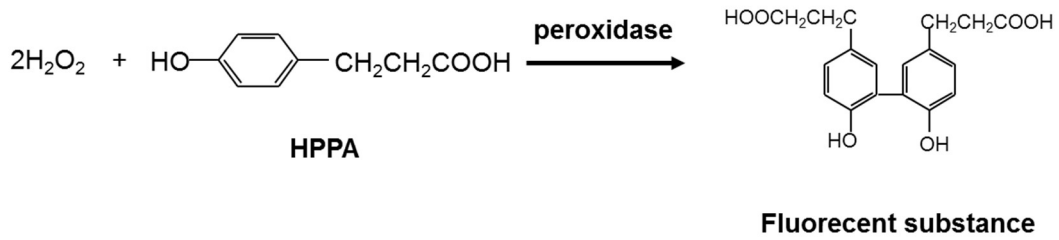
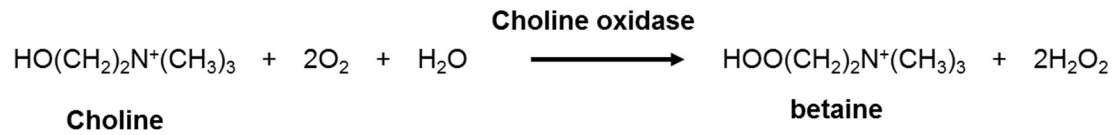


図 3 lysoPLD 活性の測定原理

2.6. COC から単離された卵丘細胞による LPA の分解

2.2 に示す方法でヒト卵胞から採取した 5 つの卵丘-卵母細胞複合体(COC)を、1% ヒアルロニダーゼ溶液に約 30 秒間浸した後、mHTF 中に移し 2-3 回洗浄を行った。洗浄液中の卵丘細胞を 1000×g、1 分で遠心分離し、上清を捨ててヒアルロニダーゼを除去した後、15:0-LPA あるいは 18:3-LPA (3 μM) を溶解した 0.25%BSA 含有生理食塩水 1.5 mL 中に移して、1.5、3、4.5 時間インキュベートを行った。インキュベーション後、残存する外因性 LPA を、前述のとおり Bligh と Dyer 法によって二段階抽出後、LC-MS / MS により定量した。

2.7. ATX の免疫沈降

2.2. で得た卵胞液 0.3 mL に抗 ATX 抗体が結合したビーズ溶液を様々な容量で添加し、10~15 分おきに混合しながら 4℃で 2 時間反応させた。その後、混合液を遠心分離 (10,000 rpm, 1 min, 4℃) して抗 ATX 抗体結合ビーズを沈殿させ、上清を採取した。コリン測定法 (2.5. 項に示す) を用いて上清の lysoPLD 活性を測定した。また、抗 ATX 抗体結合ビーズに結合した ATX/lysoPLD を溶出させるために、ビーズを生理食塩水で 2 度洗浄し、100 mM グリシン緩衝液 (pH 2.5) 中で 1 時間静置した。その後、遠心分離 (10,000 rpm, 1 min, 4℃) し、上清を回収し、1 N NaOH で上清の pH を 6~7 に戻した。これを ATX 回収液として実験に用いた。

2.8. 統計解析

実験データは平均値±標準誤差として示す。

統計解析は、ソフトウェア (JMP、SAS 研究所、東京、日本) を用いて行った。多群間の差は、Tukey's 多重比較検定に ANOVA をかけて評価した。重回帰分析は、多項式モデルで解析し、最小二乗法により評価した。P<0.05 で、統計的に有意とみなした。

第 2 節・結果

3.1 ヒト卵胞液中の ATX の高い lysoPLD 活性による リゾホスファチジン酸の生産

卵成熟における卵胞液中の LPA 量の変化を解析するため、著者達は、不妊治療患者から提供された新鮮なヒト卵胞液量に応じて卵胞サイズを S(2mL 未満)、M(2mL 以上、8mL 未満)、L(8mL 以上)に分類し、LC-MS/MS によりサイズごとの LPA とその前駆体の LPC との各分子種組成と総濃度を比較した。その結果、各サイズの総 LPA 濃度は S 群で 24.5 μ M、M 群で 24.5 μ M、L 群で 30.3 μ M であり、卵胞液中の LPA 総濃度に各群間で有意差はなかった (図 4-A)。しかし、卵胞液中の LPA 濃度は女性血漿および血清の LPA 濃度よりもはるかに高かった(data not shown)。図 4-B に示すように卵胞液の各サイズ (S、M、L) の LPC 総濃度が約 200 μ M であり、新鮮なヒト血漿が平均 147 μ M、血清が平均 149 μ M であり、同等の値であった(data not shown)。また、LPA と LPC の分子種組成は、図 4 に示すように卵胞液 (S、M、L) の 3 群間で大きな差はなかった。LPA 濃度の平均値を比べると統計的有意性はなかったが、特に 18:2 と 16:0 の分子種において L 群は、S 群と M 群のものよりやや高値であった。新鮮卵胞液 (S、M、L) 中の LPC では多価不飽和脂肪酸を含有する分子種の割合は非常に低かったのに対し、LPA では多価不飽和脂肪酸アシル基を持つグループが顕著に高い割合を占めていた。

次に、ヒト卵胞液における可溶性 lysoPLD の LPA 産生への関与を調べた。まず、外因性基質 LPC (16:0-LPC) を加えたものと加えなかったものとの内因性基質に対する lysoPLD 活性の希釈依存性を試験した。その結果、図 6-A で示すように原液 1 mL あたりに換算してコリン産生活性を計算すると、ヒト卵胞液中の外因性基質 LPC からコリン産生活性は希釈率を上げることで非線形的に増加した。この結果から、筆者ははその後の実験に 3.3 倍希釈を選択した。

次に LPA が卵胞液中で lysoPLD 活性の生成物阻害を誘導するかどうかを調べるため、著者達は 3.3 倍、10 倍、30 倍、100 倍希釈した卵胞液に外因性基質 16:0-LPA を加えて 12 時間インキュベーションし、コリン蛍光法により lysoPLD 活性を測定した。添加する LPA 濃度は最終濃度 6 μ M 及び 18 μ M になるように設定した。図 6-B で示すように、16:0-LPA が存在する希釈卵胞液の lysoPLD 活性は、16:0-LPA を添加していない希釈卵胞液の lysoPLD 活性と違いはなかった。これは LPA 以外の未知の基質が未希釈卵胞液中で lysoPLD 活性の減弱に関連していることを示唆している。

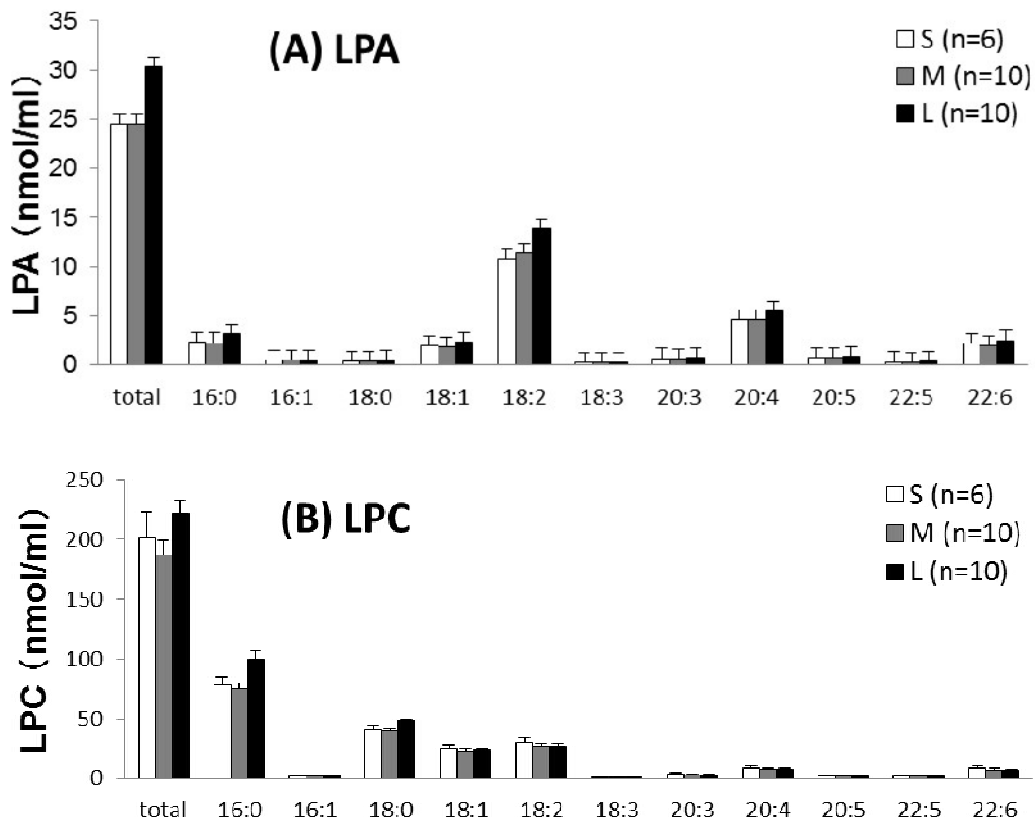


図4 新鮮ヒト卵胞液中の LPA および LPC 濃度と分子種組成

LC-MS/MS を用いて卵胞サイズごとの LPA 濃度 (A) および LPC 濃度 (B) を測定した。値は平均±標準誤差で表す。各バーは白が S サイズ (n=6)、灰色が M サイズ (n=10)、黒が L サイズ (L=10) を示す。

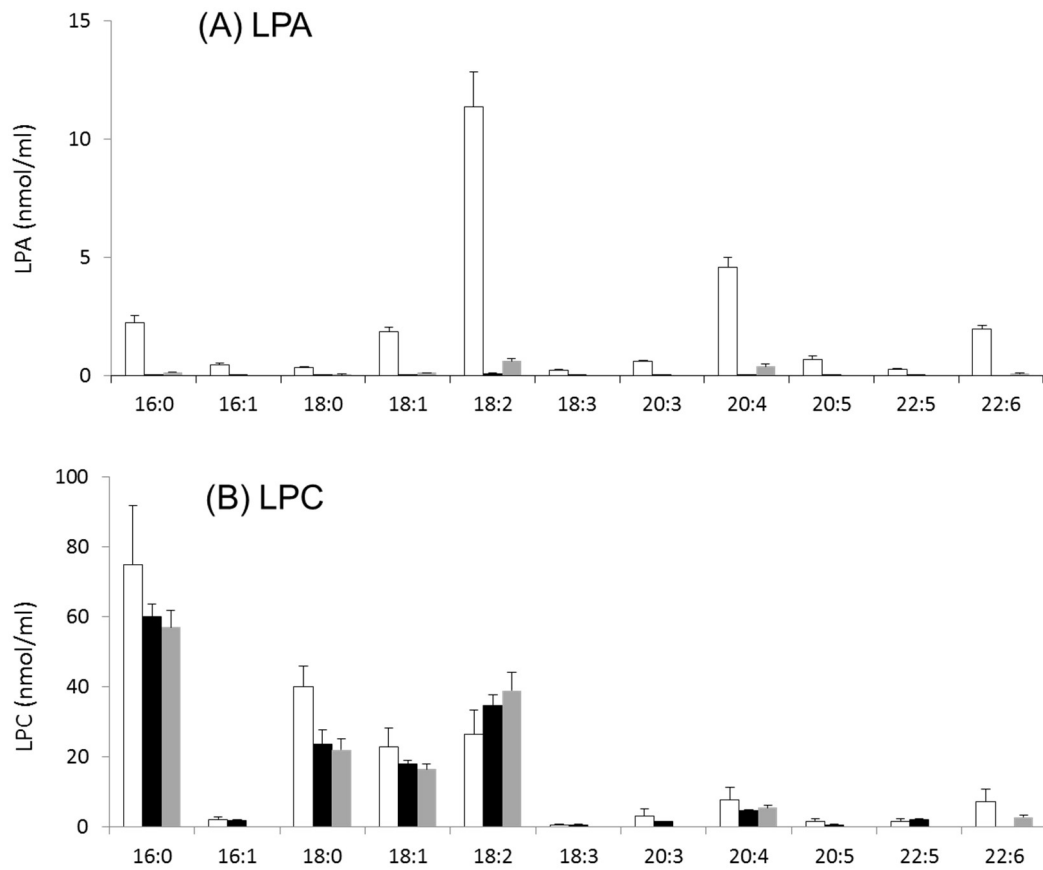


図5 ヒト卵胞液、血漿、血清中の LPA および LPC 濃度と分子種組成

LC-MS/MS を用いて各体液中の LPA 濃度 (A) および LPC 濃度 (B) を測定した。値は平均 ± 標準誤差で表す。各バーは白が新鮮ヒト卵胞液 (n=26)、黒が血清 (n=7)、灰色が血漿 (n=7) を示す。

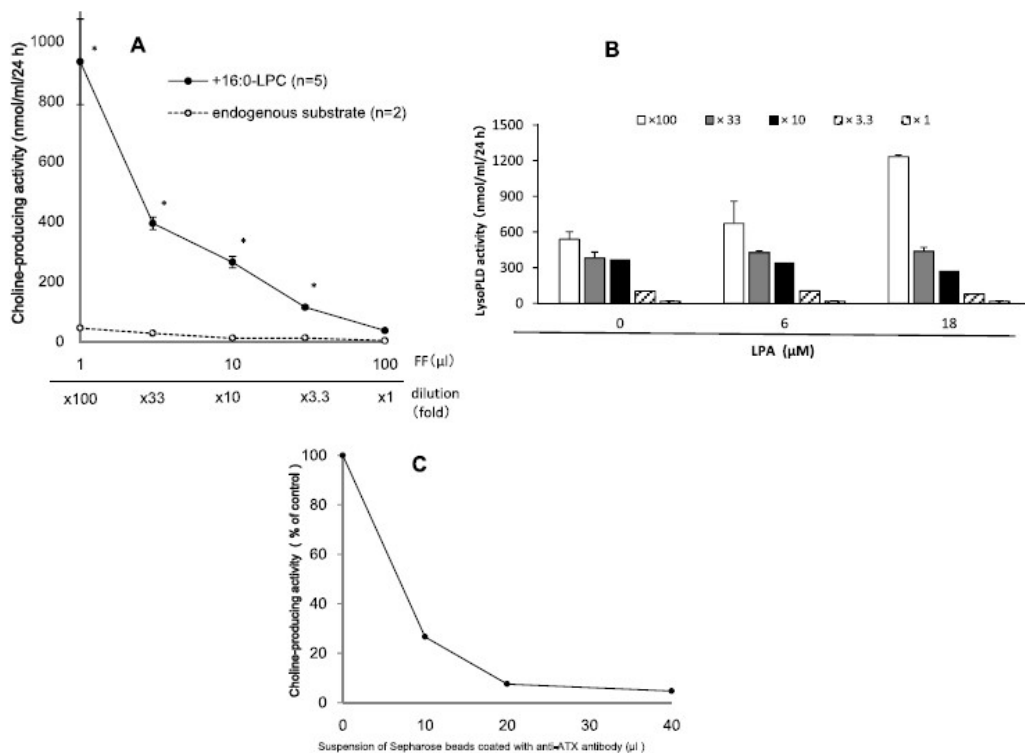


図6 ヒト卵胞液中の ATX 由来のコリン産生活性 (lysoPLD 活性)

A : ヒト卵胞液のコリン蛍光活性が示す希釈依存性
 値は平均±標準誤差で表す。外因性基質 16:0-LPC を添加した値を黒点と実線で示し (n=5)、
 内因性基質のみの値を白丸と点線で示す (n=2)。* $p < 0.0001$ [vs. 100 μL 卵胞液 (未希釈)]

B : LPA と LPC を添加した卵胞液の lysoPLD 活性
 16:0-LPA と 16:0-LPC をともに脂肪酸を含まない 0.25% BSA (50 μL) に溶解し、各希釈卵
 胞液(100 μL)とともに 37°C、24 時間インキュベートしてコリン蛍光活性を測定した。
 LPA と LPC の最終濃度はそれぞれ 6、18 と 150 μM である。

C : 抗 ATX 抗体結合ビーズによる 3.3 倍希釈卵胞液のコリン産生活性の免疫沈降
 基質 16:0-LPC の最終濃度は 150 μM とした。値は平均値 (n=2)を示す。新鮮ヒト卵胞液
 に各濃度の抗 ATX 抗体結合ビーズ溶液を加えてインキュベーション後、遠心分離して抗
 ATX ビーズ抗体を沈殿させ、上清を採取し lysoPLD 活性を測定した。lysoPLD の相対活性
 は抗 ATX ビーズ抗体を添加していない希釈卵胞液 lysoPLD 活性との比(% of control)で示
 す。

続いて、筆者は、血漿や血清と卵胞液の LPA 分子種組成が類似している点から、血漿と同じく卵胞液 lysoPLD も ATX かどうかを確認した。図 6-C に示すように、新鮮な卵胞液をインキュベーションする際に、抗 ATX 抗体でコーティングされたセファロース 4B ビーズ懸濁液を加えると、加えたビーズ量に依存して上清中の lysoPLD 活性が著しく減少した。この結果から、筆者は lysoPLD 活性の大部分は ATX に起因するものと判断した。また、筆者は図 7-A に示すように、16:0-LPC 存在下の卵胞液に EDTA を加えることで lysoPLD 活性が濃度依存的に有意に減少し、EDTA が lysoPLD 活性を阻害することを明らかにした。o-フェナントロリンは金属カチオンのキレーターであり、その添加により濃度依存的に lysoPLD 活性が有意に減少した。各キレーターが低濃度存在する場合、EDTA の方が o-フェナントロリンよりも強く活性を阻害した。0.1 mM EDTA による lysoPLD 活性阻害は、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} や Ni^{2+} との共付加によって減弱したが、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} または Cu^{2+} の共付加では減弱しなかった(図 7-B)。図 8-A に示すように、ヒト卵胞液におけるコリン産生活性は、飽和 LPC の中でミリストイル基 (14:0) を有する LPC が最も高かった。その活性は、短鎖 (C10、C12) や長鎖 (C16、C18) 脂肪酸残アシル基を有する LPC よりも有意に高かった (14:0 > 12:0 > 16:0 > 10:0 = 18:0 > 8:0 > 6:0)。不飽和 LPC のうち 20:4-LPC に対するコリン産生活性は、他の不飽和 LPC からのコリン産生活性よりも有意に高かった (20:4 > 18:2 = 18:1 > 18:3)。飽和脂肪酸アシル基を 2 本もつ PC に対する lysoPLD 活性は低かった。図 8-B に示すように、ヒト卵胞液中の lysoPLD は、次の機序 (アシル>アルキル>アルケニルの順) で LPC サブクラスを加水分解した。しかし、スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) からのコリン産生活性は、LPC サブクラスからのコリン産生活性よりも有意に低かった。また、飽和脂肪酸アシル基が 2 つある PC に対しての活性は低く、かつ、PC 分子種間で有意な差はなかった。これらの結果はヒト卵胞液の lysoPLD 活性が示す基質特異性が SPC を除いて基本的にヒト血漿 lysoPLD の基質特異性と同一であることを示している²⁹⁾。卵胞サイズが L 群 (15 患者)、M 群 (16 患者)、S 群 (10 患者) の各卵胞液中の lysoPLD 活性を比較すると、内因性基質に対する lysoPLD 活性は基本的に各卵胞サイズで同じであり、外因性基質である 16:0-LPC と 18:2-LPC に対する lysoPLD 活性も同様であった。ただし、卵胞サイズが大きいほど lysoPLD 活性が減少する傾向はあるが、統計学的に有意な差は得られなかった (図 9-A)。外因性基質 16:0-LPC に対する活性と 18:2-LPC の lysoPLD 活性の比は L 群の卵胞群において高い傾向があった (図 9-B)。次に、各卵胞液の飽和脂肪酸 (16:0)-LPC 及び多価不飽和脂肪酸 (18:2)-LPC に対する lysoPLD 活性や lysoPLD の基質選択性を反映する 18:2-LPC に対する活性/16:0-LPC に対する活性の比と、患者年齢、胞胚数や妊娠成立などの臨床データとを比較し、この酵素の生理学的役割の検討を行った。その結果、卵胞液を採取した患者 (36 患者、36.25 ± 0.55 歳) の年齢と卵胞液の lysoPLD の基質選択性を反映する 18:2-LPC に対する活性/16:0-LPC に対する活性の比に負の相関がみられた (図 10-A)。そのうち妊娠不成立症例 (30 患者、36.23 ± 1.41 歳) でも同様の相関関係が示されたが、妊娠成立症例 6 患者、36.33 ± 1.91 歳) では相関性を示さなかった。次に、妊娠成立症例と妊娠不成立症例の間で、胞胚数に有

意な差が見られた(図 10-B、 $p < 0.05$)。しかし、内因性基質または外因性基質に対する lysoPLD 活性に関する 2 群の患者の値に差は見られず、活性比にも有意な差は見られなかった。

次章で詳述するが、LPA をマウス COC に作用させるとヒアルロン酸の産生が誘導され、卵丘膨化が促進されるので、ヒト卵胞液中の LPA が卵成熟や排卵誘発に関係すると考えられる。過排卵患者卵胞液中の活性比と胞胚数の関連について多項式モデルで解析し、1 次の項では関連性は見られなかったが、2 次の項において有意な関連性が見られた。胞胚数が増加するにつれて活性比も基質選択性が不飽和選択に傾いているが、胞胚数 4 以上では活性比は再び胞胚数 0-1 と同じ比となる(図 10-C)。

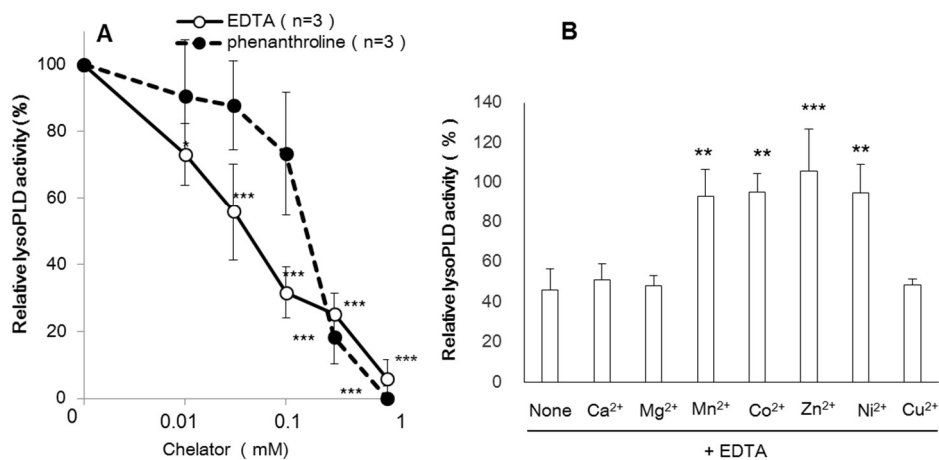


図7 ヒト卵胞液 lysoPLD の金属要求性

(A) キレーターによる抑制効果

各濃度の EDTA(実線)またはフェナントロリン(点線)を希釈卵胞液に添加し、0.15 mM の 16:0-LPC と共に 37°C で 24 時間インキュベート後、lysoPLD 活性を測定した。卵胞液は 3.3 倍に希釈して実験に用いた。キレーターを添加していないときの活性も同様の手順で測定し、その値を 100% とし、これに対する相対活性を求めた。値は平均±標準誤差で示す (n=3)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ および*** $p < 0.001$ vs. 0 mM (コントロール)である。

(B) 2 価カチオンの影響

最終濃度 0.1 mM EDTA と 0.1 mM 2 価カチオンを希釈体液試料に添加し、16:0-LPC と共にインキュベート後、lysoPLD 活性を測定した。キレーターと 2 価カチオンを添加していないときの活性を測定し、これを 100% とした(* $p < 0.05$)。各体液の値をこのコントロール値に対する相対活性で示す。卵胞液は 3.3 倍希釈したものを実験に用いた。値は平均±標準誤差で表す (n=3)。

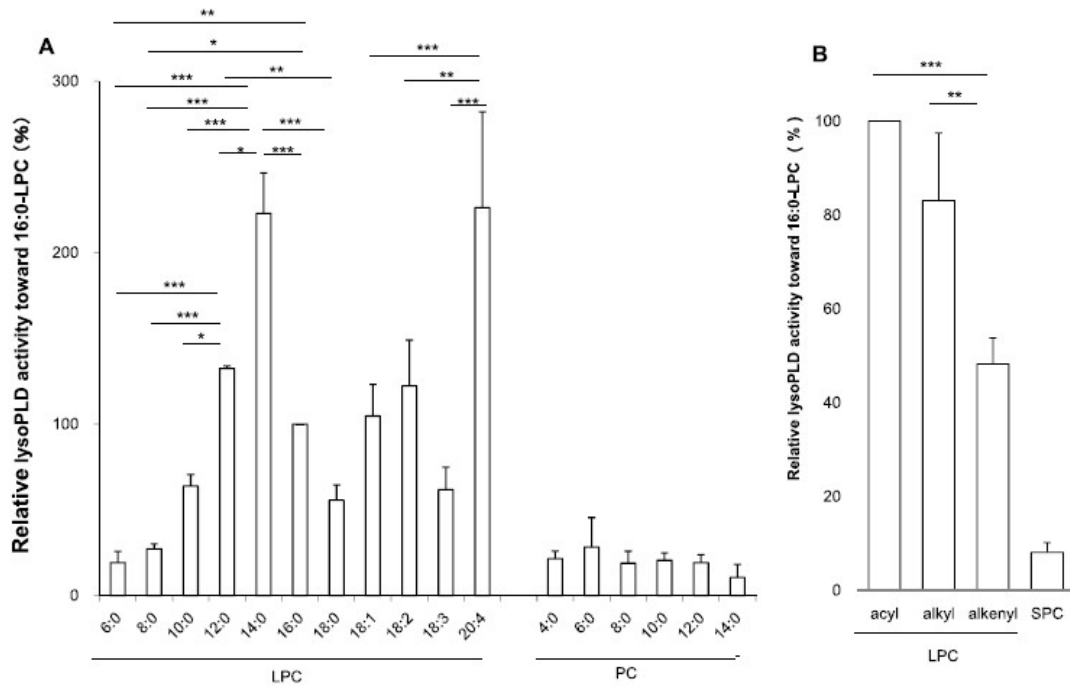


図8 ヒト卵胞液 lysoPLD の基質特異性

A: 0.15 mM の各リン脂質基質を 3.3 倍希釈ヒト卵胞液に添加し、37°Cで 24 時間インキュベート後、生成するコリンを定量し lysoPLD 活性を測定した。各分子種の LPC (左図) と、鎖長が同じ短鎖または中鎖脂肪酸をもつ PC (右図) の lysoPLD 活性は 16:0-LPC に対する相対活性 (%) で示した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

B: 0.15 mM の 3 種の基質 LPC と SPC を 3.3 倍希釈ヒト卵胞液に添加し、37°Cで 24 時間インキュベート後、生成するコリンを定量し lysoPLD 活性を測定した。アシル基 16:0-LPC の lysoPLD 活性に対する相対活性 (%) で示した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

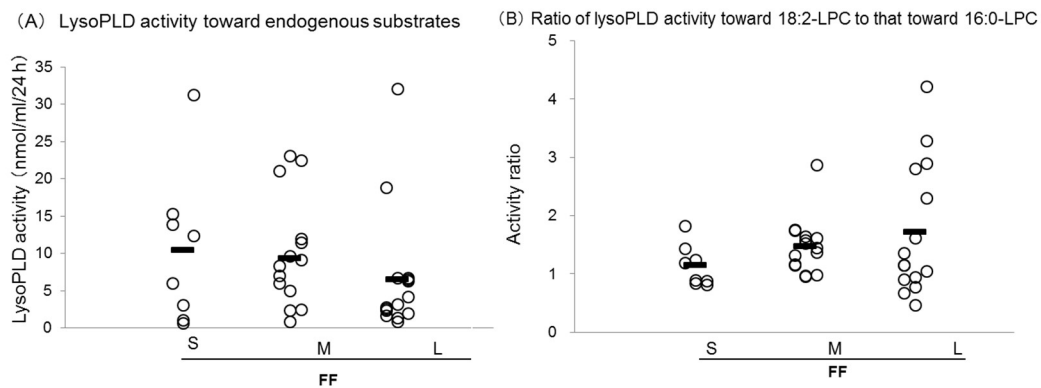


図9 各卵胞サイズにおける lysoPLD 活性の変化

採取した卵胞液量により卵胞サイズを S (n=10)、M (n=16)、L (n=15) の 3 群に分けた。

A: 3.3 倍希釈卵胞液 と 0.25% BSA 生理食塩水を混合し、37°C、24 時間インキュベート後、コリン蛍光測定によって内因性基質に対する lysoPLD 活性を測定した。白丸は各検体の値を、黒棒はそれらの平均値を示す。

B: 0.15 mM の 16:0-LPC または 18:2-LPC を 3.3 倍希釈卵胞液に添加し、37°C、24 時間インキュベート後、コリン蛍光測定によって lysoPLD 活性を測定した。活性比は 18:2-LPC と 16:0-LPC を加えた場合での lysoPLD 活性の 18:2/16:0 比(18:2 / 16:0)で表した。白丸は各検体の値を、黒棒はそれらの平均値を示す。

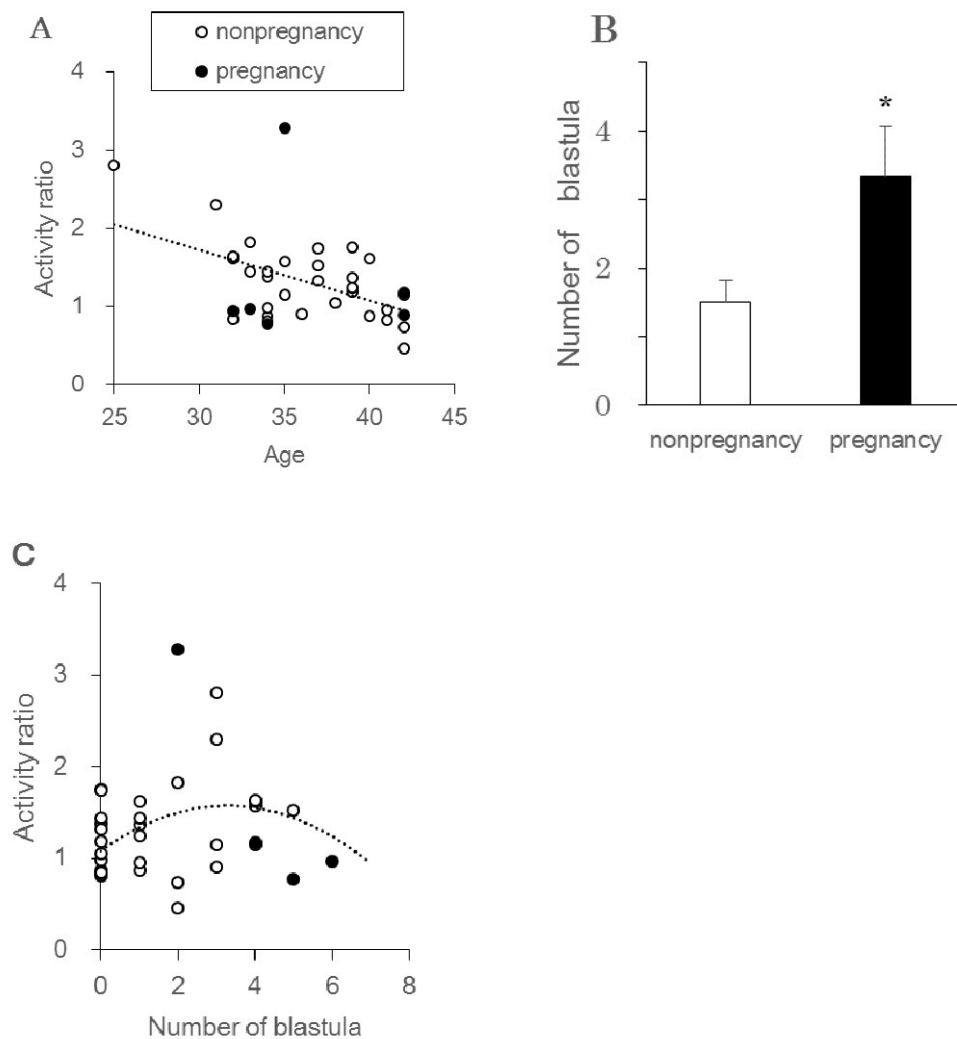


図 10 卵胞液の lysoPLD 基質特異性と卵成熟の関わり

A : 0.15 mM の 16:0-LPC または 18:2-LPC を 3.3 倍希釈卵胞液に添加し、37°C、24 時間インキュベート後、コリン蛍光測定によって lysoPLD 活性を測定した。活性比は 18:2-LPC と 16:0-LPC を加えた場合での lysoPLD 活性の 18:2/16:0 比(18:2 / 16:0)で表した。妊娠非成立症例を白丸、妊娠症例を黒丸で示した。最少 2 乗法によって回帰直線をあてはめた(n=36、 $y = -0.0651453x + 3.6803415$ 、 $r^2 = 0.21$ 、 $p < 0.05$)。

B : 不妊治療患者から採卵され体外受精処理を受けた後、成育した胞胚数を数えた。妊娠非成立症例(n=30、白いバー)と妊娠症例(n=6、黒いバー)の比較した(* $P < 0.05$)。

C : 活性比(A)と胞胚数(B)を多項式モデルで解析し、最小二乗法により 2 次の項にあてはめた(n = 36、 $y = -0.046(x - 1.806)^2 + 0.135x + 1.234$ 、 $r^2 = 0.13$ 、 $p < 0.05$)。

3.2. ヒト卵胞液を 37°C でインキュベーションした場合の LPA および LPC 濃度の経時変化

卵胞液に脂肪酸を含まない BSA に結合した 15:0-LPC を添加後、37°C で 12 時間または 24 時間インキュベートを行っている間に 15:0-LPC 由来のコリン産生と同じ速度で 15:0-LPA が徐々に生成した。内因性基質である 16:0、16:1、18:1、20:4 と 22:6-LPA 産生の場合も同様のタイムコースであった (図 11-B)。18:0-LPA の濃度は基本的に非常に低く、インキュベーションの間、基本的に変化しなかった。図 9-A に示すように、飽和または単不飽和の脂肪酸アシル基 (C16、C18) を持つ内因性 LPC の濃度は、著者の予測に反しインキュベーションの間で変化なかった。さらに、4 時間インキュベーションをする中で 15:0-LPC の卵胞液濃度は約 250 μM の減少が見られたが、15:0-LPA の増加は約 180 μM であった。この結果はインキュベーションの間に卵胞液中で 15:0-LPC 由来の 15:0-LPA が産生されるが、一部は、更に分解されていたことを示唆している。

卵胞液により LPA が分解する可能性を調査するために、まず、未希釈の新鮮卵胞液に外因性基質の 15:0-LPA と 18:3-LPA の両方を加えて一緒にインキュベートし、インキュベーション時間での各濃度を測定した。37°C、24 時間のインキュベーションの間に 15:0-LPA は約 30% 減少した。同じ条件下で 18:3-LPA では有意な減少は示さなかった (図 12-A)。次に、ヒト卵丘細胞を添加した mHTF 培地または卵丘細胞未添加の mHTF 中に最終濃度 3 μM の 15:0-LPA または 18:3-LPA 溶液を混合し、37°C で 1.5、3、4.5 時間インキュベートを行った (図 12-B)。その後、培養上清を分取し Bligh と Dyer 法により LPA を抽出し LC-MS/MS により濃度を測定した。その結果、15:0-LPA と 18:3-LPA ともにコントロールからインキュベート開始時点で濃度がすでに減少しており、その後大きな変化は見られなかった。この結果は、おそらく卵丘細胞表面に分解酵素は存在せず、遊離型 LPA の一部が卵丘細胞膜に速やかに結合したため、添加後の短時間内に培養液の LPA 濃度が低下したためと考えられた。

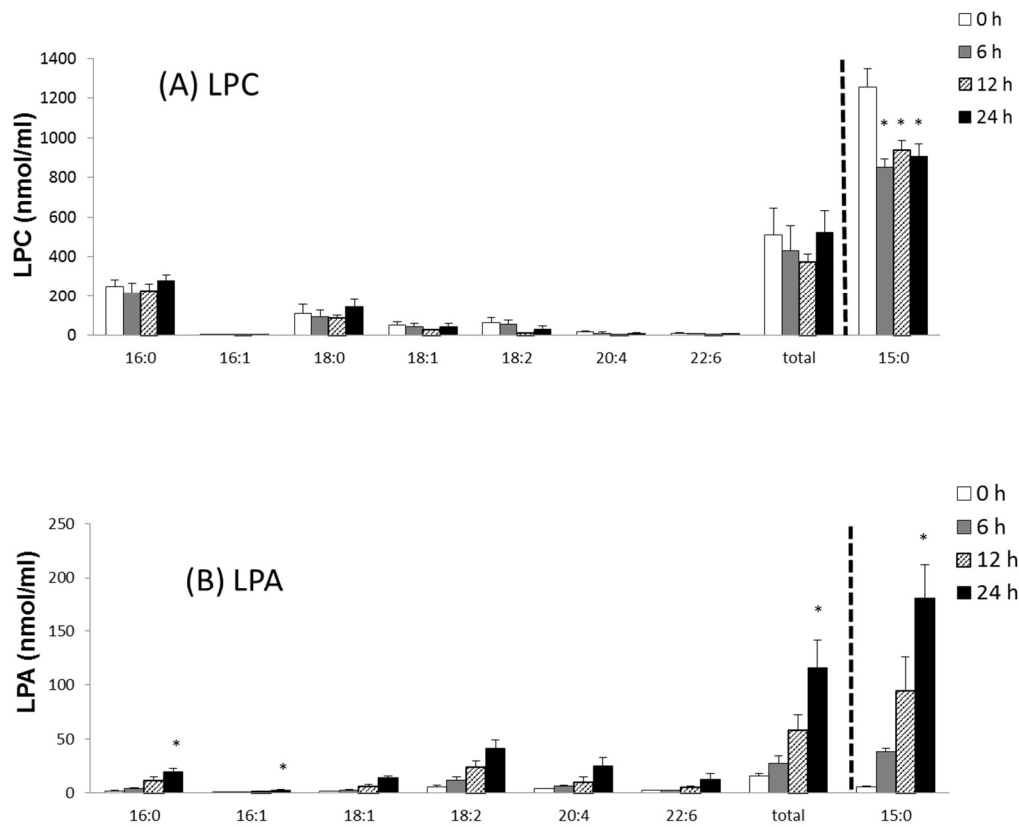


図 11 ヒト卵胞液中の内因性および外因性 LPC から産生される LPA 濃度変化
 3.3 倍希釈卵胞液 (100 μ L) に 0.25% BSA 含有生理食塩水に溶解した 15:0-LPC 溶液 (0.45 mM) 50 μ L と混合し、37°C で 0、6、12、24 時間インキュベートを行った。その後、Bligh と Dyer 法により LPC (A)、LPA (B) を抽出し LC-MS/MS により濃度を測定した (* $p < 0.05$ vs. 0 h)。値は原液 1 ml 当りに換算したものである。値は平均 \pm 標準誤差で示す (n=3)。

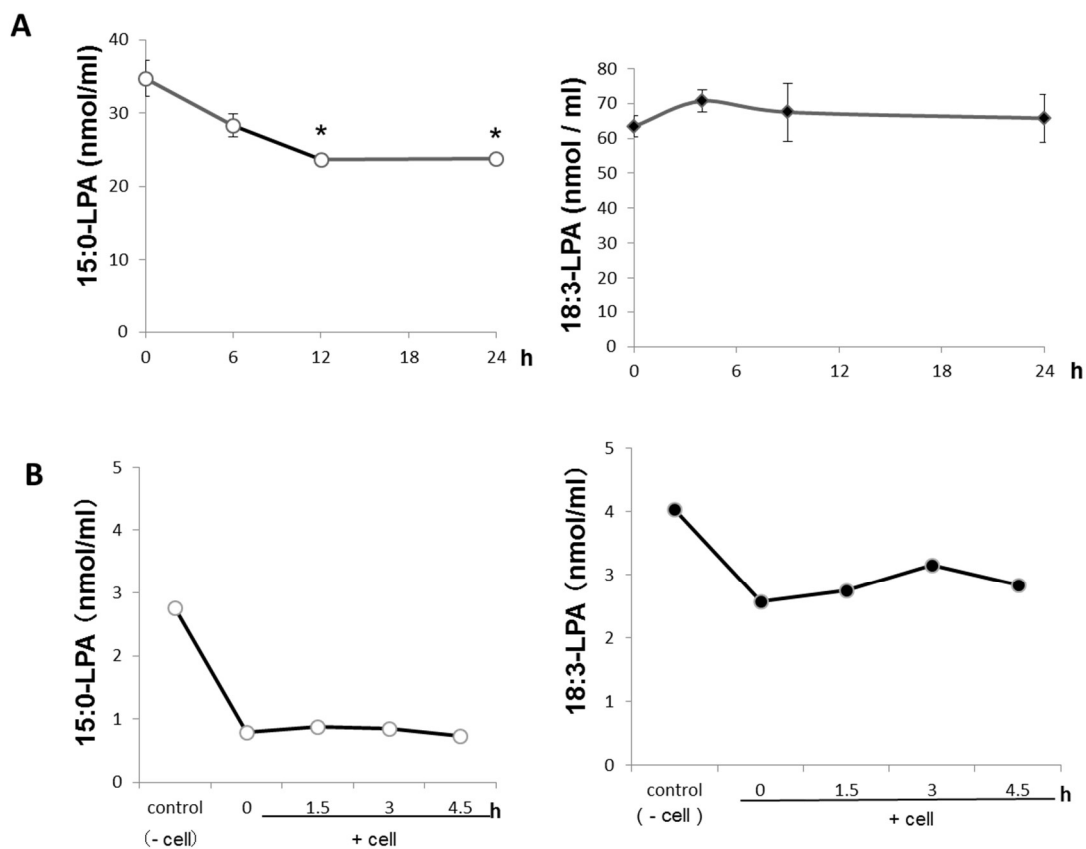


図 12 ヒト卵胞液と卵丘細胞表面における LPA 濃度変化

A: 3.3 倍希釈卵胞液に 0.25%BSA 含有生理食塩水に溶解した最終濃度 $50 \mu\text{M}$ の 15:0-LPA(左図)または 18:3-LPA 溶液 (右図)を混合し、 37°C で 0、6、12、24 時間インキュベーションを行った。その後、Bligh と Dyer 法により LPA を抽出し LC-MS/MS により濃度を測定した(* $p < 0.05$ vs. 0 h)。値は原液 1 ml 当りに換算したものである。値は平均±標準誤差で示す (n=3)。

B: ヒト卵丘細胞培養 mHTF または未添加 mHTF 中に最終濃度 $3 \mu\text{M}$ の 15:0-LPA(左図)または 18:3-LPA 溶液 (右図)を混合し、 37°C で 1.5、3、4.5 時間インキュベーションを行った。その後、Bligh & Dyer 法により LPA を抽出し LC-MS/MS により濃度を測定した。値は原液 1 ml 当りに換算したものである。値は平均±標準誤差で示す (n=3)。

