

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20126

研究課題名(和文) LH作用の分子メカニズムの解明による新規排卵誘発法の開発

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanism of LH on granulosa cell maturation

研究代表者

山下 宗一 (YAMASHITA, SOICHI)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10516412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラット卵巣顆粒膜細胞における全トランス型レチノイン酸(以下、ATRA)の効果を検討した。幼若ラット顆粒膜細胞系においてATRAに關与する因子がmRNAレベルで発現していることを確認した。同細胞にATRAを添加すると、容量依存的に培養液中のprogesterone量が増加した細胞系においてステロイド産生因子のmRNA発現量が上昇した。ATRA添加による細胞内cAMP濃度の上昇およびCREBのリン酸化を観察できた。これらの効果はPKA inhibitorを共添加した場合減弱を認めた。【考察】レチノイン酸は、顆粒膜細胞においてcAMP pathwayを介してprogesterone産生を増加させることが示された。

研究成果の概要(英文)：Activin regulates the Retinoic acid (RA) pathway and affect granulosa cell (GC) proliferation, suggesting that RA is important for early follicle development. The aim of this study was to investigate the effects of all-trans-RA (atRA) on progesterone production in immature rat GCs cultured without gonadotropin. Our results demonstrated that atRA enhanced progesterone production by upregulating the levels of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and cytochrome P450_{scc} (Cyp11a1) mRNAs, but not 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase mRNA. atRA enhanced intracellular cAMP accumulation and phosphorylation of cAMP response-element binding protein (CREB). In addition, H-89, an inhibitor of protein kinase A (PKA), abolished the stimulatory effects of atRA, indicating that atRA enhanced progesterone synthesis through cAMP/PKA signaling. In conclusion, our data demonstrated that atRA has a crucial role in progesterone synthesis in rat GCs during the early follicle stage.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：ラット顆粒膜細胞 レチノイン酸 性ステロイド合成 シグナル伝達

1. 研究当初の背景：

近年の晩婚化・妊娠年齢の高齢化の傾向は顕著であり、それに伴い生殖医療の果たす役割は大きくなってきていると考えられる。生殖内分泌学・生殖補助医療技術の発達によりこれまで妊娠が不可能であった女性の妊娠例を得られるようになってきたが、月経周期や排卵のメカニズムにはいまだ不明な点が多く、原因不明の原発性無月経や排卵障害・不妊症例を見る機会も多い。

2. 研究の目的：

卵巣においては、卵子の形成および妊娠成立・維持に必要な性ステロイドホルモンの合成がなされている。当教室では以前よりラット卵巣より顆粒膜細胞を抽出して初代培養系を作成し、この細胞培養系を用いて種々の因子の解析を行っている。ビタミンAの代謝物であるレチノイン酸は細胞分化・生殖に関与していることが知られている。また、性腺・下垂体などで産生されるアクチピンはFSHと共同して卵胞発育や細胞の分化誘導に関わっていることが知られているが、レチノイン酸 pathway を調整し卵巣顆粒膜細胞および卵巣機能を修飾することが報告されている。一方、レチノイン酸の卵巣顆粒膜細胞における直接的な作用を示した報告は少ない。今回我々は幼弱ラット顆粒膜細胞におけるレチノイン酸の作用につき、主に性ステロイドであるプロゲステロン合成経路への影響につき検討し、妊娠維持機構の解明に努めたい。

3. 研究の方法：

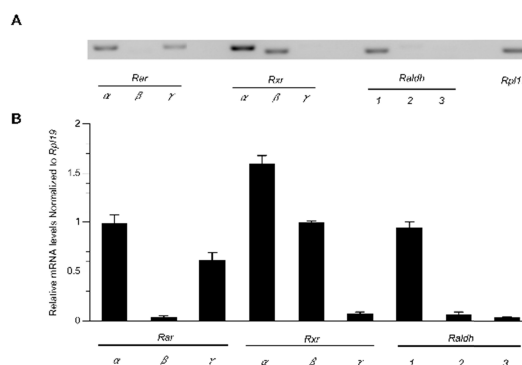
ラット卵巣より顆粒膜細胞を抽出して初代培養系を作成し、まずレチノイン酸に対す

る受容体の有無を確認する。レチノイン酸に対する受容体を確認できれば、レチノイン酸添加時の性ステロイドホルモンであるプロゲステロン産生量をELISA法を用いて評価する。プロゲステロン産生量について変化が確認できた場合、細胞内のcAMP濃度についてEIA法を用いて測定する。加えて、プロゲステロン産生に関わるStAR・Cyp11a1などの緒因子の変化や、シグナル伝達経路につき定量的PCR法やWestern-blot法を用いて検討する。

4. 研究の成果：

ラット卵巣顆粒膜では、mRNAレベルにおいては各種レチノイン酸受容体の発現を認める。

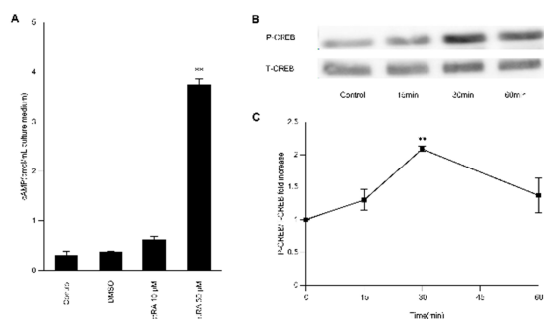
ラット卵巣顆粒膜細胞から抽出したmRNAを用いてRT-PCRを行った結果、mRNAでのレチノイン酸受容体(*Rar*, *Rxr*, *Raldh*)の発現が確認できた。



ラット顆粒膜細胞にレチノイン酸を添加すると、プロゲステロン産生が増加する。また、mRNAレベルではステロイド産生酵素であるStAR, Cyp11a1の増加を認める。

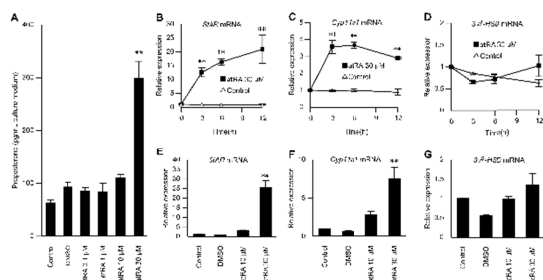
ラット卵巣顆粒膜細胞にレチノイン酸を添加し、培養液中のレチノイン酸濃度

が 30 μM まで上昇した場合培養液中の
 プログステロン濃度の上昇をみとめた。
 また、同濃度においてはステロイド合成
 酵素である StAR, Cyp11a1 の mRNA レベル
 での増加を認めた。一方、3 HSD につ
 いては変化を認めなかった。



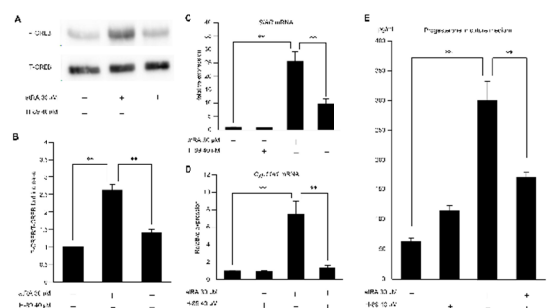
ラット顆粒膜細胞に対するレチノイン酸の 効果は、PKA 阻害薬により抑制され る。

ラット卵巣顆粒膜細胞に、レチノイン酸
 (30 μM) と PKA 阻害薬を共添加した場合、
 CREB のリン酸化は抑制された。また、mRNA
 レベルでの StAR および Cyp11a1 の発現上昇
 抑制、プロゲステロン産生増加の抑制も認
 められた。この結果から、レチノイン酸の
 効果は PKA pathway を介して作用するこ
 とが確認できた。



ラット顆粒膜細胞に対するレチノイン酸の 効果は、cAMP/CREB pathway を介す る。

ラット卵巣顆粒膜細胞にレチノイン酸
 を添加し、培養液中のレチノイン酸濃度
 が 30 μM まで上昇した場合細胞中の c
 AMP 濃度の上昇をみとめた。また CREB
 のリン酸化については、レチノイン酸添
 加 15 分後にはリン酸化を認めはじめ、
 30 分後に最大となり、60 分後には減弱
 を認めた。この結果よりラット顆粒膜細
 胞に対するレチノイン酸の効果は c
 AMP/CREB pathway を介して作用するこ
 とが示された。



総括：ラット卵巣顆粒膜細胞におけるレチ
 ノイン酸の効果を検討した。幼若ラット顆
 粒膜細胞系においてレチノイン酸受容体が
 mRNA レベルで発現していることを確認した。
 同細胞にレチノイン酸を添加すると、容量
 依存的に培養液中のプロゲステロン量が増
 加した細胞系においてステロイド産生因
 子の mRNA 発現量が上昇した。レチノイン酸
 添加による細胞内 cAMP 濃度の上昇および

CREB のリン酸化を観察できた。これらの効果は PKA inhibitor を共添加した場合減弱を認めた。【考察】レチノイン酸は、顆粒膜細胞において cAMP pathway を介してプロゲステロン産生を増加させることが示された。

5. 主な発表論文等：

〔雑誌論文〕(計1件)

— Suwa H, Kishi H, Imai F, Nakao K, Hirakawa T, Minegishi T: Retinoic acid enhances progesterone production via the cAMP/PKA signaling pathway in immature rat granulosa cells
Biochemistry and Biophysics Reports 8(2016)62-67 (査読有)

〔学会発表〕(計2件)

第20回日本生殖内分泌学会学術集会
2016年1月 神戸市
第68回日本産科婦人科学会学術講演会
2016年4月 横浜市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下宗一 (YAMASHITA SOICHI)
群馬大学医学部附属病院・講師
研究者番号：10516412