

学 位 論 文 題 名

# Induction of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Human Ovary by Human Chorionic Gonadotrophin

(ヒト卵巣におけるヒト絨毛性ゴナドトロピンによる  
マクロファージ遊走阻止因子の誘導)

## 学位論文内容の要旨

### 目的

macrophage migration inhibitory factor (MIF) はマクロファージの機能に関与するサイトカインとして知られていたが、近年では様々な特徴を有していることが解ってきている。ヒトMIFは115アミノ酸残基よりなる12kDaの蛋白質で、従来activated T-cellでの存在が証明されていたが、近年ではいろいろな組織においてその存在が知られており、卵巣顆粒膜細胞も例外ではない。一方、卵巣機能には内分泌系のみならず免疫系が深く関与しており、その中でも最もdynamicなstageである排卵期におけるサイトカインの役割も明らかになりつつある。しかしその詳細についてはいまだ不明なことも多く、MIFの卵巣機能への関与も知られていない。本研究は、主に体外受精・胚移植 (IVF-ET) の患者より得られた血清・卵胞液中のMIF濃度を把握し月経周期との関連を考察するとともに、顆粒膜細胞の培養系におけるhuman chorionic gonadotrophin (HCG) によるMIF分泌への影響を解析して、HCGにより誘導される排卵の過程とMIFとの関連を検討することを目的とした。

### 対象と方法

IVF-ET施行の患者の血清、IVF-ET及び手術の際得られた卵胞液、卵胞液中に含まれる顆粒膜細胞を材料として用いた。卵巣刺激法によるIVF-ETの方法は、卵巣刺激周期の場合、前周期の黄体期中期よりGnRH analogueを用いるlong protocolで下垂体のゴナドトロピン分泌を抑制し、human menopausal gonadotrophin (HMG) の連日投与により十分な卵胞成熟が見られた後HCGを投与し、その35時間後に経膈超音波ガイド下に卵胞穿刺・吸引を行い、卵を採取した。症例により同時に卵胞液・顆粒膜細胞を採取した。2日後の胚移植の後、HCG製剤及びプロゲステロン製剤を黄体機能維持のため投与した。自然周期法によるIVF-ETは、超音波断層法にて卵胞成熟を確認しHCGを投与して35時間後に卵胞液を吸引し卵を採取した。MIFの定量に用いる抗体は、recombinant human MIFを免疫されたウサギの血清を精製して得られたpolyclonal抗体を用いた。抗体のspecificityはWestern blot法にて確認された。そのウサギ抗ヒトMIF抗体を一次抗体として、ELISA法にて血清・卵胞液・培養上清のMIF濃度の測定を行った。

本研究では、以下の4つの実験系を行った。(1)8名の卵巣刺激法によるIVF-ET患者より、①HMG開始よりday-6 (HCG投与日をday 0とする)、②day-5~0、③day 1 (HCG投与後35時間後)、④day 2~14、の4期に分けて採血し、MIF濃度を測定した。(2)13名の卵巣刺激法によるIVF-ET患者の卵胞液、および同時に採取した血液のMIF濃度を測定した。(3)9名の自然周期における排卵期後期の患者より手術の際得られた卵胞液、および8名の自然周期におけるIVF-ET患者より、HCG投与35時間後の排卵期に得られた卵

胞液についてMIF濃度を測定した。(4)5名のIVF-ET患者より得られた卵胞液中の顆粒膜細胞をHam-F 10において2群に分けて24時間培養し、一方にHCG 0.5 IU/Lを添加し、非添加群をコントロールとしてさらに24時間培養し、培養上清中のMIF濃度を測定した。

データの統計学的解析は、実験(1)ではKruskal-Wallis test およびpost hoc comparisonにScheffe's test、(2)および(4)ではWilcoxon signed-rank test、(3)ではMann-Whitney U-test を用いた。

