

220 ヒト黄体化顆粒膜細胞における progesterone の産生およびリポ蛋白受容体の発現に対する25-hydroxycholesterol の影響

秋田大

滝沢 淳, 村田昌功, 安田師仁, 福田 淳, 清水 靖, 河村和弘, 田中俊誠

【目的】ヒト黄体化顆粒膜細胞 (GC) に直接取り込まれる25-hydroxycholesterol (25OH-chol) の, progesterone (P4) 産生並びに LDL 受容体 (LDL-R)・VLDL 受容体 (VLDL-R) mRNA 発現に及ぼす影響について検討した。

【方法】体外受精・胚移植法施行時に得られた卵胞液中より, 患者の同意を得て GC を回収し, 3日間培養後, (1) hCG, VLDL, 25OH-chol を添加して24時間培養し, P4を測定した。(2) 25OH-chol を添加して24時間培養し, 細胞を回収して RNA を抽出し, LDL-R および VLDL-R mRNA の発現を検討した。(3) 25OH-chol を加え, 24時間培養した後, 125 I-LDL および 125 I-VLDL の取り込み (total uptake) を測定した。

【成績】(1) 25OH-chol 単独添加の場合, 25OH-chol の増加に伴い P4産生は増加した。25OH-chol と VLDL を添加した場合, $10\mu\text{g/ml}$ の25OH-chol 添加で P4産生が増加 (無添加時 3433 ± 351 [ng/ 10^6 cells] (mean $\pm$ S.D.), 添加時 3933 ± 681 , $p < 0.05$) したが, $100\mu\text{g/ml}$ の添加で P4産生は減少 (1497 ± 535 , $p < 0.01$) した。(2) LDL-R mRNA の発現は, $100\mu\text{g/ml}$ の25OH-chol の添加により低下したが, VLDL-R mRNA の発現は変動しなかった。(3) 25OH-chol 添加量の増加に伴い, GC における 125 I-LDL の取り込みは減少したが, 125 I-VLDL の取り込みは変動しなかった。

【結論】GC において, (1) LDL-R mRNA の発現は25OH-chol の増量により down regulation を受け, LDL の取り込みが減少すること, (2) VLDL-R mRNA の発現および VLDL の取り込みは25OH-chol の増量による調節を受けないこと, (3) VLDL 添加による P4産生は25OH-chol の増量により減少すること, が明らかになった。従って, GC に VLDL が取り込まれる際, LDL-R を介する場合と VLDL-R を介する場合とで細胞内代謝経路が異なる可能性が初めて示された。

221 ヒト卵巣顆粒膜細胞における IL-8の発現とサイトカインによる調節

鳥取大

藤井亜希子, 出浦伊万里, 山内延広, 谷口文紀, 吉田壮一, 岩部富夫, 原田 省, 寺川直樹

【目的】ケモカインの一つである Interleukin-8 (IL-8) のヒト卵巣における発現とその発現調節を知ることを目的とした。

【方法】患者の同意のもと, 体外受精時に採取した卵胞液と黄体化顆粒膜細胞 (GLC), 手術時に採取した莢膜細胞と卵巣間質細胞, 九州大学第三内科で顆粒膜細胞腫より樹立された KGN 細胞を実験に供した。卵胞液中の IL-8 と IL-1 β 濃度を ELISA で測定し, 各種細胞における IL-8 とその受容体遺伝子発現を RT-PCR で検索した。IL-1 β (0.1–10ng/ml) を添加培養後の GLC と KGN 細胞における IL-8 遺伝子発現と IL-8 産生, および I κ B のリン酸化を Western blot 法で検索した。IL-8 添加による間質細胞の細胞増殖能を MTT Assay にて評価した。

【成績】卵胞液中 IL-8 濃度と卵胞液量, および IL-8 濃度と IL-1 β 濃度との間に有意な正の相関を認めた。顆粒膜 (GLC, KGN 細胞), 莢膜および間質細胞に IL-8 と IL-8 受容体の遺伝子発現を認めた。IL-1 β の添加は GLC および KGN 細胞の IL-8 遺伝子発現と IL-8 蛋白産生を濃度依存性に増加させ, この増加は IL-1 受容体アンタゴニストの併用添加で中和された。IL-1 β 添加により KGN 細胞におけるリン酸化 I κ B の発現が増強した。IL-8 (100pg/ml) の添加は間質細胞の増殖を促進した。

【結論】ヒト卵巣における IL-8 とその受容体の遺伝子発現を明らかにした。顆粒膜細胞における IL-8 の発現は, IL-1 β による転写因子 NF- κ B の活性化によって増加することが示された。排卵期の卵巣に発現する IL-8 は, ケモカイン作用に加えて間質細胞の増殖を促進することで卵胞発育に関与することが示唆された。

222 不死化ヒト顆粒膜細胞における17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性を調節する因子についての検討

熊本大

宮原 陽, 大場 隆, 田畑 愛, 新田 慎, 片瀧秀隆, 岡村 均

【目的】われわれはヒト発育卵胞より採取した顆粒膜細胞に, SV40 ラージ T 抗原を導入し, 不死化ヒト顆粒膜細胞 (GC1a) を樹立した。GC1a は継代に伴い E2 産生が低下し, steroidogenic factor-1 (SF-1) を含めた, 性ステロイド産生に関わる蛋白発現が低下した。マウス SF-1 cDNA を導入した細胞 (GC1a/SF-1) ではチトクローム p450 遺伝子群の発現が惹起された。このとき E2 産生もまた惹起されたが, これは17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) により E1 が E2 に転換されたものであった。この細胞での, 17 β -HSD 活性を調節する因子について調べる目的で, 以下の検討を行った。

【方法】GC1a/SF-1 を20%FCS, DMEM/F-12 中で培養した後培養液を交換し, 基質として E1 5ng/ml を添加して, さらに24時間培養した上清中の E2 濃度を測定した。E1 と同時に dBtcAMP, PMA, アクチビン A を加えて同様の検討を行った。また, アクチノマイシン D, あるいはサイクロヘキシミド (CHX) $50\mu\text{g/ml}$ を加えて同様に検討した。さらにこのときの17 β -HSD type1, type7 遺伝子の発現について検討した。

【成績】17 β -HSD の発現は SF-1 導入前より認められ, SF-1 導入後も RT-PCR レベルでの発現に差はみられなかった。また10 ng/ml 以上のアクチビン A 存在下で E2 産生の有意な増加がみられ, その増加は濃度依存性であった。CHX は E2 産生を用量依存的に抑制した。

【結論】アクチビンには, ヒト顆粒膜細胞の17 β -HSD 活性を増強させ, E2 産生を増加させる作用があることが示唆された。SF-1 は, ヒト顆粒膜細胞の17 β -HSD 活性を, 転写後の段階で増強している可能性が示された。