

学位論文題名

# The Role of macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Follicle Growth and Ovulation

(卵胞発育, 排卵機構におけるマクロファージ遊走阻止因子の役割)

## 学位論文内容の要旨

### 緒言

卵巣機能には内分泌系のみならず免疫系の関与が報告され, 卵胞発育および排卵機構におけるサイトカインの役割が明らかになりつつある. マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は遅延型アレルギー反応に関与するサイトカインとして発見され, 現在炎症, 免疫応答のイニシエーターとして機能すると考えられている. 一方, MIF は細胞の分化増殖能を促すサイトカインの一つとしても知られ, 最近卵巣機能調節への関与が示唆されている. 本研究では, 卵胞発育および排卵機構に MIF が関与するか否かについて検討した.

### 材料と方法

A) 卵巣組織での MIF の局在を調べる目的で, 25 日齢の幼若雌性 Sprague-Dawley (S-D) ラットの両側卵巣を摘出し, Labelled Streptavidin Biotin (LSAB) 法による MIF 免疫組織染色を施行した.

B) 23 日齢に妊馬血清性性腺刺激ホルモン (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) 15 IU を皮下投与した S-D ラット排卵動物モデルを用いて以下の実験を行った. 実験群では, 22 日齢より両側子宮付属器摘出前日までウサギ抗ラット MIF 抗体 (以下, 抗 MIF 抗体) 600  $\mu$ g を 24 時間毎に 3 日間腹腔内投与した (A 群). 対照群では同様に Non-Immuno IgG 600  $\mu$ g を腹腔内投与した (C 群). A 群と C 群について, 以下の 1) ~4) の比較検討を行った. 1) PMSG 投与 48 時間後に hCG 10 IU を腹腔内に投与し, その 22 時間後に両側卵管を摘出し, 採取した卵数を算出した. 2) PMSG 投与 47 時間後に摘出した両側卵巣の湿重量を計量した. また HE 染色を施行し, 卵胞最大径により胞状卵胞 (250  $\mu$ m 以上 500  $\mu$ m 未満, Antral Follicle; AF), 成熟卵胞 (500  $\mu$ m 以上, Preovulatory Follicle; PF) の 2 種類に卵胞を分類し, 全切片中の AF 数および PF 数を算出した. 3) PMSG 投与 47 時間後に A 群と C 群より摘出した両側卵巣, および同日齢 (25 日齢) で PMSG 未負荷・抗体非投与の S-D ラットより摘出した両側卵巣を採取, 凍結保存し, 各個体の両側卵巣を合わせて各個体毎の検体として, 卵巣組織内のインヒピン濃度を Immunofluorometric assay (IFMA) 法により計測した. 4) PMSG 投与 47 時間後に摘出した卵巣を凍結保存し, 各個体の両側卵巣を合わせて各個体毎の検体とし, 卵巣組織内のインヒピン  $\alpha$  mRNA 発現をノーザンプロット法により解析した. それぞれのシグナルは NIH Image 画像解析ソフトにより定量化し, インヒピン  $\alpha$  / GAPDH 比を算出し, 比較

検討した。統計学的検討は Unpaired Student's t-test により行った。なお IFMA 法によるインヒビン濃度の比較については、One-Factor ANOVA および Turkey-Kramer 法を用いて検定した。いずれの検定についても  $p < 0.05$  をもって統計学的有意差と判定した。

### 結果

A) PMSG 未負荷・抗体非投与の 25 日齢 S-D ラット( $n=2$ )に対して LSAB 法により MIF 免疫組織染色を行い、卵巣の顆粒膜細胞での局在が認められた。また卵巣莢膜細胞にも強い染色が認められた。

B) 1) 1 個体 (両側卵巣分) あたりの排卵数は、A 群( $n=9$ )で  $14.9 \pm 9.2$  個 (mean  $\pm$  SD), C 群( $n=11$ )で  $34.2 \pm 16.3$  個であり、C 群と比較し A 群においては排卵数が有意( $p < 0.01$ )に減少した。2) 1 卵巣あたりの湿重量は、A 群( $n=10$ )で  $20.2 \pm 9.5$  mg, C 群( $n=10$ )で  $36.4 \pm 5.3$  mg であり、C 群と比較し A 群において卵巣湿重量が有意( $p < 0.01$ )に減少した。1 卵巣あたりの AF 数 (全切片)は、A 群( $n=5$ )で  $45.0 \pm 9.6$  個, C 群( $n=5$ )で  $38.6 \pm 13.1$  個であり、両群に差はなかった。一方、PF 数 (全切片)は、A 群( $n=5$ )で  $12.2 \pm 5.8$  個, C 群( $n=5$ )で  $27.8 \pm 7.9$  個であり、C 群と比較し A 群では PF 数が有意( $p < 0.01$ )に減少した。3) 両側卵巣組織内のインヒビン濃度は A 群( $n=9$ )で  $1.2 \pm 0.7$  ng/ml, C 群( $n=9$ )で  $2.8 \pm 1.9$  ng/ml, PMSG 非投与群( $n=4$ )で  $0.3 \pm 0.1$  ng/ml であり、PMSG 非投与群に対し C 群では 9.3 倍の、A 群では 4 倍のインヒビン濃度を示した。A 群と C 群間、および C 群と PMSG 非投与群間に有意( $p < 0.05$ )な差を認めた。4) インヒビン  $\alpha$  mRNA の発現は A 群( $n=6$ )で  $0.515 \pm 0.099$ , C 群( $n=5$ )で  $0.918 \pm 0.064$  であり、C 群と比較して A 群ではインヒビン  $\alpha$  mRNA の発現が有意( $p < 0.01$ )に減少した。

