

P1-238 卵による卵胞発育・閉鎖調節機構の研究—Growth Differentiation Factor-9 は前胞状卵胞の閉鎖を抑制し発育を促す—

福井大

折坂 誠, 折坂早苗, 福田 真, 田嶋公久, 小辻文和

【目的】性周期に繰り返される“卵胞の選択と閉鎖”は、最良の卵を排出するための生命現象と推測されるが、そのメカニズムの詳細は明らかでない。著者らは、「卵自身による顆粒膜細胞のアポトーシス調節が、卵胞の運命を決定する鍵」と仮説し、検討を進めてきた。本演題では、卵由来の成長因子である Growth differentiation Factor-9 (GDF-9) が卵胞発育や閉鎖をどのように調節するのか、さらにはその細胞内機構を、in vitro 卵胞培養系で検討した結果を報告する。【方法】14日齢ラットから前胞状卵胞（直径150~180μm）を単離し、無血清条件で培養した。以下の実験により、GDF-9の生物学的役割を考察した。【実験1】培養系にGDF-9を加えた時の、卵胞発育と顆粒膜細胞のアポトーシスの変化、さらには細胞内シグナル伝達系の変化を検討した。【実験2】卵にアンチセンス注入することでGDF-9の発現をノックダウンした時の、卵胞発育と顆粒膜細胞のアポトーシスの変化を観察した。【成績】【実験1】GDF-9は、(1)卵胞発育を促進した。また、(2)PI3K/Akt pathwayを活性化することにより、顆粒膜細胞のアポトーシスを抑制した。【実験2】卵内のGDF-9発現ノックダウンにより、(1)卵胞中のCaspase-3活性が上昇し、(2)顆粒膜細胞にアポトーシスが誘導され、(3)卵胞発育が抑制された。さらには、(4)顆粒膜細胞のFSH受容体発現も抑制を受けた。【結論】GDF-9は、顆粒膜細胞のアポトーシスを抑制し、FSH受容体発現をサポートすることで、卵胞の生存と発育を促す働きを持つ。卵由来の因子が卵胞細胞のアポトーシス抑制作用を有すること、さらには、その発現量が卵胞選択や閉鎖の調節に関わる可能性を初めて明らかにした。

P1-239 卵成熟機構におけるCOX-2の関与

山形大¹, 米国バンダビルト大小児科・発生学教室²高橋俊文¹, Dey S.K.², 倉智博久¹

【目的】COX-2は排卵、受精、着床、脱着膜形成など広く生殖現象に関与する。今回、卵成熟機構におけるCOX-2の意義について検討した。【方法】野生型マウス(WT)およびCOX-2ノックアウトマウス(COX-2(-/-))を用い、ゴナドトロピンによるin vivo (hCG刺激)およびin vitro (FSH刺激)での卵成熟について検討した。卵成熟は、卵核胞崩壊(GVBD)率およびMII期卵への到達率または卵丘膨化の程度で評価した。卵・卵丘細胞複合体(COCs)におけるCOX-2の発現は免疫蛍光染色を行った。各種プロスタグランジン(PGs)の測定はHPLC法を用いた。4種類のPGE2受容体(EP1, EP2, EP3, EP4)の発現はRT-PCR法および免疫蛍光染色を行った。【成績】COX-2(-/-)はWTと比較し、in vivoおよびin vitroの卵成熟過程において、GVBD率、MII期卵の割合および卵丘膨化の程度がいずれも障害された。In vitroの卵成熟系において、COX-2(-/-)の卵成熟の障害は、PGE2を培養液中へ添加することで回復した。WTのCOCsにおいて、培養開始から4時間目にCOX-2の発現が卵丘細胞に認められ、6時間目よりPGE2が培養液中に検出されたが、COX-2(-/-)では培養液中にいずれのPGsも検出されなかった。PGE2受容体は、卵丘細胞にEP2, EP3, EP4の発現を認めた。EP2, EP4アゴニストは卵丘膨化を促進したが、EP1, EP3アゴニストおよびEP2選択的アゴニストは卵丘膨化を促進しなかった。EP2およびEP4のアнтаゴニストは単独では卵成熟を抑制しなかったが、同時投与で卵成熟を抑制した。【結論】ゴナドトロピン刺激による卵成熟にはCOX-2を介するPGE2の産生が重要であり、PGE2はその受容体であるEP2およびEP4を介して卵成熟を促進するものと思われる。

P1-240 INSL3-LGR8 システムの卵成熟機構への役割

秋田大

河村和弘, 田中俊誠

【目的】近年我々はオーファン受容体であった、G Protein-Coupled Receptors (GPCR)の一つであるLGR8のライガンドとしてinsulin-like 3 (INSL3)を同定した。我々の検討によりLGR8は卵巣では卵に特異的に発現が認められたため、本研究では卵巣におけるINSL3-LGR8システムの役割を解明することを目的とした。【方法】(1)ラット卵巣を用いてin situ hybridizationを行いLGR8およびINSL3の局在を検討した。(2)ゴナドトロピン投与における卵巣INSL3の発現量変化をReal-time RT-PCRで定量した。(3)INSL3の卵成熟への寄与をin vitroおよびin vivoのアプローチにより検討した。【成績】(1)LGR8は排卵前卵胞の卵に、INSL3は莢膜細胞に特異的に発現が認められた。(2)卵巣INSL3はhCG投与後に発現量が増加し1.5時間でピークに達しその後漸減した。以上からINSL3は卵に直接作用し、卵成熟に関与する可能性が考えられた。(3)INSL3は排卵前卵胞を用いた卵胞培養にて、容量依存性に卵核胞崩壊を促進した。この作用はGPCRにおけるG inhibitory (Gi)経路の抑制剤であるPertussis toxinにて抑制された。(4)in vivoにおいて過排卵刺激を行ったラット卵巣にintrabursal injectionによりINSL3を投与したところ、有意に卵核胞崩壊が認められた。(5)INSL3はGi経路を介して卵内cAMP濃度を減少させ卵核胞崩壊を誘導することが推測されたため、INSL3による卵内cAMP濃度の変化をRIA法により検討したところ、INSL3は有意に卵内cAMP濃度を減少させた。【結論】INSL3はLHサーージ後に卵巣莢膜細胞で産生され、卵に局在するLGR8に作用し、Gi経路を介して卵内cAMP濃度を減少させ卵核胞崩壊を誘導することを初めて明らかにした。