第3節・考察

本研究により、新鮮ヒト卵胞液中の LPA 濃度が約 $24.5 \mu\text{M}$ と、ヒト血漿中の LPA 濃度 (約 $0.2 \mu\text{M}$) と比べて 100 倍以上高値であることが明らかとなった。卵胞液中の lysoPLD 活性は不飽和 LPC を好むという基質選択性をもつこと、及び EDTA 添加による lysoPLD 活性の阻害効果に対して金属イオンの共付加が阻害効果を減弱させることから、基本的に卵白やヒト血漿中の lysoPLD 活性の性質と同じであった⁶⁴⁾。抗 ATX 抗体を用いた筆者による免疫沈降実験は、卵胞液の主な LPA 産生経路は ATX の lysoPLD 活性に起因することを明確に示した。著者は、ヒト血漿 ATX による lysoPLD 活性よりも数倍高い lysoPLD 活性をヒト卵胞液で検出した (data not shown) が、これだけでは、ヒト血漿中よりもヒト新鮮卵胞液で二桁以上高い LPA 濃度を説明することは難しいため、卵胞液での LPA 分解系、並びに卵胞液に浸されている卵丘細胞や顆粒膜細胞での LPA 分解系や LPA 輸送系の関与を解析すべきと考えている。哺乳動物の卵管液は受精前に卵丘と配偶子の両方で微小環境を提供する。七面鳥の卵管液中で低いリゾホスホリパーゼ活性とともに比較的高いホスホリパーゼ A1 活性が検出された。これは、両ホスホリパーゼ活性強度のバランスが精子の膜安定化を促進させるリゾリン脂質の蓄積につながることを示唆している⁶⁵⁾。新鮮ヒト卵胞液でも同じように、リゾホスホリパーゼによる LPA 分解活性が多価不飽和 LPA よりも飽和 LPA に対して起こり、ATX が示す lysoPLD 活性による LPA 産生の方が分解活性以上であるために多価不飽和 LPA が豊富に存在する状況が作られていると著者は推測した。さらに、今回の研究で COC から分離した卵丘細胞は、ほとんど LPA 分解活性を示さないことが明らかとなり、卵胞液中の可溶性 LPA 分解活性が非常に低かったことから、ヒト体内を循環している血液環境よりも局所にとどまっている卵胞内の液体環境の方で高濃度の多価不飽和 LPA が発生しやすいと著者は考えた。今回の研究では、インキュベートした卵胞液と新鮮卵胞液中とで LPA の分子種組成が異なることが LC-MS/MS を用いて明らかとなった。前述のように、新鮮卵胞液では、不飽和 LPA 分子種が大半を占め飽和 LPA はかなり低値であったが、それをインキュベートした場合、卵胞液では後者よりも不飽和脂肪酸アシル基をもつ LPA のみならずかなりの量の飽和 LPA が蓄積していった。卵胞液単独では、飽和 LPC と不飽和 LPC から LPA を産生する酵素活性が優勢であるが、*in vivo* やそれに近い状況では、卵胞液は卵丘細胞や顆粒膜細胞などの卵巣体内細胞と接触しており、これらが、不飽和 LPA よりも飽和 LPA をより効率的に分解あるいは取り込みを行うために生じたこの結果は解釈できる。事実、ATX の lysoPLD 活性は、飽和(12:0、14:0、16:0)、モノ不飽和(18:1) 及びポリ不飽和(18:2、18:3、20:4)の分子種を持つ LPC から LPA を産生することがはっきりと示された。そのため、卵胞液に体細胞層が浸かっている状態の *in vivo* の条件下では、飽和および単不飽和 LPA は多価不飽和 LPA よりも早く分解されるか、卵胞液から取り除かれる可能性がある。基本的に飽和型分子種の LPA は内因性 LPA 分解酵素である脂質リン酸ホスファターゼとリゾホスホリパーゼによって細胞外で分解されるだろう⁶⁶⁻⁶⁹⁾。外因性基質 15:0-LPA と 18:3-LPA を添加した実験結果はこの仮説を支持するが、より正確な分

子メカニズムについては、更なる検討を要する。いずれにしても、新鮮卵胞液で多価不飽和分子種の LPA が豊富に存在することと一致し、LPA₃ 受容体は飽和および単不飽和の LPA よりも多価不飽和 LPA を好むリガンド選択性を持つことが知られている⁶⁴⁾。卵胞液の LPA の生理的意義を考える上で有用な知見である。

著者が所属する研究室ではこれまでにマウスとハムスターの COC を用いた *in vitro* で LPA が核と卵母細胞の両方の成熟を誘導することを報告している。また、ヒト卵胞液におけるリン脂質の n-6 リノール酸の濃度は体外受精における潜在的要因として体重当たりの精子数と精子運動性と関連があり、受精率と正の相関があることが報告されている⁷²⁾。しかし、卵巣組織、特に卵胞内でのリン脂質クラスの機能的役割は未だ十分に明らかとなっていない。卵成熟においてヒト卵胞液中に高濃度 LPA が存在し、多価不飽和分子種に富んでいることの生理的意義は定かではない。今回の研究では、卵胞液 lysoPLD の基質特異性が年齢によって異なることが明らかとなった。この原因については今後さらなる解明が必要となる。また、妊娠に重要な因子である胞胚数と lysoPLD の関連性から、妊娠卵成熟や妊娠において多価不飽和 LPA に富んでいることが有利に働くが、過剰産生を防ぐための負のフィードバック機構が存在すると推測される。さらに卵胞液 lysoPLD の基質特異性が加齢による妊娠率低下の要因の一つである可能性が考えられる。最新の研究ではヒト卵丘細胞が LPA₃ 受容体を活性化させることのできるため、卵丘細胞を浸す卵胞液内の LPA も多価不飽和に富む分子種組成に仕組まれているのかもしれない。ヒト卵胞がもつ機能における LPA が果たす生理学的役割を解明するために、更なる積極的な研究推進が求められている。

第二章

マウス卵丘-卵母細胞複合体における
LPA のヒアルロン酸合成促進作用

第二章 序論

哺乳類の卵巢では、卵母細胞は、顆粒膜細胞とギャップ結合のネットワークにより接着しており、それを介して卵丘・卵母細胞複合体 (cumulus-oocyte complex, COC) への低分子量の分子の移動を可能になっている。このギャップ結合を介した双方向輸送は、減数分裂による成熟⁷³⁾を維持する上で重要な役割を果たすと推定されている。排卵前の段階では、マウス卵母細胞の周囲に存在する卵丘細胞は、ゴナドトロピンによって刺激されヒアルロン酸 (hyaluronic acid, HA) を細胞外に分泌する^{74,75)}。そして、分泌された HA は粘性の複合体を形成することにより、卵丘細胞間および卵丘細胞と卵母細胞間のギャップ結合を消失させる⁷⁷⁾。HA は、インター α -トリプシンインヒビター (inter- α -trypsin inhibitor, I α I) と相互作用して卵丘細胞外マトリックス内に保持されるので、それを含むウシ胎児血清 (FBS) は、FSH により誘発される *in vitro* での卵丘膨化に必要である⁷⁶⁾。*in vivo* においては、血漿由来のこの因子を含む排卵前の卵胞液は、卵丘膨化を促進する際に血清と同様の機能を果たすと思われる^{79,80)}。また、濾胞形成の各段階に採取したブタ卵胞液は I α AI を含んでおり、COC の成熟を向上すると報告されている⁸¹⁾。

1-または 2-アシル-*sn*-グリセロール-3-リン酸の一般化学名を持つリゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid, LPA) は、特異的な 6 種の G タンパク質共役受容体を介して多様な生理学的効果を発揮する重要な脂質メディエーターである^{82,83)}。以前、筆者が所属する研究室は LPA がゴールデンハムスター⁸⁴⁾とマウス⁸⁵⁾の卵母細胞の減数分裂成熟を誘導し、マウス胚の着床前の成長を促進すること⁸⁶⁾、並びに、マウス卵子の卵管内輸送を促進すること⁸⁷⁾から、哺乳類の妊娠の成立に LPA が関与しうることを示唆してきた。LPA は、様々な動物種の血清中に存在する増殖因子であることが知られている⁸⁸⁾。更に、体外受精処置患者から採取した新鮮ヒト卵胞液から、ステアロイル、パルミトイル、オレオイル、リノレオイル、アラキドノイル LPA 分子種がマイクロモルレベルの高濃度で検出された⁸⁹⁾。また、この卵胞液を 37°C でインキュベートを行うと、オートタキシンが持つリゾホスホリパーゼ D 活性により内因性基質リゾホスファチジルコリンから LPA が合成されることが示された⁸⁹⁾。これまでに、卵丘膨化と細胞外マトリックスの形成に関与する重要な因子が幾つか検出されているが^{90,100)}、卵丘膨化および HA 合成に対する LPA の役割は現時点では不明である。そのため、筆者はマウス COC による卵丘膨化および HA 合成に対する LPA の効果とその細胞内シグナル伝達経路を検証しようと考えた。

第1節・方法

1. リン脂質および実験試薬

ヒト卵管液培地 (HTF) および改良ヒト卵管液培養培地 (mHTF) は、日本医療薬品工業 (大阪) から入手した。1-オレオイル(18:1)-LPA、百日咳毒素、AG-1478、Ro31-8220、SB203580、PD98059、1-パルミトイル(16:0)-リゾホスファチジルコリン(LPC)、ペルオキシダーゼ (西洋わさび、グレードⅢ) はフナコシ (東京) から購入した。LPA は最終濃度 0.4% に調製した牛血清アルブミン (BSA) を含む HTF 中に加えて超音波処理し溶解後、COC とともに 37°C で 2~3 時間、CO₂ インキュベーター中でインキュベートした。刺激剤は蒸留水に溶解し、薬理的阻害剤はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。妊馬血清ゴナドトロピン(PMSG)、3-イソブチルメチルキサンチン (IBMX)、上皮細胞成長因子 (EGF)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)、脂肪酸不含 BSA、および Ki16425 (LPA 受容体 1 および 3 アンタゴニスト) は、シグマアルドリッチ (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入した。妊馬血清ゴナドトロピン(PMSG)1000 IU と FSH、EGF、LH を滅菌した生理食塩水及び蒸留水にそれぞれ溶解し貯蔵原液を調製後、0.4%(w/v)BSA 含有 HTF で希釈して実験に供した。U73122 はケイマンケミカル(アナーバー、ミシガン州、米国)から購入し、DMSO に溶解した。

2. 培養液の調製

2-1 IBMX を含有する mHTF 培養液

最終濃度 0.2mM の IBMX を含む mHTF 培養液を調製し、これに最終濃度が 0.4% になるように BSA を溶解させ、37°C に保温させ COC の選別に用いた。

2-2 BSA 含有 HTF 培養液

HTF 培養液に最終濃度が 0.4% になるように BSA を溶解させ、2~3 時間 CO₂ インキュベーター (37°C、5%CO₂) で保温後、COC の培養に使用した。

2-3 LPA 含有 HTF 培養液調製

LPA ストック液より適量を試験管にとり、窒素気流下で溶媒を除去後、残渣に HTF 培養液を加えバス型ソニケーター内で超音波処理を行い、LPA を溶解させ、最終濃度が 0.4% となるように BSA を加えた。その後、2~3 時間 CO₂ インキュベーター (37°C、5%CO₂) で保温後、COC の培養に使用した。

2-4 FSH、EGF、LH 含有 HTF 培養液調製

HTF 培養液に最終濃度 10、30 および 100 ng/ml 相当量の FSH 溶液、0.1、0.3 および 1ng/ml 相当量の EGF 溶液 あるいは 100 ng/ml 相当量の LH 溶液を添加し、次に最終濃度が 0.4%

となるように BSA をこれらの溶液に加えた。その後、2~3 時間 CO₂ インキュベーター内 (37°C、5%CO₂) で保温後、COC の培養に使用した。

2-5 LPA と Ki16425 を含有する HTF 培養液の調製

各最終濃度に対応する LPA 相当量を含む LPA 溶液 [クロロホルム:メタノール=2:1] を試験管に転容し窒素気流下で溶媒を除去後、HTF 培養液を加え、バスタイプ音波洗浄器内で音波処理し LPA を溶解させた。その後、各種濃度で Ki16425 を DMSO 溶液あるいは Ki16425 不含 DMSO と BSA を、最終濃度がそれぞれ 0.2% と 0.4% になるように加えた。2~3 時間 CO₂ インキュベーター内 (37°C、5%CO₂) で保温後、COC の培養に使用した。

2-6 百日咳毒素を含有する HTF 培養液の調製

HTF 培養液に 200 ng/ml 相当の百日咳毒素水溶液を加え、さらに最終濃度が 0.4% となるように BSA を加えた。その後、2~3 時間 CO₂ インキュベーター内 (37°C、5%CO₂) で保温後、COC の培養に使用した。

2-7 AG1478、U73122、Ro31-8220、SB203589、あるいは PD98059 を含有する HTF 培養液調製

2-2 から 2-4 で示したように、各濃度の生理活性物質含有培養液を調製後、これに 200 nM 相当量の AG1478、15 μM 相当量の U73122、1 μM 相当量の Ro31-8220、15 μM 相当量の SB203589 あるいは 15 μM 相当量の PD98059 の DMSO 溶液を、DMSO の最終濃度が 0.2% となるように加えた。その後、2~3 時間 CO₂ インキュベーター内 (37°C、5%CO₂) で保温後、COC の培養に使用した。

3. 卵丘-卵母細胞複合体の体外培養

動物の飼育と使用については、米国国立衛生研究所のガイドラインに沿って行った。全ての実験の手順は、徳島大学動物飼育・使用委員会の承認を受けている。6-8 週齢のメス B6C3F1Cr1j マウス (日本チャールスリバー、横浜 または日本クレア、富士宮) に、10 U の PMSG を含む生理食塩水 0.5 ml を腹腔内に注射し、48 時間後にジエチルエーテルが充満したデシケータにマウスを移し昏睡状態とした。その後、頸椎を脱臼させ、開腹後、卵巣を摘出した。次に、0.2% IBMX 含有 mHTF 培養液に卵巣を移し、27 ゲージ針で卵胞を穿刺後、未熟 COC を選別し、0.2% IBMX 含有 mHTF 培養液に浸した。0.4% アルブミン含有 HTF 培養液で COC を 2 回洗浄後した。本研究では卵丘細胞が卵母細胞の周囲に 3 層以上密集している COC を選別した。

4. HA 産生の測定

HA 産生の測定のために、6 個の COC を選別し、種々の濃度の刺激剤 (LPA, EGF, FSH あるいは LH) を含む 100 μ L の 0.4% 含有 mHTF に移し、DMSO に溶解させた阻害剤の存在下と非存在下でインキュベートした。DMSO の最終濃度は 0.2% 未満であった。百日咳毒素を用いた実験では、生理食塩水に溶解した 200 ng/mL の毒素の存在下あるいは非存在下で、COC を mHTF 中で 37°C、6 時間、インキュベートし、次いで 10 nM の LPA を含む mHTF 中で 37°C、9 時間インキュベートした。HA 産生量は ng/mL で表した。この培養は、37°C で 15 時間、5% (v/v) CO₂ の存在下で行った。培養後、上清を採取し、残った COC を 2 回 HTF で洗浄した。これらの洗浄液を遊離型 HA の測定に用いた。COC を HTF 0.1 mL に浸し、これを結合型 HA 含有の画分とし、プロナーゼ溶液で 2 時間酵素反応 (37°C、5% CO₂) 後、100°C で 15 分間熱処理、続いて 5 分間超音波処理を行って、HA 測定に供した。プロナーゼ溶液は卵丘細胞に結合している HA 複合体のタンパク部を切断するために行った。HA 産生量の測定には HA 測定キット (生化学工業、東京) を用いた。検体 50 μ L とビオチン標識 HA 結合性タンパク質溶液 50 μ L を 37°C、60 分間静置し一次反応を行った。次に、これらを除去し HRP 標識ストレプトアビジン溶液 100 μ L を添加後再び 37°C、60 分間静置し二次反応を行った。再び溶液を除去した後、酵素基質溶液 100 μ L を添加し遮光下常温で 30 分間静置し発色させた。反応停止溶液 100 μ L を添加後、マイクロプレートリーダー MTP-300 (コロナ電気) を用い測定波長 492 nm 及び対照波長 630 nm で吸光度を測定した。標準溶液を用いて検量線を作成した。この検量線 (0、12.5、25、50、100、200、400 ng/mL) と検体の吸光度から HA の濃度を算出した。

本研究では、卵母細胞の核成熟を、ヒアルロニダーゼによる剥脱後に顕微鏡下で観察した。卵成熟中期 II と見なされる第 1 極体を有する卵母細胞の数を数えた。COC から卵丘細胞層を剥脱後、LPA が減数分裂再開を誘導していることを筆者は確認した。これは過去の結果と一致している⁸⁵⁾。

5. 定量的逆転写・ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-qPCR)

174 個のマウス COC から分離した卵丘細胞を HTF で洗浄し、LPA を添加した COC 培地と無添加の COC 培地とに分けた。その後、TRIZOL 試薬キット (インビトロジェン、カールズバッド、米国) および RNeasy plus マイクロキット (キアゲン、ヒルデン、ドイツ) を用いて mRNA の抽出を行った。スーパースク립ト III ファーストスタンダード合成システム (インビトロジェン、カールズバッド、米国) に腫瘍壊死因子誘導タンパク質 6 (Tnfaip6) 遺伝子およびリボソームタンパク質 L19 (Rp119) (BEX Co、東京) の特異的プライマーを用いてトータル RNA を cDNA に逆転写した。11 μ L の cDNA と 10 μ L の Fast SYBR Green Master Mix (アプライドバイオシステムズ、フォスターシティ、米国) を含む 20 μ L の反応液、7 μ L の

RNA 不含水、順方向および逆方向の遺伝子特異的プライマーそれぞれ 1 μ L を加えてリアルタイム RT-qPCR を行った。PCR 条件は以下の通りである。Tnfaip6: (forward) 5' -ATA CAA GCT CAC CTA CGC CGA A-3'、(reverse) 5' -ATC CAT CCA GCA GCA CAG ACAT-3'、Rp119: (forward) 5' -TCA GGC TAC AGA AGA GGC TTG C-3'、(reverse) 5' -ATC AGC CCA TCC TTG ATC AGC-3'。PCR 条件を変性 (95°C 10 秒)、アニーリング (60°C 30 秒) に設定して 50 サイクルを行った。そして、0.01 pg、0.1 pg、1 pg、10 pg、および 100 pg/20 μ L の標準物質を用いて特異性を検証するシーケンスおよび解離曲線分析により、PCR 合成物の解析を行った。内部標準としてリボソームタンパク質 L10 (Rp119) を用いた。Tnfaip6 遺伝子の相対的発現レベルは、標準曲線から計算した。観察されたピークは単一であり、リアルタイム RT-qPCR の増幅サイクルの間にプライマー二量体は生成されなかった。実験は 3 回繰り返し、平均値 \pm 標準誤差で示した。

6. COC 膨張と卵母細胞の成熟

0.3% ウシ胎児血清 (FBS) の存在下または非存在下で、10 μ M の LPA および 100 ng/mL の FSH などの刺激剤の有無に分けて脂肪酸不含 0.4% BSA 入り 0.1 mL の mHTF 中で COC を培養した。いくつかの実験では、前述のとおり、HTF で満たされたキャピラリーガラス管内から COC を数回出し入れさせ、卵丘細胞層を剥脱することにより卵母細胞を単離し、その核成熟の度合いを顕微鏡で観察した⁸⁵⁾。前述のように、COC 拡張の度合いを評価した⁹²⁾。0 は、COC は膨張せず、1, 2 および 3 は、それぞれ最小限の観察可能な COC 膨張、卵丘細胞の外側層の拡張を伴う中程度の膨張間応答、および最大膨張を、それぞれ示す。

7. 統計解析

結果は、2-15 回の独立した実験の平均値 \pm 標準誤差で示す。卵丘膨化のスコア評価に用いた数値は例外として、それ以外の図中の各括弧内の数字は、三重測定で行われた独立実験の数を示すものである。スチューデントの t 検定またはフィッシャーの PLSD 多重比較検定を用いて統計的 평균値の差を分析した。 $P < 0.05$ の値は統計的に有意であるとみなす。

第 2 節・結果

1. マウス COC における LPA の HA 合成促進作用

筆者は、まず、*in vitro*でのマウス COC で LPA が HA 産生を誘導するか否かを調べた。LPA を 10 nM 加えた結果を図 13-A に示す。LPA 添加により遊離型 HA は増加したが、結合同型 HA は増加しなかった。EGF と FSH のどちらも LPA と同様に遊離型 HA 合成を促進させたが、結合同型 HA は促進しなかった。また、マウス COC 中に LH を加えインキュベートしても、遊離型 HA と結合同型 HA の両方とも合成は促進しなかった。したがって、血清非存在下においては、LPA により合成が促進された HA の大部分は遊離型であり、分泌 HA は卵丘細胞表面に結合できていないと思われる。

LPA により誘導される HA 遊離のタイムコースを図 13-B に示す。10 nM の LPA を加えて COC をインキュベーションすると、15 時間および 20 時間後で有意な HA 遊離量の増加が見られた。次に、LPA 濃度依存的に HA 遊離が促進されるか実験を行った。その結果を図 12-C に示す。比較のために、FSH や EGF も 3 段階の濃度で実験を行ったところ、LPA と同様に HA 遊離を誘導することが示された。LPA は 3 μ M 以下の低濃度でも HA 合成を有意に誘導した。しかしながら、3 μ M 以上の濃度の LPA が誘導した HA 合成の最大増加比は最大濃度の FSH と EGF が誘導した HA 合成よりも低かった。HA 合成促進における LPA の作用機序は後述するが、LPA が FSH と EGF の効果に補助的に作用し、HA 合成の誘導を介して、卵丘膨化という生理学的に重要な現象に寄与していることを示唆している。

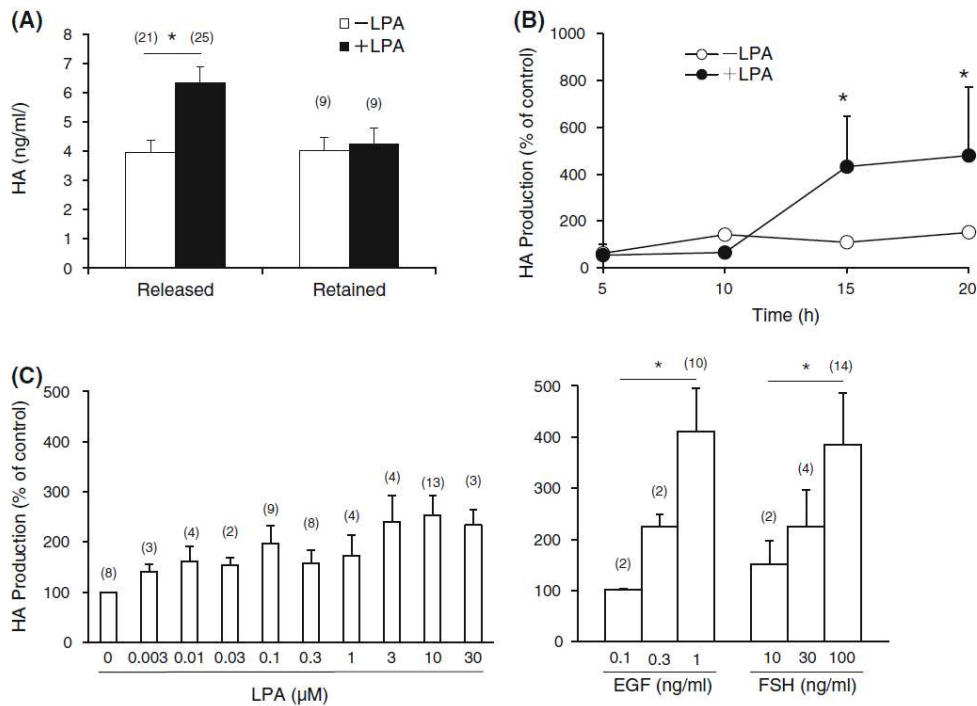


図 13 マウス COC で LPA が HA 産生を誘導する

A : マウス COC を 0.2% BSA 含有 mHTF 0.1mL に浸し、LPA 10 nM 存在下または非存在下で、37°C、15 時間インキュベートした。COC 培養液中の遊離型 HA と COC 洗浄液中の結合型 HA をプロナーゼ溶液で 2 時間酵素反応 (37°C、5%CO₂) 後、100°C で 15 分間熱処理、続いて 5 分間超音波処理を行った後、HA 測定を行った。HA 濃度は ng/mL で示す。() 内の数字は独立した実験数を示す。* $P < 0.05$

B : マウス COC を 0.2% BSA 含有 mHTF 0.1mL に LPA 10 nM を存在下または非存在下で 37°C、5、15、20 時間インキュベートした。HA 産生は、LPA を加えなかった COC 培養液 (control) を 15 時間インキュベートしたものを 100 % として示す。* $P < 0.05$

C : マウス COC を 0.2% BSA 含有 mHTF 0.1mL に異なる濃度の LPA を加えて 37°C、15 時間インキュベートした。比較対象として、EGF(0.1、0.3、1 ng/mL) または FSH(10、30、100 ng/mL) を加えた COC 培養液を同条件下でインキュベートした。HA 産生は、LPA を加えなかった COC 培養液 (control) を 15 時間インキュベートしたものを 100 % として示す。* $P < 0.05$

2. HA 合成における異なった阻害剤の効果

HA 合成における LPA の誘導メカニズムを筆者は検証した。COC 培地に LPA 受容体アンタゴニストの Ki16425 (10 μ M) を添加することで、LPA による COC 中の HA 合成が著しく抑制された。しかし、1 ng/ml EGF と 100 ng/ml FSH による HA 合成は Ki16425 処理で抑制されなかった (図 14-A)。Gi 共役型受容体のインヒビターである PTX を加えて 9 時間処理した COC では、外因性刺激を加えないコントロールのレベルまでに、HA 合成が顕著に減少した (図 14-B)。これらの結果は、LPA が Gi 共役型 LPA 受容体 (LPA₁ または LPA₃) を介して HA 合成を誘導することを示唆している。ホスファチジルイノシトール特異的なホスホリパーゼ C (PI-PLC) の阻害剤である U73122 (15 μ M) で COC を処理することにより、LPA の HA 合成効果が抑制されたが、EGF または FSH による HA 合成効果は抑制されなかった (図 15-A)。次に、COC 中の HA の合成における LPA または EGF、FSH の作用とプロテインキナーゼ C (protein kinase C, PKC) 活性化との関連性について検討を行った。図 15 の結果は、全ての PKC アイソフォームを阻害する Ro31-8220 1 μ M を添加すると、マウス COC 内の HA 合成が著しく減少したことを示している。Ro32-0432 と GF109203X は、旧型と新型の PKC インヒビターであり、どちらも HA 合成を阻害した (data not shown)。このことから、PKC が PI 特異的なホスホリパーゼ C のシグナル下流のみ位置しているのではなく、EGF 受容体下流のシグナル伝達経路内にも存在しているためと思われる。

EGF 受容体キナーゼ阻害剤 AG1478 (200 nM) は、EGF と LPA の HA 合成促進作用を阻害した (図 15-A)。FSH の HA 合成促進作用も同様に、AG1478 により阻害されることが、図 15 に示されている。MAP キナーゼ経路の活性化は、HA 合成を含む多種類の遺伝子を調節する転写因子の発現を誘導する^{94,95)}。P38 MAP キナーゼを阻害する SB203580 と、MAP キナーゼ-ERK キナーゼを阻害する PD98059 は、ともに 15 μ M の LPA が誘導する HA 合成を阻害することを、筆者は明らかにした (図 15-B、図 15-C)。このことは、LPA の HA 合成促進シグナル経路に p42/44 MAP キナーゼと p38MAP キナーゼ経路が関与していることを示している。図 16-B、図 16-C に示すように、SB203580 または PD98059 のどちらの処理でも EGF の HA 合成促進作用を抑制できることから、p42/44 MAP キナーゼと p38 MAP キナーゼはともに EGF 受容体発現によるシグナル経路の下流で関与していることが示唆された。これまでの報告⁹⁶⁾と同様に、PD98059 はマウス COC の卵丘膨化と減数分裂の再開を阻害することが明らかとなった。AG1478、SB203580、PD98059 は、それぞれ図 15-A、B、C に示すように FSH による HA 合成促進を阻害する傾向を示したが、用いた阻害剤のいずれにおいても、2 群の平均値に有意な差は見られなかった。

