

## 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25年4月10日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659295

研究課題名（和文） 妊娠率向上のための子宮におけるLH/hCG作用の解明

研究課題名（英文） The role of LH/hCG in uterine endometrium for fertility

## 研究代表者

峯岸 敬 (MINEGISHI TAKASHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00209842

## 研究成果の概要（和文）：

幼若ラットにおいて、PMSG でやや誘導された LH/hCG receptor mRNA は hCG 投与により急激に Down Regulation を受けて、その後増加し、2-3 倍の増加がみられた。MVK はこのレセプター mRNA に結合することが示されており、PMSG 処理後に MVK の発現が上昇し、このレセプターの一時的減少は MVK によることが推測された。子宮切片に hCG を作用させると、メディアウム中の cAMP が上昇した。次に、子宮の局在を明らかにするため、幼若ラット子宮の免疫染色を行い、子宮内膜上皮に最も強く発現がみられた。

## 研究成果の概要（英文）：

We have detected LH/hCG receptor mRNA in the immature rat uterus by Northern blot and down-regulation of this receptor mRNA in the PMSG-hCG treated immature rats. Mvk, an LHR mRNA-binding protein, has been shown to accelerate LHR mRNA instability in the ovary. In the uterus, Mvk increased after PMSG treatment of immature rats and decreased after hCG treatment. The cultured uterus displayed an hCG concentration-dependent increase in cAMP production in medium. The immunohistochemical experiment showed that these receptor proteins are expressed in the epithelial cells of endometrium. These results suggest that functional LH/hCG receptors are present in the immature rat uterus and are down-regulated and up-regulated by signals resulting from hCG treatment.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	570,000	3,370,000

## 研究分野：生殖内分泌

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：LH/hCG、子宮、LH/hCG receptor

1. 研究開始当初の背景  
不妊治療においては、体外受精の技術の発展は著しいが、着床不全の治療は困難であり、

着床のメカニズム解明に進展が必要である。妊娠中の hCG 上昇に関しては、黄体機能維持メカニズムに関して新しい知見が報告され、

同様のメカニズムによる子宮における hCG の機能を明らかにすることが着床不全の治療に必要であると考えた。R. J Phillips らは、ヒト子宮筋に LH/hCG 受容体が存在し、子宮筋の弛緩に作用していると報告している。P. Cameo らは、サルの子宮に対する免疫組織法を用いて、増殖期には検出できないが、分泌期に子宮内膜に LH/hCG 受容体蛋白発現を確認している。実験結果に不一致がみられるが、これは信頼性の低い抗体を用いているためと考え、今回我々は mRNA レベルでの発現と cAMP 産生能を指標に受容体の発現変化を検討し、原因不明不育症の病態解明と治療法の検索が必要であると考えた。

## 2. 研究の目的

LH/hCG の卵巣・精巣における作用は、cAMP から EGF スーパーファミリーの分泌を介して ERK1/2 の活性化を誘起するとされている。我々は、子宮も LH/hCG に反応して cAMP 上昇がもたらされることを確認したので、子宮の受容体も同様の経路を活性化して着床に対する新たな役割が存在する可能性があり、まず子宮に存在する LH/hCG 受容体の存在と機能を明らかとし、排卵着床時期の LH または hCG の子宮に対する作用メカニズムを解明することを目的とした。さらに、これらの機能解析結果を着床に最も適した内膜の状況を判断することに利用し、着床不全、習慣流産の治療法と体外受精成績向上に反映させることを目的とした。

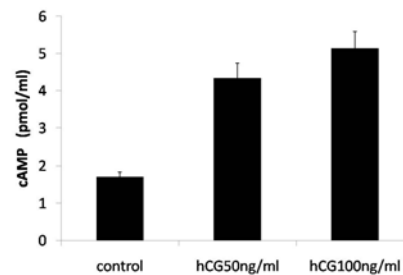
## 3. 研究の方法

- ① ラット子宮を用いた実験では、LH が子宮に作用すると cAMP が上昇することがわかり、ノーザンブロットでも子宮に LH/hCG 受容体 mRNA の存在を確認する。  
ラット子宮を切断し、小片をメディウム中に置き、それぞれの濃度の hCG を添加後、2 時間でメディウムを採取し、その cAMP 濃度を測定した。
- ② 生理的状況で LH 作用は卵巣から排卵を起こすが、この LH が子宮にも LH/hCG 受容体を介して周期的に作用をしている可能性があり、ホルモン環境の変化での LH/hCG 受容体の増減を検討する。さらに、LH 作用の子宮における胚の着床に影響するメカニズムを検討する為、ヒト子宮内膜細胞培養系を用いて、EGF スーパーファミリー等の成長因子の分泌との関連を明らかとする。
- ③ 一方培養細胞での検討として 293ce11 をコントロールとして、内膜癌細胞培養系を用いて (Ishikawa, HEC-1A, KLE) LH-R の発現と EGFR・HER-2 発現を検討する。  
またこれらのレセプターは 2 量体を形成して作用が伝達されるため、2 量体形成に関する検討を行った。

## 4. 研究成果

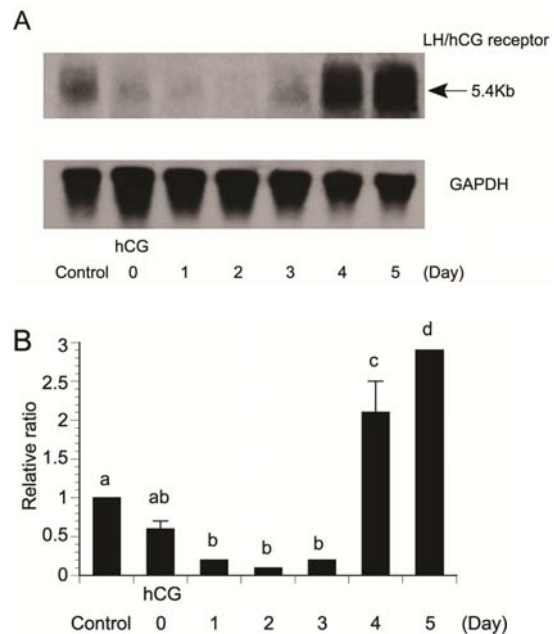
- ① ラット子宮を用いた実験では、LH が子宮に作用すると cAMP が上昇することがわかり、ノーザンブロットでも子宮に LH/hCG 受容体 mRNA の存在を確認した。  
ラット子宮を切断し、小片をメディウム中に置き、それぞれの濃度の hCG を添加後、2 時間でメディウムを採取し、その cAMP 濃度を測定した。無添加 control に比し、hCG 50ng と 100ng で有意に上昇がみられた。これらの実験結果は、子宮に LH/hCG 受容体が存在し、機能している可能性を示している。(図 1)

図 1



- ② in vivo でのゴナドトロピン投与による子宮内膜における変化を観察するため幼若ラットに PMSG と hCG を投与してその後の子宮におけるレセプターの発現を観察する。

図 2



PMSG でやや誘導された LH/hCG receptor は hCG 投与により急激に Down Regulation を受けて 2-3 日目を最低に減少した。一方この処置により 4-5 日目にかけて 2-3 倍への増加がみられた。この実験では PMSG を投与せずにも同様の結果が得られたことから、