### 考察

本研究では、まず PMSG 未負荷、抗 MIF 抗体非投与である幼若ラットに対して MIF 免疫組織染色を行い、卵巣顆粒膜細胞での局在を認めた。続いて幼若ラット排卵動物モデルに抗 MIF 抗体を腹腔内投与し、MIF が卵胞発育および排卵機構に参与する可能性を検討した。その結果、抗 MIF 抗体投与群では排卵数が有意に減少した。これは内因性 MIF が十分量あればそれが不足する場合より排卵数が多くなることを意味しており、MIF は排卵数調節機能を有することを示している。また抗 MIF 抗体投与群では対照群に比し有意差はなかったものの、より未成熟である胞状卵胞数は増加した。一方、より成熟した段階の成熟卵胞数は対照群に比し有意に減少した。卵巣湿重量は抗 MIF 抗体投与により有意に減少した。これらは、抗 MIF 抗体投与により多くの卵胞が胞状卵胞の段階で発育が阻害されたことを意味しており、MIF が卵胞発育過程において胞状卵胞から成熟卵胞への発育を促進することを示している。

本研究において、抗 MIF 抗体投与の卵巣組織内ではインヒビン濃度およびインヒビン mRNA 発現は有意に減少した。インヒビンは重要な卵胞発育調節因子であり、MIF の卵巣顆粒膜細胞でのインヒビンの生成促進効果が示唆された。これは MIF と卵胞発育の関連をさらに補強する所見と思われる。なお抗 MIF 抗体投与群の中で、インヒビン  $\alpha$  mRNA シグナルが明瞭に減少しなかった例が 6 個体中 2 個体にみられた。これが生じた原因の一つとしては、アクチビン、insulin like growth factor (IGF)-I、フォリスタチンなどのインヒビン以外の卵胞発育調節因子の影響が考えられ、今後これらの因子と MIF の関連についても検討する必要がある。

今回の結果から、MIF は卵巣でのインヒピン産生増加を促進することが強く示唆された。これは卵巣でのエストロゲンの産生増加につながり、LH サージを介した一連の排卵機構の過程で MIF が関与する可能性が考えられる。一方、抗 MIF 抗体投与による排卵数および成熟卵胞数の減少の割合がほぼ同一であることから、MIF は卵胞発育に関与している可能性が示唆され今後さらに検討が必要である。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 櫻 木 範 明  
副 査 教 授 石 橋 輝 雄  
副 査 教 授 水 上 尚 典

学 位 論 文 題 名

## The Role of macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Follicle Growth and Ovulation

(卵胞発育, 排卵機構におけるマクロファージ遊走阻止因子の役割)

卵巣機能には内分泌系のみならず免疫系の関与が報告され, 卵胞発育および排卵機構におけるサイトカインの役割が明らかになりつつある. マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は遅延型アレルギー反応に関与し, 炎症, 免疫応答のイニシエーターとして機能するとともに, 細胞の分化増殖能を促すサイトカインの一つとしても知られている. 本研究では卵胞発育および排卵機構に MIF が関与するか否かについて検討した.

