

卵胞発育とアクチビン

誌名	Journal of mammalian ova research = 日本哺乳動物卵子学会誌
ISSN	13417738
著者名	松崎,利也 岩佐,武 山野,修司 苛原,稔
発行元	日本哺乳動物卵子学会
巻/号	24巻2号
掲載ページ	p. 50-56
発行年月	2007年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



—総説—

卵胞発育とアクチビン Follicular Growth and Activin

松崎 利也^{1*}・岩佐 武¹・山野 修司²・苛原 稔¹

Toshiya Matsuzaki^{1*}, Takeshi Iwasa¹, Shuji Yamano² and Minoru Irahara¹

¹徳島大学大学院女性医学 〒770-8503 徳島市

²徳島大学医学部保健学科 〒770-8503 徳島市

¹Department of Obstetrics and Gynecology, The University of Tokushima Graduate School, Institute of Health Biosciences and ²The University of Tokushima, Faculty of Health, 3-18-5 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan

要旨：卵胞発育は種々の因子により調節されている。アクチビン、インヒビンおよびフォリスタチンは下垂体、卵巣の局所においてそれぞれFSH分泌、卵胞発育を調節している。下垂体局所では、アクチビンBがFSHの分泌を促進し、またインヒビン、フォリスタチンも局所でアクチビンの作用を調節している。さらに卵巣の胞状卵胞から分泌されるインヒビンが、血液循環を介して下垂体のアクチビン作用を抑制することによりFSH分泌を低下させる。一方、卵巣局所では前胞状卵胞からアクチビンが発現し、その作用により顆粒膜細胞にFSH-受容体が発現する。その結果、前胞状卵胞はFSH依存性の発育を開始する。卵胞の発育に伴い、インヒビンA、フォリスタチンの発現が高まり局所のアクチビン活性は抑制される。このように、アクチビンは末梢、中枢の両面から前胞状卵胞以降の発育を調節し、FSH依存度の高い発育の遅れた卵胞を閉鎖させ生理的な卵胞発育を起こす。

キーワード：アクチビン、インヒビン、フォリスタチン、卵胞発育、FSH

Abstract: Growth of preantral follicles is mainly controlled by gonadotropins. Activin stimulates synthesis of FSH at the pituitary gland, and on the other hand inhibin which is secreted by antral follicles is transferred to the pituitary gland, and the complex of inhibin and TGF β -receptor type III inhibits the function of Activin receptors, resulting in a decrease of pituitary FSH secretion. In folliculogenesis, a strong expression of activin mRNA is observed from the preantral follicle stage and Activin induces expression of FSH-R mRNA on granulosa cells of preantral follicles. Thereafter the follicles grow in a FSH-dependent manner. As the follicles grow larger, the activin-rich follicular environment changes to inhibin/follistatin-rich. The inhibin/follistatin-rich environment with decreases of FSH- and Activin-requirement on development of larger follicles would suppress development of smaller follicles in ovary through suppression of FSH secretion. Activin, inhibin and follistatin possibly play an important role in regulating physiological follicular development.

