

機関番号：82302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791541

研究課題名(和文) 卵巣表層上皮細胞におけるゴナドトロピン受容体を介する ERK 活性化の機序の解明

研究課題名(英文) The mechanism of ERK activation via Gonadotrophin receptor activation on ovarian surface epithelial cells

研究代表者

平川 隆史 (HIRAKAWA TAKASHI)

群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員

研究者番号：80375534

研究成果の概要(和文)：卵巣表層上皮細胞由来の OSE-29 においてゴナドトロピン受容体である FSH 受容体、LH 受容体が mRNA レベルならびにタンパクレベルで発現していることが確認された。同細胞ではゴナドトロピン刺激により用量依存的な ERK の活性化が起こり、その活性化は U0126 の存在下で抑制された。

研究成果の概要(英文)：The expression of Gonadotrophin receptors mRNA and protein were confirmed in OSE-29 cells, derived from ovarian surface epithelial cells. The activation of ERK were observed in the presence of Gonadotrophins in dose-dependent manner. MEK inhibitor, U0126 inhibited the activation of ERK via Gonadotrophin receptor activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

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：FSH レセプター、LH レセプター、ゴナドトロピン、卵巣癌

## 1. 研究開始当初の背景

日本における卵巣癌の年齢調整罹患率は 8.7(10 万対、平成 14 年)であり、近年増加傾向にある。臨床像として早期発見が困難であり、診断時には進行していることが多く、治療困難な癌腫として認識されている。一方で化学療法に対する感受性が高く、進行症例ながら長期生存する症例や根治に至る症例な

どが散見される点が他の癌腫とは異なる点として挙げられる。

卵巣癌の発生机序の一つとしてゴナドトロピン受容体を介する発癌の可能性が指摘されている。根拠として卵巣癌の発症が血中ゴナドトロピン値が上昇する閉経期に多いこと、多嚢胞性卵巣症候群患者で卵巣癌発症リスクが高いことなどが挙げられる。不妊症

に対する排卵誘発としてゴナドトロピンを使用した場合、その後の卵巣癌の発症が増加するとの報告もあり、ゴナドトロピン使用による卵巣における発症の可能性が危惧されている。

従来、ゴナドトロピン受容体は性索細胞に発現するものと理解されていたが、近年卵巣表層上皮細胞 (ovarian surface epithelium、以下 OSE) および卵巣癌細胞 (ovarian epithelial cancer、以下 OEC) でのゴナドトロピン受容体発現が報告されるようになった。上皮性卵巣癌細胞におけるゴナドトロピン受容体発現に関する我々の検討では、10 症例中 FSH 受容体 mRNA が 50% の症例に、LH 受容体 mRNA が 70% の症例に陽性であることが確認された。

OSE におけるゴナドトロピンの生理作用に関しては、FSH は増殖促進に、LH/hCG はアポトーシス抑制に働くとの報告がなされている。一方、OEC に対するゴナドトロピンの作用として、FSH は増殖促進に、LH/hCG は増殖抑制・アポトーシス抑制に作用すると報告されている。

ゴナドトロピン受容体を介する細胞増殖のシグナル伝達経路に関して、卵巣顆粒膜細胞や精巣 Leydig 細胞においては詳細な検討がなされている。我々の検討においてマウス Leydig 細胞腫由来の細胞株において LH 受容体活性化により誘導される ERK の活性化は、Src family kinase から Ras の活性化を介していることが示された<sup>2)3)</sup>。卵巣顆粒膜細胞においても ERK の活性化に Ras が関与することが示されている。以上より性索細胞においては Ras がその増殖を司るシグナル伝達経路の重要な因子と考えられている。OSE においても FSH 刺激により ERK 活性化が惹起されることは示されているが、そのシグナル伝達経路の詳細に関する検討は今日までなされていない。

## 2. 研究の目的

卵巣におけるゴナドトロピン受容体を介するシグナル伝達経路の研究は性索細胞における検討が先行しており、卵巣表層上皮細胞 (OSE) に関しては未だ不明な点が多い。しかし近年の研究知見の蓄積により、OSE にゴナドトロピン受容体が発現していることや、ゴナドトロピン刺激によるゴナドトロピン受容体の活性化が OSE 増殖を惹起することが示されるようになった。OSE における細胞増殖に関与するシグナル伝達経路に関する知見は乏しいのが現状である。本研究では OSE におけるゴナドトロピン刺激による ERK 活性化に関与する細胞内シグナル伝達

経路の解明を第一の目的とした。

上皮性卵巣癌の発生機序の一つとしてゴナドトロピン受容体を介する発症の可能性が指摘されている。根拠として卵巣癌の発症が血中ゴナドトロピン値が上昇する閉経期に多いこと、多嚢胞性卵巣症候群患者で卵巣癌発症リスクが高いことなどが挙げられる。上皮性卵巣癌細胞(OEC)におけるゴナドトロピン刺激、非刺激におけるシグナル伝達の差異を検出する。さらに OSE と OEC におけるシグナル伝達経路の違いを比較し、上皮性卵巣癌の腫瘍化に関与する分子を検出することを本研究の第二の目的とした。OSE におけるゴナドトロピン刺激による ERK 活性化に関与する細胞内シグナル伝達経路の解明を研究の目的とした。

## 2. 研究の方法

### (1) IOSE および OEC におけるゴナドトロピン受容体発現の確認

様々な検討において IOSE および OEC におけるゴナドトロピン受容体の発現が mRNA レベルおよびタンパク質レベルで確認されている。その追試を行うべく、入手可能な IOSE および OEC に関して FSH 受容体、LH 受容体の発現を mRNA レベルに関しては RT-PCR および Northern blot 法にて、蛋白レベルに関しては Western blot 法または 125-I を用いた結合実験にて観察を行う。以後の検討に関しては少なくとも FSH 受容体が発現している細胞株を用いて実験を勧める予定である。IOSE に関しては IOSE-29 を、OEC に関しては SKOV-3 を使用した。

### (2) IOSE および OEC におけるゴナドトロピン刺激による増殖能の確認

ゴナドトロピン受容体発現が確認された IOSE および OEC に関して、FSH または hCG 刺激を行い、その増殖能を MTS assay にて評価する。また、細胞増殖に関与する遺伝子 (RabGAP/TBC, cyclinG2 など) の発現に関しての検討も行う。

### (3) IOSE における ERK シグナル伝達経路の活性化の確認

IOSE において ERK の活性化が見られるか否かを検討する。IOSE、OEC を FSH または hCG で刺激し、ERK のリン酸化が観察されるか否かを抗リン酸化 ERK 抗体を用いた Western blot にて評価する。

### (4) IOSE におけるシグナル伝達経路の詳細の解

明

ゴナドトロピン刺激による ERK の活性化が如何なるタンパク質を介するかを以下の様に検討する。MEK における PD098059 や U0126 など、特異的阻害剤が存在するタンパク質に対してはそれを用い、ERK 活性化の変化を Western blot 法にて観察する。Ras など特異的阻害剤が存在しないタンパク質に対しては dominant negative form のタンパク質を遺伝子導入で過剰発現することにより内在性タンパク質の競合的阻害を行い、活性化の変化を評価する。Ras、Rap など small GTPase 活性化については活性化 Ras および活性化 Raf との結合領域を有する GST 結合タンパクを用いた pull down assay にて検討する。

#### OEC におけるシグナル伝達経路の検討

卵巣癌由来細胞株においてその増殖能や生存に關与するシグナル伝達はゴナドトロピン非依存的であり、ERK のシグナル伝達経路は恒常的に活性化していると考えられる。一方、OEC においてゴナドトロピン依存的に細胞増殖が惹起されるといった報告も散見されることより、OEC におけるゴナドトロピン受容体の活性化が少ないながら細胞内シグナル伝達経路を修飾している可能性も指摘されている。OEC のシグナル伝達経路に関して、以下の項目をゴナドトロピン刺激の有無で比較検討する。

- ①ゴナドトロピン刺激によるセカンドメッセンジャーの産生を確認するため、細胞内 cAMP を Radio-immuno assay で、inositol phosphate をイオン交換クロマトグラフィーで測定する。
- ②ERK の活性化を抗リン酸化 ERK 抗体を用いた Western blot 法にて比較する。
- ③GST-fusion Protein である GST-Raf および GST-Ral を用いた Pull Down Assay にて活性化 Ras および Raf-1 を分離し、Ras、Rap-1 の活性化を定量する。
- ④ERK 活性化に關与する分子を同定するため細胞内シグナル伝達阻害剤 (MEK inhibitor の U0126 や PD98059) の使用、または small GTPase の Dominant negative mutant の遺伝子導入によって ERK 活性化が抑制されるか否か検討する。
- ⑤RNAi によってシグナル伝達物質の発現抑制を行い、シグナル伝達に關与する物質の同定を行う。

#### 4. 研究成果

IOSE-29 (IOSE)、OVCAR3 (OSE) においては FSH 受容体、LH 受容体発現を評価した。mRNA 発

現の評価は半定量的 RT-PCR で行った。IOSE-29 においては FSH 受容体 mRNA、LH 受容体 mRNA ともに発現が確認されたが、OVCAR3 においては発現レベルは極めて低かった。蛋白レベルの評価は 125-I で標識した FSH ならびに hCG を用いた結合実験で行った。mRNA 発現と同様に、OSE-29 においてはタンパクレベルの発現が確認されたが、SKOV-3 (OSE) においては FSH 受容体、LH 受容体ともにタンパク発現レベルは非常に低かった。

SKOV-3 に FSH 受容体、LH 受容体の遺伝子導入を試みたが、CaCl<sub>2</sub> 法、リポフェクション法などで効率的な遺伝子導入を行うことは困難であった。

IOSE-29 における内因性ゴナドトロピン受容体を介する ERK 活性化を評価するためリン酸化 ERK 抗体を用いた Western blot 法を行った。その結果、添加する FSH、hCG の用量依存的な ERK のリン酸化増強が確認され、ゴナドトロピン受容体の活性化を介し ERK の活性化が起こることが示された。この ERK 活性化は MEK 阻害薬である U0126 の存在下に抑制された。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

平川 隆史 (HIRAKAWA TAKASHI)

群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員

研究者番号：80375534

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：