卵巣組織での MIF の局在を調べる目的で, 25 日齢の幼若雌性 Sprague-Dawley (S-D) ラットの両側卵巣を摘出し, Labelled Streptavidin Biotin (LSAB) 法による MIF 免疫組織染色を施行した. 23 日齢に妊馬血清性性腺刺激ホルモン (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) 15 IU を皮下投与した S-D ラット排卵動物モデルを用いて以下の実験を行った. 実験群では, 22 日齢より両側子宮付属器摘出前日までウサギ抗ラット MIF 抗体 (以下, 抗 MIF 抗体) 600  $\mu$ g を 24 時間毎に 3 日間腹腔内投与した (A 群). 対照群では同様に Non-Immuno IgG 600  $\mu$ g を腹腔内投与した (C 群). A 群と C 群について, 以下の 1)~4) の比較検討を行った. 1) PMSG 投与 48 時間後に hCG 10 IU を腹腔内に投与し, その 22 時間後に両側卵管を摘出し, 採取した卵数を算出した. 2) PMSG 投与 47 時間後に摘出した両側卵巣の湿重量を計量した. また HE 染色を施行し, 卵巣最大径により胞状卵胞 (250  $\mu$ m 以上 500  $\mu$ m 未満, Antral Follicle ; AF), 成熟卵胞 (500  $\mu$ m 以上, Preovulatory Follicle ; PF) の 2 種類に卵胞を分類し, 全切片中の AF 数および PF 数を算出した. 3) PMSG 投与 47 時間後に A 群と C 群より摘出した両側卵巣, および同日齢 (25 日齢) で PMSG 未負荷・抗体非投与の S-D ラットより摘出した両側卵巣を採取, 凍結保存し, 各個体の両側卵巣を合わせて各個体毎の検体として, 卵巣組織内のインヒビン濃度を Immunofluorometric assay (IFMA) 法により計測した. 4) PMSG 投与 47 時間後に摘出した卵巣を凍結保存し, 各個体の両側卵巣を合わせて各個体毎の検体とし, 卵巣組織内のインヒビン  $\alpha$  mRNA 発現をノーザンブロット法により解析した. それぞれのシグナルは NIH Image 画像解析ソフトにより定量化し, インヒビン  $\alpha$  / GAPDH 比を算出し, 比較検討した. 統計学的検討は Unpaired Student's t-test により行った. なお IFMA 法によるインヒビン濃度の比較については, One-Factor ANOVA および Turkey-Kramer 法を用いて検定した. いずれの検定についても  $p < 0.05$  をもって統計学

的有意差と判定した。

その結果、PMSG 未負荷・抗体非投与の 25 日齢 S-D ラット(n=2)に対して LSAB 法により MIF 免疫組織染色を行い、卵巣の顆粒膜細胞での局在が認められた。また卵巣莢膜細胞にも強い染色が認められた。1 個体(両側卵巣分)あたりの排卵数は、A 群(n=9)で  $14.9 \pm 9.2$  個 (mean  $\pm$  SD), C 群(n=11)で  $34.2 \pm 16.3$  個であり、C 群と比較し A 群においては排卵数が有意( $p < 0.01$ )に減少した。2) 1 卵巣あたりの湿重量は、A 群(n=10)で  $20.2 \pm 9.5$  mg, C 群(n=10)で  $36.4 \pm 5.3$  mg であり、C 群と比較し A 群において卵巣湿重量が有意( $p < 0.01$ )に減少した。1 卵巣あたりの AF 数(全切片)は、A 群(n=5)で  $45.0 \pm 9.6$  個, C 群(n=5)で  $38.6 \pm 13.1$  個であり、両群に差はなかった。一方、PF 数(全切片)は、A 群(n=5)で  $12.2 \pm 5.8$  個, C 群(n=5)で  $27.8 \pm 7.9$  個であり、C 群と比較し A 群では PF 数が有意( $p < 0.01$ )に減少した。3) 両側卵巣組織内のインヒビン濃度は A 群(n=9)で  $1.2 \pm 0.7$  ng/ml, C 群(n=9)で  $2.8 \pm 1.9$  ng/ml, PMSG 非投与群(n=4)で  $0.3 \pm 0.1$  ng/ml であり、PMSG 非投与群に対し C 群では 9.3 倍の、A 群では 4 倍のインヒビン濃度を示した。A 群と C 群間、および C 群と PMSG 非投与群間に有意( $p < 0.05$ )な差を認めた。4) インヒビン  $\alpha$  mRNA の発現は A 群(n=6)で  $0.515 \pm 0.099$ , C 群(n=5)で  $0.918 \pm 0.064$  であり、C 群と比較して A 群ではインヒビン  $\alpha$  mRNA の発現が有意( $p < 0.01$ )に減少した。

本研究から、MIF は卵巣でのインヒビン産生増加を促進することが強く示唆された。これは卵巣でのエストロゲンの産生増加につながり、LH サージを介した一連の排卵機構の過程で MIF が関与する可能性が考えられる。一方、抗 MIF 抗体投与による排卵数および成熟卵胞数の減少の割合がほぼ同一であることから、MIF は卵胞発育に関与している可能性が示唆され今後さらに検討が必要である。

公開発表に際し、副査の石橋教授から、抗 MIF 抗体により内因性 MIF が中和される程度、抗 MIF 抗体投与例の免疫染色結果、抗 MIF 抗体投与例の血清 MIF 値、MIF 投与実験、卵巣湿重量と成熟卵胞数との関連、卵巣組織内のインヒビン濃度を検体上清中濃度と単位蛋白あたりの量について示した意味、などについて質問があった。副査の水上教授からは、本研究で示した日齢以外の日齢での卵巣の MIF 免疫染色の結果、卵胞発育と MIF の関係、抗 MIF 抗体投与によりインヒビン、成熟卵胞数、排卵数が減少した機序、などについて質問があった。主査の櫻木教授からは、MIF 発現についての *in situ hybridization* 実験について、インヒビンが産生される顆粒膜細胞における MIF レセプターの存在、などについて質問があった。これらの質問に対して、申請者は自身のこれまでの研究成績や文献的情報をもとに概ね妥当な回答をなした。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(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。