

平成21年 4月 3日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390425
 研究課題名（和文） ゴナドトロピン作用と卵成熟のメカニズム解明
 研究課題名（英文） Study for mechanism of gonadotropin action on follicular and oocyte maturation.
 研究代表者
 峯岸 敬（MINEGISHI TAKASHI）
 群馬大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：00209842

研究成果の概要：GRP78 は小胞体において蛋白が高次構造を獲得するのに関与している分子シャペロンである。LH レセプター(LHR)を恒常的に発現している細胞に GRP78 を発現させると LHR と GRP78 が結合し、更に GRP78 発現量依存的に LHR 発現が増加することを確認した。ヒト、ラットとも hCG 添加に伴い GRP78 promoter 活性の上昇がみられ、また hCG にエストロゲンを加えることで若干ではあるが更なる promoter 活性上昇がみられた。LH/hCG により GRP78 promoter 活性が変化し、LHR 発現調節に GRP78 が関与することを強く示唆する結果が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：生殖内分泌

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：LH-R、E₂、FSH-R、β-グリカン、TGF-β

1. 研究開始当初の背景

体外受精胚移植法ならびに顕微授精などの生殖補助医療技術の臨床応用が、不妊症治療に大いに貢献しているが、これらの技術を駆使しても、妊娠率の向上は十分でない。更なる妊娠率の向上のためには、生理的な受精のメカニズムの解明とその理論をもとにした生殖医療の技術進歩が必要である。受精と胚発生能力を保持する配偶子形成においては、雌雄の性腺における支持細胞と配偶子の相互作用が重要であり、相互作用を担う因子の

解析も進んでいる。

未成熟卵子を体外成熟培養して得られた MII 期卵子の受精や発生能力は排卵卵子に比べ劣っている。これは、核成熟の進行に伴い細胞質内に獲得されるはずの受精と胚発生に必要な機能が不十分であることを示している。さらに、体外成熟で得られた成熟卵の卵丘細胞の膨化は排卵卵子に比べ顕著に小さい。すなわち、体外培養卵子の低い受精と発生能力の一因として、成熟過程における卵丘細胞と卵子のコミュニケーションの不足な

ど、卵丘細胞膨化が関与している可能性が考えられている。このように、体外受精を用いた不妊治療において、卵細胞質の成熟が受精と胚発生に必要であると認識されているので、卵胞発育過程における卵細胞と体細胞の相互作用のメカニズムを解明し、受精後の発生能力の改善により、不妊症治療の向上が望める可能性がある。

2. 研究の目的

排卵直前の卵胞の構造を考えると、顆粒膜細胞には卵に接する卵丘細胞と卵胞壁の顆粒膜細胞とがあり、それぞれ機能が異なる。これは卵丘細胞には卵からの影響が強くあり、LH レセプターの発現が乏しいと報告されている。つまり、LH の作用は卵胞壁の顆粒膜細胞に作用し、そこから分泌される因子が、卵・卵丘細胞複合体に作用し、排卵、卵成熟の過程に進むと考えられる。ゴナドトロピンの作用が顆粒膜細胞を通して卵子にまで至るので、卵胞発育の各ステージで異なった局所因子による制御があり、FSH、LH によってそのステージに依存して分泌される因子を同定することが大切である。特に体外受精の臨床の場で多く使用されるのは、排卵誘起を体内で起こすことを目的として hCG を投与された後の卵と卵丘細胞複合体と顆粒膜細胞が採取されている。この状態を理解して、LH の作用メカニズムを検討する。LH の作用については、FSH によって発育した卵胞の排卵に主に作用すると考えられてきたが、下垂体除去ラットにリコンビナント FSH を投与することで排卵が起きるという報告以来、LH の特異的な作用に議論があった。しかし、ノックアウト (KO) マウスが実験に用いられるようになり、LH レセプター-KO ラットでは排卵しないことが示されて、LH の排卵における中心的作用が見直されている

(Mol. Endocrinol. 2005, 19(10):2591-2602)。我々はヒト LH レセプター cDNA をクローニングした際に、短いタイプ (LH-RS) の mRNA の存在を報告し、最近この蛋白発現が本来のレセプター蛋白の細胞内輸送に負の影響を与えることを示してきた。つまり、短いレセプターが細胞内で一定の割合で FSH-R または正常 LH-R と 2 量体を作り、細胞表面への発現を抑制することを示した (Mol. Endocrinol. 2004, 18(6):1461-70, Mol. Endocrinol. 2005, 19(8):2099-111)。この LH-RS は、スプライシングの相違が原因で exon9 が欠失し、更に、生理的な状態の卵胞から黄体に連続的に発現が確認されている。LH-RS の存在により、正常の LH-R の蛋白の細胞表面への移動が障害されるので、採取された顆粒膜細胞の LH-RS の発現量を測定し、受精能との関連を検討する。

3. 研究の方法

(1) LHR の発現と GRP78 の関係

先ず *in vitro* の実験系で、GRP78 が rLHR の発現に関しヒトと同じように rLHR の発現を促進するかどうか検討を行う。293 cell を用いて myc のエピトープタグを付加した rLHR を恒常的に発現する stable cell line を確立する。その cell line に容量依存的に GRP78 が発現するように、発現ベクターに組み込まれたラット GRP78cDNA をトランスフェクションする。トランスフェクションしてしかるべき後細胞からライセートを作成し、ウエスタンブロットを行って GRP78 の発現と rLHR の発現量との関係を調べる。続いて PMSG と hCG を幼弱の雌ラットに注射して擬月経周期を作成し、その周期内での rLHR と GRP78 の発現パターンをノーザンブロットを用いて検討を行う。以前の実験結果から (Mol Cell Endocrinol 1991 82:259-263)、hCG 注射直後に生じる rLHR の down-regulation が生じる時期 (図 1) と、黄体が退縮する黄体末期に特に注意深く観察したいと考えている。さらに *in situ* hybridization を行い、ラット卵巢内での局在つまり顆粒膜細胞、夾膜細胞、間質、卵丘、卵胞壁のどの部位にどの時期に強く GRP78 が発現するのか、確認する。

(2) GRP78 の発現調節の検討

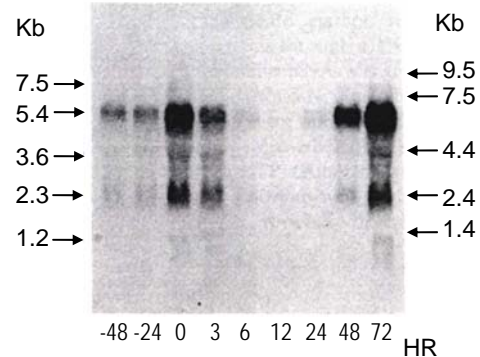


図 1. ラット LHR mRNA のダウンレギュレーション

幼若雌ラットに PMSG-hCG (hCG を注射した時間を 0 とする) 投与後、LHR mRNA の発現レベルをノーザンブロットで検討した。

(1) の検討により *in vivo* の卵巢において、GRP78 の rLHR の発現に対する関与が確認されたら、次の段階として *in vitro* の実験系、つまりラット顆粒膜細胞初代培養細胞を用いて検討を行いたい。培養開始直後には、この顆粒膜細胞には LHR は発現していないが、FSH を培養メデューム中に添加することにより LHR を誘導することができる。さらにエストロゲンは FSH の存在下で LHR の発現誘導を

増強することが知られているので、GRP78 の発現に対して FSH とエストロゲンの影響を調べる。LHR の発現誘導に関しては、アクチビン、TGF- β 、IGF-I などの物質も知られているが、FSH とエストロゲンを基本的な検討項目とした。

4. 研究成果

卵巣の局所因子としてインヒビン、アクチビンなど TGF- β スーパーファミリーの作用することが示されているが、これらの卵子胚成熟に対する検討のため、ペーターゲットグリカンの卵管上皮での発現の調節について研究を行った。卵管上皮の局在は、免疫染色で行い、in situ でも確認を行った。また、発現量に関しては、mRNA 量を RT-PCR とノーザンブロットで定量し、その発現量は性周期変動することを見いだした。mRNA 量のピークが排卵後に一致するため、排卵時に卵管内に進入する卵に対してペーターゲットグリカンが何らかの影響を及ぼすことが考えられた。TGF- β スーパーファミリーのレセプター mRNA を性周期で同時に測定したが、有意に変化を認めるものはなく、結合するインヒビンまたはインヒビンに拮抗するアクチビンの卵に対する影響を修飾するものとして卵管上皮の膜状に発現することが考えられた。

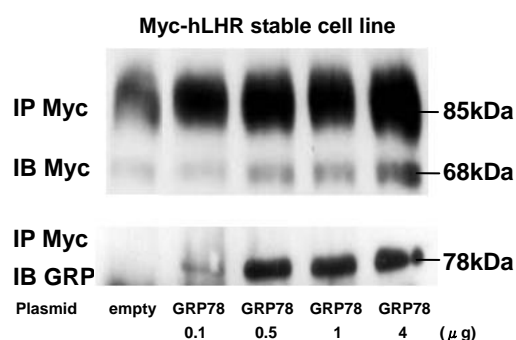


図 2. hLHR と GRP の Western blot
上段は hLHR のバンドで下段は GRP のバンドを表す。GRP の蛋白量が増すにつれて hLHR の蛋白量も増している。

GRP78 は小胞体において蛋白が高次構造を獲得するのに関与している分子シャペロンである。我々は、LH レセプター (LHR) を恒常的に発現している細胞 (LHR cell) に GRP78 を発現させると LHR と GRP78 が結合し、更に GRP78 発現量依存的に LHR 発現が増加することを確認した。ヒト及びラット genomic DNA library を template として、GRP78 promoter 領域と考えられる GRP78 遺伝子上流領域を luciferase reporter vector に組み込んだ plasmid を作成した。これを LHR cell に transfect し、ホルモンを添加した上で

promoter 活性を測定した。ヒト、ラットとも hCG 添加に伴い GRP78 promoter 活性の上昇がみられ、また hCG にエストロゲンを加えることで若干ではあるが更なる promoter 活性上昇がみられた。LHR 発現量変化をもたらす hCG により GRP78 promoter 活性が変化することで、LHR 発現調節に GRP78 が関与することを強く示唆する結果が得られた。

体外受精プログラムで得られた顆粒膜細胞より mRNA を抽出して GRP78 の発現量を検討すると、35 歳以上の方がそれ未満の年齢の女性の卵巣における発現が有意に低いことが判明した。

このことは、年齢の卵の質の低下において、GRP78 の発現低下と関連する可能性があり、今後の検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Kubota K, Omori Y, Ikeda S, Minegishi T, Expression and Cyclic Change of Betaglycan in the Rat Oviduct, J Reprod Dev, 2009, 印刷中、査読有
- ② Kubota K, Itho M, Kishi H, Igarashi S, Minegishi T, Primary hypothyroidism presenting as multiple ovarian cysts in an adult woman: a case report, Gynecol Endocrinol, 24(10), 586-589, 2008, 査読有
- ③ Ota T, Asahina H, Park SH, Huang Q, Minegishi T, Auersperg N, Leung PC, HOX cofactors expression and regulation in the human ovary, Reprod Biol Endocrinol, 6, 49, 2008, 査読有
- ④ Nakamura K, Aoki H, Hirakawa T, Murata T, Kanuma T, Minegishi T, Compartment syndrome with thrombosis of common iliac artery after gynecologic surgery, Obstet Gynecol, 112(2 Pt 2), 486-488, 2008, 査読有
- ⑤ Faried LS, Faried A, Kanuma T, Aoki H, Sano T, Nakazato T, Tamura T, Kuwano H, Minegishi T, Expression of an activated mammalian target of rapamycin in adenocarcinoma of the cervix: A potential biomarker and molecular target therapy, Mol Carcinog, 47(6), 446-457, 2008, 査読有
- ⑥ Minegishi T, Nakamura K, Yamashita S, Ikeda S, Kogure K, Regulation of human luteinizing hormone receptor in the ovary, Reprod Med Biol, 7(1), 11-16, 2008, 査読有

- ⑦ Ikeda S, Nakamura K, Kogure K, Omori Y, Yamashita S, Kubota K, Mizutani T, Miyamoto K, Minegishi T, Effect of Estrogen on the Expression of Luteinizing Hormone-Human Chorionic Gonadotropin Receptor Messenger Ribonucleic Acid in Cultured Rat Granulosa Cells, Endocrinology, 149(4), 1524-1533, 2008, 査読有
- ⑧ 峯岸 敬, 日本産科婦人科学会 研修コーナー C.産婦人科検査法 1.内分泌・不妊検査法 5) 血中ホルモン測定 6) ホルモン負荷試験, 日本産科婦人科学会雑誌, 59 (4), 43, 2007, 査読無

[学会発表] (計4件)

- ① Nakamura K, Kogure K, Kubota K, Ikeda S, Minegishi T, The effect of 78-kilodalton glucose-regulated protein on the expression of rat luteinizing hormone receptor, 13th International Congress of Endocrinology, 2008.11.1, リオ・デ・ジャネイロ
- ② 小暮佳代子, 中村和人, 久保田和子, 池田禎智, 峯岸 敬, ラット卵巣におけるLHRおよびGRP78発現量変化についての検討, 第60回日本産科婦人科学会学術講演会, 2008.4.14, 神奈川
- ③ Minegishi T, Progress Report British Columbia-Gunma, 4th Canada-Japan Bilateral Workshop on Human Reproduction Biology (Canada-Japan Bilateral Symposium on Womens Reproductive Health), 2007.8.1, 青森
- ④ 伊藤理廣, 五十嵐茂雄, 岸 裕司, 田村友宏, 池田禎智, 峯岸 敬, 不妊症患者の抗リン脂質抗体出現頻度, 第59回日本産科婦人科学会総会・学術講演会, 2007.4.16, 京都

[図書] (計1件)

- ① 峯岸 敬, 中外医学社, Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2009, 2009, 213-218

[その他]

ホームページアドレス

<http://obgyn.dept.med.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峯岸 敬 (MINEGISHI TAKASHI)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00209842

(2) 研究分担者

伊藤 理廣 (ITOH MASAHIRO)
群馬大学・医学部・准教授
研究者番号：20282402

篠崎 博光 (SHINOZAKI HIROMITSU)
群馬大学・医学部・教授
研究者番号：30334139

五十嵐 茂雄 (IGARASHI SHIGEO)
群馬大学・医学部・講師
研究者番号：60343084