総説

免疫系による卵巣機能調節

京都大学医学部婦人科学産科学教室

森 崇 英, 福 岡 正 恒

Immune Regulation of Ovarian Function

Takahide MORI and Masatsune FUKUOKA

Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Kyoto University

Although it is well established that the pituitary gonadotropins and prolactin are the primary regulators of ovarian function, steroidal and nonsteroidal molecules produced locally in the ovary have been implicated in the modulation of gonadotropin action as autocrine or paracrine regulators. Recent studies suggest that the cells of the immune system play important roles in regulating ovarian function, and the immune regulation of ovarian function has become one of the topics in the field of ovarian physiology. Since it has become clear that the immune factors, cytokines, show a wide range of biological functions, not only on immune cells but also on nonimmune cells, the physiological significance of the resident immune cells, the widespread distribution of which in mammalian ovaries has been known for a long time, has reattracted attention as a third kind of regulator of ovarian function. In this article, current knowledge of the regulatory roles of immune cells as well as the cytokines in ovarian physiology is reviewed.

Key words : cytokine, steroidogenesis, granulosa cell, interleukin-1, tumor necrosis factor

はじめに

卵胞の発育・成熟→排卵→黄体形成→黄体退行といった卵巣の周期的変化と、それに伴う性ステロイドの産生は、下垂体より分泌されるゴナドトロピン、プロラクチンにより endocrine regulation を受けていることは周知の事実であるが、近年こうしたゴナドトロピンの作用を卵巣レベルで修飾するステロイド性・非ステロイド性の paracrine and autocrine regulators の存在が知られるようになってきた。この卵巣内局所調節に携わる細胞として、卵胞を構成する顆粒膜細胞・莢膜細胞や黄体細胞といった卵巣細胞が当然挙げられるが、最近注目を集めているのが、免疫系細胞の関与である。本稿では、こうした免疫因子による卵巣機能調節に関する最近の知見を述べる。

1. 免疫系と卵巣との機能連関

以前より、自己免疫疾患において卵巣炎による卵巣機能不全をしばしば伴うことや、胸腺欠損マウスで卵巣形成不全・機能不全がおこることが知られており、また性ステロイドが免疫細胞機能に影響を与えることなどから、免疫系と卵巣との機能連関が示唆されていた。

2. 卵巣における免疫系細胞の分布

卵巣間質には、卵巣周期のあらゆる時期において単球/マクロファージ、リンパ球、顆粒球などが存在する¹⁾。とくにマクロファージは卵巣間質に数多く存在し、その突起により卵巣細胞と接触している像も観察される。退行黄体においては、マクロファージは変性した黄体細胞の貪食に携わっていると考えられてきた。卵胞については、その発育の初期段階では単球/マクロファージ以外の免疫系細胞は卵胞内には出現しない。しかし排卵前卵胞あるいは閉鎖卵胞には免疫系細胞が急速に流入する。排卵前卵胞において最も早く出現する免疫系細胞は肥満細胞 (mast cell) である。排卵現象は一種の炎症反応と考えられ、肥満細胞が LH サージによって脱顆粒をおこし、ヒスタミンを遊離することが排卵現象の引金になると考えられている。同時に排卵前卵胞や形成期黄体からは、好中球をはじめとする炎症細胞に対する遊走刺激因子が分泌され、そのシグナルにより集まる種々の免疫系細胞が排卵や黄体形成、黄体機能維持に重要な役割を果たしている可能性がある。

3. 実験モデルとしての顆粒膜細胞培養系について

卵巣内局所調節機構の実験モデルとして、卵胞の内層を構成するステロイド産生細胞である顆粒膜細胞の培養系がしばしば用いられる。顆粒膜細胞は卵胞発育に伴って活発に増殖すると同時に、FSH、次いで LH に対する感受性を獲得して機能的に成熟していく。LH サージの発来により機能的成熟をはば完了し、排卵後には黄体細胞 (顆粒膜黄体細胞) へと形態的变化を遂げる。こうした増殖と分化のさまざまな局面を *in vitro* においても再現することが可能である。とくにブタでは、大きさの異なる卵胞 (小・中・大) より、FSH レセプターのみ獲得した未成熟な細胞、LH レセプターも獲得した細胞、LH サージ後の成熟細胞という、成熟度の異なる顆粒膜細胞を選別して採取することが可能である。また、体外授精の採卵時に卵とともに得られるヒト顆粒膜細胞は、自然周期の LH サージに相当する hCG 投与から約36時間後に採取されることから、ブタ大卵胞由来の顆粒膜細胞同様、黄体形成期の顆粒膜黄体細胞に近い機能を有していると考えられる。

4. 免疫系細胞による卵巣細胞の機能調節 (*in vitro*)

本来免疫担当細胞であるマクロファージが *in vitro* において、卵巣細胞のステロイド産生に影響をおよぼすことを最初に報告したのは、Kirsch ら (1981)²⁾ である。彼らはマクロファージとの co-culture により、マウス黄体細胞のプロゲステロン産生が亢進すると報告した。この刺激にはマクロファージと卵巣細胞との接触が必要であり、そのシグナル伝達物質はマクロファージ細胞膜上に存在し、Concanavalin A (Con A) 刺激により培養液中に放出される蛋白と考えられた。ヒト黄体化顆粒膜細胞の培養系においても、同様のマクロファージ/単球によるプロゲステロン産生刺激作用が報告されている。一方、著者らの実験では単球による影響は追試しえず、対照的にリンパ球とヒト黄体化顆粒膜細胞との co-culture で、プロゲステロンの産生亢進がみられた³⁾。またマイトジェンで刺激したリンパ球の培養上清中には、ヒト黄体化顆粒膜細胞のプロゲステロン産生 (hCG 刺激時・非刺激時とも) を抑制する因子が検出されるとの報告もある。ブタあるいはラット顆粒膜細胞についても、免疫系細胞あるいはその培養上清によるステロイド産生への影響がいくつか報告されているが、species や Con A 刺激の有無、あるいは顆粒膜細胞の成熟度等の実験条件によりその影響 (作用様式) はさまざまではある。

5. サイトカインによる卵巣細胞の機能調節

上記のような、免疫系細胞による卵巣細胞機能調節のシグナル伝達には、おそらく多くの因子 (未知のものを含む) が関与していると思われる。近年、免疫系のシグナル伝達物質であるサイト

カインが免疫系のみならず、卵巣細胞を含む様々な組織あるいは細胞に対し、広汎な生物作用を示すことがあきらかとなり、卵巣における局所調節因子としての存在意義が注目を集めている。種々のサイトカインの同定や recombinant のサイトカインの開発とあいまって、サイトカインによる in vitro での卵巣機能調節に関する知見が集積しつつある。また、マクロファージはサイトカイン以外に、 $\text{TGF-}\alpha$ ・ $\text{TGF-}\beta$ ・PDGF・EGF・FGF・IGF-1などの細胞増殖因子を分泌することが知られており⁴⁾、これらの因子は卵巣細胞の増殖と分化に対してさまざまな影響をおよぼすところから、マクロファージによる卵巣細胞の機能調節は、サイトカインのみならず細胞増殖因子をも介している可能性がある⁵⁾。

既知のサイトカインのうちとくに注目されているのは、マクロファージ由来のインターロイキン 1 (IL-1) と腫瘍壊死因子 (TNF- α) である。

表1. 培養ブタ顆粒膜細胞に対する LL-1 の作用

A. 増殖促進 ^{*1}
1.細胞数増加
2.[³ H] thymidine incorporation
TNF・細胞増殖因子 (EGF・FGF・insulin) と相乗作用あり
B. FSH による分化 (1-4) 抑制 ^{*2}
1. aromatase 活性誘導
2. LH receptor 誘導
3. progesterone 産生
4. cAMP 産生
C. LH による分化 (黄体化) 抑制 ^{*3}
1. 形態的黄体化
2. 機能的黄体化 (progesterone 産生)
(機序)
1. cAMP 産生抑制
2. LH receptor 数減少
3. adenylate cyclase 活性阻害
D. Progesterone 基礎分泌抑制 ^{*1}

* 1 小・中卵胞由来の顆粒膜細胞でみとめられ、大卵胞由来の成熟顆粒膜細胞ではみとめられない作用

* 2 小卵胞由来の顆粒膜細胞でのデータ

* 3 中卵胞由来の顆粒膜細胞でのデータ

1) インターロイキン 1 (IL-1)

正常月経周期婦人の血中 IL-1 活性が卵胞期より黄体期に高いことは以前から知られており⁶⁾、卵巣機能と IL-1 活性との関連が示唆されていた。単球/マクロファージの IL-1 産生能は性ステロイ

ドにより影響を受ける⁷⁾。プロゲステロン $10^{-9} \sim 10^{-8} \text{M}$, エストラジオール $10^{-10} \sim 10^{-9} \text{M}$ という比較的低濃度の刺激でヒト単球の IL-1 産生は亢進し, より高濃度では逆に抑制される。単球/マクロファージのリポポリサッカライド (LPS) 刺激による IL-1 β mRNA の発現も, プロゲステロン・エストラジオール濃度の上昇に伴い抑制される。また, 体外授精時に採取したヒト卵胞液中には, かなり高い IL-1 活性がみとめられ⁸⁾, その産生源は顆粒膜細胞ではないかと考えられている。

in vitro における, IL-1 のブタ顆粒膜細胞に対する作用を表1に挙げた。IL-1 は未熟な顆粒膜細胞の増殖を促進し⁹⁾, FSH による分化誘導を抑制する¹⁰⁾とともに, LH 添加による形態的黄体化(線維芽細胞様の細い形態から, 黄体細胞に類似した, 細胞質内に顆粒や脂肪滴を集積した上皮細胞様形態への変化)と機能的黄体化(プロゲステロン産生の著明な増加)をも抑制する¹¹⁾。そのメカニズムについては, LH レセプター数を減少させるとともに, adenylate cyclase に対しても直接的な抑制作用をおよぼすためと考えられる¹²⁾。一方, cAMP による A キナーゼの活性化からプロゲステロン産生に至るステップについては, 有意な影響をおよぼさない。また, IL-1 は種々の組織において, プロスタグランディン (PG) の産生を刺激することが知られており, PGF $_2\alpha$ は IL-1 同様に LH による顆粒膜細胞の黄体化を抑制するが, PG 産生の抑制物質であるインドメサシンの大量添加によっても IL-1 の抑制作用は影響を受けないことから, 黄体化に対する IL-1 の作用は PG を介したものではないと考えられる。

ラット顆粒膜細胞に対しても IL-1 は, FSH 刺激時のエストラジオール, プロゲステロン産生, LH レセプターの誘導を抑制することが報告されている。またプロゲステロンの代謝産物である 20 α -OH-P の産生を増加させるところから, IL-1 によるプロゲステロン分泌の減少は, 少なくとも部分的にはその代謝亢進による可能性がある。なお, 2種類の IL-1, IL-1 α と IL-1 β の抑制作用について, ラットの顆粒膜細胞培養系では, IL-1 β の方がより少ない濃度で有効であると報告されているが, ブタの系では IL-1 α と IL-1 β の効力に差はみとめられない。

卵胞の外層を構成する英膜細胞に対する IL-1 の作用については, ラットとハムスターで相反する報告がなされている。ラットでは LH/hCG 刺激によるアンドロゲン産生を抑制すると報告されているのに対し, ハムスターでは卵胞の器官培養, 英膜細胞の培養系において IL-1 はプロゲステロン・テストステロンの産生を促進すると報告されている。

ヒト黄体化顆粒膜細胞のプロゲステロン分泌に対しては, in vitro で hCG を添加してプロゲステロン分泌能を維持した場合は, ブタの大卵胞由来の顆粒膜細胞に対する作用同様, IL-1 は影響をおよぼさない¹³⁾。これに対し, hCG 非添加時の基礎プロゲステロン分泌に対しては, 促進的影響をおよぼす。一方, FSH 刺激時のエストラジオール分泌に対しては, IL-1 は抑制作用を示す。

2) 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α)

卵巣における TNF- α の役割は, 黄体退行への関与と考えられてきた。黄体退行期にはマクロファージが著明に増加し, また退行期の黄体組織は in vitro において, LPS 添加により容易に TNF を産生すること¹⁴⁾から, マクロファージより産生された TNF- α が黄体の退行に関与している可能性が指摘されている。一方, 免疫組織化学的手法により, ラット・ウシ顆粒膜細胞からも TNF- α が産生されるという報告がなされ, また体外授精の際に得られたヒト黄体化顆粒膜細胞の培養液中にも TNF- α が検出されると報告されている。

ブタ顆粒膜細胞上には高親和性の TNF- α レセプターが存在し, そのレセプター数は FSH とインスリンの同時添加により増加すると報告されている¹⁵⁾。ラットの顆粒膜細胞培養系において, T

NF- α はFSH刺激によるプロゲステロン・エストラジオール産生, LHレセプターの誘導や種々のステロイド合成酵素活性を抑制する¹⁶⁾。FSH作用抑制の機序としては, FSHのレセプターへの結合により活性化されるadenylate cyclase活性に対する阻害作用によると考えられている。ラット卵胞の器官培養系においてTNFは, 発育卵胞・閉鎖卵胞いずれに対しても, プレグネノロン・プロゲステロン・ 20α -OH-P・ 17α -OH-Pの産生を亢進させる。この卵胞ステロイド産生に対するTNF- α の促進作用は莢膜細胞を標的としたものであり, 実際分離した莢膜細胞に対してTNF- α は同様の促進作用を示す。ヒト黄体化顆粒膜細胞のステロイド産生に対するTNF- α の影響は, IL-1と全く同様である¹³⁾。

3) インターフェロン (IFN)

IFN α は正常月経周期婦人へのin vivo投与により, ゴナドトロピン分泌には影響せずに, 卵胞期から排卵期のエストラジオール分泌と黄体期のプロゲステロン分泌を低下させると報告されている¹⁷⁾。ヒト卵胞液中にはIFN活性(10-36U/ml)が検出され, その活性はIFN γ に対する抗体で80%, IFN α に対する抗体で20%中和された¹⁸⁾。また, 自己免疫疾患に合併した早発卵巣不全(premature ovarian failure)においては, 顆粒膜細胞にクラスIIタイプの組織適合抗原が発現するが, in vitroにおいてIFN γ によりヒト顆粒膜細胞にクラスII抗原が誘導され, クラスI抗原も増加する¹⁹⁾ところから, IFN γ が自己免疫による卵巣機能不全の発生に関与している可能性が指摘されている。

ラットの顆粒膜細胞培養系において, IFN- γ はFSH刺激時のプロゲステロン, 20α -OH-P, エストラジオール, LH/hCGレセプターの誘導を抑制すると報告されている¹⁹⁾。ブタの未成熟な顆粒膜細胞の培養系では, ヒトIFN- α 添加により, FSH刺激時のプロゲステロン産生は抑制されるが, IL-1と異なり, エストラジオール産生(テストステロンからエストラジオールへの変換)は逆に増加する²⁰⁾。また, IFNは, 他の多くの腫瘍・非腫瘍性細胞に対する影響同様, 未熟なブタ顆粒膜細胞の増殖を抑制する²⁰⁾。ヒト黄体化顆粒膜細胞培養系においては, IFNはIL-1・TNFと異なり, LH/hCG刺激時のプロゲステロン産生を抑制する¹³⁾。このIFNの抑制作用は $\alpha\beta\gamma$ いずれのIFNでもみられるが, IFN γ が最も強力である。プロゲステロン基礎分泌, FSH刺激によるエストラジオール産生に対しても, IFN γ はやはり抑制作用を示す。

4) その他のサイトカイン

ラット顆粒膜細胞培養系において, インターロイキン2(IL-2)はFSH刺激時のプロゲステロン・ 20α -OH-Pの産生を促進し, ヒト黄体化顆粒膜細胞に対してはhCG刺激時のプロゲステロン産生を抑制するとの報告もあるが, こうした影響がみられないという否定的データもあり, 議論が分かれている。IL-3については, ラット顆粒膜細胞培養系において, 見かけ上プロゲステロン産生には影響しないが, 20α -OH-Pの産生を亢進させるとの報告がある。ブタ顆粒膜細胞のLH刺激時のプロゲステロン産生に対する種々のサイトカインの影響を比較検討した結果, IL-1・TNF・IFNが濃度依存的抑制作用を示したのに対し, IL-3・IL-6では100ng/mlという高濃度ではじめて有意な抑制効果が得られ, IL-2・G-CSF・M-CSFでは影響をみとめなかった(図1)。

おわりに

免疫系による卵巣機能調節について, in vitroでのデータを中心に, 現在得られている知見を述べた。免疫系はサイトカインや他のペプチドを介して卵巣細胞の機能調節に関与するとともに, 免疫系もまたステロイドホルモン等を介して卵巣細胞による機能調節を受けている可能性がある⁹⁾。

またサイトカインは視床下部からの GnRH 分泌や下垂体からのゴナドトロピン分泌にも影響をおよぼすことが知られており, こうした間接的作用により卵巣機能調節に関与している可能性もある。卵巣細胞機能に対する免疫系細胞やサイトカインの影響は多彩であり, in vitro においてサイトカイン同志あるいはサイトカインと細胞増殖因子との相互作用もみられる⁹⁾ところから, 免疫系による性腺機能調節機構は, まだ同定されていない未知のサイトカインを含めた複雑なネットワークを形成している可能性が大きい。今後の研究が待たれるところである。

図1. ブタ顆粒膜細胞培養系における LH 刺激時のプロゲステロン産生に対する種々のサイトカインの影響

文 献

- 1) Adashi EY: The potential relevance of cytokines and growth factors to ovarian physiology: the emerging role of resident ovarian cells of the white blood cell series. *Endocr Rev* 1990; 11: 454—464
- 2) Kirsch TM, Friedman AC, Vogel RL, Flickinger GL: Macrophages in corpora lutea of mice: characterization and effects on steroid secretion. *Biol Reprod* 1981; 25: 629—638
- 3) Emi N, Kanzaki H, Yoshida M, et al.: Lymphocytes stimulate progesterone production by cultured human granulosa luteal cells. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 1469—1474
- 4) Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z: Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science* 1988; 241: 708
- 5) Mori T: Immuno-endocrinology of cyclic ovarian function. *Am J Reprod Immunol* 1990; 23: 80—89
- 6) Cannon JG, Dinarello CA: Increased plasma interleukin-1 activity in women after ovulation. *Science* 1985; 227: 1247—1249
- 7) Polan ML, Daniele A, Kuo A: Gonadal steroids modulate human monocyte interleukin-1 (IL-1) activity. *Fertil Steril* 1988; 49: 964—968

- 8) Khan SA, Schmidt K, Hallin P, Di Pauli R, De Geyter C, Nieschlag E: Human testis cytosol and ovarian follicular fluid contain high amounts of interleukin-1-like factor(s). *Mol Cell Endocrinol* 1988; 58: 221—230
- 9) Fukuoka M, Yasuda K, Taii S, Mori T: Synergistic actions of cytokines and growth factors in enhancing porcine granulosa cell growth. *Endocrinol Jpn* 1992; 39: 277—288
- 10) Yasuda K, Fukuoka M, Taii S, Takakura K, Mori T: Inhibitory effects of interleukin-1 on follicle-stimulating hormone induction of aromatase activity, progesterone secretion, and functional luteinizing hormone receptors in cultures of porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 1990; 43: 905—912
- 11) Fukuoka M, Mori T, Taii S, Yasuda K: Interleukin-1 inhibits luteinization of porcine granulosa cells in culture. *Endocrinology* 1988; 122: 367—369
- 12) Fukuoka M, Taii S, Yasuda K, Takakura K, Mori T: Inhibitory effects of interleukin-1 on luteinizing hormone-stimulated adenosine 3',5'-monophosphate accumulation by cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology* 1989; 124: 884—890
- 13) Fukuoka M, Yasuda K, Emi N, et al.: Cytokine modulation of progesterone and estradiol secretion in cultures of luteinized human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 254—258
- 14) Bagavandoss P, Kunkel SL, Wiggins RC, Keyes PL: Tumor necrosis factor- α (TNF- α) production and localization of macrophages and T lymphocytes in the rabbit corpus luteum. *Endocrinology* 1988; 122: 1185—1187
- 15) Veldhuis JD, Garmey JC, Urban RJ, Demers LM, Aggarwal BB: Ovarian actions of tumor necrosis factor- α (TNF- α): pleiotropic effects of TNF α on differentiated functions of untransformed swine granulosa cells. *Endocrinology* 1991; 129: 641—648
- 16) Adashi EY, Resnick CE, Croft CS, Payne DW: Tumor necrosis factor α inhibits gonadotropin hormonal action in nontransformed ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 11591—11597
- 17) Kauppila A, Cantell K, Janne O, Kokko E, Vihko R: Serum sex steroid and peptide hormone concentrations, and endometrial estrogen and progestin receptor levels during administration of human leukocyte interferon. *Int J Cancer* 1982; 29: 291—294
- 18) Grasso G, Muscettola M, Traina V, Causio F, Fanizza G, Cagnazzo G: Presence of interferons in human follicular fluid after ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *Med Sci Res* 1988; 16: 167—168
- 19) Gorospe WC, Tachel T, Kasson BG: γ -interferon inhibits rat granulosa cell differentiation in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 891—897
- 20) Yasuda K, Fukuoka M, Fujiwara H, Mori T: Effects of interferon on the steroidogenic functions and proliferation of immature porcine granulosa cells in culture. *Biol Reprod* (in press)