

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791549

研究課題名(和文)

ヒト顆粒膜細胞発育とPTEN誘導に関連した新規排卵誘発剤の開発

研究課題名(英文)

The new development of ovulation inductor associated with the expression of PTEN in human granulosa cells.

研究代表者

後藤 真紀 (GOTO MAKI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90378125

研究成果の概要(和文)：

1. 研究開始当初の背景：ヒト卵胞発育において顆粒膜細胞の正常な増殖が必要不可欠であるが解明されていない点も多い。
2. 研究の目的：ヒト顆粒膜細胞の増殖制御機構の解明および新規排卵誘発剤の開発
3. 研究の方法：体外受精採卵時に得られた黄体化顆粒膜細胞を用いた解析
4. 研究成果：黄体化ホルモンが insulin-like growth factor-1 (IGF-1) 依存性の顆粒膜細胞増殖を抑制し、この過程において、Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) が IGF-1 刺激による Akt リン酸化および細胞増殖を抑制した。また、多嚢胞性卵巣症候群との関連が指摘されるインスリンにおいても同様に PTEN 発現が誘導され、PI3K-Akt 経路を抑制した。

研究成果の概要(英文)：

Granulosa cells proliferate and then undergo differentiation; an inverse relationship between these processes is observed during terminal follicular growth. But this proliferation/differentiation transition is not fully understood. We show that PTEN was induced with hCG treatment in human luteinized granulosa cells. Pretreatment with hCG attenuated IGF-1-induced phosphorylation of AKT and cell proliferation. Furthermore, we assess the induction of PTEN expression with insulin treatment and effects of PTEN on IGF-1-induced granulosa cell proliferation as well as the correlation of PTEN levels with the concentration of insulin in follicular fluid in PCOS and non-PCOS patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：卵胞発育、ヒト顆粒膜細胞、PTEN、インスリン抵抗性、多嚢胞性卵巣症候群

1. 研究開始当初の背景

ヒトの配偶子形成すなわち卵胞発育においては、顆粒膜細胞の正常な増殖が必要不可欠であると言える。ゴナドトロピン依存性の卵胞発育段階においては、

follicle-stimulating hormone (FSH) と insulin-like growth factor-1 (IGF-1) が顆粒膜細胞の増殖に特に重要であり、増殖が正常に営まれない場合には顆粒膜細胞はアポトーシスに陥り、その卵胞は発育途中で閉鎖

に至る、また閉鎖にまで至らない卵胞も卵の質の低下は免れ得ないと考えられる。顆粒膜細胞の増殖・分化はヒトの生殖に深く関わっているが、解明されていない点も多い。また近年では、排卵誘発抵抗性を示すことが多い多嚢胞性卵巣症候群 polycystic ovary syndrome (PCOS) の存在も問題となっている。PCOS は高 LH 血症、卵胞発育障害を呈し、卵の質が低下していることが知られている。その病態については顆粒膜細胞の正常な増殖能の障害やインスリン抵抗性との関連が示唆されているが、未だ明らかになっていない。PTEN は、phosphatidyl-inositol-3, 4, 5-triphosphate (PIP3) を phosphatidylinositol-3, 4-diphosphate (PIP2) に脱リン酸化する。従って Akt のリン酸化抑制作用を有し、細胞増殖に抑制的に働く。PTEN は癌抑制遺伝子として、様々な癌の発症・進展に関与することや、過剰発現により癌細胞における cell cycle の抑制やアポトーシスの誘導がおこることが知られているが、正常細胞での機能に関する研究は未だに少ない。顆粒膜細胞における細胞増殖能調節因子の詳細を明らかにすることは、卵胞発育・卵成熟の機構解明につながり、ひいては卵の質の低下を改善するための新たな治療法の開発の一助となる。

## 2. 研究の目的

PTEN を誘導する因子として LH/hCG やインスリンについての細胞増殖のメカニズム、および黄体化周辺における顆粒膜細胞増殖のメカニズムについて検討する。

## 3. 研究の方法

体外受精-胚移植周期での採卵時に得られた卵胞液より培養黄体化顆粒膜細胞を分離培養した。各卵胞ごとに卵胞液および培養黄体化顆粒膜細胞を分離培養し保存した。また、培養黄体化顆粒膜細胞それぞれについてタンパクおよびRNAを回収して保存し、PTENおよびアポトーシス関連因子の発現について卵胞ごとの比較検討、得られた卵の質ごとの検討、受精した卵胞と受精不成立卵胞での比較、また妊娠例および非妊娠例との比較検討を、realtime RT-PCRやウェスタンブロッティング法で検討した。また、マイクロアレイを用いて各種遺伝子発現についても比較検討を行った。

## 4. 研究成果

黄体化ホルモン添により、培養黄体化顆粒膜細胞での PTEN mRNA およびタンパク発現は濃度依存性、また時間依存性に増加した(図 1-A, B, C)。

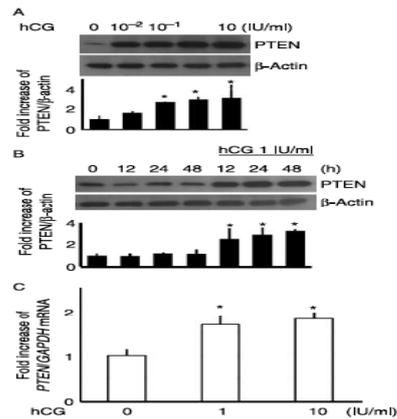


図 1

培養黄体化顆粒膜細胞での PTEN mRNA およびタンパク発現

また、hCG 前処置にて IGF-1 刺激による Akt リン酸化は抑制されたが、ERK リン酸化は抑制されなかった(図 2)。

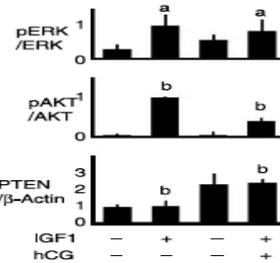


図 2

hCG 前処置による IGF-1 シグナル伝達経路の変化

さらに hCG 添加し前培養した黄体化顆粒膜細胞では、IGF-1 依存性の細胞増殖能が抑制された(図 3)。

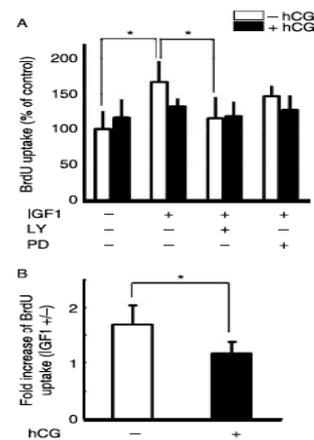


図 3

hCG 前処置した際の細胞増殖能の変化  
同様にインスリン刺激をした培養黄体化顆粒膜細胞においても PTEN 発現は濃度/時間

依存性に増加し、IGF-1 刺激による Akt リン酸化および細胞増殖を抑制することを確認した (図 4)。

さらに、インスリン抵抗性との関連が示唆される多嚢胞性卵巣症候群についての検討を行った。多嚢胞性卵巣症候群患者群 (n = 13) では対照群 (n = 37) と比較して顆粒膜細胞での PTEN mRNA 発現が増加し、卵胞液中インスリン濃度と相関していた (図 5)。

また、今後顆粒膜細胞についての詳細な機能解析を進めていくために、国立がんセンター清野透博士との共同研究により不死化ヒト顆粒膜細胞樹立に成功した。ステロイドホルモンレセプターの発現やステロイド産生能を有し、新しい顆粒膜細胞株として学会報告を行った。

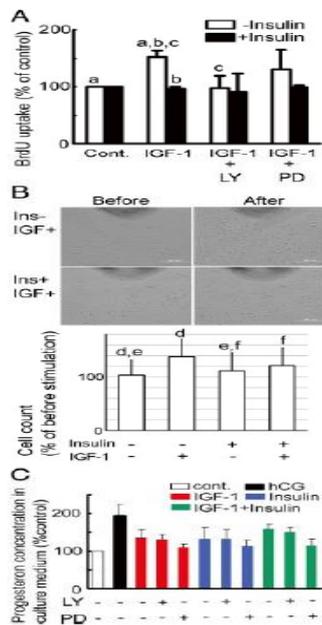


図 4

インスリン刺激による PTEN 発現変化と細胞増殖能の変化

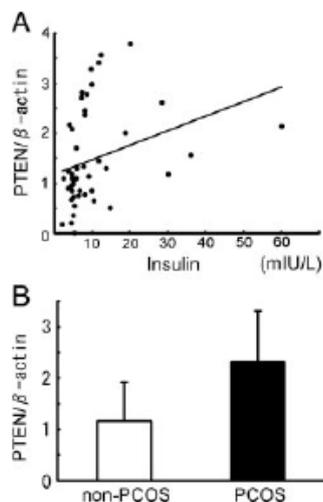


図 5

多嚢胞性卵巣症候群患者の培養黄体化顆粒膜細胞における PTEN 発現および卵胞液中インスリン濃度

また、採卵時に得られた卵胞液中のプロテオーム解析を行い、1) 同一症例においても妊娠成立胚由来卵胞と非成立胚由来卵胞では検出タンパク数が異なること、2) 年齢や PCOS の有無などの患者背景により検出タンパク数に差を認めることを確認し報告している。

引用:

IGF1-induced AKT phosphorylation and cell proliferation are suppressed with the increase in PTEN during luteinization in human granulosa cells.

Goto M, et al.

Reproduction. 2009 May;137(5):835-42.

(図 1、図 2、図 3)

Insulin attenuates the insulin-like growth factor-I (IGF-I)-Akt pathway, not IGF-I-extracellularly regulated kinase pathway, in luteinized granulosa cells with an increase in PTEN.

Iwase A, et al.

J Clin Endocrinol Metab. 2009

Jun;94(6):2184-91 (図 4、図 5)

## 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 3 件)

(1) Assessment of the predictive value of follicular fluid insulin, leptin and adiponectin in assisted reproductive cycles.

Takikawa S, Iwase A, Goto M, Harata T, Umezumi T, Nakahara T, Kobayashi H, Suzuki K, Manabe S, Kikkawa F.

Gynecol Endocrinol. 2010 Jul;26(7):494-9.

査読有

(2) IGF1-induced AKT phosphorylation and cell proliferation are suppressed with the increase in PTEN during luteinization in human granulosa cells.

Goto M, Iwase A, Harata T, Takigawa S, Suzuki K, Manabe S, Kikkawa F.

Reproduction. 2009 May;137(5):835-42.

査読有

(3) Insulin attenuates the insulin-like growth factor-I (IGF-I)-Akt pathway, not IGF-I-extracellularly regulated kinase

pathway, in luteinized granulosa cells with an increase in PTEN.

Iwase A, Goto M, Harata T, Takigawa S, Nakahara T, Suzuki K, Manabe S, Kikkawa F. J Clin Endocrinol Metab. 2009 Jun;94(6):2184-91

査読有

〔学会発表〕(計 6件)

(1) Establishment of cell lines of immortalized human ovarian granulosa cells

S. Takikawa, A. Iwase, Y. Nagatomo, B. Bayasula, W. Hirokawa, T. Nakahara, S. Manabe, H. Kobayashi, M. Goto, K. Kikkawa  
26th ANNUAL MEETING European Society of Human Reproduction and Embryology  
2010. 6. 29 (イタリア Fiera Roma)

(2) PTEN は顆粒膜細胞増殖の細胞内調節因子でありインスリンで誘導される

岩瀬明, 後藤真紀, 眞鍋修一, 鈴木恭輔, 小林浩治, 滝川幸子, 中原辰夫, 廣川和加奈, 吉川史隆  
第 54 回日本生殖医学会学術講演会  
2009. 11. 22 (金沢市 石川県立音楽堂)

(3) Insulin attenuates IGF-1 induced proliferation of granulosa cells with an increase in PTEN

A. Iwase, M. Goto, S. Takikawa, K. Kikkawa  
65th ANNUAL MEETING American Society for Reproductive Medicine 2009. 10. 17 (アメリカ Georgia World Congress Center Atlanta)

(4) Insulin attenuates IGF-1 induced proliferation of granulosa cells with an increase in PTEN

A. Iwase, S. Takikawa, M. Goto, T. Harata, T. Umezumi, T. Nakahara, S. Manabe, K. Suzuki, H. Kobayashi, K. Kikkawa  
19th ANNUAL MEETING the International Federation of Gynecology and Obstetrics  
2009. 10. 4 (南アフリカ Cape Town International Convention Centre)

(5) ヒト顆粒膜細胞の不死化、遺伝子導入による cell line の樹立について

滝川幸子, 廣川和加奈, 岩瀬明, 中原辰夫, 小林浩治, 鈴木恭輔, 眞鍋修一, 梅津朋和, 後藤真紀, 吉川史隆  
第 27 回日本受精着床学会学術講演会  
2009. 8. 6 (京都市 国立京都国際会館)

(6) インスリン、アディポネクチンは卵胞発育

に影響を与えるか

滝川幸子, 岩瀬明, 中原辰夫, 小林浩治, 鈴木恭輔, 眞鍋修一, 梅津朋和, 後藤真紀, 吉川史隆

第 61 回日本産科婦人科学会学術講演会  
2009. 4. 3 (京都市 国立京都国際会館)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 真紀 (GOTO MAKI)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 90378125

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし