

P2-40-3 mTOR アクチベーター添加はヒト卵巣顆粒膜細胞の4E-BP1リン酸化と増殖を促す

名古屋大

邨瀬智彦, 清水 顕, 石田千晴, 加藤奈緒, 森 正彦, 大須賀智子, 近藤美佳, 中村智子, 中原辰夫, 後藤真紀, 岩瀬 明, 吉川史隆

【目的】初期卵胞から成熟卵胞に至る過程を体外で培養する in vitro growth (IVG) は, 患者への卵巣刺激を必要とせず初期卵胞を活用できる画期的な技術であるが, ヒトでは確立していない. 近年, 卵胞発育とその構成要素である顆粒膜細胞増殖に PI3K-Akt-mTOR 経路の関与が明らかになった. 今回我々は, ヒトの IVG への応用を念頭に, in vitro の系を用いて mTOR アクチベーターが顆粒膜細胞増殖に及ぼす影響を検討した. 【方法】まずマウス卵巣組織培養にて mTOR アクチベーター (MHY1485) の添加効果を調べた. 次に, 倫理委員会の承認とインフォームドコンセントの取得のもと当科で樹立した不死化ヒト顆粒膜細胞 (HGrC1) を用いた実験に移った. MHY1485 または mTOR インヒビター (PP242) を添加, 培養し BrdU assay で細胞増殖について検討した. また下流の 4E-BP1, p70 S6 Kinase の発現とリン酸化について検討した. 【成績】マウス卵巣組織培養で MHY1485 添加によって 1 次卵胞数の増加を認め, HGrC1 を用いた BrdU Assay では PP242 で濃度依存性に増殖が抑制される傾向を認めた. また HGrC1 において 4E-BP1 のリン酸化は, MHY1485 で亢進, PP242 で抑制された. p70 S6 Kinase のリン酸化には変化がみられなかった. 【結論】 mTOR は 4E-BP1 を介して細胞増殖や細胞分化の制御へ関与していることが報告されている. 今回, mTOR アクチベーターとインヒビターを用い, マウス卵巣組織と不死化ヒト顆粒膜細胞にて各々細胞増殖の促進と抑制効果を認めた. さらにこれらの薬剤添加によって 4E-BP1 のリン酸化が制御されていることを確認した. mTOR とその下流の 4E-BP1 はヒト卵胞の発育において重要な役割を果たしている可能性がある.

P2-40-4 ヒト顆粒膜細胞における黄体形成ホルモンレセプターの発現制御

名古屋大

中村智子, 岩瀬 明, 清水 顕, 邨瀬智彦, 石田千晴, 加藤奈緒, 森 正彦, 大須賀智子, 近藤美佳, 中原辰夫, 後藤真紀, 吉川史隆

【目的】顆粒膜細胞では卵胞発育と共に黄体形成ホルモンレセプター (LHR) 発現は上昇する. LHR 発現における LHR プロモーター領域の DNA メチル化とヒストン修飾の関与につきヒト顆粒膜細胞で調べた. 【方法】不死化ヒト顆粒膜細胞 (HGrC1) と IVF 患者の黄体化顆粒膜細胞に PMA, TSA, 5-AzaC, FSH, estradiol を添加し LHR mRNA 量を調べた. HGrC1 と黄体化顆粒膜細胞の LHR プロモーター領域のヒストン修飾の変化を ChIP にて評価. 同領域の 13 個の CpG site のメチル化を調べた. 【成績】HGrC1 の LHR 発現は TSA と 5-AzaC で上昇し相乗効果を示した. FSH や estradiol は TSA との共添加で初めて相乗効果を認めた. 黄体化顆粒膜細胞では HGrC1 の約 1 万倍 LHR 発現があり薬剤添加で発現上昇せず. LHR プロモーター領域において H4K8 と H3K9 は, HGrC1 では TSA によりアセチル化は増加し, 黄体化顆粒膜細胞ではさらに高率だった. ヒト卵巣組織で黄体と 2 次卵胞の顆粒膜細胞のプロモーター領域は同程度に大部分脱メチル化されていたが初期卵胞由来の HGrC1 は比較的メチル化されていた. 【結論】 LHR 発現は LHR プロモーター領域の DNA メチル化とヒストン修飾, 特に LHR プロモーター領域の H4K8 と H3K9 のアセチル化で制御されている可能性がある. また HGrC1 における FSH 及び estradiol 反応性の LHR 発現上昇は, 同領域のヒストン修飾により制御されている可能性がある. ヒト顆粒膜細胞の LHR 発現におけるエピジェネティック制御に関しては黄体化との関連においても更なる検討が必要である.

P2-40-5 テストステロンの抗癌剤からの卵巣保護作用の検討

大阪医大

劉 昌恵, 田辺晃子, 中村真由美, 八田幸治, 芦原敬允, 小野賀大, 中村起代子, 林 篤史, 藤田太輔, 林 正美, 寺井義人, 大道正英

【目的】抗癌剤の中でもアルキル化剤は早発卵巣機能不全 (POI) の高リスク薬剤として有名である. 若年性悪性腫瘍治療に際し, 現状の妊孕性温存法には侵襲的なものが多く適応も限定的である. ところで海外では若年の POI に対する排卵誘発にテストステロン (Ts) が併用されており, その顆粒膜保護作用が注目されている. よって今回, Ts がシクロフォスファミド (CPA) による卵巣毒性を軽減させる可能性とそのメカニズムについて検討した. 【方法】(1) ヒト顆粒膜細胞株 COV434 を用い, Ts が CPA によるアポトーシスを抑制するか否かを MTS 法, Western Blotting 法, および蛍光免疫染色法で検討した. (2) 週齢 6 週の Balb/c メスマウスに CPA 100mg/kg を 3 回/週腹腔内投与し抗癌剤治療モデルを作成し, Ts 4mg/kg を 4 回/週皮下投与併用群と比較した. 14 日目に安楽死させたのちに解剖し, 摘出卵巣の HE 染色, Cleaved Caspase3 免疫染色から卵胞数カウントおよび顆粒膜細胞のアポトーシスを, 血清からは AMH 値を測定し比較した. 【成績】(1) COV434 は CPA 濃度依存性にアポトーシスが增加し, BimEL および Cleaved Caspase3 の増加が認められたが, Ts 併用により有意に抑制された. (2) CPA 投与マウスの卵巣において, 原始卵胞数の減少, 閉鎖卵胞数の増加, Cleaved Caspase3 陽性卵胞数率の増加, および血清 AMH 値の減少を認めたが, Ts 併用により改善された. 【結論】テストステロンはシクロフォスファミドからの卵巣保護作用を有する可能性がある.