Key words: Activin, Inhibin, Follistatin, Follicular growth, FSH

はじめに

卵胞の発育は、視床下部－下垂体系からの内分泌的な調節と、卵巣内の局所因子による調節を受けている。前胞状卵

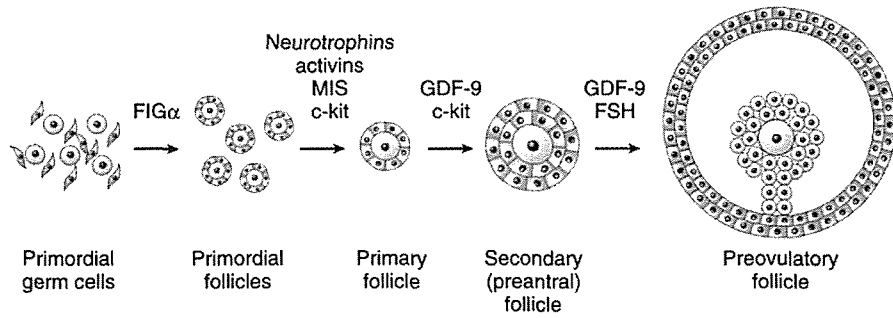
胞に至るまでの卵胞発育はゴナドトロピン非依存性に起きているが、その制御機構は未解明の部分が多く残されており、多くの因子が関与している(図1)¹⁾。前胞状卵胞がゴナドトロピンに対する感受性を獲得した後は、卵胞発育に応じて中枢からの制御と卵巣での局所調節が互いに影響を及ぼしながら働き、月経周期を形成する。この過程には卵胞に発現するインヒビン、アクチビン、フォリスタチンが関与していることが明らかになっている。

(受付 2007年3月9日/受理 2007年3月18日)

別刷請求先：〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町3丁目18-15
徳島大学大学院女性医学

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: mat@clin.med.tokushima-u.ac.jp



(Strauss III, J.F. and Williams, C.J., 2004¹⁾)

図1 卵胞の発育を調節する因子

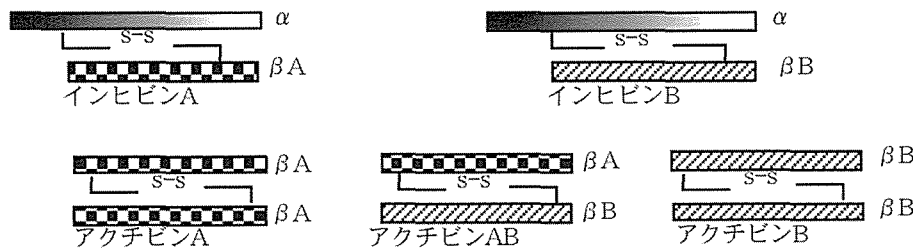


図2 インヒビンとアクチビンの構造。インヒビンとアクチビンは α と β サブユニットのダイマーであり、インヒビンのみが α サブユニットを持つヘテロダイマーである。また、 β サブユニットの種類の違いによる複数の分子が存在する。

インヒビン、アクチビン、フォリスタチンの歴史

1932年にMcCullaghは、去勢したラットの下垂体に大型の去勢細胞が出現すること、また、精巢の水溶性抽出物を投与すると去勢細胞は出現しないことを示し、精巢に下垂体機能を抑制するステロイド以外の物質、インヒビンが存在することを提唱した。その後、1976年に卵胞液中にもインヒビン様物質が存在することが報告され²⁾、1985年にはラット下垂体培養細胞を用いたFSH分泌抑制作用を指標として、ブタ卵胞液中からインヒビンが純化精製された³⁾。その翌年1986年に、ValeとLingの2グループが卵胞液からインヒビンを精製する過程でFSH分泌を促進する物質アクチビンを単離した。フォリスタチンは1987年にインヒビンの精製過程でブタ卵胞液から単離された⁴⁾。FSH分泌抑制活性がインヒビンの5～20%と低かったために当初はあまり注目されなかったが、杉野らのグループがアクチビン受容体の精製過程で見いだしたアクチビンに高い親和性を持つ因子がフォリスタチンであることを証明し、フォリスタチンがアクチビン結合蛋白であることが明らかになった⁵⁾。

インヒビン、アクチビン、フォリスタチンの構造

インヒビンとアクチビンは、ともに2つのサブユニット

が1つのジスルフィド結合により架橋された2量体(ダイマー)で、2本鎖の糖タンパク質である。インヒビンは18kDの α サブユニットと14kDの β サブユニットからなる分子量32kDのヘテロダイマー、アクチビンは β サブユニット同士からなるホモダイマーである。 β サブユニットには相同性の高い複数のサブユニット、 $\beta A \sim \beta E$ が存在するため、インヒビン、アクチビンにも多数のタイプが存在する。代表的な組み合わせを図2に示す。 α 鎖、 β 鎖ともに、成長因子のTGF- β と構造が類似し7つのシステイン残基をもち、2つのサブユニットが1つのジスルフィド結合でつながったTGF- β スーパーファミリーに特徴的な構造を持つ。アクチビン、インヒビンはTGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子に分類されている。

