

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 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：2013～2014

課題番号：25861468

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) the mechanism of regulation of LH-receptor expression in granulosa cell of rat ovary.

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では卵巣におけるLH受容体の発現制御機序について検証した。IL-6は、正常女性の卵巣顆粒膜より生成される物質であるが生殖機能については抑制的に働くことが報告されている。以前よりFSHによりLH受容体発現が促されることを当教室では確認しているが、卵巣顆粒膜細胞系にFSHとの共存下でIL-6を添加すると、濃度依存的にLH受容体発現がmRNAレベル・細胞膜表面のタンパク発現レベルともにさらに促されることを確認した。また、炎症やアポトーシスを誘導するサイトカインとして知られるTNFのLH受容体に対する作用も検証し、TNFの濃度依存的にLH受容体発現が抑制されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We examined the mechanism of regulation of LH-receptor expression in granulosa cell of rat ovary. Under normal physiological conditions, IL-6 is produced in granulosa cells, but some studies have suggested that IL-6 negatively affects reproductive functions in the ovary. Our previous study showed that FSH upregulates LH-receptor expression. We examined the effect of IL-6 on FSH-induced LHR mRNA and protein expression levels and mechanisms of regulation in rat primary granulosa cells. Our results indicated that IL-6 increased FSH-induced expression of LHR. We also studied the effect of TNF, and our results indicated TNF decreased FSH-induced expression of LHR.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：LHR rat-ovary IL-6 TNF-

1.研究当初の背景：

近年生殖内分泌学・生殖補助医療技術が発達し、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、原因不明の不妊症例を見る機会も多い。一方、昨今の晩婚化・妊娠年齢の高齢化を鑑みるに、今後生殖医療の果たす役割は大きくなっていくと考えられる。

2.研究の目的：

妊孕能低下を来す病態として、子宮内膜症は以前より知られているが、近年その頻度は上昇し生殖医療における問題となってきた。当教室では以前よりラット卵巢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 LH 受容体 (LHR) の発現を解析しているが、今回我々はこの実験系を用いて子宮内膜症による妊孕能低下のメカニズムを解明したい。具体的には、特に子宮内膜症患者においてその腹腔内濃度が高いと報告されている IL-6 の作用機序の解明を行う。また、炎症やアポトーシスを誘導するサイトカインとして知られる TNF についても、子宮内膜症患者において濃度が高いという報告もあるため、この LHR に対する作用も検証する。最終的には、卵巢機能の調節機構についてより理解を深め、安全で有効な排卵誘発法の解明につなげたい。

3.研究の方法：

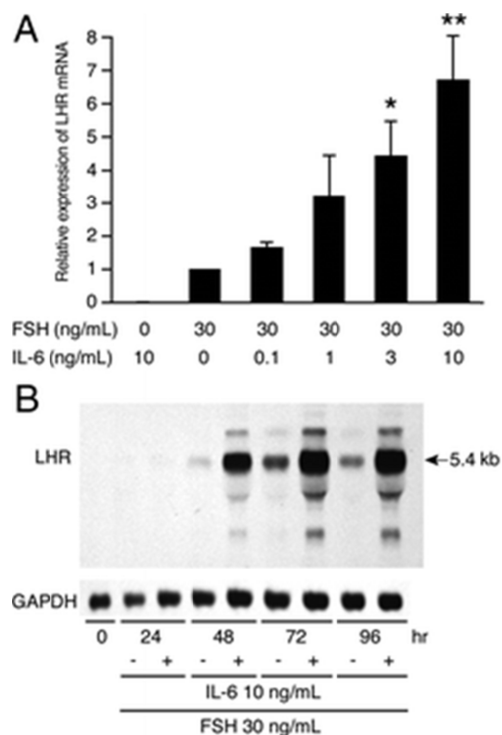
ラット卵巢より顆粒膜細胞を抽出して初代培養系を作成し、これに FSH と共に IL-6 または TNF α を共添加し、Northern-brot 法や定量的 PCR を用いて mRNA レベルでの LHR の発現調整につき検討する。発現に有意差が

みられるならば、mRNA レベルだけではなく、binding assay 法を用いての細胞膜表面での発現の差異、また発現調節の細胞内シグナル伝達機序についても、それに関わる各種たんぱく質のリン酸化を western-blot 法を用いて解明を行う。

4.研究の成果

IL6 は FSH による LHR の発現を mRNA レベルにおいて増強させる。

顆粒膜細胞に IL-6 のみ投与した場合は LHR 発現を誘導しないが、FSH と共に IL-6 を共添加すると、FSH 単独を添加した場合に比べて優位に LHR の発現が増強することが Northern-blot 法にて示された。また定量的 PCR 法でも同様の結果が得られた。



IL6 は FSH による LHR の発現を細胞膜

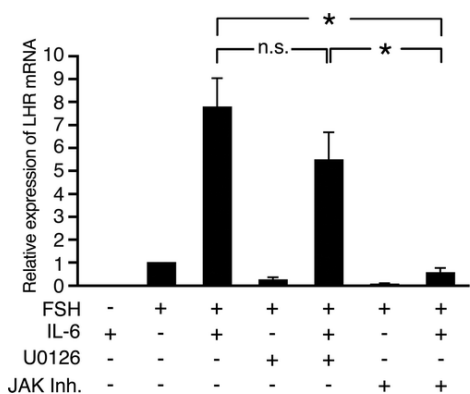
表面タンパクレベルでも増強させる。

顆粒膜細胞に FSH を添加するとその細胞膜表面に LHR が発現し、そこに ligand である hCG が結合する。FSH と共に IL-6 を共添加すると、FSH 単独を添加した場合に比べて優位に hCG の結合が増加し、これにより LHR の発現が細胞膜表面のタンパクレベルでも増強していることが示された。

IL-6 の LHR 発現増強は、JAK/STAT 経路を介してシグナル伝達される。

次に、IL-6 による LHR の発現増強の機序につき検証した。FSH のシグナル伝達系として MAPK 経路が良く知られているが、その key となる ERK のリン酸化につき western-blot を用いて検証したところ、IL-6 は影響を与えなかった。一方 STAT3 については、FSH 添加ではリン酸化されないが IL-6 を添加した場合強くリン酸化された。

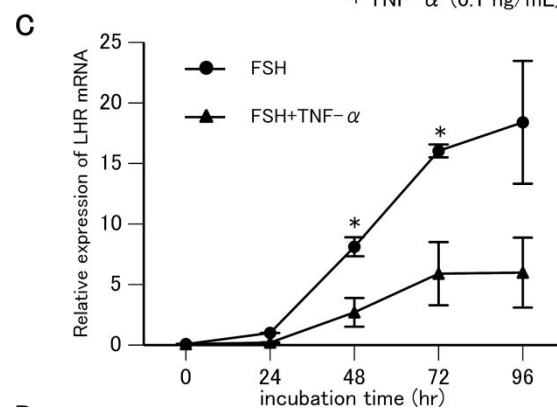
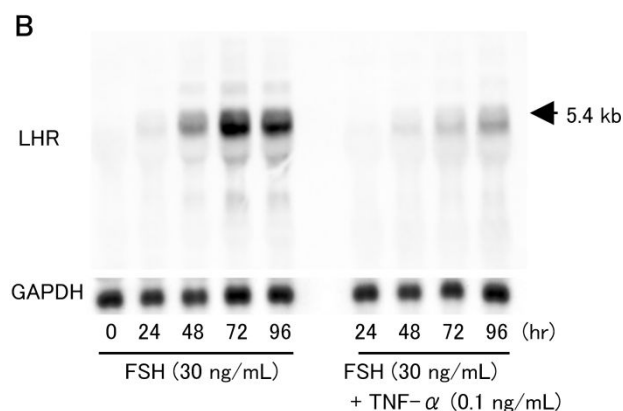
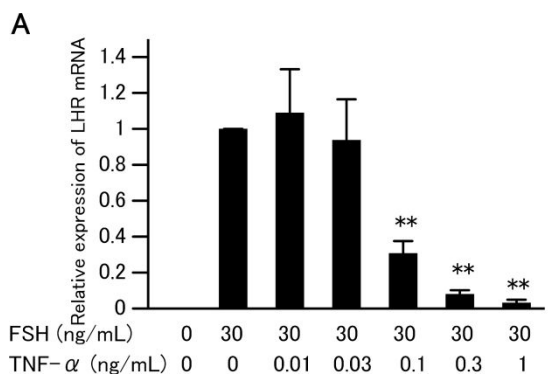
また、JAK/STAT 経路の阻害剤である JAK-inhibitor を投与したところ、mRNA レベルでの LHR 発現が非添加群に比べ有意に抑制され、IL-6 の LHR の発現増強効果は JAK/STAT 経路を介することが示された。



TNF- α は FSH による LHR の発現を mRNA レベルにおいて減弱させる。また、細胞膜表面における LHR の発現をタン

パクレベルでも低下させる。

顆粒膜細胞に IL-6 のみ投与した場合は LHR 発現を誘導しないが、FSH と共に IL-6 を共添加すると、FSH 単独を添加した場合に比べて優位に LHR の発現が増強することが Northern-blot 法にて示された。また定量的 PCR 法でも同様の結果が得られた。



TNF- α は FSH による LHR の発現を細胞膜表面タンパクレベルでも減弱させる。
顆粒膜細胞に FSH を添加するとその細胞

膜表面に LHR が発現し、そこに ligand である hCG が結合する。FSH と共に TNF- α を共添加すると、FSH 単独を添加した場合に比べて優位に hCG の結合が低下し、これにより LHR の発現が細胞膜表面のタンパクレベルでも低下していることが示された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計1件)

Imai F, Kishi H, Nakao K, Nishimura T, Minegishi T: IL-6 up-regulates the expression of rat LH receptors during granulosa cell differentiation. *Endocrinology*. 2014 Apr;155(4):1436-44
doi: 10.1210/en.2013-1821. 査読有

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