

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月14日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390448

研究課題名（和文）microRNA（miRNA）のLH作用機序における関与の解明

研究課題名（英文）Role of microRNA on the Expression of Luteinizing Hormone-Human Chorionic Gonadotropin Receptor Messenger Ribonucleic Acid in rat ovary

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（和文）：我々のグループでは今までに、卵巣に発現しているゴナドトロピン受容体がどのように発現調節されているかを解明してきた。今回は翻訳の制御や mRNA の分解など ‘post transcriptional regulation’ 関与している miRNA に着目し研究を行った。ターゲットとした miRNA は、LH 受容体の down regulation において、なんらかの作用を及ぼしていることが今回の実験結果から示すことができたと思われる。しかし、そもそも miRNA がどのように誘導され、どのように翻訳の制御や mRNA の分解を行っているのかなど、まだまだ解明されていない点も多くあるのも事実である。

研究成果の概要（英文）：MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that interact with mRNAs and trigger either translation repression or RNA cleavage of target genes. In this study, we investigated whether miRNA is involved in down-regulation of the LH receptor (LHR) in the ovary. A miRNA microarray was carried out to analyze the overall miRNA expression profile while LHR mRNA was down-regulated, and found that 23 miRNAs were highly expressed during this period. Combining these results with data from the bioinformative database, the clustering analysis led us to focus on miR-136\* for further analysis. In both in vivo and in vitro studies, miR-136\* levels were found to increase 6 hr after hCG administration while LHR mRNA levels were down-regulated. To confirm that miR-136\* binds to LHR mRNA, we cloned the 3' -end of LHR mRNA from 2570 to 2895 into reporter vector which contained a Renilla luciferase coding region upstream of the cloning site. When the miR-136\* inhibitor was co-transfected with the reporter vector in granulosa cells, the luciferase activity was de-repressed, revealing that miR-136\* definitely bound to the 3' -end of LHR mRNA. From these data, we conclude that miR-136\* participates in the mechanism of down-regulation of LHR mRNA, whereby miR-136\* forms base pairs with LHR mRNA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学

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：miRNA、LH receptor、down regulation、卵巣

## 1. 研究開始当初の背景

ゴナドトロピンは卵巣機能調節において中心的役割を果たすので、FSH、LH 受容体は標的細胞に、ゴナドトロピン情報伝達を適切に開始するための要として機能している。ヒトのゴナドトロピン受容体の構造決定以来、恒常的受容体の活性化が思春期早発の原因となることなどが明らかとされ、その後も構造異常と病態の報告が続いている。一方、受容体の発現の制御に関しては、卵胞局所の成長因子が FSH 受容体発現に重要な作用を示すことが報告され、最近我々の研究室でも、エストロジェンが LH 受容体の半減期を延長させることで発現量を増加し、LH サージに反応すべき LH 受容体蛋白の発現に対応していることを示した。

LH 受容体の制御については未だ micro RNA (miRNA) の報告はなく、この未知の制御を検討することで新しい mRNA の制御様式を明らかとし、LH 作用の情報伝達経路の全体像を理解する。LH 作用は、排卵現象と卵子の成熟に関与する生殖内分泌における中心的関与であり、この作用メカニズムを明らかにすることで生殖医療の成績向上を目的とする。

## 2. 研究の目的

ゴナドトロピン受容体の発現制御に関して miRNA の関与を検討することが今回の独創的な点である。

今までのゴナドトロピン受容体研究においては、受容体蛋白、mRNA の変化が様々なホルモン、局所因子によって誘起されることは明らかとされている。また、そのメカニズムにおいても、転写、翻訳のレベルでの検討、解析が進んでいる。しかし、特に LH 受容体 mRNA は、リガンドによって強力に mRNA のレベルで Down regulation されることが示されているが、今までの手法には限界があり、そのメカニズムが全て明らかとなっているわけではない。

LH 受容体 mRNA は他の mRNA と比較しても特に増加・減少が著しく観察されることから、この受容体 mRNA の系を利用して miRNA の制御を研究することは他の蛋白で検討するより有利な点であり、また、我々の実験の実績から、未知の制御を発見するには最も可能性があると考えられた。miRNA は mRNA の発現や蛋白への翻訳を抑制する働きをするものであり、我々の系では LH 受容体 mRNA が急激に減少する in vivo、in vitro 両方での実験系を既に研究しているため、新たな mRNA の調節機序を報告できる可能性が高い。