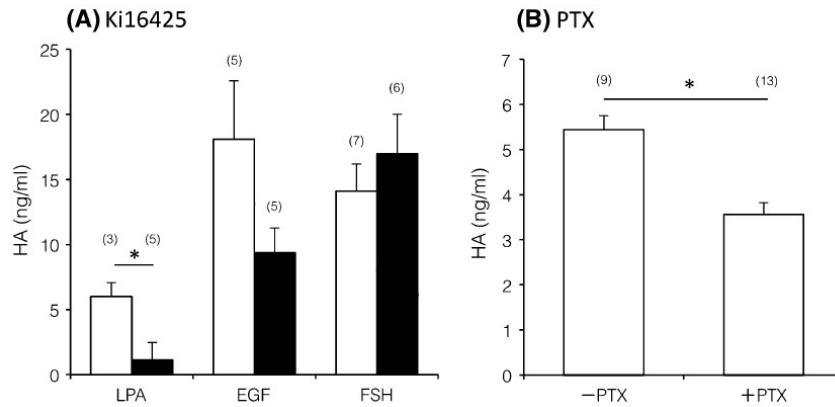


図 14 LPA が誘導する HA 産生における Gi タンパク共役型 LPA 受容体の役割

A : マウス COC を 0.2%BSA 含有 mHTF 0.1mL に LPA 10 nM、EGF 1 ng/mL、FSH 100 ng/mL をそれぞれ加え、Ki16425 10nM 存在下と非存在下でインキュベートした。LPA、EGF および FSH が誘導した HA 産生は、刺激剤の存在下での値から刺激剤非存在下での対照値を差し引くことによって計算した。黒と白のバーはそれぞれ Ki16425 の存在下と非存在下の実験で得られた平均値を示す。* $P<0.05$

B : 0.4%BSA 含有 HTF に 10 nM LPA を含む COC を 200 ng/ml 相当の百日咳毒素水溶液存在下または非存在下で CO_2 インキュベーター内(37°C、5% CO_2) で 9 時間保温した。HA 産生量を ng/mL で示す。* $P<0.05$

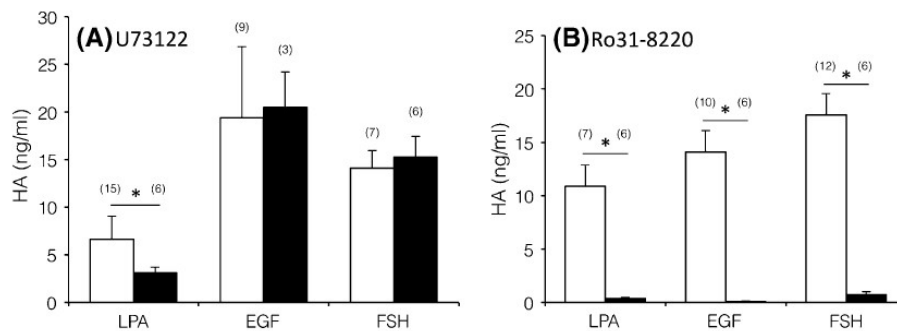


図 15 LPA は、PI-PLC および PKC の活性化を介して HA 産生を誘導する。

A : マウス COC を 0.2%BSA 含有 mHTF 0.1mL に LPA 10 nM、EGF 1 ng/mL、FSH 100 ng/mL をそれぞれ加え、U73122 10 nM 存在下と非存在下でインキュベートした。

B : マウス COC を 0.2%BSA 含有 mHTF 0.1mL に LPA 10 nM、EGF 1 ng/mL、FSH 100 ng/mL をそれぞれ加え、Ro31-8220 1 μ M 存在下と非存在下でインキュベートした。LPA、EGF および FSH が誘導した HA 産生は、各刺激剤の存在下の値から非存在下での対照値を差し引くことによって計算した。黒と白のバーはそれぞれ U73122 または Ro31-8220 の存在下と非存在下の実験で得られた平均値と標準誤差を示す。* $P<0.05$

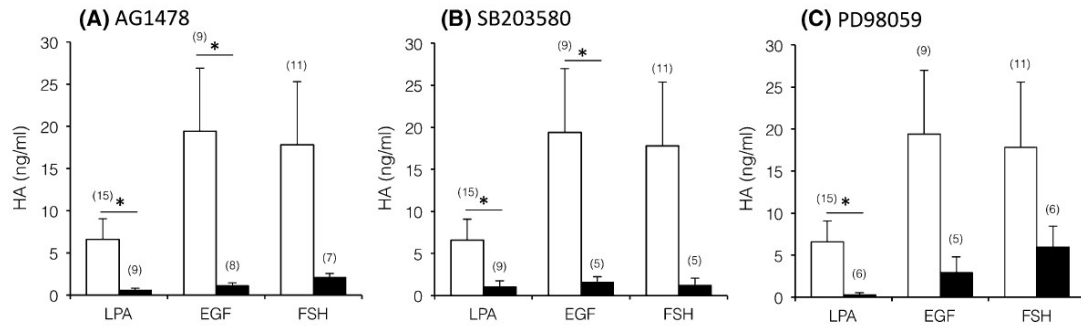


図 16 LPA は、EGF 受容体のトランス活性化に続く 2 つの MAP キナーゼ経路の活性化を介して HA 産生を誘導する

A : マウス COC を 0.2%BSA 含有 mHTF 0.1mL に LPA 10 nM、EGF 1 ng/mL、FSH 100 ng/mL をそれぞれ加え、AG1478 200 nM 存在下と非存在下でインキュベートした。

B : A と同じ条件で、SB203580 15 μ M 存在下と非存在下でインキュベートした。

C : A と同じ条件で、PD98059 15 μ M 存在下と非存在下でインキュベートした。

LPA、EGF および FSH が誘導した HA 産生は、各刺激剤の存在下の値から非存在下での対照値を差し引くことによって計算した。黒と白のバーはそれぞれ AG1478 または SB203580、PD98059 の存在下と非存在下の実験で得られた平均値と標準誤差を示す。

* $P < 0.05$

3. Tnfaip6 遺伝子発現に及ぼす LPA の作用

筆者が所属する研究室では卵成熟とともに進行にする卵丘膨化に LPA は関与していないと考えていたが、図 13 に示した通り、COC に LPA を添加することで HA 合成が促進されることが明らかとなった。そのため HA 合成により卵丘膨化を促進するためには卵丘細胞の HA 結合タンパク発現が必須と考え、内部標準物質にリボソームタンパク質 L10 (Rp119) を用い、HA 結合タンパク Tnfaip6 の発現を確認した。Tnfaip6 は HA とインタートリプシンインヒビターの両方と結合することが知られている⁹⁷⁾。マウス COC に 10 μ M の LPA を添加し 6 時間インキュベートした結果、Tnfaip6 の mRNA 発現が有意に増加することを筆者は見出した。LPA 処理した COC 群の Tnfaip6 mRNA 発現比は 0.28 \pm 0.016 であり、コントロール群では、0.18 \pm 0.011 であった ($P < 0.001$)。

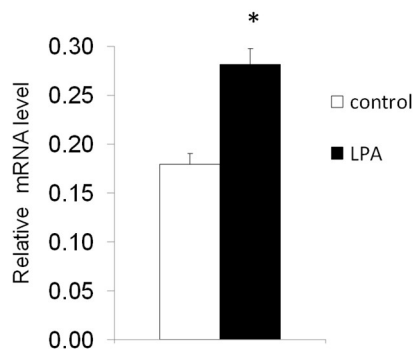


図 17 LPA が誘導する卵丘細胞の Tnfaip6 遺伝子発現

LPA 存在下と非存在下で 6 時間インキュベートした。Control を白いバーで示す(n=3)。18:2-LPA (10 μ M)を添加しインキュベートしたものを黒いバーで示す(n=3)。

4. LPA は卵丘膨化を誘発する

写真 (図 18-A)に示すように、0.3%FBS の存在下でマウス COC を 15 時間インキュベートした場合、自発的な卵丘膨化は観察されなかった。しかし、同じ条件下で、FSH (100 ng / mL) を添加した場合、大幅な COC 膨化がおこった。10 μ M の LPA を COC に添加し、インキュベーション時間を 15 時間に延長した場合は、COC の有意な膨化が見られたが、その度合いは、FSH で得た値ほどではなかった。図 18-B は、誘発剤の非存在下および存在下における卵丘膨張のスコアを示している。

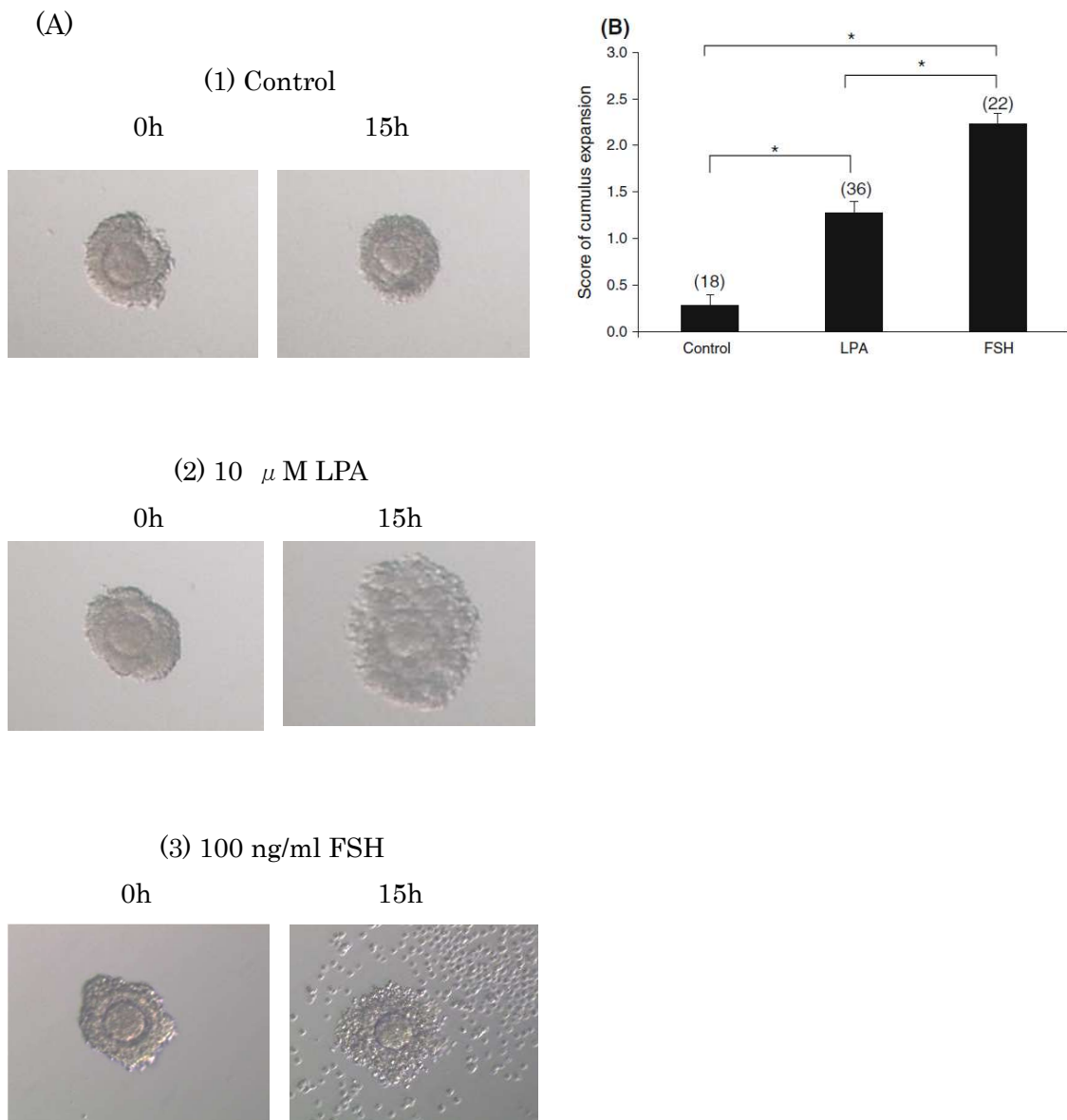


図 18 LPA、FSH 処理したマウス COC の顕微鏡による観察

A : 0.3%FCS 存在下で、COC 培養液のみ (1) LPA 10 μ M (2)、または FSH 100 ng/ml (3) を添加して共に 15 時間インキュベートし、インキュベーション前後の COC を顕微鏡で観察した。

B : COC 拡大の程度を定量化した。 * $P < 0.05$

第3節・考察

本研究で筆者は、*in vitro* マウス COC に LPA をナノモル濃度単位加えることで有意な HA 合成促進作用を示すことを見出した。したがって、卵胞形成後のマウス COC では、卵胞液中のマイクロモル濃度単位の LPA から最大級の卵成熟刺激シグナルを受けていることになる。本研究でマウス COC において LPA が HA の産生を強く誘導することがわかったが、LPA の HA 合成促進作用の最大値は EGF と FSH が示す最大値よりも低かった(図 13-C)。また、LPA が HA 結合タンパク Tnfaip6 の産生を誘導できることがわかった。これは EGF と FSH が Tnfaip6 の mRNA 発現を向上させるというこれまでの結果^{89,100}と一致している。おそらく LPA は HA 合成酵素の発現を促進することにより、0.3% FBS 存在下で顕著な COC 膨化促進作用を示すが、その最大値は同条件下での FSH による COC 膨化促進作用の最大値より低いことがわかった。したがって、マウス卵胞液中に常に存在する LPA が、卵成熟中に FSH と EGF の作用を補足するように働き、LH サージ後の卵丘膨化を促進する生理的役割を担っている可能性が考えられる。

本研究の結果に基づき、LPA による遊離型 HA の産生を導くシグナル伝達系の流れを作成し、図 17 に示す。その図の流れは、COC 内における LPA 誘導によるマウス卵母細胞成熟に関するシグナルの流れと良く似ており、PI-PLC、PKC、p42/44 マイトジェン活性化タンパク質(MAP)キナーゼが関与するが、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼが関与していなかった⁸⁵。筆者が得た第 1 の新しい知見は、外因性 LPA により EGF 受容体がトランス活性化されることである。この知見は、LPA がヘパリン結合型 EGF 様成長因子の受容体活性化によってマウス胚盤胞成熟を調節するという以前の報告¹⁰¹と一致している。第 2 の知見は、マウス COC 中において LPA 受容体の活性化後のシグナル伝達経路下流に、PI 特異的ホスホリパーゼ C が関与しているが、EGF と FSH 受容体の活性化後のシグナル伝達経路下流には、このリン脂質分解酵素は関与しないことである。マウス卵丘細胞が多くの PKC サブタイプを持っているため、筆者は、多くの PKC サブタイプを阻害できる Ro31-8220 の HA 産生と卵丘膨化に及ぼす作用を調べた。筆者が得た結果では、LPA、FSH や EGF による HA 産生に PKC 活性化の過程が関与していることが明らかとなった。しかし、本研究では LPA、EGF、FSH 受容体活性化のシグナル伝達経路下流に関与する PKC のサブタイプの同定には至らなかった。これまで、PKC 阻害剤が、マウス卵母細胞の減数分裂再開に FSH が作用するのを阻害すること⁹⁶や、EGF 様成長因子が FSH および PKC アゴニストを介して卵丘細胞に囲まれた卵母細胞の成熟を促進させること⁹⁷が報告されている。以上はマウス COC に HA 合成を誘導させる FSH と EGF の作用機序と一致している。第 3 の知見は、本研究では p38MAP キナーゼ阻害剤と MAP キナーゼの両方が、LPA および FSH 誘導だけでなく EGF 誘導 HA 産生も抑制したことである。筆者の研究は、これらの MAP キナーゼが EGF 受容体活性のシグナル経路下流に関係していることを示唆しているが、LPA および FSH 誘導シグナル伝達経路に組み込まれている EGF 受容体活性化の上流

に、p42/p44 MAP キナーゼと p38 MAP キナーゼの両方またはどちらか一方が関与しているかは不明である。以前、マウス COC 中の硫酸化グルコサミノグリカンまたはヘパリンの COC への添加により FSH や EGF 誘導卵丘膨化の選択的阻害^{103,104)} が起こることから、FSH または EGF が誘導する卵丘膨化はこれらホルモンにより単独で誘発されるものではなく、相互に関連し合っていることが示唆される。筆者の研究結果は、上述の研究結果と類似しており、MAP キナーゼ下流のシグナルは、核プロモーターの活性化と HA 産生によるギャップジャンクション閉鎖の両方において、それぞれ独立して設定されていることを示唆している。結論として、筆者は単離したマウス COC に外因性 LPA を添加すると、遊離型 HA の有意な増加が引き起こされること、及び、低濃度の FBS が存在すれば、LPA は有意な卵丘膨化を引き起こすことを見出した。これらの結果から、マウス卵胞中に血漿成分が浸潤している状況下では、卵胞液に存在する LPA が卵丘細胞からの HA 遊離や遊離型 HA の卵丘細胞との結合を介して COC への複数シグナル伝達に送り込んでいることが推定される。生理学的な排卵誘発を導く過程において、卵巣組織内の卵母細胞成熟および卵丘膨化に及ぼす LPA の役割に関して、更なる研究が必要である。

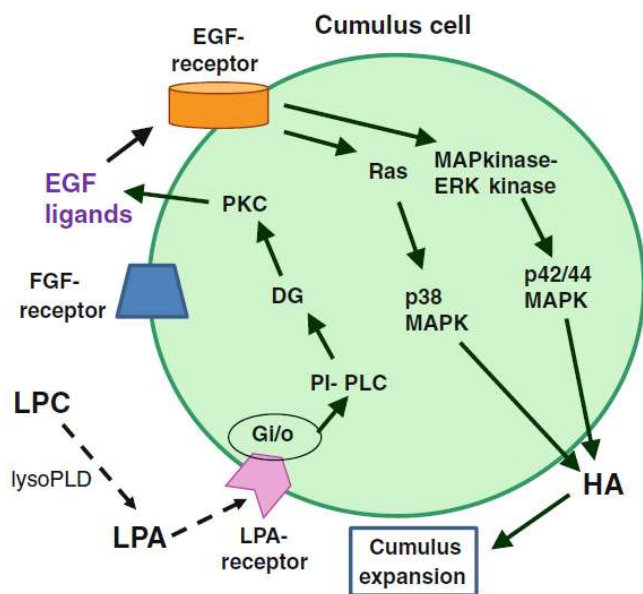


図 18 マウス卵丘細胞内の LPA が誘導する HA 合成経路の仮設

総括

卵胞成熟に伴い、卵胞内ではCOCが形成され、卵胞液で満たされた状態となる。本研究において、ヒト卵胞液中のLPA濃度は、血漿や血清に比べ高濃度で存在し、多価不飽和型の分子種割合が高い傾向にあることが明らかとなった。その一方で、ヒト卵胞液中のLPC濃度は血漿や血清と大きな差はないため、卵胞内でのLPA産生経路あるいは代謝経路に要因があると考え、卵胞液中のLPAの主な産生経路であるlysoPLDの酵素活性を調べた。本研究でlysoPLD活性は2価カチオン要求性を示し、抗ATX抗体によりlysoPLD活性が沈降することから、血漿と同じく卵胞液中のlysoPLD活性も主にATXであると推定された。卵胞液のlysoPLD活性の基質特異性を調査し、多価不飽和LPCに選択性が高いことを示したが、このLPA産生経路のみでヒト血漿よりも卵胞液でLPA濃度が2倍以上高いことを説明することは難しいため、次に卵胞液中のLPA分解活性を検証した。その結果、飽和型LPAが有意に減少したのに対し、不飽和LPAは有意な減少を示さなかった。分泌型LPA分解酵素が多価不飽和型よりも飽和型LPAに選択性を持つことが明らかとなったが、膜結合型LPA分解酵素酵素活性は明らかとなっておらず、今後さらに検証を進める必要がある。

次に、卵成熟におけるLPA濃度変化と生理活性を検証するため、卵胞サイズごとのLPA濃度とlysoPLD活性を調べたところ、LPAが一定して高濃度を維持していることが分かった。卵胞液に存在するLPAの生理的役割を検証するため、同一患者の卵胞液のlysoPLD活性と卵母細胞の臨床データを照合した。その結果、卵胞液のlysoPLD活性は不飽和型LPCに対する活性が飽和型LPCよりも優位であるが、加齢とともに選択性が減少することが明らかとなった。女性の妊孕性は、加齢とともに低下することが報告されているが、その原因は解明されていない^{1,3)}。本研究から、加齢が排卵因子による妊孕性低下と関連があり、さらに排卵前の卵成育環境における不飽和型LPA濃度が関連している可能性が考えられる。また、本研究で妊娠成立に重要な因子である胞胚数は、lysoPLD活性の基質選択性と二次項の有意な相関があることを明らかとした。以上のことから、受精前の卵成育環境が妊娠成立に影響を与えることが考えられ、過排卵モデルでは、複数排卵を誘発による不飽和型LPAの過剰産生を防ぐ負のフィードバック機構も存在していると筆者は推測した。今後、卵胞液LPA代謝経路の更なる解析により、特徴的な分子種組成を持つLPAの生理学的役割の解明と至適な卵成熟環境を明らかにすることが期待できる。

また、本研究でマウスCOCにおいてLPAが作用する卵丘膨化とHA合成の経路は同一であり、新たにEGF受容体の活性化を介することが明らかとした。さらにLPA受容体発現からHA産生を促進する経路にPI-PLCが関与しているが、EGFとFSH受容体の活性化後のシグナル伝達経路下流には、このリン脂質分解酵素は関与しないことを明らかにした。HA産生経路が複数発現するLPAの解析は、排卵誘発を導く一連の生理学的な過程機構の解明において重要な寄与を果たす可能性がある。LPA研究が進展すれば、よりよい妊娠条

件の基盤となる体外卵成熟の培地や条件を提示でき、不妊治療および体外卵成熟技術の更なる発展に寄与すると考えられる。

論文目録

1. Lysophosphatidic acid stimulates hyaluronan production by mouse cumulus–oocyte complexes
Kuwahara E, Yamamoto J, Yano Y, Omura M, Kuwahara A, Irahara M, Tokumura A. (2013) Lysophosphatidic acid stimulates hyaluronan production by mouse cumulus–oocyte complexes. *Reprod Med Biol* DOI 10.1007/s12522-013-0169-6
2. Preferable existence of polyunsaturated lysophosphatidic acids in human follicular fluid from patients programmed with in vitro fertilization
Yamamoto J, Omura M, Tuchiya K, Hidaka M, Kuwahara A, Irahara M, Tanaka T, Tokumura A. (2016) *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 126 16–23

参考文献

- 1) 日本生殖医学会 不妊症 Q&A(2013)
- 2) 日本産科婦人科学会雑誌 67 卷 10 号 , 2135 (2015)
- 3) 岩澤美帆・三田房美, 人口問題研究 第 63 卷第 3 号, 24-41(2007)
- 4) Human Reproduction, Vol.24, No.11 pp. 2683-2687 (2009)
- 5) 厚生労働省 不妊に悩む方への特定治療支援事業等のあり方に関する検討会 (2013)
- 6) Tokumura A., J. Cell. Biochem. 92(5), 869-881(2004)
- 7) Tokumura A., Prog. Lipid Res. 34, 151-184(1995)
- 8) Aoki J., Taira A., Takanezawa Y., Kishi Y., Hama K., Kishimoto T., Mizuno K., Saku K., Taguchi R., Arai H., J. Biol Chem. 13, 48737-44(2004)
- 9) Schumacher K.A., Classen H.G., Spath M., Thromb. Haemostas. 42, 631-640(1979)
- 10) Shimizu Y, Morikawa Y, Okudaira S, Kimoto S, Tanaka T, Aoki J, Tokumura A. Am J Pathol. 184(5):1593-603.
- 11) Vogt W., Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 240, 134-149(1960)
- 12) Moolenaar W.H., Kruijer W., Tilly B.C., Verlaan I., Bierman A.J., De laet S.W., Nature 323, 171-173(1986)
- 13) Tigyi G., Miledi R., J. Biol. Chem. 267, 21360-21367(1992)
- 14) Imamura S., Horai T., Mukai M., Shinkai K., Sawada M., Akedo H., Biochem. Biophys. Res. Commun. 193, 497-503(1993)
- 15) Watterson K.R., Lanning D.A., Diegelmann R. F., Spiegel S., Wound Repair Regen. 5, 607-16.(2007)

- 16) Hecht J.H., Weiner J.A., Post S.R., Chun J., *J. Cell. Biochem.* 135, 1071-1083 (1996)
- 17) An S., Dickens M.A., Bleu T., Hallmark O.G., Goetzl E.J., *Biochem. Biophys. Res. Commun* 231, 619-622 (1997)
- 18) Bandoh K., Aoki J., Hosono H., Kobayashi S., Kobayashi T., Murakami-Murohushi K., Tshujimoto M., Arai H., Inoue K., *J. Biol. Chem.* 274, 2777-27785 (1999)
- 19) Noguchi K., Ishii S., Shimizu T., *J. Biol. Chem.* 278, 25600-25606 (2003)
- 20) Kotarsky K., Boketoft A., Bristulf J., Nilsson N.E., Norberg A., Hansson S., Oqman C., Sillard R., Leebundburg A.M.F., Olde B., *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 318, 619-628 (2006)
- 21) Lee C.W., Rivera R., Gardell S., Dubin A.E., Chun J., *J. Biol. Chem.* 281, 23589-23597 (2006)
- 22) Ishii I., Fukushima N., Ye X., Chun J., *Rev. Biochem.* 73 321-354 (2004)
- 23) Tabata K., Baba K., Shiraishi A., Ito M., Fujita N., *Biochem. Biophys. Res. Commun* 363, 861-867 (2007)
- 24) Gaits F., Fourcade O., Le Balle F., Gueguen G., Gaig B., Fauve J., Salle s J., Mauco G., Simon M., Chap H., *FEBS Lett.* 410, 54-58 (1997)
- 25) Aoki J., *Biochim. Biophys. Acta.* 1582, 18-25 (2004)
- 26) Fourcade O., Simon M., Viode C., Rugani N., Leballe F., Rabab A., Fournie B., Sarda L., Chap H., *Cell* 80, 919-927 (1995)
- 27) Tokumura A., *Prog. Lipid Res.* 34, 151-184 (1995)
- 28) Tokumura A., *Biochim. Biophys Acta* 1582, 18-25 *Sem. Cell Dev.* 15, 477-489 (2002)
- 29) Tokumura A., *Biochim. Biophys. Acta.* 875, 31-38 (1986)

- 30) Hinokio K, Yamano S, Nakagawa K, Irahara M, Kamada M, Tokumura A, Aono T. *Life Sci.* 70(7),759–767(2002)
- 31) Komatsu J, Yamano S, Kuwahara A, Tokumura A, Irahara M. *Life Sci.* 79(5):506-11. (2006)
- 32) Tokumura A., Miyake M., Nishioka Y., Yamano S., Aono T., Fukuzawa K., *Biol. Reprod.* 61,195–199(1999)
- 33) M.L. Hennet, C.M.H. Combelles, The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation, *Int. J. Dev. Biol.* 56 (2012) 819–831.
- 34) H.J. Chi, D.H. Kim, J.J. Koo, S.S. Chang, The suitability and efficiency of human follicular fluid as a protein supplement in human in vitro fertilization programs, *Fertil. Steril.* 70 (1988) 871–877.
- 35) F.P. Daen, E. Sato, K. Naito, Y. Toyoda, The effect of pig follicular fluid fractions on cumulus expansion and male pronucleus formation in porcine oocytes matured and fertilized in vitro, *J. Reprod. Fertil.* 101 (1994) 667–673.
- 36) Y. Inoue, S. Miyamoto, T. Fukami, K. Shirota, F. Yotsumoto, T. Kawarabayashi, Amphiregulin is much more abundantly expressed than transforming growth factor- α and epidermal growth factor I in human follicular fluid obtained from patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer, *Fertil. Steril.* 91(2009) 1035–1041.
- 37) L.G. Westergaard, C.Y. Andersen, Epidermal growth factor (EGF) in human preovulatory follicles, *Hum. Reprod.* 4 (1989) 257–260.
- 38) T. Vanholder, J.L.M.R. Leroy, A. Van Soom, G. Opsomer, D. Maes, M. Coryn, A. de Kruif, Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro, *Anim. Reprod. Sci.* 87 (2005) 33–44.
- 39) N. Lepage, P. Miron, R. Hemmings, K.D. Roberts, J. Langlais, Distribution of lysophospholipids and metabolism of platelet-activating factor in human follicular and peritoneal fluids, *J. Reprod. Fertil.* 98 (1992) 349–356.

