

## 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 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 年度～2011 年度

課題番号：22791516

研究課題名（和文）卵巣での血管新生調節作用における、黄体刺激ホルモン受容体の意義の検討

研究課題名（英文）A possible role of luteinizing hormone receptor (LHR) in the temporal and spatial regulation of angiogenesis in the ovary

研究代表者

原田 美由紀 (HARADA MIYUKI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70451812

研究成果の概要（和文）：卵巣は LH を含むゴナドトロピンの厳密な支配下にある臓器である。LH が卵巣における血管新生に強く影響していることは知られているが、本研究において、LH 反応性の LH の受容体の変化によっても血管新生が調節されていることが示された。本研究の成果は、卵巣における血管新生調節機構の破綻に起因する各種疾患ならびに病態において、LHR の発現調節による新たな治療法の発展の可能性を開くものである。

研究成果の概要（英文）：It had been well known that LH had an important role in ovarian angiogenesis. In this study, we demonstrated that not only LH but also ligand-specifically regulated LH receptor (LHR) might exert regulatory effects on temporal and spatial regulation of angiogenesis in the ovary. To modulate the LHR expression might be a new strategy for ovarian pathology stemmed from abnormal angiogenesis, such as PCOS and OHSS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：卵巣、血管新生、黄体刺激ホルモン受容体(LHR)、血管内皮増殖因子(VEGF)、多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)、卵巣過剰刺激症候群(OHSS)

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣において、血管新生は、性周期に応じた周期的な調節を受けている。卵巣における血管新生の調節機序については、依然不明な点が多い。既知の事項として、VEGF は、重要な血管新生因子の一つであり、血管内皮細胞の増殖、遊走を促進し、さらに血管透過性を

亢進する。

卵巣での血管新生調節機序の破綻は種々の病態を引き起こす。不妊症の原因疾患の一つとして重要な、多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) 患者の卵巣においては、胞状卵巣周囲の血管網の発達において、主席卵胞と他の多数の卵

胞とで差別化がおこらず、一様な血管網の発達が起きていることが指摘されている。一方、PCOS 卵巣においては VEGF の過剰発現が認められており、この均一な血管網の発達と、これらの血管新生因子の過剰発現との関連が疑われている。また不妊症治療における、卵巣刺激の副作用として最も重要である、卵巣過剰刺激症候群 (OHSS) は、全身における血管の透過性亢進がその病態である。その原因の一つとして、卵巣における VEGF の発現亢進が挙げられている。さらに、不妊、不育症患者における黄体機能不全の原因として黄体内での血管網の形成不全が疑われており、動物モデルにおいては VEGF シグナルの阻害による黄体形成不全が示されている。

以上のことより、卵巣における血管新生因子発現の時間的、空間的な制御機構を解明することが重要な課題となっている。一般に血管新生因子の発現は酸素濃度による調節を受けるが、極めて特徴的なことに、卵巣においては LH/human chorionic gonadotropin (hCG) により、直接的・間接的に制御を受けている。一方卵巣においては、この LH に対する受容体 (LHR) の発現自体が周期的に変化することが知られている。卵胞成熟過程において、卵胞刺激ホルモン (FSH) とエストロジオールにより、LHR の発現が獲得される。そして排卵前 LH サージに反応して一時的に LHR の発現が抑制され、その後再び発現が増強し、黄体中期において最強となり、黄体機能を支持している。

## 2. 研究の目的

背景の項で述べたが、卵胞・黄体においては、黄体刺激ホルモン (LH) が血管新生を誘導すること、一方、卵巣における LH 受容体 (LHR) の発現は性周期に応じてダイナミックに変動する。この事実到我々は着目し、本研究において、LHR の発現変化が、血管内皮増

殖因子 (VEGF) などの血管新生因子の発現を制御することにより、血管新生の調節因子として生理的・病理的意義を担っていることを明らかにしたいと考えた。

しかしながら、これまで LHR と VEGF の発現の関連性について解析した検討はないため、まず LHR の発現を一時的に抑制するラットダウンレギュレーションモデルを用いて、VEGF mRNA と LHR mRNA の発現の変化について検討を行い、その関係性を明らかにすることを目的とした。

次に、ラットの性周期全般にわたって、卵巣における両者の発現の検討を行なった。

さらに、ヒトにおいても LHR の発現変化が VEGF の発現変化に寄与するのではないか、ということを確認する目的で、ヒト顆粒膜黄体 (GL) 細胞を用いて両者の発現の検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット卵巣における LHR および VEGF mRNA 発現の解析

LHR ダウンレギュレーションモデル、および排卵前後、妊娠黄体期の VEGF, LHR mRNA の変化につき、定量的 PCR 法、*in situ* hybridization 法を用いて検討した。

#### ① ダウンレギュレーションラットモデル

23 日齢の未熟 Sprague-Dawley 雌ラットに PMSG 50 単位を皮下注射し、その 56 時間後に hCG 25 単位を単回皮下注射した。偽妊娠 5 日目に hCG 50 単位を単回投与することにより、LHR の発現を一過性に抑制する (効果は 24 時間後に最高となる) ことができる (Peegel H, Menon KM et al. *Endocrinology* 1994; 135: 1044-51)。これをダウンレギュレーションラットモデルと称し、すでに確立されている。2 度目の hCG 投与時、12、24、53 時間後に卵巣を回収した。

②排卵期前後:23日齢の未熟 Sprague-Dawley 雌ラットに pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) 50単位を皮下注射し、その56時間後にhCG 25単位を単回皮下注射した。これは性周期を同期させるために行うものである。PMSG注射前、PMSG注射56時間後、hCG注射10時間後(排卵時)、hCG注射24時間後、hCG注射48時間後の5つのタイムポイントにおいて卵巣を回収した。

③偽妊娠黄体期:23日齢の未熟 Sprague-Dawley 雌ラットにPMSG 50単位を皮下注射し、その56時間後にhCG 25単位を単回皮下注射した。PMSG注射56時間後=hCG注射前、偽妊娠2、4、6、8、10、12、14日目の8つのタイムポイントにおいて卵巣を回収した。

(定量的PCR法を用いた解析)

まず、卵巣全体における mRNA の発現解析を行った。卵巣より RNA を回収し、逆転写して cDNA を得、定量的 PCR 法にて VEGF, LHRmRNA 発現量のそれぞれのモデルにおける経時的变化を解析した。

次に、上記の卵巣よりステロイド産生細胞のみを分離し、その細胞における VEGF, LHRmRNA 発現量の解析を同様に行った。

(*In situ* hybridization 法を用いた解析)

採取した卵巣より凍結切片を作成した。ラット LHR, VEGF 配列より、PCR 法を用いて 400-600 塩基長の cDNA 断片を作成し、SP6, T7 転写領域を持つベクターに T/A クローニングした。そして転写により、 $[^{35}\text{S}]$  でラベルした antisense, sense RNA プローブを作成した。また、卵巣内での局在をよりわかりやすくするために、同じ切片を用いて同時にヘマトキシリン-エオジン染色も行った。

(2) ヒト顆粒膜黄体 (GL) 細胞を用いた解析

ヒトにおいても LHR の発現変化が VEGF の産生を制御しており、卵巣過剰刺激症候群

(OHSS) 症例では LHR の発現調節不全のために VEGF が過剰に発現しているという仮説を立てて研究を進めた。卵巣因子以外の不妊因子にて体外受精を受けた患者から得た GL 細胞において、LHR, VEGF の発現の関連性につき検討した。

体外受精患者より採卵時に回収した卵胞液より、密度勾配法により GL 細胞を分離した。GL 細胞より RNA を抽出後、cDNA を得て、LHRmRNA, VEGFmRNA の発現を定量的 PCR 法にて解析した。これらの発現と各種パラメータ(卵胞刺激ホルモン (FSH) 基礎値、LH 基礎値、成熟卵胞数、採卵決定時の血性エストロジオール値、採卵数、成熟卵数、受精卵数)の関連の有無につき検討した。

#### 4. 研究成果

卵巣の血管新生調節機構における、黄体刺激ホルモン受容体 (LHR) の役割につき検討した。

ラット卵巣において、LHR の発現を一過性に抑制するダウンレギュレーションラットモデルを用いた検討において、LHR と血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現が同調して変化するという知見を得た。さらに排卵期前後では、PMSG 処理後の卵胞の発育に伴い、LHR, VEGFmRNA 発現はいずれも急激に増加し、hCG 処理後その発現は同調して低下し、10 時間後の排卵期に最低となった後、その後偽妊娠黄体期 day4 までは両方とも増加を続けた。その後、LHR に関しては、day8-10 まで増加を続けた後、減少に転じた。一方 VEGF に関しては、day6 にかけて一旦減少し、day8-10 に再び増加したのち減少に転じるという二峰性の変化を示した。この結果より、排卵前後では LHR と VEGF の発現が同調して変化することより、LHR が VEGF の調節因子として働いていることが示唆された。黄体形成期にも同

様の現象が見られたが、黄体期中期の一旦血管新生が落ち着く時期には VEGF 発現は減少し、その後の黄体退縮に伴う血管新生と同期するように再び増強する、というように、黄体期中期以降は VEGF と LHR 発現の間には乖離が見られ、VEGF の発現調節への LHR 以外の因子の関与が示唆された。

ヒト顆粒膜黄体 (GL) 細胞を用いた検討においては、LHR, VEGF mRNA 発現と、各種パラメータ (卵巣刺激ホルモン (FSH) 基礎値、LH 基礎値、成熟卵胞数、採卵決定時の血性エストラジオール値、採卵数、成熟卵数、受精卵数) の関連の有無につき検討した。非 OHSS 症例において、VEGF mRNA 発現量と各種パラメータとの間に関連は認めなかったが、LHR mRNA 発現については、採卵数および成熟卵数と逆相関を認めた。OHSS 症例は症例数が少なく、今回の検討では一定の傾向を見出すには至らなかった。しかし、OHSS は採卵数の多い症例で発症しやすいことは以前より知られている。今回我々は、採卵数が多いほど LHR 発現が低下していることを初めて示した。一方、VEGF 発現は採卵数により変化しておらず、採卵数が多くなるような環境では、LHR による VEGF 発現調節機構になんらかの異常をきたす、あるいは LHR 以外の VEGF 発現調節機構が優位に働き、それが一定のレベルを超えると VEGF の過剰発現につながり OHSS を引き起こす可能性も考えられた。

卵巣は LH を含むゴナドトロピンの厳密な支配下にある臓器である。LH が卵巣における血管新生に強く影響していることは知られているが、LH 反応性の LH の受容体の変化によっても血管新生が調節されているという本研究で示された概念は、卵巣機能の生理・病理に新たな視座を提供するものである。本研究の成果は、卵巣における血管新生調節機構の破綻に起因する各種疾患ならびに病態

において、LHR の発現調節による新たな治療法の発展の可能性を開くものと考えられる。

## 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 13 件)

① Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Akiyama I, Harada M, Koga K, Yano T, Taketani Y.

Growth differentiation factor 3 is induced by bone morphogenetic protein 6 (BMP-6) and BMP-7 and increase luteinizing hormone receptor messenger RNA expression in human granulose cells.

Fertil Steril. 2012;97(4):979-83. 査読有

② Tsutsumi R, Fujimoto A, Osuga Y, Harada M, Takemura Y, Koizumi M, Yano T, Taketani Y.

Successful pregnancy following low-dose hCG administration in addition to hMG in a patient with hypothalamic amenorrhea due to weight loss.

Gynecol Endocrinol. 2011 Nov 21. [Epub ahead of print] 査読有

③ Yoshino O, Izumi G, Shi J, Osuga Y, Hirota Y, Harada M, Nishii O, Koga K, Taketani Y.

Activin-A is induced by interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  and enhances the mRNA expression of interleukin-6 and protease-activated receptor-2 and proliferation of stromal cells from endometrioma.

Fertil Steril. 2011;96(1):118-21. 査読有

④ Harada M, Osuga Y, Izumi G, Takamura M, Takemura Y, Hirata T, Yoshino O, Koga K, Yano T, Taketani Y.

Dienogest, a new conservative strategy for extragenital endometriosis: a pilot study.

Gynecol Endocrinol. 2011;27(9):717-20.  
査読有

⑤Harada M, Peegel H, Menon KM.

Expression of vascular endothelial growth factor A during ligand-induced down-regulation of luteinizing hormone receptor in the ovary.

Mol Cell Endocrinol. 2010;328(1-2):28-33.  
査読有

⑥Harada M, Hiroi H, Fujiwara T, Fujimoto A, Kikuchi A, Osuga Y, Momoeda M, Kugu K, Yano T, Taketani Y.

Case of chronic ectopic pregnancy diagnosed in which the complete shape of the fetus was visible by ultrasonography. J Obstet Gynecol Res. 2010;36(2):462-5.  
査読有

⑦Fisseha S, Towns R, Harada M, Peegel H, Menon KM.

Inhibitory effect of valproic acid on ovarian biosynthesis in rat theca interstitial cells.

Endocrine. 2010;37(1):187-93. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

①原田美由紀、櫻橋彩子、藤本晃久、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二

早期発症型卵巣過剰刺激症候群に対する cabergoline(カバサル)の使用経験

第 56 回日本生殖医学会 2011 年 12 月 横浜

②原田美由紀、平池修、吉野修、大石元、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二

POF(premature ovarian failure)患者における経口エストロゲン製剤(ジュリナ)を用いた排卵誘発の試み

第 26 回日本女性医学会 2011 年 11 月 神戸

③Harada M, Osuga Y, Fujimoto A, Oi N, Yoshino O, Koga K, Yano T, Taketani Y.

Laparoscopic cystectomy of ovarian endometrioma may impair the response of affected ovary to controlled ovarian hyperstimulation in IVF patients.

11<sup>th</sup> World Congress on Endometriosis. 2011 年 9 月 モンペリエ(フランス)

④原田美由紀、大須賀穰、藤本晃久、大井なぎさ、矢野哲、武谷雄二

腹腔鏡下子宮内膜症性卵巣嚢胞摘出術の、卵巣予備能へ与える影響についての検討

第 55 回日本生殖医学会 2010 年 11 月 徳島

⑤Harada M.

Changes in the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) mRNA during Ligand-Induced Down-Regulation of Luteinizing Hormone Receptor (LHR) in the Ovary.

62<sup>nd</sup> Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology. 2010 年 4 月 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原田 美由紀 (HARADA MIYUKI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 70451812

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし