

100 ヒト卵巣顆粒膜・莢膜細胞における HGF と SCF のパラクリン作用

鳥取大

伊藤雅之, 坂本靖子, 山内延広, 藤井亜希子, 大島順恵, 谷口文紀, 吉田壮一, 岩部富夫, 原田 省, 寺川直樹

【目的】ウシ卵巣において、莢膜細胞由来の HGF (hepatocyte growth factor) と顆粒膜細胞由来の SCF (stem cell factor) は性ホルモン産生と細胞増殖を促進する。本研究では、ヒト卵巣における HGF, SCF およびそれぞれの受容体の遺伝子発現を検索するとともに、HGF と SCF の作用を検討した。【方法】患者の同意のもと、体外受精時に卵胞液と顆粒膜細胞を、手術時に莢膜細胞と卵巣間質細胞を採取した。それぞれの遺伝子発現を RT-PCR 法にて検索した。卵胞液中の HGF および SCF 濃度は ELISA 法で測定した。顆粒膜細胞に HGF を、莢膜細胞に SCF を添加したのち細胞増殖能を MTT assay にて評価し、培養液中の性ホルモン濃度を EIA 法で測定した。【成績】莢膜および卵巣間質細胞において HGF と c-kit の遺伝子発現を、顆粒膜細胞において SCF と c-met の遺伝子発現を認めた。HGF (50ng/ml) の添加は顆粒膜細胞の SCF 遺伝子発現を、SCF (50ng/ml) の添加は莢膜細胞の HGF 遺伝子発現を増強した。卵胞液中 HGF と SCF 濃度の間には正の相関 ($r=0.547, p<0.01$) がみられた。SCF の添加は莢膜細胞の増殖を促進した。HGF の添加は顆粒膜細胞の増殖に影響を及ぼさなかったが、P 産生を有意に増加した。【結論】ヒト卵巣における HGF, SCF およびそれぞれの受容体の遺伝子発現を明らかにした。顆粒膜細胞に発現する SCF と莢膜細胞に発現する HGF はパラクリン因子として positive feedback loop を形成し、細胞増殖と分化に関与することが示唆された。

101 コラーゲン膜両面培養系を用いた卵胞発育機構解明へのアプローチ：ゴナドトロピン刺激が顆粒膜・莢膜細胞間相互作用に及ぼす影響

福井医大

折坂 誠, 矢田敬二, 田嶋公久, 小辻文和

【目的】我々は、顆粒膜細胞と莢膜細胞の共培養系を用いて、卵胞発育調節機構における顆粒膜・莢膜細胞間相互作用の役割を報告してきた。本研究では、一方の卵胞細胞がゴナドトロピン刺激を受けた時に、他方の細胞の機能にどのような変化が起こるのか検討し、卵胞発育における顆粒膜・莢膜細胞間相互作用とゴナドトロピンとの関わりを考察した。【方法】ウシ卵巣より卵胞細胞を採取し、コラーゲン膜の一侧に顆粒膜細胞、対側に莢膜細胞を共培養した。(1) 顆粒膜細胞を FSH (0.01~1 IU/ml) で刺激した時の、莢膜細胞のアンドロステジオン (A-dione) 産生量と細胞数の変化、(2) 莢膜細胞を LH (0.01~1 IU/ml) で刺激した時の、顆粒膜細胞のエストラジオール (E_2) 産生量と細胞数の変化を観察した。以上の実験を、発育初期 (3~5mm) と後期の卵胞 (15~18mm) より得た細胞を用いて行った。【成績】(1) 顆粒膜細胞を FSH で刺激した場合の莢膜細胞の変化；(a) A-dione 産生量：初期卵胞では用量依存的に増加し、後期卵胞では逆に減少した。(b) 莢膜細胞数：初期卵胞では変化を認めず、後期卵胞では用量依存的に増加した。(2) 莢膜細胞を LH で刺激した場合の顆粒膜細胞の変化；いずれの実験においても、顆粒膜細胞の E_2 産生量や細胞数に変化を認めなかった。【結論】顆粒膜細胞への FSH 刺激は、卵胞発育の初期には莢膜細胞の機能分化を促進するが、増殖には影響しない。一方、発育後期には莢膜細胞の機能分化を抑制し、増殖を促進する。すなわちゴナドトロピンは、卵胞発育の過程で、卵巣局所の顆粒膜・莢膜細胞間相互作用に様々な影響を与えると考えられる。

102 プロゲステロンによる Niemann-Pick C1 (NPC1) 遺伝子の発現増加札幌マタニティウイメンズホスピタル¹, ペンシルバニア大²渡利英道¹, ストラウス・ジェローム²

【目的】ステロイドホルモンの基質となるコレステロールのライソゾームからの輸送を制御する Niemann-Pick C1 (NPC1) タンパク質の発現に影響を与える因子について検討する。【方法】あらかじめ患者に同意を得て IVF-ET 時に採取された顆粒膜細胞に、1mM 8-Br-cAMP または 30 μ M プロゲステロン (P4) を添加して 24 時間培養後に total RNA もしくは細胞抽出液を調整した。NPC1 遺伝子プロモーター領域を含む断片を pGL ルシフェラーゼレポーター遺伝子につなぎ、P4 添加によるプロモーター活性の変化を顆粒膜細胞を用いて測定した。さらに、P4 存在下または非存在下で actinomycin D (5 μ g/ml) または cycloheximide (50 μ g/ml) を添加し、P4 が NPC1 mRNA の stability に与える影響を検討した。【成績】8-Br-cAMP 添加によって steroidogenic acute regulatory protein (StAR) の発現量は増加したが、NPC1 の発現量に変化は認められなかった。P4 の添加によって NPC1 の発現量は増加したが、プロモーター活性の有意な上昇は認められなかった。actinomycin D 添加により、P4 非添加群では NPC1 mRNA の発現量が経時的に減少したのに対し、P4 添加群では変化しなかった。c-fos などの mRNA の stability を増加させることが知られている cycloheximide の添加により NPC1 mRNA の発現量は増加し、さらに P4 による NPC1 mRNA の増加効果を増強した。【結論】ヒト顆粒膜細胞において、P4 が posttranscriptional に NPC1 の発現量を増加させることが初めて示された。