

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月2日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791807

研究課題名（和文） 卵巣機能と脂質代謝の関連についての基礎的研究

研究課題名（英文） The relationship between ovarian function and expression of Mvk

研究代表者

池田 禎智（IKEDA SADATOMO）

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：60568252

研究成果の概要（和文）：LH 受容体の転写後の調節において mevalonate kinase (Mvk) が LH 受容体 mRNA に結合し代謝を促進することが判明した。E₂ が Mvk の発現を抑制することが判り、炎症性サイトカインの IL-6、TNF α は共に発現増強をはかり、mRNA の減少に働くと考えられた。ラット子宮内膜にも LH 受容体が発現していたが hCG 投与で減少し、この時 Mvk が上昇していたので子宮内膜の発現減少にも Mvk が関与する可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that Mvk binds to LHR mRNA and stimulates the digestion of this mRNA as post-translational regulation. The production of Mvk was inhibited by E₂ and stimulated by IL-6 and TNF α in granulosa cell culture. In the uterus, Mvk expression decreased after hCG treatment of immature rats. These results suggest that functional LHR are present in the uterus and are downregulated by hCG induced hCG.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

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：卵巣、ゴナドトロピン、脂質代謝、機能調節

1. 研究開始当初の背景

卵巣における黄体化ホルモン (LH) 受容体は、生殖機能の制御において重要な役割を担っている。その発現にはゴナドトロピンのみならず種々の局所因子が関与することが知られているが、近年新たな LH 受容体の発現調節因子として mevalonate kinase (Mvk) が報告された。Mvk はコレステロール生合成に関わる酵素であるが、ラット卵巣において LH 受容体 mRNA と結合してその安定性を低下させることにより発現を抑制する働きをもつことが明らかとなった。

卵巣はエストロゲン産生の中心であり、かつその主要な標的臓器でもある。エストロゲン

は FSH に相乗的に作用し、顆粒膜細胞において LH 受容体発現を誘導し細胞の分化を促進する。エストロゲン受容体には α と β が存在し顆粒膜細胞の分化には主に β 受容体 (ER β) が関与することが知られているが、FSH とエストロゲンの共存下での LH 受容体発現増加の機序は解明されていない。我々は Mvk がこの機序に関与すると考え、ラットの卵巣および初代顆粒膜細胞培養系を用いてエストロゲンが LH 受容体 mRNA の発現に与える影響について研究を行った。

2. 研究の目的

卵巣は種々のホルモンや局所における様々

な調節因子によってその機能が制御されている。その中でも下垂体から分泌されるゴナドトロピン (LH、FSH) は卵胞発育や排卵、黄体化といった一連の機構に密接に関与しており、またそれは臨床的にも広く応用されている。

卵巣へのゴナドトロピン刺激は性周期の形成や生殖機能の調節に重要であり、その異常が無月経や不妊症といった疾患の原因のひとつとして考えられている。ゴナドトロピンの標的臓器である卵巣では、受容体レベルでの調節を介してその刺激伝達の制御が行われているとされる。そのため卵巣機能を考える上でゴナドトロピン受容体の発現調節を研究することには意義があることと思われる。

近年、卵巣における LH 受容体 (LHR) の発現調節因子として Mvk の存在が報告された。Mvk はコレステロール生合成に関わる酵素であり、コレステロールや抗高脂血症薬の投与によりその発現や活性が変化することが知られている。

一方で月経異常や無排卵といった卵巣機能不全症状を来す疾患として多嚢胞性卵巣症候群が知られているが、これは肥満や脂質代謝異常とも大きく関係している。脂質代謝と生殖内分泌制御機構には密接な関係があると考えられるが、Mvk が卵巣において LH 受容体の発現調節因子として機能していることがその関連性を解明する手がかりのひとつになるとと思われる。

そこで本研究では卵巣内での Mvk の発現や機能の解析を進め、卵巣機能調節に与する役割やその機構を解明することを目的とする。前述のとおり Mvk が卵巣に発現しており LH 受容体の発現調節に関与することが判明しているものの、Mvk の卵巣内での局在や、Mvk 自体の発現の調節機序など未だ解明されていない点も多い。卵巣局所における Mvk を介した LH 受容体の発現調節機構の解明を進めることで、前述の多嚢胞性卵巣症候群にみられるような脂質代謝異常と卵巣機能異常との関連性についての理解を進めていく一助になると考えられる。

3. 研究の方法

3 週齢の幼若 Wistar ラットに Diethylstilbestrol 2mg/日を 4 日間皮下投与した後、卵巣を採取し顆粒膜細胞を分離して初代顆粒膜細胞培養を作成し実験に供した。

顆粒膜細胞を無血清培地にて 24 時間培養し、次いで FSH や Estradiol (E_2) などを種々の条件で添加した後に細胞を回収して RNA を抽出した。抽出した RNA より LH 受容体 mRNA の発現を Northern blotting にて解析した。また LH 受容体の promoter 領域の転写活性を

Luciferase assay にて解析した。LH 受容体 mRNA の安定性を調べるため、ホルモン添加後の顆粒膜細胞培養に RNA 合成抑制剤である actinomycin D をさらに添加して培養を継続した後、RNA を抽出して Northern blotting を行った。

顆粒膜細胞における Mvk mRNA の発現を解析するため、種々の条件で培養した顆粒膜細胞より RNA を抽出し定量的 RT-PCR を行った。また Mvk 発現ベクターを調製し、顆粒膜細胞にトランスフェクションして Mvk を過剰発現させた系を作成した。この系に FSH や E_2 を種々の条件で添加して培養した後に RNA を抽出し、Northern blotting にて LH 受容体 mRNA の発現の変化を解析した。

25 日齢の Wistar ラットに妊馬血清ゴナドトロピン (PMSG) およびヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) を投与して、LH 受容体の down-regulation を誘導した卵巣を採取した。その卵巣における LH 受容体 mRNA および Mvk mRNA の発現を Northern blotting にて解析し、in vivo での Mvk の LH 受容体 mRNA に対する影響を調べた。

4. 研究成果

(1) ラット顆粒膜細胞における LH 受容体 mRNA に対する FSH および E_2 の影響

FSH および E_2 が LH 受容体 mRNA に与える影響を調べるため、まず無血清培地にて 24 時間培養した顆粒膜細胞の培養液中に FSH、 E_2 を種々の条件で添加し 72 時間後の LH 受容体 mRNA の発現量を Northern blotting にて解析した (図 1)。FSH (30ng/ml) 添加により LH 受容体 mRNA の発現が誘導され、また E_2 (0.1 ~ 1nM) を同時添加した群では用量依存的に LH 受容体 mRNA 発現が促進された (1nM 同時添加で約 3.5 倍の発現増加作用あり)。一方で、 E_2 単独添加群やホルモン非添加群では LH 受容体 mRNA の発現は認められなかった。

次いで時間経過による LH 受容体 mRNA 発現の変化を解析した。FSH 単独添加群と FSH と E_2 (1nM) を同時添加した群で、それぞれホルモン投与から 24~96 時間後の LH 受容体 mRNA の発現量を Northern blotting にて比較した (図 2)。FSH により誘導された LH 受容体 mRNA は、 E_2 同時添加により 24 時間後よりその発現の増強がみられ、96 時間後でも高い発現量が維持されていた。

続いて、エストロゲン拮抗薬による E_2 の LH 受容体 mRNA 発現促進作用に対する影響を調べた。ラット顆粒膜細胞では ER β が優位に発現しているとされ (Schomberg DW, 1999)、ER β の選択的アンタゴニストである R, R-THC をエストロゲン拮抗薬として使用した。顆粒膜細胞に FSH と E_2 (1nM) を同時添加した群と、さらに R, R-THC (0.01~0.1 μ M) を同時添加した群をそれぞれ 72 時間培養した後、

LH受容体 mRNA の発現量を Northern blotting にて解析した (図 3)。FSH により誘導された LH 受容体 mRNA は E_2 によりその発現が促進されるが R, R-THC 同時添加によりその作用は中和され、この結果より E_2 の LH 受容体発現促進作用は $ER\beta$ を介するものであることが示唆された。

図 1

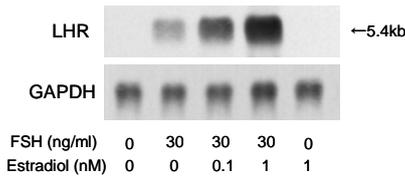


図 2

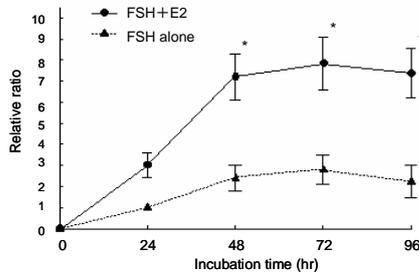
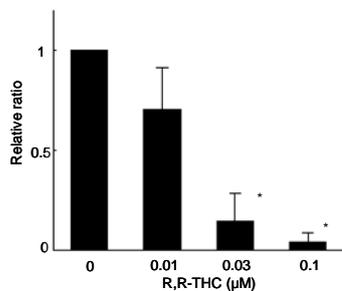


図 3



まず FSH 単独または FSH と E_2 (0.1~1nM) を同時添加して培養した顆粒膜細胞より RNA を抽出し定量的 RT-PCR にて LH 受容体ならびに Mvk mRNA の発現を解析した (図 4)。前述と同様に FSH により誘導された LH 受容体 mRNA は E_2 添加により発現が促進されたのに対し、Mvk mRNA は E_2 添加により用量依存的にその発現が抑制された。

次に顆粒膜細胞における Mvk 発現が LH 受容体 mRNA に対し抑制的に作用することを確認するため、Mvk 発現 vector を調製し顆粒膜細胞にトランスフェクションして Mvk を過剰発現させた系を作成した。Mvk 発現ベクターをトランスフェクションした細胞では対照群と比較して Mvk mRNA が過剰に発現しているのを確認した上で、この系に FSH、 E_2 を種々

の条件にて添加して 48 時間培養後の LH 受容体 mRNA の発現を Northern blotting にて解析した (図 5)。Mvk 過剰発現群においては、 E_2 による LH 受容体 mRNA の発現促進効果が対照群に比し減弱しているのが確認された。これらの結果より、顆粒膜細胞では E_2 は FSH との共存下で Mvk に対して抑制的に作用し、それに伴い LH 受容体 mRNA の安定性が増加するものと考えられた。

図 4

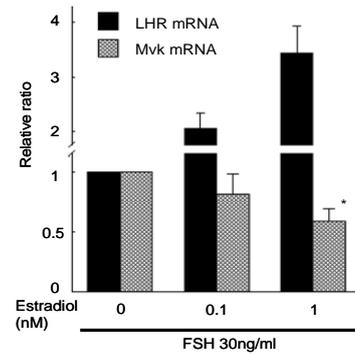
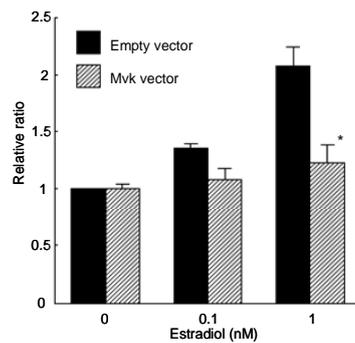
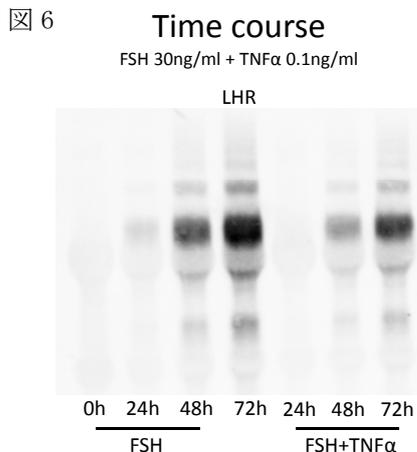


図 5

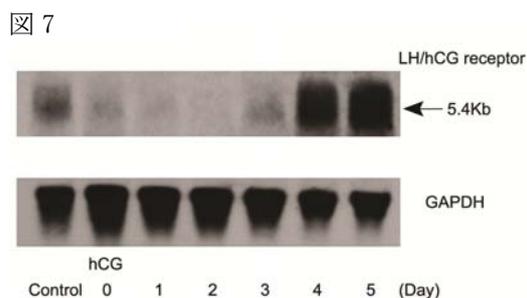


卵巣内の主席卵胞は他の卵胞に比し多くの E_2 を含有しており、また主席卵胞内の顆粒膜細胞における LH 受容体発現は二次卵胞より増加している (Ginther OJ, 2002)。顆粒膜細胞における LH 受容体の発現には FSH やそれにより合成が誘導される E_2 の他にも様々な因子の関与が知られているが、本研究より E_2 による Mvk の発現抑制が LH 受容体発現制御機構のひとつであることが示唆された。またラット Mvk 遺伝子の 5' -非翻訳領域 (-700bp ~ -1bp) の解析では ERE-half site が存在し、このことから E_2 がその発現調節に関与していることが考えられる。ラット顆粒膜細胞では、Mvk が LH 受容体の発現を調節する可能性があるため、同じ細胞を用いて FSH による LH 受容体 mRNA の増加を誘導し、この時同時に存在することで LH 受容体 mRNA の増加を抑制する物質の Mvk に対する作用を検討した。

TNF α はFSHの効果に対して48時間から72時間にかけて抑制的に作用することが観察された(図6)。さらに、この時のMvkは、TNF α により誘導されることも判明した。



一方、IL-6はLH受容体発現に対して促進的に作用したが、Mvkについても発現誘導を促進した。これらサイトカインの効果については今後更に検討が必要である。



ラット子宮についても検討を行った。幼若雌ラットにPMSG-hCG投与後の子宮を摘出してmRNAを抽出した。この子宮のLH受容体mRNAのレベルはダウンレギュレーションを受け減少することが判った(図7)。この時、同時に測定したMvkの変化より、Mvkが上昇していることから、子宮においてもLH受容体は発現しているが、増加することでLH受容体が減少する可能性が示された。

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2件)

- ① Kogure K, Nakamura K, Ikeda S, Kitahara Y, Nishimura T, Iwamune M, Minegishi T 2013 Glucose-Regulated Protein, 78-Kilodalton as a Modulator of Luteinizing Hormone Receptor Expression in Luteinizing Granulosa

Cells in Rats. Biol Reprod 88:8 査読有

- ② Luvsandagva B, Nakamura K, Kitahara Y, Aoki H, Murata T, Ikeda S, Minegishi T 2012 GRP78 induced by estrogen plays a role in the chemosensitivity of endometrial cancer. Gynecol Oncol 126:132-139 査読有

[学会発表] (計0件)

[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 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

池田 禎智 (IKEDA SADATOMO)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号: 60568252

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし