

61 GnRH とアクチビンによる LH と FSH の遺伝子発現調節

島根大

山田曜子, 金崎春彦, 高橋健太郎, 宮崎康二

【目的】LH と FSH 合成の律速段階は、それぞれのβサブユニットの遺伝子発現であると考えられている。今回、GnRH とアクチビンによる LHβ と FSHβ のプロモーターの活性化への MAP キナーゼの関与について比較検討した。【方法】マウス下垂体前葉細胞由来の LβT2細胞を実験に用いた。ラット LHβ (-797~+5) と FSHβ (-590~+15) プロモーターを単離し、pGL3 basic vector に組み込み、pGL3-LHβp と pGL3-FSHβp を作製した。これらの vector を LβT2細胞に導入し、プロモーターの活性化をルシフェラーゼ活性の増加により検討した。MAP キナーゼの活性化はリン酸化特異抗体を用いた免疫プロット法により検討した。【成績】GnRH 刺激により MAP キナーゼが活性化されたが、アクチビン刺激では活性化されなかった。LHβ と FSHβ のプロモーターは GnRH 及び、アクチビンにより活性化された。GnRH による LHβ プロモーターの活性化は、MAP キナーゼキナーゼ (MEK) の阻害剤である U0126 の前処理により完全に抑制された。これに対し、FSHβ プロモーターの活性化は部分的に抑制された。MEK1 の過剰発現により、MAP キナーゼが活性化され、LHβ プロモーター活性が増加した。しかし、FSHβ プロモーターは活性化されなかった。【結論】単離した LHβ と FSHβ プロモーターは、GnRH とアクチビンにより活性化された。両プロモーターで MAP キナーゼ系の関与の程度に違いが認められた。

62 停留精巣に關する orphan receptor LGR8 に対する ligand の同定

秋田大¹, 秋田医療技術短大看護科²熊谷 仁¹, 佐藤 恵¹, 熊沢由紀代¹, 本田陽子¹, 佐藤敏治¹, 清水 靖¹, 福田 淳¹, 児玉英也², 田中俊誠¹

【目的】停留精巣は全出生男児の約2%に認められ、高頻度に不妊または胚細胞腫瘍を合併する先天奇形である。近年、ligand が特定されていない orphan receptor である LGR8 と Relaxin family に属す INSL3 の遺伝子欠損マウスがともに精巣導帯の發育不全による停留精巣を表現型とする、と報告された。本研究では、1) INSL3 が LGR8 の ligand であること、2) 両者の相互作用を明らかにすること、を目的とした。【方法】1) ヒト LGR8 を形質導入した HEK293T 細胞に合成 INSL3 を添加し、培養上清中の cAMP 濃度を RIA 法により測定した。2) ビオチン標識 INSL3 を用いて、binding assay を行った。加えて cross linker による蛋白レベルでの結合を確認した。3) 7日齢雄ラットより精巣導帯を摘出し、LGR8 mRNA の発現を RT-PCR 法で確認した。4) 精巣導帯細胞の初代培養を行い、INSL3 を添加し、cAMP 産生と RI 標識チミジン取り込みを測定した。【成績】1) INSL3 は LGR8 を発現させた HEK293T 細胞の cAMP 産生を増加させたが、同様に LGR7 を発現させた細胞では変化がなかった。2) LGR8 はビオチン標識 INSL3 との結合を認め、その結合は非標識 INSL3 により濃度依存的に阻害された。cross linker を用いた Western blot 法でも同様に LGR8 とビオチン標識 INSL3 との結合を確認した。3) ラットにおいて、LGR8 mRNA は精巣導帯組織で発現を認めた。4) INSL3 は精巣導帯細胞の cAMP 産生とチミジン取り込みを濃度依存性に増加させた。【結論】1) INSL3 は orphan receptor である LGR8 の特異的 ligand であることを初めて確認した、2) INSL3 は精巣導帯細胞の cAMP を介して細胞増殖を亢進させた、ことより、INSL3 と LGR8 の相互作用が精巣の下降に關与することが明らかになった。

63 Y 染色体 AZFc 領域の微小欠失症例の造精機能の予測におけるインヒビン B 値の有用性

新潟大

寺林京子, 藤田和之, 萬歳淳一, 関根正幸, 加嶋克則, 鈴木美奈, 倉林 工, 田中憲一

【目的】Y 染色体の AZFc 領域に微小欠失を持つ症例は種々の段階での造精機能障害を呈するとされており、その理由として経時的な造精機能障害の進行が考えられている。今回、AZFc 領域微小欠失症例における造精機能障害の進行の有無、およびインヒビン B 値より造精機能を推測することが可能であるかを検討した。【方法】当院の男性不妊外来を受診した無精子症23例、重症乏精子症8例を対象とした。Y 染色体上の19の STS マーカーを、蛍光標識した PCR プライマーを用いて増幅し微小欠失を検索した。インヒビン B 値は ELISA 法で測定した。【成績】無精子症23例中4例 (17.4%)、重症乏精子症8例中2例 (25%) に Y 染色体の欠失を認めた。欠失の領域は AZFb + AZFc が2例、AZFc が4例であった。AZFc 欠失例のうち精子が存在した3例はインヒビン B 値がすべて50pg/ml 以上であった。FSH 値は、2例は正常値 (15.1mIU/ml 以下) であったが1例は16.3 と高値を示した。AZFc 欠失例で Sertoli cell only であった症例ではインヒビン B 値は測定感度 (15pg/ml) 以下であった。1年以上経過を観察した AZFc 欠失乏精子症2例では総精子数の減少傾向が認められ、インヒビン B 値も低下していた。【結論】AZFc 領域の微小欠失症例においてインヒビン B 値測定は造精機能を反映するマーカーとして FSH より有用であることが示唆された。造精機能障害の経時的進行が示唆され、AZFc 領域微小欠失のある乏精子症症例では精子の凍結保存を考慮する必要があると考えられた。