

P-103

ヒト黄体化顆粒膜細胞(GC)におけるcAMPのVery Low Density Lipoprotein(VLDL)およびLow Density Lipoprotein(LDL)レセプター(R)発現に及ぼす影響について

秋田大

村田昌功, 安田師仁, 滝沢 淳, 福田 淳, 熊谷 仁, 児玉英也, 太田博孝, 田中俊誠

〔目的〕ヒトGCでのプロゲステロン(P)産生に利用されるコレステロールが, LDLからだけではなくVLDLからも供給されていること, VLDLのGCへの取り込みは hCGの影響を受けるVLDL-RおよびLDL-Rを介すること, を報告してきた。GCにおけるcAMPのVLDL-RおよびLDL-R発現に及ぼす影響についてP産生を指標として検討した。〔方法〕(1)IVF採卵時に得られたGCを無血清培地にて5日間培養し, 8Br-cAMP (1mM)またはhCG (10IU/ml) およびVLDLまたはLDL ($10^3 \mu\text{g/ml}$) を添加して24時間培養し, 培養液中のP濃度をRIAで測定した。なお, GCは患者の同意を得てから, 実験に供した。(2)無血清培地にて5日間培養したGCに, 8Br-cAMP (0.1, 1mM)を添加し, VLDL-RおよびLDL-R mRNAの発現をNorthern blot法で検討した。〔成績〕(1) P産生(ng/ml , Mean $\pm$ S.D., n=5)は, 660 ± 156 (リボ蛋白非添加), 1500 ± 424 (VLDL添加), 965 ± 332 (LDL添加), 8Br-cAMP添加群では, 同様に 2750 ± 71 , 3650 ± 354 , 3300 ± 283 で, hCG添加群では, 同様に 2700 ± 283 , 3950 ± 354 , 3850 ± 637 であった。8Br-cAMP添加によりhCG添加と同程度に有意に($p < 0.05$)増加した。(2) VLDL-Rの発現は8Br-cAMP添加により変動を認めなかったが, LDL-Rの発現は8Br-cAMP添加 (0.1mM以上, 2h以降)により増強した。〔結論〕cAMPは, ①GCにおけるVLDLおよびLDLを利用したP産生を促進すること, ②VLDL-RおよびLDL-Rの発現に対しては異なる作用を有すること, を初めて明らかにした。

P-104

ヒト卵巣におけるAdrenomedullin発現に関する検討

群馬大

安部和子, 峯岸 敬, 平川隆史, 土屋 恵, 亀田高志, 伊藤郁朗, 伊吹令人

〔目的〕Adrenomedullin (AM) はヒト褐色細胞腫より発見された降圧活性ペプチドである。近年様々な作用が解明され, 細胞増殖や血管新生への関与なども明らかになっている。今回ヒト卵巣におけるAMの発現と最近報告されたAM receptorを構成するreceptor activity modifying protein (RAMP)の発現につき検討した。

〔方法〕インフォームドコンセントを行い承諾を得たのち手術的に摘出した組織を使用した。また, 卵巣癌のcell lineとしてSKOV3, OVCAR3を用いた。それぞれmRNAを抽出し, AM及びLH receptorの特異的cRNAプローベを用いてNorthern blot法にて検討した。

〔成績〕正常卵巣と黄体においてAM mRNAおよびRAMP2 mRNAを示すそれぞれ1.6kb, 0.8kbのバンドがNorthern blot法で認められた。AMの発現は黄体ではさらに増強していた。検討した上皮性卵巣癌全例およびSKOV3, OVCAR3でもAM, RAMP2の発現を認めた。8-Br-cAMPを添加するとSKOV3でAMの発現が増加した。

〔結論〕ヒト卵巣においてAMが発現し, 黄体での発現の増加を認めたことから, AM発現が黄体機能と関連していることが考えられた。またAM receptorの一部であるRAMP2の発現が明らかになったことから, AMのautocrine/paracrine機構の存在が卵巣で示唆された。卵巣癌でもAMの発現が認められ, cAMPの添加により発現が増加したことから腫瘍細胞の増殖との関係で検討が必要と考えられた。

P-105

卵丘膨張へのlink proteinの関与

浜松医大

平嶋泰之, 小林浩, 田中晶, 鈴木美香, 田中賀子, 大井豪一, 小林隆夫, 寺尾俊彦

〔目的〕排卵直前に起こる卵丘(Cumulus-oocyte complex;COC)膨張時にはCOCの細胞外マトリックス(ECM)にヒアルロン酸(HA), Inter-a-trypsin inhibitor(IaI)が集積することを報告してきた。今回我々はHA結合蛋白であるlink protein(LP)の卵丘膨張への関与について検討した。〔方法〕家兔に精製 LP を免疫して抗 LP ポリクローナル抗体(LP-Ab)を作成した。3週齢の未熟マウスの卵巣, PMSG, hCG にて排卵誘発し hCG 投与 6 時間後に摘出した卵巣を使用した。また, hCG 投与前に摘出した卵巣より COC を穿刺にて採取し培養した。1) 摘出卵巣のホルマリン固定パラフィン胞埋切片と培養 COC を LP-Ab を用いた間接抗体法にて免疫染色し, LP の局在を検討した。2) 卵巣および培養 COC からの抽出液の LP-Ab による Western blot を施行した。3) 培養 COC から mRNA を抽出し RT-PCR で LP mRNA の発現を検討した。4) COC を gonadotropin の添加, 非添加の条件で培養し, 培養上澄中の LP 濃度を ELISA にて測定した。〔成績〕1) 未熟卵巣では卵細胞に LP の局在を認め, 顆粒膜細胞には局在を認めなかった。成熟卵巣では COC 細胞質及びその ECM, 壁側顆粒膜細胞に LP が染色され, 卵胞液にも弱い染色を認めた。培養 COC でも細胞質, ECM に LP の染色を認めた。2) Western blot にて卵巣および培養 COC からの抽出液中には LP が存在し, また培養 COC 細胞では無血清下で蛋白量が低下した。3) mRNA レベルでも培養 COC に LP の発現を認めた。4) COC 培養上澄中 LP 濃度は時間依存性に上昇し, gonadotropin 添加で濃度がさらに上昇した。〔結論〕COC 膨張時には gonadotropin 存在下で COC より LP が産生され, ECM の安定化に関与していると考えられた。