- 40) A. Tokumura, M. Miyake, Y. Nishioka, S. Yamano, T. Aono, K. Fukuzawa, Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of in vitro fertilization patients, *Biol. Reprod.* 61 (1999) 195–199.
- 41) L.M. Foulds, R.I. Boysen, M. Crane, Y. Yang, J.A. Muir, A.I. Smith, D.M. deKretser, M.T.W. Hearn, M.P. Hedger, Molecular identification of lyso-glycerophosphocholines as endogenous immunosuppressives in bovine and rat gonadal fluids, *Biol. Reprod.* 79 (2008) 525–536.
- 42) A. Von Otto, J.R. Palleta, S. Becker, S. König, M. Fobker, R.R. Grebb, L. Kiesel, G. Assmann, K. Diedrich, J.R. Nofer, Follicular fluid high density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate is a novel mediator of ovarian angiogenesis, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 5398–5405.
- 43) Y. Xe, J. Chun, Lysophosphatidic acid (LPA) signaling in vertebrate reproduction, *Trends Endocrinol. Metab.* 21 (2010) 17–24.
- 44) I. Woclawek-Potocka, P. Rawinska, I. Kowalczyk-Zeiba, D. Boruszewska, E. Sinderwicz, T. Wasniewski, D.J. Skarzynski, Lysophosphatidic acid (LPA) signaling in human and ruminant reproductive tract, *Mediators Inflamm.* 2014 (2014) 649-702.
- 45) A. Tokumura, K. Fukuzawa, S. Yamada, H. Tsukatani, Stimulatory effect of lysophosphatidic acid on uterine smooth muscles of non-pregnant rats, *Arch. Int. Pharmacodyn.* 245 (1980) 74–83.
- 46) T. Kobayashi, S. Yamano, S. Murayama, H. Ishikawa, A. Tokumura, T. Aono, Effect of lysophosphatidic acid on the preimplantation development of mouse embryos, *FEBS Lett.* 351 (1994) 38–40.
- 47) K. Kunikata, S. Yamano, A. Tokumura, T. Aono, Effect of lysophosphatidic acid on the ovum transport in mouse oviducts, *Life Sci.* 65 (1999) 833–840.
- 48) Hama K. & Aoki, K. (2010) *Prog. Lipid Res.*, 49, 335-342.
- 49) Hama K., Aoki J., Inoue A., et al.: *Biol. Reprod.* 77, 954-957, 2007.

- 50) Achache, H., Tsafirir, A., Prus, D., Reich, & Revel, A (2010) *Fertil. Steril.*,94, 1271-1278
- 51) Woclawek-Potocka I., Komiyamam J., Saulnier-Blache J.S., et al .: *Reproduction* 137, 95-105, 2009.
- 52) Tsuchiya K., Akai K., Tokumura A., et al : *BBA* 1725, Issue 1, 2005, 111–119
- 53) Guo, Z., Liliom, K., Ficher, D.J., et al .: *Sciences*.93(1996),14367-14372
- 54) K. Hinokio, S. Yamono, K. Nakagawa, M. Irahara, M. Kamada, A. Tokumura, T. Aono, Lysophosphatidic acid stimulates nuclear and cytoplasmic maturation of golden hamster immature oocytes in vitro via cumulus cells, *Life Sci.* 70(2002) 759–767.
- 55) J. Komatsu, S. Yamano, A. Kuwahara, A. Tokumura, M. Irahara, The signaling pathways linking to lysophosphatidic acid-promoted meiotic maturation in mice, *Life Sci.* 79 (2006) 506–511.
- 56) A. Tokumura, E. Majima, Y. Kariya, K. Tominaga, K. Kogure, K. Yasuda, K. Fukuzawa, Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 39436–39442.
- 57) M.L. Stracke, H.C. Krutzsch, E.J. Unsworth, A. Arestad, V. Cioce, E. Sciffmann, L.A. Liotta, Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility stimulating protein, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 2524–2529.
- 58) M. Umezū-Goto, Y. Kishi, A. Taira, K. Hama, N. Dohmae, K. Takio, Y. Yamori, G.B. Mills, K. Inoue, J. Aoki, H. Arai, Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production, *J. Cell Biol.* 158 (2002) 227–233.
- 59) J.M. Onorato, P. Shipkova, A. Minnich, A.F. Aubry, J. Easter, A. Tymiak, Challenges in accurate quantification of lysophosphatidic acids in human biofluids, *J. Lipid Res.* 55 (2014) 1784–1796.

- 60) A. Tokumura, J. Sinomiya, S. Kishimoto, T. Tanaka, K. Kogure, T. Sugiura, K. Satouchi, K. Waku, K. Fukuzawa, Human platelets respond differentially to lysophosphatidic acids having a highly unsaturated fatty acyl group and alkylether-linked lysophosphatidic acids, *Biochem. J.* 365 (2002) 617–628.
- 61) Warn-Cramer B.J., Cottrell G.T., Burt J.M., Lau A., F., *J. Biol. Chem.* 273, 9188–9196 (1998)
- 62) A. Tokumura, L.D. Carbon, Y. Yoshioka, J. Morishige, M. Kikuchi, A. Postlethwaite, M. Watsky, Elevated serum levels of arachidonoyl-lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate in systemic sclerosis, *Int. J. Med. Sci.* 6 (2009) 168–176.
- 63) A. Tokumura, T. Kume, S. Taira, K. Yasuda, H. Kanzaki, Altered activity of lysophospholipase D which produces bioactive lysophosphatidic acid and choline, in serum from pregnant women with pathological pregnancy, *Mol. Hum. Reprod.* 15 (2009) 301–310.
- 64) J. Morishige, K. Touchika, T. Tanaka, K. Satouchi, K. Fukuzawa, A. Tokumura, Production of bioactive lysophosphatidic acid by lysophospholipase D in hen egg white, *Biochim. Biophys. Acta* 1771 (2007) 491–499.
- 65) V. Douard, A. Gassama-Diagne, D. Hermier, E. Blesbois, Activity of phospholipase A and lysophospholipase in turkey semen and oviducal fluid, *Poult. Sci.* 83 (2004) 1385–1393.
- 66) D.N. Brindley, D. English, C. Pilqui, K. Buri, Z.C. Ling, Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids, *Biochim. Biophys. Acta* 1582 (2002) 33–44.
- 67) J.L. Tomsig, A.H. Snyder, E.V. Berdyshev, A. Skobeleva, C. Mataya, V. Natarajan, D.N. Brindley, K.R. Lynch, Lipid phosphate phosphatase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo, *Biochem. J.* 419 (2009) 611–618.
- 68) S. Kuwata, K. Ohkubo, S. Kumamoto, N. Yamaguchi, N. Izuka, K. Murota, T. Tsujiuchi, M. Iwamori, N. Fukushima, Extracellular lipid metabolism influences the survival of

ovarian cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 439 (2013) 280–284.

69) A. Tokumura, K. Murota, M. Nikawadori, E. Kishino, R. Matsuda, M. Takagi, T. Ohkubo, T. Tanaka, J. Terao, A. Tokumura, Extracellular metabolism-dependent uptake of lysolipids through cultured monolayer of Caco-2 cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1841 (2014) 121–131.

70) K. Bandoh, J. Aoki, A. Taira, M. Tsujimoto, H. Arai, K. Inoue, Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors, *FEBS Lett.* 478(2000) 159–165.

71) E. Kuwahara, J. Yamamoto, Y. Yano, M. Omura, A. Kuwahara, M. Irahara, A. Tokumura, Lysophosphatidic acid stimulates hyaluronan production by mouse cumulus-oocyte complexes, *Reprod. Med. Biol.* 13 (2014) 95–102.

72) M. Shaaker, A. Rahimpour, M. Nouri, K. Khanaki, M. Darabi, L. Farzadi, V. Shahnazi, A. Mehdizadeh, Fatty acid composition of human follicular fluid phospholipids and fertilization rate in assisted reproductive techniques, *Iran. Biomed. J.* 16 (2012) 162–168.

73) Edry I, Sela-Abramovich S, Dekel N. Meiotic arrest of oocytes depends on cell-to-cell communication in the ovarian follicle. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;252:102–6.

74) Eppig JJ. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature.* 1979;281:483–4.

75) Hess KA, Chen L, Larsen WJ. Inter- α -inhibitor binding to hyaluronan in the cumulus extracellular matrix is required for optimal ovulation and development of mouse oocytes. *Biol Reprod.* 1999;61:436–43.

76) Allworth AE, Albertini DF. Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Dev Biol.* 1993;158:101–12.

77) Larsen WJ, Wert SE, Brunner GD. A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Dev Biol.* 1986;3:517–21.
Eppig JJ. Role of serum in FSH stimulated cumulus expansion by mouse oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Biol Reprod.* 1980;22:629–33.

- 78) Kimura N, Konno Y, Miyoshi K, Matsumoto H, Sato E. Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol Reprod.* 2002;66:707–17.
- 79) Schoenfelder M, Einspanier R. Expression of hyaluronan synthase and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. *Biol Reprod.* 2003;69:269–77.
- 80) Nagyova E, Camaioni A, Prochazka R, Salustri A. Covalent transfer of heavy chains of inter- α -trypsin inhibitor family proteins to hyaluronan in in vivo and in vitro expanded porcine oocyte-cumulus complexes. *Biol Reprod.* 2004;71:1838–43.
- 81) Tokumura A. A family of phospholipid autacoid: occurrence, metabolism and bioactions. *Prog Lipid Res.* 1995;4:151–84.
- 82) Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, Mutoh T, Lin ME, Teo ST, Park KE, Mosley AN, Chun J. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2010;50:157–86.
- 83) Hinokio K, Yamano S, Nakagawa K, Irahara M, Kamada, Tokumura A, Aono T. Lysophosphatidic acid stimulates nuclear and cytoplasmic maturation of golden hamster immature oocytes in vitro via cumulus cells. *Life Sci.* 2002;70:759–67.
- 84) Komatsu J, Yamano S, Kuwahara A, Tokumura A, Irahara M. The signaling pathways linking to lysophosphatidic acid-promoted meiotic maturation in mice. *Life Sci.* 2006;79:506–11.
- 85) Kunikata K, Yamano S, Tokumura A, Aono T. Effect of lysophosphatidic acid on the ovum transport in mouse oviducts. *Life Sci.* 1999;65:833–40.
- 86) Kobayashi T, Yamano S, Murayama S, Ishikawa H, Tokumura A, Aono T. Effect of the preimplantation development of mouse embryos. *FEBS Lett.* 1994;351:38–40.
- 87) Tokumura A. Metabolic pathways and physiological and pathophysiological significances of lysolipid phosphate mediators. *J Cell Biochem.* 2004;9(92):869–81.

- 88) Tokumura A, Miyake M, Nishioka Y, Yamano S, Aono T, Fukuzawa K. Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of in vitro fertilization patients. *Biol Reprod.* 1999;61:195–9.
- 89) Fülöp C, Sza'nto S, Mukhopadhyay D, Ba'rdos T, Kmath RV, Rugg MS, Day AJ, Salustri A, Hascall VC, Glant TT, Mikecz K. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. *Development.* 2003;130:2253–61.
- 90) Varani S, Elvin JA, Yan C, DeMAyo J, DeMyo FJ, Horton HF, Byrne MC, Matzuk MM. Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-8, causes female subfertility. *Mol Endocrinol.* 2002;16:1154–67.
- 91) Bolamba D, Russ KD, Harper SA, Sandler JL, Durrant BS. Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes in vitro. *Theriogenology.* 2006;65:1037–47.
- 92) Ohta H, Sato K, Murata N, Damirin A, Malchinkhuu E, Kon J, Kimura T, Tobo M, Yamazaki Y, Watanabe T, Yagi M, Sato M, Suzuki R, Murooka H, Sakai T, Nishitoba T, Im DS, Nochi H, Tamoto K, Tomura H, Okajima F. Ki16425, a subtype-selective antagonist for EDG-family lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol.* 2003;64:994–1005.
- 93) Harris TE, Persaud SJ, Jones PM. Atypical isoforms of PKC and insulin secretion from pancreatic b-cells: evidence using Go 6976 and Ro 31-8220 as PKC inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;1996(227):672–6.
- 94) Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayana I, Richard JS. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Mol Endocrinol.* 2006;20:1352–65.
- 95) Nemkova' L, Nagyova', Petlach M, Toma'nek M, Procha'zka R. Molecular mechanisms of insulin-like growth factor 1 promoted synthesis and retention of hyaluronic acid in porcine oocytecumulus complexes. *Biol Reprod.* 2007;76:1016–24.

- 96) Su YQ, Rubinstein S, Luria A, Lax Y, Breitbart H. Involvement of MEK-mitogen-activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Biol Reprod.* 2001;65:358–65.
- 97) Eppig JJ. The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Dev Biol.* 1982;89:268–72.
- 98) Schroeder AC, Eppig JJ. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously in vitro is normal. *Dev Biol.* 1984;102:493–7.
- 99) Eppig JJ, Wigglesworth K, Chesnel F. Secretion of cumulus expansion enabling factor by mouse oocytes: relationship to oocyte growth and competence to resume meiosis. *Dev Biol.* 1993;158:400–9.
- 100) Diaz FJ, O'Brien MJ, Wigglesworth K, Eppig JJ. The preantral granulosa cell to cumulus cell transition in the mouse ovary: development of competence to undergo expansion. *Dev Biol.* 2006;299:91–104.
- 101) Liu Z, Armant DR. Lysophosphatidic acid regulates murine blastocyst development by transactivation of receptors for heparin binding EGF-like growth factor. *Exp Cell Res.* 2004;2004(296):17–326.
- 102) Fan HY, Huo LJ, Chen DY, Schatten H, Sun QY. Protein kinase C and mitogen-activated protein kinase cascade in mouse cumulus cells: cross talk and effect on meiotic resumption of oocyte. *Biol Reprod.* 2004;70:1178–87.
- 103) Downs SM, Chen J. EGF-like peptides mediate FSH-induced maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2008;75:105–14.
- 104) Eppig JJ. Regulation by sulfated glycosaminoglycans of the expansion of cumuli oophori isolated from mice. *Biol Reprod.* 1981;25:559–608.
- 105) Downs SM. Specificity of epidermal growth action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus in vitro. *Biol Reprod.* 1989;41:371–9.

謝辞

本研究実施の機会を与えていただき、遂行にあたり終始、ご指導ご鞭撻を賜りました安田女子大学衛生薬学研究室 徳村彰教授に深謝いたします。また、本研究をまとめるのあたり、ご助言をいただいた徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部衛生薬学研究室 木暮健太郎教授に感謝いたします。さらに、本研究に試料をご提供いただいた患者様、ならびにご助言を賜りました徳島大学病院 医歯薬学研究部 産科婦人科学分野 苛原稔教授、桑原章准教授、岩佐武助教、矢野祐也氏に感謝いたします。また、本研究にご協力ならびにご助言を賜りました徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部 医薬品機能生化学研究室 土屋浩一郎教授、安田女子大学薬学部 日高麻由美助教、徳島大学病院薬剤部 桑原絵美氏、福井翠氏に感謝いたします。最後に、本研究に協力いただきました徳島大学薬学部衛生薬学研究室の卒業生、在校生の皆様、本研究の実施ならびに論文作成に際して御指導賜りました徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部衛生薬学研究室 田中保准教授に感謝いたします。