

機関番号：14501
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791556
 研究課題名(和文) ストレス関連新規 CRH ファミリーペプチドの卵巢機能に与える影響の解析
 研究課題名(英文) The effect on ovarian functions by CRH family peptides
 研究代表者 中林幸士 (KOJI NAKABAYASHI)
 神戸大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：80362789

研究成果の概要 (和文)：

近年、CRH 関連ペプチドとして、urocortin1 (Ucn1), stresscopin (SCP)/urocortin3 (Ucn3), stresscopin-related peptide (SRP)/urocortin 2 (Ucn2)が発見され、CRHR1 および CRHR2 という 2 種類の受容体にそれぞれ異なる結合能 (CRH と Ucn1 は、CRHR1, CRHR2 の両方に結合し得るが、SCP と SRP は、CRHR2 のみに結合する。) で結合し、CRH と同様に生体のストレス反応に関与することが解明されつつある。ヒト正常卵巢ならびに卵胞液から分離培養したヒト黄体化顆粒膜細胞では、CRH, Ucn1, SCP, SRP の mRNA 発現を認めた。培養ヒト黄体化顆粒膜細胞において、Ucn1 と SCP のタンパク発現を免疫染色法で検討したが、Ucn1 のタンパク発現は抗体が悪いため不明瞭であったが、SCP タンパク発現は存在を認めた。SCP/Ucn3 添加により培養ヒト黄体化顆粒膜細胞でのプロゲステロン産生を抑制した。

研究成果の概要 (英文)：

Corticotropin-releasing hormone (CRH) and its receptors have been identified in female reproductive tissues. CRH regulates follicular maturation, ovulation, luteolysis, and steroidogenesis. A CRH-related peptide stresscopin (SCP), or urocortin III (Ucn3), has recently been identified, but its functions in the ovary remain to be elucidated. In the present study, we investigated the effects of SCP/Ucn3 on progesterone production in cultured human granulosa-lutein cells. SCP/Ucn3, and CRHR2 mRNAs and proteins were expressed in granulosa-lutein cells. SCP/Ucn3 was detected in culture media of granulosa-lutein cells and follicular fluid by RIA. In cultured granulosa-lutein cells, treatment with SCP/Ucn3 decreased progesterone secretion. In addition, concomitant treatment with the CRHR2 antagonist antisauvagine-30 counteracted the inhibitory effects of SCP/Ucn3, suggesting a mediatory role of CRHR2. The present results suggest that the SCP/CRHR2 system is present in human ovaries and treatment with SCP/Ucn3 inhibits progesterone production by cultured granulosa-lutein cells through interaction with CRHR2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：SCP, CRH, UCN, Progesterone, ovary

1. 研究開始当初の背景

生体にストレスが加わると、生体防御機構として神経伝達物質を介する神経系・サイト

カインを介する免疫系・ホルモンを介する内分泌系が作動し、生体は生体の恒常性の維持に努める。ストレスにさらされると、視床下

部より分泌された corticotropin-releasing hormone(CRH)は視床下部-下垂体-副腎(HPA)axisを介して、副腎皮質ホルモンを分泌し短時間の生体防御機能を高めると考えられている。しかし、過度のHPA axis刺激は、うつ病、神経性食思不振症などの身体的・精神的障害をもたらす。生殖内分泌領域では、生活環境の変化によるストレスや、身体的・精神的なストレスが月経周期・妊娠維持に影響を及ぼすことは、臨床でしばしば経験される。本研究ではストレスが卵巣機能に与える影響を解明することを目的としている。1960年代、視床下部組織抽出タンパク(CRH)が下垂体を刺激し、adrenocorticotrophic hormone(ACTH)を分泌することが発見された。1981年にはCRHの41からなるアミノ酸配列が同定され、さらに1995年にはCRH類似のペプチドurocortin(UCN)が発見され、CRH,urocortinの受容体であるCRH receptor 1(CRHR1)とCRH receptor 2(CRHR2)が同定された。また、2001年には、CRH類似のペプチドであるstresscopin(SCP)とstresscopin-related peptide(SRP)が米国スタンフォード大学産婦人科生殖内分泌部門Aaron Hsueh教授の教室で発見された。申請者はSCP,SRPが順次発見された時期に、同研究室において指導的立場にいた者であり、下垂体前葉より分泌される新しい甲状腺刺激ホルモンであるサイロステイムリンの発見やリラキシン受容体の発見に携わり、SCP,SRPにも精通した。SCP,SRPの生殖内分泌領域での研究を遂行するにあたり、国内外で先駆的な立場にあるひとりである。CRH,UCNはCRHR1,CRHR2を刺激するが、CRHはCRHR1を、一方、UCNはCRHR2を優位に刺激し、SCP,SRPはCRHR2を選択的に刺激する。近年のCRHR1,CRHR2ノックアウトマウスの検討で、CRHR1は短時間の生体防御機能に関わり、CRHR2はCRHR1を介する過剰な反応を抑える機能を有することが解明されてきている。UCN,SCP,SRP,CRHR1,CRHR2の発現は、CRHと同様に脳などの中枢組織以外に末梢組織の心臓・胃・大腸・膵臓・卵巣・胎盤において認められており、autocrine/paracrine調節因子としての役割が注目されている。