他の蛋白での報告があり、癌細胞の増殖にも関係すると考えられているが、生殖領域では未だ報告はない。この LH 受容体蛋白発現に関与する miRNA が同定できれば、この miRNA

の調節機構の研究を進めることが可能になり、LH による作用メカニズムがより詳細に明らかとなる。

LH 刺激により排卵、黄体維持と生理的に重要な働きをするが、そのシグナルによって同時に LH 受容体の発現調節も主な経路となっているため、LH 受容体発現の分子メカニズムを解明することは、LH 刺激の分子メカニズム全体を明らかとすることにつながる。LH 作用の詳細を明らかにすることは、生殖に意義のある排卵、卵子の成熟の機序がより明らかとなり、排卵障害のメカニズムや受精に関係する卵子の成熟まで明らかとすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

幼若ラットを用いた in vivo の実験としては、PMSG と HCG を用いて過排卵刺激後の卵巣を用いて検討することにした。

以前の実験から hCG 投与後の卵巣で LH-R の急激な減少を認めており、これが hCG 刺激で誘導されるシグナルが原因であることは判明していた。特に蛋白レベルでは細胞表面のレセプターが細胞内に取り込まれることを示してきたが、mRNA のレベルでも減少することが示された。今回の実験でも同様の処理により miRNA の変化とレセプターの発現量を測定することでその生理的意義を検討した。in vitro の検討では、DES 前処置幼若ラット卵巣から卵巣を採取し顆粒膜細胞培養を行い、LH 受容体発現の調節を検討した。miR-136\*、そのインヒビターを導入することで、細胞における LH 受容体発現量の変化を観察し、その結果から miRNA の機能を評価した。さらにその構造上の特徴から遺伝子制御にかかわる部位の同定のため、塩基配列の変更による機能変化を観察して、機能的に重要な配列を特定した。

## 4. 研究成果

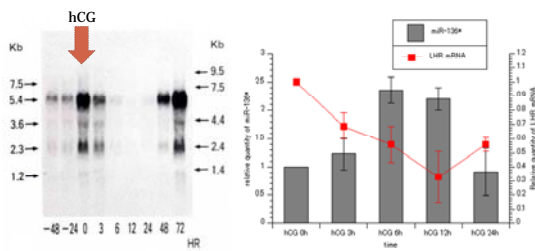
(1) miRNA database を用いた miRNA の絞り込み

miRNA database “miRBase” (<http://www.mirbase.org>) を用いて、候補に挙げられた 23 個の miRNA のうち、LH 受容体 mRNA と結合し得る miRNA を検索

⇒ rno-miR-136\*のみが LH 受容体と結合する可能性があるという結果であった。

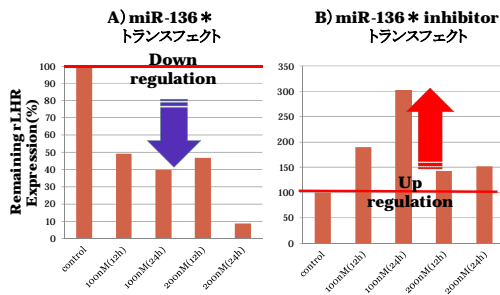
```
Rno-miR-136*:-ucU8AQUAAAGUCUGCUACUAc--
                :| :|||      |||||
LH receptor:-taGCATATTGTTTCBATGATt--
```

(2) miR-136\*と LH 受容体 mRNA 発現量の経時的変化 (in vivo)



PMSG-hCG 刺激を行った 3 週齢のメスのラットより卵巣を摘出し、それぞれの卵巣より RNA を抽出し、real time RT-PCR を行い、miRNA と LH 受容体の経時的な発現量の変化を調べた。これらの結果は、LH 受容体 mRNA の down regulation が起こっている時相に一致して miRNA の発現量が増加し、さらに、LH 受容体の発現量が回復してくると、miRNA の発現量は減少傾向となっていた。これらの結果より、LH 受容体の down regulation に miRNA が何らかの影響を及ぼしている可能性があることが、再度示唆された。