一方、フォリスタチンは分子量約35,000の1本鎖の糖蛋白であり、いくつかの分子種がある。例えば、ブタ卵胞液中にはアミノ酸残基の数から、FS288、FS303、FS315の3種の分子種が存在する⁶⁾。フォリスタチンの遺伝子は6つのエクソンにコードされており、スプライシングの違いによって長さの異なる2種類のmRNAが作られ、315個のアミノ酸残基からなるFS315と288個からなるFS288の2種類の分子種が形成される。翻訳後にFS315のC端がプロテアーゼによるプロセッシングを受けるとFS303が形成される。そ

表1 アクチビンの生理作用

卵巣	: 顆粒膜細胞のFSH受容体発現促進, アロマターゼ活性促進
精巣	: セロトリ細胞の精子形成を促進
造血系	: 前赤芽球系細胞の分化誘導作用 アクチビンによりコミットメント(分化の開始決定)される. その後, エリスロポエチン存在下では赤血球への分化, エリスロポエチン非存在下ではアポトーシスにより排除される
下垂体	: FSH産生を促進 プロラクチン分泌を抑制 ソマトトロフの増殖を抑制, 成長ホルモンの分泌を抑制
膵臓	: ランゲルハンス島細胞からのインスリン分泌を促進
肝臓	: 肝細胞でのグリコーゲン分解を促進しグルコースを放出(ラット), 肝細胞の増殖を抑制
胎盤	: GnRH, プロゲステロンの分泌を促進(ヒト)
骨	: 骨形成に関与
血管	: TGF- β とともに血管内皮細胞の増殖を調節していることが示唆されている
胚発生	: 中胚葉誘導(アフリカツメガエル初期胚)

の上, 糖鎖の付加部位が2カ所あるため, 結合する糖鎖の数の違いによってもサイズの異なる複数の分子種ができる。

アクチビン, フォリスタチン, インヒビンの作用機序

アクチビンは広範囲の組織に発現し, 臓器ごとに異なる生理作用を持つ(表1)。アクチビンはパラクライン/オートクラインにより作用する局所調節因子である。アクチビンII型受容体は1991年にTGF- β スーパーファミリーの受容体の中で初めてクローニングされた。II型受容体は513個のアミノ酸残基からなり, 細胞内にセリン・スレオニンキナーゼ構造をもつ膜1回貫通型の受容体であり, 恒常的にリン酸化されている。まずアクチビンがII型受容体と結合すると, そこへI型受容体が結合してI型とII型がヘテロ複合体を形成し, II型のキナーゼがI型をリン酸化することで細胞内へのシグナル伝達が始まる。受容体から核までの情報伝達はSmadsにより行われる。SmadsはTGF- β スーパーファミリーの細胞内伝達を担う一群の蛋白で, 哺乳類ではSmad1からSmad8が報告されている。アクチビンの場合は, 受容体との結合により細胞内情報伝達物質であるR-SmadのうちSmad2/3がリン酸化される。Smad2/3はコメディエータSmad(co-Smad)のSmad4とヘテロ二量体を形成する。このSmad複合体が核内に移行して標的遺伝子の転写調節領域に結合し, 転写因子としてその発現を調節する。またこのシグナル伝達系には抑制型Smad(I-Smad)のSmad7による細胞内のネガティブフィードバックが存在する。

フォリスタチンは β 鎖と結合する部位を持ち, β 鎖ダイマーのアクチビンとは2対1のモル比で結合する。フォリスタチンとアクチビンの結合は速やかかつ強力で, ほぼ不可逆的である。フォリスタチンと結合したアクチビンは, アクチビン受容体に結合することができないため, フォリスタ

チンはアクチビンの作用を中和する役割を担っている。

インヒビンには, 細胞内にシグナル伝達をおこす固有の受容体が見いだされていない。インヒビンはTGF β III型受容体(ベータグリカン)に結合し, その複合体がアクチビンII型受容体と結合することで, アクチビンの受容体との結合を阻害すると考えられ, また同様の機序でアクチビン阻害作用を発揮するインヒビン結合タンパクの存在も報告されている。インヒビンがアクチビンII型受容体に弱い親和性で結合し, アクチビンとの結合を阻害することも阻害作用に寄与していると考えられる。インヒビンはアクチビンの作用に拮抗するが, 明確な固有の作用はほとんどない。

アクチビンによるFSH分泌調節機構

下垂体にはアクチビン/インヒビンの α および β Bサブユニットが発現し⁷⁾, それらの蛋白はゴナドトロフに局在している⁸⁾。アクチビンはFSHの産生を促進し, インヒビンは抑制する。インヒビンのFSH分泌抑制作用は, 下垂体に恒常的に発現するアクチビンのパラクライン/オートクラインによるFSH分泌促進作用に拮抗するものと考えられる。月経周期内で, 発育卵胞の顆粒膜細胞から分泌されるインヒビンは, 血液循環を介して内分泌的に下垂体へ作用しFSH分泌を調節している。なお, アクチビンも血中に存在するが, 全てフォリスタチンと結合して活性が中和されているため, 血液循環を介した作用は存在しない⁹⁾。

ラット下垂体にフォリスタチンmRNAが発現し性周期内で変動している¹⁰⁾。ラット下垂体細胞培養系で, フォリスタチン抗体の添加によりアクチビンによるFSH分泌が促進される。マウス下垂体から樹立されたL β T2細胞は, アクチビンBのオートクライン/パラクライン作用がFSH分泌を調節しているが, MellonらはL β T2細胞の培養細胞にフォリ

表2 ヒトの卵胞発育に伴うインヒビン, アクチビン, フォリスタチンの発現

	α	βA	βB	FS
Primordial or preantral follicle		(-)	(+)	(+)
Antral follicle	++++ (+)	++ (+)	++++ (+)	+
Dominant follicle	++++ (+)	++ (+)	-	++ (+)

in situ hybridization による半定量¹³⁾, ()内は免疫組織化学¹²⁾.

スタチンを添加して FSH β mRNA の発現が低下したことを報告し, フォリスタチンによる FSH 分泌調節機構の存在を示唆している. さらに, 下垂体細胞培養系でフォリスタチンの添加で GnRH 受容体が低下することから, アクチビンが GnRH 受容体の発現を促進して FSH 分泌を促進していることも示唆されている. 一方, ヒツジにおいてアクチビン受容体 mRNA の発現量が血中 FSH 濃度の高い時期に高く¹¹⁾, ベータグリカンのペプチド量がインヒビン濃度, FSH 濃度と関連して変動することが示されている¹²⁾.

以上のように, 卵巣由来のインヒビンが下垂体に存在するアクチビン B のオートクライン/パラクライン作用を抑制することが FSH 分泌調節の主要な機序であり, さらに, ゴナドトロフ内のフォリスタチン, アクチビン受容体, ベータグリカン, インヒビン B の変動も FSH の分泌に関与していると推察される.

アクチビンと卵胞発育

卵巣においてアクチビンは 2 次卵胞以降の特定の発育段階の卵胞に促進的に作用する. FSH 受容体のノックアウトマウスでは, 卵胞は前胞状卵胞の段階で発育が止まることが報告されており¹³⁾, 卵胞の発育に FSH の作用は不可欠であるが, アクチビンは顆粒膜細胞培養系で FSH 受容体の発現を促進し, FSH による LH 受容体発現促進作用も促進する. 我々の行ったマウス前胞状卵胞を用いた *in vitro* follicle culture による検討でも, アクチビンは前胞状卵胞の顆粒膜細胞における FSH 受容体の発現を促進すると共に卵胞の発育を卵胞サイズ, 形態変化共に促進し, 前胞状卵胞の発育開始時に限定して作用した. インヒビンとフォリスタチンは細胞内からのオートクライン作用としてはアクチビンの作用に拮抗していると考えられるが, *in vitro* で培養系に投与した場合には拮抗作用が明らかでなく, 他臓器で産生されたインヒビン, フォリスタチンが卵胞発育へ影響を与えることはない.

ヒトの卵胞発育に伴うインヒビン, アクチビン, フォリスタチンの発現は, 免疫組織化学, *in situ* hybridization で検討されている (表 2)^{14, 15)}. 各サブユニットは莢膜細胞にはほとんど染色が見られず, 顆粒膜細胞には明瞭な染色が見られる. α サブユニットは卵胞期中期の卵胞から染色が見られ, 排卵前期に最も強い. このことは, インヒビンの発現が卵胞発育に伴い発現が高まることを意味している. β サブユ

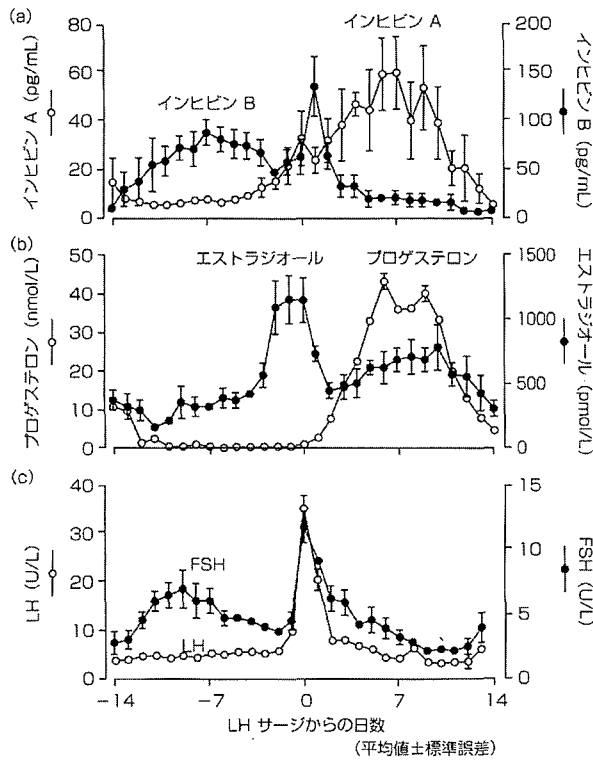
ニットに関しては, βA , βB ともに, mRNA の発現が卵胞が発育するにつれ低下する. 概して, 卵胞発育の初期にはアクチビンが優位で, 発育に伴いインヒビン, フォリスタチン優位な環境に移行すると結論づけられる¹⁶⁾. また, Schneyer らも卵胞穿刺液中のホルモン濃度, 各因子の mRNA の発現の検討から, 卵胞発育が進むにつれ, 卵胞内はアクチビン B 優位な環境から, インヒビン B, 次いでインヒビン A, フォリスタチン優位な環境に推移することを示している^{17, 18)}.

以上を総合すると, 前胞状卵胞から胞状卵胞初期の小さい卵胞では, アクチビンが強く発現して顆粒膜細胞に FSH 受容体を発現させることで卵胞の発育が促進され, FSH 依存度が低下する大きい卵胞ではアクチビンの必要性も低下し, 自らフォリスタチンやインヒビン A を分泌することによりアクチビンの作用を抑制し, その結果, 卵巣内の非主席卵胞の発育を抑制することが示唆される. この卵胞内の変化が, 卵胞の発育と選択に重要な役割を担っていると考えられる. なお, この他にも TGF- β ファミリーの各因子が卵胞発育に作用していることが知られている¹⁹⁾.

正常月経周期における血中インヒビン濃度の変動

月経周期内には, 卵巣由来の性ステロイドホルモン, インヒビン B, インヒビン A の血中濃度の変動する (図 3)²⁰⁾. 血中インヒビン B は, 卵胞期中期に高値を示した後に徐々に低下し, 排卵期に一時的に低いピークを作った後, 黄体期に低下する. 一方, 血中インヒビン A は, 卵胞期後期に上昇し, 排卵期にピークを示し, 黄体期中期に再びピークを示す. Welt は手術摘出されたヒト卵巣を用いた研究から, インヒビン B は前胞状卵胞と胞状卵胞の両者から分泌され, インヒビン A は前胞状卵胞から分泌されず胞状卵胞から分泌されることを報告している²¹⁾. インヒビン B は顆粒膜細胞におけるハウスキーピングジーン的な物質であり, 血中インヒビン B 濃度は顆粒膜細胞の総数, すなわち臨床的にはゴナドトロピン依存性に発育を開始した中小の発育卵胞の数と大きさを反映する. インヒビン A の産生源は主席卵胞および黄体であり, 卵胞の成熟, 排卵, 黄体の成熟と退行を反映している. また, 血中総フォリスタチンの月経周期内での変動は少なく, また, 血中ではフォリスタチンの 90% 以上がアクチビンと結合した形で存在する.

下垂体のゴナドトロフは, アクチビン B のパラクライン/オートクライン作用により FSH を分泌しているが, 血中に



(Groome, N.P. ら²⁰⁾)

図3 月経周期内の各種ホルモンの血中濃度の変動, 卵巣由来のインヒビンの血中濃度は月経周期内で変動する. これは, 卵巣における卵胞発育を反映し, インヒビンの情報に基づき下垂体のFSH分泌が調節される.

存在する卵巣由来のインヒビンがその作用を強力に抑制し, 下垂体からのFSH分泌を抑制する(図4). このように卵巣由来のインヒビンB, 次いでインヒビンAによるネガティブフィードバック作用で血中FSH濃度が低下すると, 卵巣ではFSHに依存度の高い次席以下の卵胞が閉鎖に向かうことになる.

アクチビン作用に関連する因子の ノックアウト動物, トランスジェニック動物

アクチビン, インヒビンに関する因子のノックアウトマウス, トランスジェニックマウスは, FSHの分泌と卵胞の発育に影響が出ることが考えられる. インヒビン α サブユニットのノックアウトマウスでは血中FSH濃度が高く, アクチビンII型受容体のノックアウトマウスではFSH濃度が低い. また, アクチビンII型受容体のノックアウトマウスでは初期の胞状卵胞で発育が停止している²²⁾. フォリスタチンのトランスジェニックマウスでは, 血中FSHについて低値の個体と正常の個体があるが, 雌雄とも不妊となり, 雌では卵巣と子宮が萎縮し卵胞発育が種々の段階で止まっている²³⁾. フォリスタチンと同様にアクチビンと結合してその作用を中和する物質にFLSL-3 (follistatin-like 3)があるが, FLSL-3のトランスジェニックマウスにおいてもフォリスタチンのトランスジェニックマウスと同様に, 卵巣の萎縮とantral follicleの減少, 閉鎖卵胞の増加が見られる^{24, 25)}. これらは卵巣と下垂体において, アクチビンが卵胞の発育に重要な役割を担っていることを示している. また, フォリスタチンのノックアウトマウスは致死性であるため, 卵巣の所

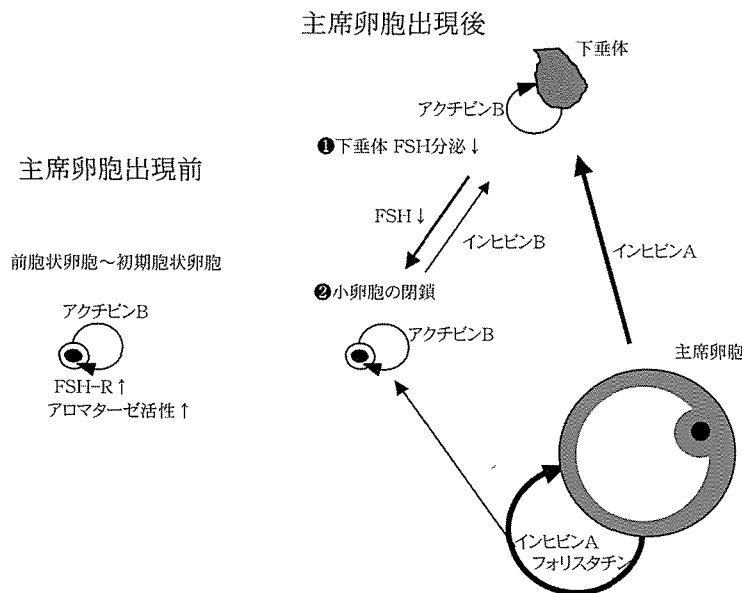


図4 卵胞発育とインヒビン, アクチビン, フォリスタチンの作用. 発育の進んだ卵胞ほどアクチビン作用を必要としない. 卵胞の発育に伴い, 卵胞内の環境はアクチビン優位からインヒビン, フォリスタチン優位に変わっていき, その結果, 卵巣局所と下垂体FSH分泌抑制を介して発育の遅れた卵胞の発育は抑制され, 一定の数の卵胞のみが成熟する.

見を解析することはできなかったが、フォリスタチンの卵巣顆粒膜細胞特異的ノックアウトマウスの卵巣所見が報告されている。このマウスは妊娠はするが、卵胞数、排卵個数が少なく、血中ゴナドトロピン濃度が高い。卵胞発育を促進するアクチビンの作用をフォリスタチンで抑制できない場合、卵胞個数がむしろ減少したことになり、さらに複雑な病態が考えられる²⁶⁾。

結 論

前胞状卵胞以降の発育には、アクチビンの作用が必要である。アクチビンは下垂体と卵巣のそれぞれで局所的に作用し、それぞれFSHの分泌とFSH受容体の発現を促進する。卵胞のゴナドトロピン依存性の発育に重要な役割を担っている。インヒビンとフォリスタチンは、アクチビンの作用を局所で抑制する作用を持ち、さらにインヒビンは卵胞発育の動的な情報を卵巣から下垂体に内分泌的に伝えることで、FSH分泌を抑制している。これらの作用により、生理的な卵胞発育が得られていると考えられ、またゴナドトロピン依存性の発育が月経周期に一致して起きる現象に深く関わっていると思われる。卵胞の発育機構が今後さらに解明され、排卵障害患者の排卵誘発における単一卵胞発育や、生殖補助医療における調節卵巣刺激に臨床応用されることを期待したい。

文 献

- 1) Strauss III, J.F. and Williams, C.J. (2004): The Ovarian Life Cycle. In: Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology (Strauss III, J.F. and Barbieri, R.L. eds.), pp. 213–253, Elsevier Inc., Philadelphia.
- 2) De Jong, F.H. and Sharpe, R.M. (1976): Evidence for inhibin-like activity in bovine follicular fluid. *Nature* 263, 71–72.
- 3) Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Fukuda, M., Nomura, M., Igarashi, M., Kangawa, K. and Matsuo, H. (1985): Isolation of porcine follicular fluid inhibin of 32K daltons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 129, 396–403.
- 4) Ueno, N., Ling, N., Ying, S.Y., Esch, F., Shimasaki, S. and Guillemin, R. (1987): Isolation and partial characterization of follistatin, a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 8282–8286.
- 5) Nakamura, T., Takio, K., Eto, Y., Shibai, H., Titani, K. and Sugino, H. (1990): Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science*, 247, 836–838.
- 6) Sugino, K., Kurosawa, N., Nakamura, T., Takio, K., Shimasaki, S., Ling, N., Titani, K. and Sugino, H. (1993): Molecular heterogeneity of follistatin, an activin binding protein: higher affinity of the carboxyl-terminal truncated forms for heparin sulfate proteoglycans on the ovarian granulosa cell. *J. Biol. Chem.*, 268, 15579–15587.
- 7) Bilezikjian, L., Vaughan, J. and Vale, W. (1993): Characterization and the regulation of inhibin/activin subunit proteins of cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology*, 133, 2545–2553.
- 8) Roberts, V.J., Peto, C.A., Vale, W. and Sawchenko, P.E. (1992): Inhibin/activin subunits are costored with FSH and LH in secretory granules of the rat anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology*, 56, 214–224.
- 9) Woodruff, T.K. (1998): Regulation of cellular and system function by activin. *Biochem. Pharmacol.*, 55, 953–963.
- 10) Halvorson, L.M., Weiss, J., Bauer-Dantoin, A.C. and Jameson, J.L. (1994): Dynamic regulation of pituitary follistatin messenger ribonucleic acids during the rat estrous cycle. *Endocrinology*, 134, 1247–1253.
- 11) Fafioffe, A., Ethier, J.F., Fontaine, J., Jean Pierre, E., Taragnat, C. and Dupont, J. (2004): Activin and inhibin receptor gene expression in the ewe pituitary throughout the oestrous cycle. *J. Endocrinol.*, 182, 55–68.
- 12) Chapman, S.C. and Woodruff, T.K. (2003): Betaglycan localization in the female rat pituitary: implications for the regulation of follicle-stimulating hormone by inhibin. *Endocrinology*, 144, 5640–5649.
- 13) Dierich, A., Sairam, M.R., Monaco, L., Fimia, G.M., Gansmuller, A., LeMeur, M. and Sassone-Corsi, P. (1998): Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 13612–13617.
- 14) Yamoto, M., Minami, S., Nakano, R. and Kobayashi, M. (1992): Immunohistochemical localization of inhibin/activin subunits in human ovarian follicles during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 74, 989–993.
- 15) Roberts, V.J., Barth, S., El-Roeiy, A. and Yen, S.S. (1993): Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 1402–1410.
- 16) Knight, P.G. and Glister, C. (2001): Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction*, 121, 503–512.
- 17) Schneyer, A.L., Fujiwara, T., Fox, J., Welt, C.K., Adams, J., Messerlian, G.M. and Taylor, A.E. (2000): Dynamic changes in the intrafollicular inhibin/activin/follistatin axis during human follicular development: relationship to circulating hormone concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 3319–3330.
- 18) Fujiwara, T., Sidis, Y., Welt, C., Lambert-Messerlian, G., Fox, J., Taylor, A. and Schneyer, A. (2001): Dynamics of inhibin subunit and follistatin mRNA during development of normal and polycystic ovary syndrome follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86, 4206–4215.

- 19) Knight, P.G. and Glister, C. (2006): TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, 132, 191–206.
- 20) Groome, N.P., Illingworth, P.J., O'Brien, M., Pai, R., Rodger, F.E., Mather, J.P. and McNeilly, A.S. (1996): Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81, 1401–1405.
- 21) Welt, C.K. and Schneyer, A.L. (2001): Differential regulation of inhibin B and inhibin a by follicle-stimulating hormone and local growth factors in human granulosa cells from small antral follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86, 330–336.
- 22) Matzuk, M.M. (2000): Revelations of ovarian follicle biology from gene knockout mice. *Mol. Cell Endocrinol.*, 163, 61–66.
- 23) Guo, Q., Kumar, T.R., Woodruff, T., Hadsell, L.A., DeMayo, F.J. and Matzuk, M.M. (1998): Overexpression of mouse follistatin causes reproductive defects in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.*, 12, 96–106.
- 24) Schneyer, A., Tortoriello, D., Sidis, Y., Keutmann, H., Matsuzaki, T. and Holmes, W. (2001): Follistatin-related protein (FSRP): a new member of the follistatin gene family. *Mol. Cell Endocrinol.*, 180, 33–38.
- 25) Xia, Y., Sidis, Y. and Schneyer, A. (2004): Overexpression of follistatin-like 3 in gonads causes defects in gonadal development and function in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.*, 18, 979–994.
- 26) Jorgez, C.J., Klysik, M., Jamin, S.P., Behringer, R.R. and Matzuk, M.M. (2004): Granulosa cell-specific inactivation of follistatin causes female fertility defects. *Mol. Endocrinol.*, 18, 953–967.