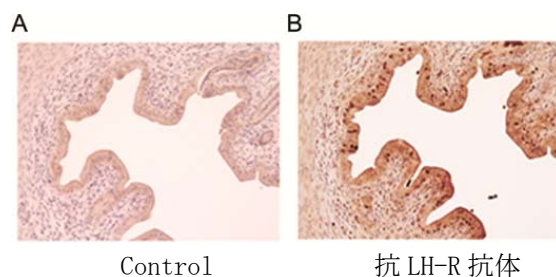
hCG が子宮におけるレセプターに結合しそのシグナル伝達により自己のレセプターmRNAの減少がもたらされたと考えられた。(図2) E<sub>2</sub>投与実験でもレセプター発現に変化がなかったことからステロイドホルモンによる変化ではないと考えた。卵巣においては、LH-R mRNA にメバロネートキナーゼ (MVK) が結合することがその減少に関わり、この MVK を E<sub>2</sub>が減少させることで間接的に E<sub>2</sub>が LH-R mRNA を上昇させる機序が明らかとなったので、同様の機序が存在するか検討した。結果としては、MVK の発現が上昇していることが観察されたので、このレセプターの一時的減少の一部は MVK の上昇による半減期が影響を受けていることが推測された。

妊娠したラットの子宮を用いて mRNA の変化を観察したが、やはり変化は見られなかった。次に、子宮の局在を明かにするため、幼若ラットの免疫染色を行い、図3のように子宮内膜上皮に強く発現がみられた。これはヒトでも同様の発現がみられている。

これらの結果から子宮内膜上皮に LH または hCG が作用するとそこで産生される cAMP が子宮間質にも分散し子宮全体に影響を及ぼすことが推定された。

このため子宮上皮系の細胞を用いて、検討することにして、LH-R の発現が報告されている内膜癌 cell line を用いてレセプター発現を検討したが、我々の系ではこの発現は認識することができなかった。

図3



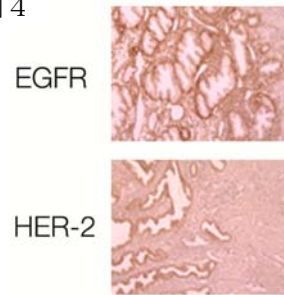
### ③培養細胞での EGFR の検討

培養細胞に EGF を添加すると MAPK の活性として ERK リン酸化が上昇することが確認できた。EGF は HEC-1A では 1 pg/ml から活性が確認でき、細胞間で感受性に相違があった。このため、EGFR の発現に対する検討を行うこととした。

はじめに正常ヒト内膜での EGFR の発現を検討すると図4に示すように、内膜上皮に EGFR、HER-2 の発現が観察された。この発現は内膜癌組織でも確認され、その強度については今後検討する。

子宮内膜の cell line を用いて EGFR の発現を検討したが、293cell と比較して、Ishikawa、HEC-1A、KLE で EGFR・HER-2 が多く発現していることが判明した。(図5)

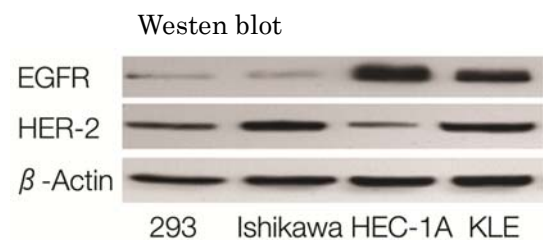
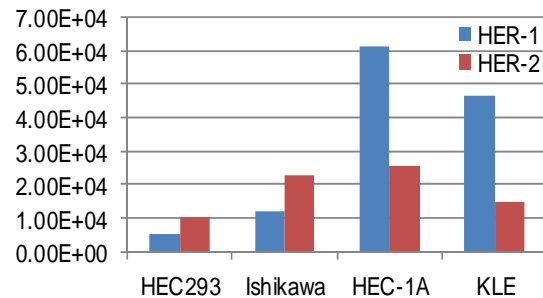
図4



(RT-PCR、western とともに)

EGFR : HEC-1A (G2) > KLE (G3) > Ishikawa (G1)  
 HER-2 : Ishikawa (G1) > KLE (G3) > HEC-1A (G2)  
 さらに、EGFR/HER-2 のレセプターのヘテロダイマーを検出できるかの検討を行い、HER-2 の発現の最も高い Ishikawa 細胞でヘテロダイマーが強く確認することができた。今後これらの EGFR と内膜細胞の増殖能の関係を明らかにし、卵巣における LH 作用による EGF 様物質の誘導が子宮内膜でも生じている可能性について検討する。

図5 RT-PCR



### 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8件)

- ① Kogure K, Nakamura K, Ikeda S, Kitahara Y, Nishimura T, Iwamune M, Minegishi T. Glucose-Regulated Protein, 78-Kilodalton as a Modulator of Luteinizing Hormone Receptor Expression in Luteinizing Granulosa Cells in Rats. Biol Reprod 88(1):8, 1-11, 2013 査読有  
 DOI: 10.1095/biolreprod.112.101873.

- ② Luvsandagva B, Nakamura K, Kitahara Y, Aoki H, Murata T, Ikeda S, Minegishi T. GRP78 induced by estrogen plays a role in the chemosensitivity of endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 126:132-139, 2012 査読有  
DOI: 10.1095/biolreprod.112.101873.
- ③ Kasahara Y, Kitahara Y, Nakamura K, Minegishi T. Downregulation of LH receptor mRNA in the rat uterus. *Mol Med Report* 5:1146-1150, 2012 査読有  
DOI: 10.3892/mmr.2012.795
- ④ Yamashita S, Nakamura K, Shinozaki H, Minegishi T. Lymphangiomiomatosis suspected to be a gynecologic disease. *J Obstet Gynaecol Res* 37:267-269, 2012 査読有  
DOI: 10.1111/j.1447-0756.2010.01368.x
- ⑤ Watari H, Kanuma T, Ohta Y, Hassan MK, Mitamura T, Hosaka M, Minegishi T, Sakuragi N. Clusterin expression inversely correlates with chemosensitivity and predicts poor survival in patients with locally advanced cervical cancer treated with cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy and radical hysterectomy. *Pathol Oncol Res* 16:345-352, 2010 査読有  
DOI: 10.1007/s12253-009-9235-0

[学会発表] (計7件)

- ① Yamashita S, Minegishi T, Ascoli M. The Leydig cell MEK/ERK pathway is critical for maintaining a functional population of adult Leydig cells and for fertility. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. 2012. 11. 16, 石川音楽堂 (石川)
- ② 笠原慶充、北原慈和、中村和人、峯岸敬、ラット子宮における LH 受容体 (LHR) の発現調節、第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会、2012. 4. 13、神戸国際展示場 (神戸)
- ③ Minegishi T, Pathophysiology of PCOS. *FertiLink* 2011, 2011. 11. 6, 釜山 (韓国)
- ④ 岩宗政幸、北原慈和、小暮佳代子、中村和人、峯岸敬、ラット卵巣 LH 受容体 (LHR) の発現調節における、GRP78 と miRNA の関係について、第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会、2011. 8. 29、大阪国際会議場 (大阪)
- ⑤ Kitahara Y, Nakamura K, Kogure K, Minegishi T. Role of microRNA in the Expression of Luteinizing Hormone-Human Chorionic Gonadotropin

Receptor mRNA in Rat Ovary. Endo 2011:93th Annual Meeting, 2011. 6. 4, ボストン (米国)

- ⑥ 岸裕司、伊藤理廣、五十嵐茂雄、今井文晴、峯岸敬、帝王切開癒痕部妊娠 14 例の臨床的検討、第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会、2010. 4. 25、東京国際フォーラム (東京)
- ⑦ ルブサンダクワバイガルマー、中村和人、青木宏、平川隆史、村田知美、池田禎智、小暮佳代子、北原慈和、峯岸敬、子宮体癌に対し、分子シャペロンの発現の意味、第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会、2010. 4. 23、東京国際フォーラム (東京)

[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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峯岸 敬 (MINEGISHI TAKASHI)  
群馬大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：00209842

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし