

349 プタ顆粒膜細胞のステロイド産生能及び細胞増殖能に及ぼす一酸化窒素(NO)の影響

東京医歯大
増田美香子, 久保田俊郎, 鎌田周作, 己斐秀樹,
麻生武志

【目的】内皮由来血管弛緩因子の本態である一酸化窒素(NO)は、血管平滑筋に対する弛緩作用だけでなく、内分泌系の臓器に対してもホルモン調節作用を有することが報告されている。本研究では、NOの卵巣機能への関与を解明するため、プタ顆粒膜細胞のステロイド産生能と細胞増殖能に及ぼすNOの影響について検討した。【方法】プタ顆粒膜細胞(PGC)を、中卵胞(3-5mm)より needle aspiration methodにて採取し48時間前培養の後、無血清DMEM培地にNO合成酵素(NOS)阻害剤であるN-monomethyl-L-arginine(LNMMA)及びその異性体であるDNMMAを添加して細胞培養を行った。24時間後、培養液中のestradiol(E₂), progesterone(P)濃度をEIA法にて測定、LNMMA添加24時間後の細胞増殖能を wst-1 assay 法にて測定した。さらに、LNMMAと同時にFSH(200ng/ml), hCG(5IU/ml)を添加し同様の検討を行った。【成績】(1)LNMMA単独添加群でLNMMAは、PGCのE₂分泌をcontrolに比し0.01mMで1.30倍、0.1mMで1.33倍、1mMで1.39倍と有意に促進した(P<0.05)。FSH+LNMMA添加群では、LNMMAはE₂分泌をcontrolに比し0.1mMで1.82倍、1mMで1.88倍、P分泌をcontrolに比し0.01mMで1.74倍、0.1mMで2.00倍、1mMで2.87倍と用量依存性に促進した(P<0.01)。hCG+LNMMA添加群においても、1mMのLNMMAはP分泌を1.61倍と有意に促進した(P<0.01)。一方異性体であるDNMMAは、E₂・P分泌には影響を与えなかった。(2)LNMMA添加24時間後の細胞増殖能には有意の変化がみられなかった。【結論】NOはPGCにおけるステロイド産生能に対し抑制的に作用し、ゴナドトロピンによるE₂・P分泌調節にも深く関与することが示唆された。

350 ヒト脂肪組織および脂肪細胞中のエストロゲンレセプターの同定

大阪府立病院、大阪府立成人病センター*、
大阪労災病院**
水谷隆洋、中室嘉郎、榎本隆之*、池上博雅*、
西川吉伸**

【目的】Estrogenは、脂肪組織に対し様々な効果を及ぼす事が知られているが、ヒト脂肪組織中のestrogen receptor(ER)の存在は未だ証明されていない。本研究では、ヒト脂肪組織、脂肪細胞中のER蛋白およびmRNAの存在をbinding assay, Western blot, Northern blot, RT-PCRを用いて検討した。

【方法】脂肪組織は、正常月経周期を有する婦人の皮下脂肪を、患者の同意のもとに術中に採取し、サンプルとした。遠沈にて核分画および可溶化分画を得た。可溶化分画中のERを20-25%硫酸で塩析、部分精製を行い、透析後1-15nMの³H-E₂を用いて、binding assayを行った。次に核分画と部分精製した可溶化分画で、抗ER抗体を用いてWestern blotを行った。さらに、脂肪組織からRNAを抽出し、rat ER cDNA probeを用いてNorthern blotを行った。また、脂肪組織をコラゲネースで処理し遠沈にて浮遊する成熟脂肪細胞を得、RNAを抽出した。このサンプルで、ERのホルモン結合部位とDNA結合部位に相当するprimerを使ってRT-PCRを行った。

【成績】Binding assayではnon-specific bindingが高く、saturationが得られず、ERの存在を示すには不十分な結果であった。しかしながら、Western blotでは66kDaのER蛋白が核および可溶化分画に認められた。またNorthern blotではヒト脂肪組織中にER mRNAの発現が示された。さらにRT-PCRで、ヒト脂肪細胞中にER mRNAの発現が示された。

【結論】ヒト脂肪細胞中にERが存在する事が示され、estrogenが直接ヒト脂肪細胞に働き脂肪代謝や、脂肪蓄積に関与している可能性が示唆された。