これまで、我々はCRH,SCPのヒト胎盤における役割、特に接着・浸潤と血管新生を介して妊娠初期の胎盤形成に重要な役割を担うヒト妊娠初期絨毛外トロホプラスト(EVT)に焦点をおき機能解明を行ってきた。母体脱落膜への侵入時に認めるEVTより分泌されるVEGFは胎盤の血管新生に役割を担っている。我々はEVTにCRH,SCP,CRHR1,CRHR2の発現を確認し、CRH,SCPはCRHR2を介しVEGF発現を抑制することを解明した(Endocrine 33:144, 2008)。すなわち、EVTに

発現するCRH,SCPは胎盤形成時の血管新生を抑制することが明らかとなり、着床不全・流産・妊娠高血圧症候群・子宮内胎児発育遅延の病態解明の一助となると考えている。

ストレスがもたらす性機能障害のメカニズムとして、視床下部でストレス刺激により活性化されたCRHがGnRHパルス分泌を抑制し性機能を障害することが解明されている。また、卵巣で発現するCRHは卵胞成熟や排卵、黄体化、ステロイド産生などに関わるとされ、CRH分泌が過剰または過少となると早発閉経や無排卵、黄体機能不全、卵巣機能不全を引き起こすことが予測されている。

2. 研究の目的

ヒト卵巣におけるCRH,UCN,SCP,SRP,CRHR1,CRHR2の役割を検討するため、CRH同様、これらUCN,SCP,SRPが卵胞の生理的な成熟過程や卵巣のステロイド産生能に影響を及ぼしているかどうか、ヒト黄体化顆粒膜細胞を用いて検討を加えた。ヒト卵巣でのCRHファミリーペプチドならびにそれらの受容体の発現態度の解析、CRHファミリーペプチドの培養ヒト黄体化顆粒膜細胞に与える影響の解析を行った。

3. 研究の方法

1. CRH,UCN,SCP,SRP,CRHR1,CRHR2のヒト卵巣組織(卵胞期・排卵期・黄体期それぞれ少なくとも3検体)ならびにヒト黄体化顆粒膜細胞のmRNA・蛋白発現ならびに免疫組織学的検討

a. RNA抽出とrealtime RT-PCR

抽出卵巣組織ならびにヒト黄体化顆粒膜細胞は少量であるため、RNAを効率よく抽出するため、Qiagen社のShredder、RNA抽出マイクロキットを使用する。Roche社のRT-PCRキットを使いRNAよりcDNAを合成する。作成したcDNAをペプチド研究所でオーダーしたCRH,UCN,SCP,SRP,CRHR1,CRHR2に対する特異的プライマーを使用し、SYBR Green kitでrealtime RT-PCRを施行し、発現態度を解析する。non specificな増幅が認められ解析不能の場合はプライマーにプローブを標識し特異度を高め解析する。

b. タンパク発現の検討

特異的抗体および中和ペプチドを添加した特異的抗体を用い比較することで、ヒト黄体化顆粒膜細胞ならびに卵胞期・排卵期・黄体期のヒト卵巣組織でのCRH,UCN,SCP,SRP,CRHR1,CRHR2タンパク発現ならびに局在を検討する。なお、CRH,UCN,SCP,SRP抗体は研究協力者であるSalk instituteのVale教授より提供を受けている。また、培養ヒト黄体化顆

粒膜細胞を 24 時間無血清培地で培養し、培養液中の CRH, UCN, SCP, SRP を RIA 法で測定し分泌タンパクであることを確認する。

2. CRH, UCN, SCP, SRP のヒト黄体化顆粒膜細胞のアポトーシス・増殖能に及ぼす影響の検討

培養 24 時間後でのヒト黄体化顆粒膜細胞の無血清培養系に CRH, UCN, SRP, SCP を添加(0.1nM~100nM)し、培養 72 時間後でのアポトーシスに及ぼす影響を TUNEL 法と Hoechst33258 染色を用い検討する。また同時に Fas, Fas ligand, caspase-3 cleavage fragment, PARP cleavage fragment タンパク発現に及ぼす影響を Western immunoblotting 法にて検討する。なお、タンパク発現量の検討は β アクチンで補正することで検討する。同様に培養 24 時間後でのヒト黄体化顆粒膜細胞の無血清培養系に CRH, UCN, SCP, SRP を添加(0.1nM~100nM)し、上記培養細胞における viable cell number を MTT 法で経時的に調べる。増殖能に関しては、CRH, UCN, SCP, SRP 添加後の上記培養細胞での BrdU 取り込みを調べ、さらに PCNA 蛋白発現動態を免疫染色法及びウエスタンブロット法を用いて経時的に解析する。

3. CRH, UCN, SCP, SRP によるヒト黄体化顆粒膜細胞のステロイド産生に及ぼす影響の検討

培養24時間後でのヒト黄体化顆粒膜細胞の無血清培養系に CRH, UCN, SCP, SRP を添加(0.1nM~100nM)し、エストロゲン・プロゲステロン産生をELISA法にて解析、非添加群と比較検討する。無血清培養液に基質であるアンドロステジオン(10nM)を添加することでより明らかな効果を解析することが可能になる。さらに、CRHR1, CRHR2 の特異的アンタゴニストの antalamine や anti-sauvagine を添加し、ステロイド産生に与える影響がどの受容体を介するかを解析する。また、ヒト黄体化顆粒膜細胞 cell line の HGP38 株を使用し同様の効果を認めるか検討する。

4. 研究成果

ヒト黄体化顆粒膜細胞における SCP/Ucn3 および CRHR2 の mRNA レベルでの存在を、RT-PCR で検討した。ヒト正常卵巢ならびにヒト黄体化顆粒膜細胞では、CRH, Ucn1, SCP, SRP の mRNA 発現を認めた。また、それら受容体である CRHR1, CRHR2 の mRNA 発現を認めた。CRHR1 ならびに CRHR2 の培養ヒト黄体化顆粒膜細胞における局在は免疫染色法で存在を確認した。とくに、CRHR2 の機能解析のため、Ucn1 と SCP に着目した。培養ヒト黄体化顆粒膜細胞において、Ucn1 と SCP のタンパク発現を免疫染色法で検討したが、Ucn1 のタンパク発現は抗体が悪いためか不明瞭であったが、SCP タンパク発現は存在

を認めた。SCP/Ucn3 の培養ヒト黄体化顆粒膜細胞のプロゲステロン産生に与える影響を検討するため、SCP/Ucn3 添加前後の培養液中プロゲステロン値の変化を ELISA 法で測定した。SCP/Ucn3 添加により培養ヒト黄体化顆粒膜細胞でのプロゲステロン産生を抑制した。アポトーシスと増殖因子については、現在検討中である。本研究成果は、卵巢でのステロイドホルモン産生に対して、ストレスホルモンの影響がパラクライン因子として存在することが判明し、ストレスによる月経異常や排卵障害の要因の一つになると考えられた。

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 3 件)

- ① 中林幸士、山田秀人、サイロムステムリン、2010 年増刊号、広範囲 血液・尿化学検査、免疫学的検査(第 7 版)4—その数値をどう読むか— 273-276, 2010
- ② Yoshida S, Ohara N, Xu Q, Chen W, Wang J, Nakabayashi K, Sasaki H, Morikawa A, Maruo T. Cell-type specific actions of progesterone receptor modulators in the regulation of uterine leiomyoma growth. *Semin Reprod Med* 28:260-273, 2010
- ③ Yata A, Nakabayashi K, Wakahashi S, Maruo N, Ohara N, Maruo T. Suppression of progesterone production by stresscopin/urocortin 3 in cultured human granulosa-lutein cells. *Hum Reprod* 24:1748-1753, 2009, 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① Maruo T, Ohara N, Yoshida S, Nakabayashi K, Xu Q, Chen W. Plenary Session on Uterine Fibroids : Cell-type specific attack on uterine fibroids by progesterone receptor modulators. The 14th World Congress of Gynecological Endocrinology, March 4-7, 2010, Florence, Italy
- ② Maruo T, Ohara N, Yoshida S, Nakabayashi K, Xu Q, Chen W, Matsu H, Yamada H. Progesterone and progesterone receptor modulators in uterine myoma cell growth : Its implication in women's health. The 20th World Congress on International Federation of

- Fertility and Sterility (IFFS), September 12-16, 2010, Munich, Germany
- ③ Hazama R, Miyahara Y, Makihara N, Nakabayashi K, Niiya K, Ebina Y, Yoshida S, Yamada H. A case of cervical cancer metastatic to the small intestine 4 months after initial surgery. 13th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS2010), October 23-26, 2010, Prague, Czech Republic
- ④ Maruo T, Ohara N, Yoshida S, Nakabayashi K, Xu Q, Matsuo H, Yamada H. Attack on uterine leiomyomas by progesterone receptor modulators in a cell-type specific manner. The 3rd NIH International Congress on Advances in Uterine Leiomyoma Research, November 22-23, 2010, Bethesda, USA
- ⑤ 鈴木嘉穂、中林幸士、武居智信、松岡左希子、陌間亮一、竹村直也、出口雅士、森田宏紀、吉田茂樹、山田秀人. 子宮体部原発の小細胞未分化癌の1例. 第62回日本産科婦人科学会・学術講演会、平成22年4月23日～25日、東京
- ⑥ 園山綾子、出口雅士、竹村直也、中林幸士、森田宏紀、吉田茂樹、山田秀人. 子宮体部 Large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) の1例. 第62回日本産科婦人科学会・学術講演会、平成22年4月23日～25日、東京
- ⑦ 武居智信、竹村直也、松岡左希子、鈴木嘉穂、陌間亮一、出口雅士、中林幸士、森田宏紀、吉田茂樹、小原範之、山田秀人. 卵巣腫瘍手術症例における下肢静脈血栓症術前診断の検討. 第62回日本産科婦人科学会・学術講演会、平成22年4月23日～25日、東京
- ⑧ 中林幸士、陌間亮一、上中美月、中島由貴、森實真由美、森田宏紀、山田秀人. 腹腔鏡で診断・治療が可能であった腹膜妊娠の1例. 第9回兵庫産婦人科内視鏡手術懇話会、平成22年5月8日、神戸
- ⑨ 中林幸士. ストレス関連新規CRHファミリーペプチド(UCN, SCP, SRP)および受容体の卵巣機能に与える影響の解析. 財団法人 神澤医学研究振興財団 第12回講演会、平成22年5月28日、東京
- ⑩ 中林幸士、陌間亮一、鈴木嘉穂、松岡左希子、森實真由美、出口雅士、宮原義也、森田宏紀、吉田茂樹、山田秀人. 孔式腹腔鏡手術の試み. 第84回兵庫県産科婦人科学会総会・学術集会、平成22年6月6日、神戸
- ⑪ 宮原義也、陌間亮一、出口雅士、中林幸士、森田宏紀、吉田茂樹、山田秀人. 神経温存広汎子宮全摘術の試み. 第84回兵庫県産科婦人科学会総会・学術集会、平成22年6月6日、神戸
- ⑫ 松岡左希子、山崎峰夫、白川得朗、山崎友維、鈴木嘉穂、陌間亮一、出口雅士、中林幸士、森田宏紀、吉田茂樹、山田秀人. 帝王切開癒痕部妊娠の治療経験. 第122回近畿産科婦人科学会総会・学術集会、平成22年6月19日～20日、京都
- ⑬ 園山綾子、中林幸士、鈴木嘉穂、出口雅士、森田宏紀、吉田茂樹、山田秀人. 子宮頸癌放射線療法後に膀胱膣直腸瘻から壊死性筋膜炎に至った1例. 第122回近畿産科婦人科学会総会・学術集会、平成22年6月19日～20日、京都
- ⑭ 武居智信、鈴木嘉穂、陌間亮一、牧原夏子、出口雅士、中林幸士、森田宏紀、吉田茂樹、山田秀人. 卵巣腫瘍手術症例における深部静脈血栓症の術前診断の検討. 平成22年度位育会臨床セミナー、平成22年8月21日、神戸
- ⑮ 宮原義也、武居智信、牧原夏子、鈴木嘉穂、陌間亮一、出口雅士、中林幸士、蝦名康彦、吉田茂樹、山田秀人. 自立神経温存広汎子宮全摘術の試み. 第123回近畿産科婦人科学会総会・学術集会、平成22年11月7日、京都

〔図書〕(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者

中林幸士 (KOJI NAKABAYASHI)
神戸大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80362789

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者