(3) LH 受容体における miR-136\* の機能解析

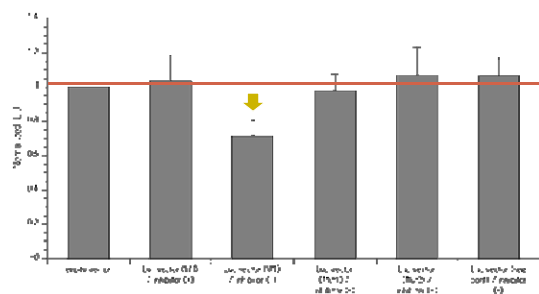


DES priming を行った 3 週齢のメスラットより、未熟な顆粒膜細胞を採取し培養を行った。この未熟な顆粒膜細胞に miRNA をトランスフェクトし、miRNA を強発現させた後、FSH を添加し LH 受容体の発現を誘導した。その際の、LH 受容体の発現量を real time RT-PCR にて調べると、コントロールに比べ miRNA をトランスフェクトした顆粒膜細胞では、LH 受容体の mRNA の減少がみられた。逆に、顆粒膜細胞に miRNA inhibitor をトランスフェクトし、その後 FSH を添加し LH 受容体を発現させた。その際の LH 受容体の発現量を real time RT-PCR にて調べたところ、コントロールに比べ LH 受容体の発現量は増加していた。これらの二つの実験より、LH 受容体の発現調節には miRNA が大きくかかわっていることが示唆された。

(4) LH 受容体 mRNA における miR-136\* の binding site の特定

rno-miR-136\* の結合部位は、ラット LH 受容体 mRNA の 3' UTR 内の 2848~2866 番目にあると、先にあげた miRBase (miRNA のデータベース) で予想されている。そこで、luciferase assay を用いて、LH 受容体に対する miRNA の結合部位の同定を試みた。まず、ラット LH 受容体の cDNA を用いて、miRBase に予想されている結合部位を含んだ luciferase vector (これを vector 1 とする) と、結合部位を含まない luciferase vector (これを vector 2 とする) を作製した。これらのベクターを、未熟な顆粒膜細胞の初代培養にトランスフェクトしたのち、FSH を添加し LH 受容体を発現させ、その後 hCG にて down regulation を引き起こした。その際に、細胞内で産生される miRNA によって翻訳の抑制 (もしくは、mRNA の分解) が起こると、Vector 1 の luciferase タンパクの発現が抑制されるため、luciferase 活性がコントロールと比べて低下することとなる。実際に今回の実験においても、luciferase 活性は約 50% 低下していた。

さらに、luciferase vector とともに、miRNA inhibitor も同時にトランスフェクトすると、miRNA の働きを抑制するため、luciferase タンパクの発現の抑制が起こりにくくなり、luciferase 活性が回復することとなる。実験においても、その活性はコントロールに比べ約 80% の活性 (20% の活性の低下) を示し、inhibitor をトランスフェクトしなかった時に比べ、明らかにその活性は回復していることが示された。結合部位を含まない Vector 2 は、いずれの条件においても、コントロール (empty vector) の luciferase 活性とほぼ同等の活性であった。つまり、miRNA の結合部位を持たない vector は、翻訳の制御などが起こらず、luciferase 活性の変化も起こらないことが示された。



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 峯岸敬、婦人科領域におけるホルモン療法の最前線、PTM:最新の疾患別治療マニュアル、査読なし、12月号、2011、15-16
- ② 今井文晴、岸裕司、峯岸敬、【不妊治療のABC-ARTの前にできること】【不妊原因診断とARTの前の対処法】中枢性排卵障害・高PRL血症、臨床婦人科産科、査読なし、Vol. 65、No. 9、2011、1108-1112
- ③ 峯岸敬、【婦人科内分泌療法 病態の理解と正しい診断に基づく対処・治療のポイント】月経異常 原発無月経、臨床婦人科産科、査読なし、Vol. 65、No. 4、2011、373-377
- ④ Tamura T, Kanuma T, Nakazato T, Faried LS, Aoki H, Minegishi T, A new system for regulated functional gene expression for gene therapy applications: nuclear delivery of a p16INK4A-estrogen receptor carboxy terminal fusion protein only in the presence of estrogen, Int J Oncol、査読有、36、2010、905-912  
DOI: 10.3892/ijo.00000569
- ⑤ 中村和人、峯岸敬、【外来診療マニュアル】不妊・内分泌 思春期早発症、産婦人科の実際、査読なし、Vol. 59、No. 11、2010、1670-1675
- ⑥ 伊藤理廣、峯岸敬、【これだけは知っておきたい 検査のポイント】PRL(プロラクチン)、LH(黄体化ホルモン)、FSH(卵巣刺激ホルモン)、Medicina、査読なし、Vol. 47、No. 11、2010、312-315
- ⑦ 倉智博久、峯岸敬、シンポジウム2「中枢神経関連生理活性物質の生殖機能へのかかわり」座長レビュー、日本産科婦人科学会雑誌、査読なし、Vol. 61、No. 10、2009、1899-1907
- ⑧ 峯岸敬、中村和人、青木宏、池田禎智、小暮佳代子、【知っておきたい今日のホルモン療法】ゴナドトロピンの作用機序、産婦人科治療、査読なし、Vol. 98増刊、2009、482-487

〔学会発表〕(計19件)

- ① 鈴木ちかる、ヒト羊膜間葉系細胞と上皮細胞におけるTNF-alphaのactivin A発現促進作用、第16回日本生殖内分泌学会学術集会、2011.11.19、シェーンバッハ・サボー(東京都)
- ② 岩宗政幸、ラット卵巣LH受容体(LHR)の発現調節における、GRP78とmiRNAの関係について、第63回日本産科婦人科学会学術講演会、2011.8.29、大阪国際会議場(大阪)
- ③ Kitahara Y, Role of microRNA in the Expression of Luteinizing

- Hormone-Human Chorionic Gonadotropin Receptor mRNA in Rat Ovary、ENDO 2011:The 93<sup>rd</sup> Annual Meeting & Expo、2011.6.4、ボストンコンベンション&エキシビジョンセンター(ボストン、米国)
- ④ バイガルマー、子宮体癌における分子シヤペロン GRP78の発現の意味、第15回日本生殖内分泌学会学術集会、2010.11.21、千里ライフサイエンスセンター(大阪)
  - ⑤ 峯岸敬、ゴナドトロピンによる卵巣機能調節、第3回阪神婦人科・内分泌研究会、2010.9.25、ホテルニューアルカイク(兵庫)
  - ⑥ 峯岸敬、ゴナドトロピンレセプターによる卵巣機能調節、第10回産婦人科内分泌研究会、2010.7.10、ウェスティンナゴヤキャッスル(愛知)
  - ⑦ 峯岸敬、症例から学ぼう 不妊症、第119回日本産科婦人科学会関東連合地方部会総会・学術集会、2010.6.13、都市センターホテル(東京)
  - ⑧ 北原慈和、ラット卵巣LH受容体の発現調節におけるmiRNAの意義、第62回日本産科婦人科学会学術講演会、2010.4.25、東京国際フォーラム(東京)
  - ⑨ 伊藤理廣、不育症に対するピシバニール療法、第62回日本産科婦人科学会学術講演会、2010.4.23、東京国際フォーラム(東京)
  - ⑩ Minegishi T, Regulation of gonadotropin receptor, 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology、2010.3.28、国立京都国際会館(京都)
  - ⑪ 峯岸敬、ゴナドトロピンの分泌と作用メカニズム、第3回生殖と女性医学、2010.2.20、ホテルグランパシフィックLE DAIBA(東京)
  - ⑫ 北原慈和、ラット卵巣LH受容体の発現調節におけるmiRNAの意義、第14回日本生殖内分泌学会学術集会、2009.11.28、シェーンバッハ・サボー(東京)
  - ⑬ 峯岸敬、ゴナドトロピンの分泌と作用メカニズム、第54回日本生殖医学会総会・学術講演会、2009.11.23、ANAクラウンプラザホテル金沢(石川)
  - ⑭ 峯岸敬、ゴナドトロピンによる卵巣機能調節、第15回徳島内分泌研究会、2009.11.13、徳島グランヴィリオホテル(徳島)
  - ⑮ 峯岸敬、ゴナドトロピンによる卵巣機能調節、第4回島根産婦人科医学講演会、2009.10.30、島根大学医学部(島根)
  - ⑯ 峯岸敬、ゴナドトロピンによる卵巣機能調節、第1回長崎県産婦人科臨床フォーラム、2009.10.8、ホテルニュー長崎(長

- 崎)
- ⑰ 峯岸敬、ゴナドトロピンの性分化に対する作用、第 27 回内分泌代謝学サマーセミナー、2009. 7. 17、三国観光ホテル (福井)
  - ⑱ 峯岸敬、ゴナドトロピンによる卵巣機能調節、第 127 回日本産科婦人科学会関東連合地方部会、2009. 6. 6、仙台国際センター (宮城)
  - ⑲ 峯岸敬、ゴナドトロピンによる卵巣機能調節、第 161 回日産婦学会茨城地方部会例会、2009. 4. 25、茨城県医師会 (茨城)

## 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

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

岸 裕司 (KISHI HIROSHI)  
群馬大学・医学部・講師  
研究者番号：10375545

伊藤 理廣 (Ito Masahiro)  
群馬大学・医学部・准教授  
研究者番号：20282402  
(H21)

### (3) 連携研究者

なし