### 結果

実験(1)のIVF-ET患者の周期別の血清MIF値(中央値)は、①12.1ng/ml ②17.5ng/ml ③92.6ng/ml ④8.2ng/ml、と③の排卵期において他の期間より有意に高かった( $P<0.001$ )。実験(2)の血清中のMIF値(中央値)は72.0ng/ml、卵胞液中は113.4ng/mlであり、卵胞液中で有意に高かった( $P<0.01$ )。実験(3)では、排卵期後期における卵胞液中MIF濃度(中央値)は13.8ng/ml、HCG投与後の排卵期では51.6ng/mlであり、排卵期において有意に高かった( $P<0.01$ )。実験(4)の顆粒膜細胞の培養上清中のMIF値(中央値)は、HCGを添加した群は、添加前の3.2ng/mlから添加後7.2ng/mlに上昇し( $P<0.05$ )、HCGを添加しなかったコントロール群では2.4ng/mlから1.2ng/mlと有意な変化はなかった。HCG添加群では、コントロール群に比して有意にMIFの産生が亢進した( $P<0.05$ )。

### 考察

本研究では、IVF-ETの患者において、排卵誘発による卵巣内の環境の変化に伴う血清MIF値の変化を検討し、HCG投与翌日の排卵期において顕著に増加することが初めて示された。また、排卵期において血清中より卵胞液中のMIF値が高く、卵胞液中のMIF値がHCG投与により増加し、さらに培養実験よりHCGの刺激により顆粒膜細胞でのMIF産生が亢進した。

すでに培養顆粒膜細胞において、Western blot法、RT-PCR法によりMIFの存在と発現が証明されている。さらに、卵巣はHCGの主な標的臓器であり、HCGが卵巣の顆粒膜細胞や白血球などの浸潤細胞を刺激することから、MIFの産生が促され、血中濃度が上昇することが示唆される。

近年、MIFがT-cellの他、macrophage、脳下垂体前葉などの細胞より、様々な炎症や生理学的なストレスに反応して分泌されていることが明らかになってきている。また、排卵は成熟卵胞にluteinizing hormone (LH)・HCGが作用して惹起されるが、その際様々な免疫反応が見られ、排卵は一種の炎症であると言われている。従って、排卵期に卵巣の細胞が刺激され、その免疫反応の過程でMIFが産生され、血中濃度の上昇が認められることが推測される。加えて、MIFはtumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )に反応して発現することが知られており、TNF- $\alpha$ が排卵の重要なmediatorであるprostaglandinを誘導することからも、排卵との関係が示唆される。一方で、MIFが、HCG処理に反応して卵巣内のmacrophageで発現されるnitric oxide synthaseを誘導することも報告されており、複数のpathwayでMIFが排卵のmediatorとなっている可能性がある。排卵の一行程である卵胞破裂に関しては、LHの刺激によりprostaglandin endoperoxide synthase、collagenase、plasminogen activatorなどの活性化が不可欠である。MIFによりplasminogenが活性化されることから、卵胞破裂のmediatorとなっている可能性がある。

以上、MIFと排卵との関係について考察を述べたが、現時点ではその詳細は不明であり、またHCGがどのような機序でMIF産生を刺激するかも明らかにされておらず、今後の研究課題である。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 橋 輝 雄  
副 査 教 授 本 間 研 一  
副 査 教 授 藤 本 征 一 郎

学 位 論 文 題 名

## Induction of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Human Ovary by Human Chorionic Gonadotrophin

(ヒト卵巣におけるヒト絨毛性ゴナドトロピンによる  
マクロファージ遊走阻止因子の誘導)

ヒト macrophage migration inhibitory factor (MIF)は115アミノ酸残基よりなる12kDaの蛋白質であるが、MIFの卵巣機能への関与は知られていない。本研究は、主に体外受精-胚移植(IVF-ET)の患者より得られた血清・卵胞液中のMIF濃度を把握し、月経周期との関連を考察するとともに、顆粒膜細胞の培養系における human chorionic gonadotrophin(HCG)によるMIF分泌への影響を解析して、HCGにより誘導される排卵の過程とMIFとの関連を検討することを目的とした。

IVF-ET施行の患者の血清、IVF-ET及び手術の際得られた卵胞液、卵胞液中に含まれる顆粒膜細胞を用いた。卵巣刺激法によるIVF-ETの方法は、前周期の黄体期中期よりGnRH analogueを用いる long protocolで下垂体のゴナドトロピン分泌を抑制し、human menopausal gonadotrophin(HMG)の連日投与により十分な卵胞成熟が見られた後HCGを投与し、その35時間後に経膈超音波ガイド下に卵胞穿刺・吸引を行い、卵を採取した。症例により同時に卵胞液・顆粒膜細胞を採取した。自然周期法によるIVF-ETは、超音波断層法にて卵胞成熟を確認しHCGを投与して35時間後に卵胞液を吸引し卵を採取した。MIFの定量に用いる抗体は、recombinant human MIFを免疫されたウサギの血清を精製して得られた polyclonal 抗体を用いた。抗体の specificityはWestern blot法にて確認された。そのウサギ抗ヒトMIF抗体を一次抗体として、ELISA法にて血清・卵胞液・培養上清のMIF濃度の測定を行った。

本研究では、以下の4つの実験系を行った。(1)8名の卵巣刺激法によるIVF-ET患者より、①HMG開始よりday-6(HCG投与日をday 0とする)、②day-5~0、③day 1(HCG投与後35時間後)、④day 2~14、の4期に分けて採血し、MIF濃度を測定した。(2)13名の卵巣刺激法によるIVF-ET患者の卵胞液、および同時に採取した血液のMIF濃度を測定した。(3)9名の自然周期における卵胞期後期の患者より手術の際得られた卵胞液、および8名の自然周期におけるIVF-ET患者より、HCG投与35時間後の排卵期に得られた卵胞液についてMIF濃度を測定した。(4)5名のIVF-ET患者より得られた卵胞液中の顆粒膜細胞をHam-F10において2群に分けて24時間培養し、一方にHCG 0.5 IU/Lを添加し、非添加群をコントロールとしてさらに24時間培養し、培養上清中のMIF濃度を測定した。

データの統計学的解析は、実験(1)ではKruskal-Wallis test およびpost hoc comparison に Scheffe's test、(2)および(4)ではWilcoxon signed-rank test、(3)ではMann-Whitney U-test を用

いた。

実験(1)のIVF-ET患者の周期別の血清MIF値(中央値)は、①12.1ng/ml、②17.5ng/ml、③92.6ng/ml、④8.2ng/ml、と③の排卵期において他の期間より有意に高かった( $P<0.001$ )。実験(2)の血清中のMIF値(中央値)は72.0ng/ml、卵胞液中は113.4ng/mlであり、卵胞液中で有意に高かった( $P<0.01$ )。実験(3)では、排卵期後期における卵胞液中MIF濃度(中央値)は13.8ng/ml、HCG投与後の排卵期では51.6ng/mlであり、排卵期において有意に高かった( $P<0.01$ )。実験(4)の顆粒膜細胞の培養上清中のMIF値(中央値)は、HCGを添加した群では、添加前の3.2ng/mlから添加後7.2ng/mlに上昇し( $P<0.05$ )、HCGを添加しなかったコントロール群では2.4ng/mlから1.2ng/mlと有意な変化はなかった。HCG添加群(24時間後)では、コントロール群に比して有意にMIFの産生が亢進した( $P<0.05$ )。

本研究では、IVF-ETの患者において、排卵誘発による卵巣内の環境の変化に伴う血清MIF値の変化を検討し、HCG投与翌日の排卵期において顕著に増加することが初めて示された。また、排卵期において血清中より卵胞液中のMIF値が高く、卵胞液中のMIF値がHCG投与により増加し、さらに培養実験よりHCGの刺激により顆粒膜細胞でのMIF産生が亢進することが初めて示された。

公開発表に際し、副査の本間教授から、自然周期の排卵期の血清MIF濃度、自然周期の排卵期卵胞液中のMIF濃度の上昇の理由、培養系でのHCGに対するdose-response、MIFが排卵に関与する機構などについて質問があった。副査の藤本教授から、培養実験のHCG添加濃度設定の背景、排卵期における血清中と卵胞液中のMIF濃度比が性ステロイドホルモン濃度比と大きく異なる理由、HCGが顆粒膜細胞以外の組織などに作用することの可能性、卵胞数とMIF濃度との関係などについて質問があった。最後に主査の石橋教授から、卵胞成熟度と血清中、卵胞液中のMIF濃度との関係、排卵期においてMIFの上昇はHCG投与の前か後かについて、また卵胞液中と血清中のMIFの分子構造の差異の有無についてなどの質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は、対象症例の統計学的解析結果、文献的情報、自身の臨床経験をもとに概ね妥当な回答をなした。

審査員一同は、ヒト排卵機構の解明にMIFの関与の可能性を初めて示唆した本研究の成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。