

## 新規卵胞培養系構築を目指した卵胞膜細胞の ステロイドホルモン産生解析

県立広島大学生命環境学部・准教授 山下 泰尚

\*\*\*\*\*

### ■ 目的

卵胞発育は LH 刺激により卵胞膜細胞で産生されるアンドロゲンを前駆体に、顆粒膜細胞で産生されるエストロゲンによって制御される。しかしながら、卵胞膜細胞におけるアンドロゲン産生制御機構についてはほとんど解明されていない。そこで本研究では、ブタ卵胞膜細胞を用いて、卵胞発育期のアンドロゲン産生制御機構の解明を目的に、LH 受容体の下流シグナルとそれにより発現上昇する因子に注目して実験を行った。

### ■ 方法

**実験 1:** LH 添加培地で卵胞膜細胞を 70 時間あるいは 30 分まで培養した。培養後、MAPK3/1、PKB、p38MAPK のリン酸化、および PKA の活性をそれぞれ Western blotting あるいは PKA アッセイキットで調べた。**実験 2:** LH 添加培地で卵胞膜細胞を 70 時間まで培養した。培養後の卵胞膜細胞から Total RNA を回収し、アンドロゲン産生制御遺伝子 (*Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1*, *Cyp17a1*) の発現をリアルタイム RT-PCR で調べた。**実験 3:** LH 添加培地へ MAPK3/1 阻害剤 (U0126, 10 $\mu$ M)、PKA 阻害剤 (H89, 10 $\mu$ M) または PI3K 阻害剤 (LY294002, 20 $\mu$ M) をそれぞれ添加し、卵胞膜細胞を 20 時間培養した。培養後の卵胞膜細胞から Total RNA を回収し、アンドロゲン産生制御遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR で調べた。**実験 4:** LH 添加培地へ U0126、H89 または LY294002 をそれぞれ添加し、卵胞膜細胞を 40 時間培養した。培養後の培地を回収し、テストステロン (アンドロゲン) 濃度を ELISA で調べた。**実験 5:** LH 無添加、添加培地で卵胞膜細胞を 10 時間培養し、培養後の Total RNA を回収し、逆転写後のサンプルから PKA により誘導され、MAPK3/1 を活性化させる候補因子を探索した。

### ■ 結果および考察

**実験 1:** MAPK3/1 のリン酸化レベルは LH 添加後、30 時間でピークを迎えた。PKB のリン酸化レベルは、LH 添加後 5 分で認められ、15 分以降減少した。p38MAPK のリン酸化は 70 時間までのどの培養時間区においても認められなかった。PKA 活性は LH 添加後 1 分で認められ、5 分で培養前と比較して有意に高値を示し、その後緩やかに減少した。**実験 2:** *Cyp11a1*、*Cyp17a1* mRNA 発現は LH 添加後 20 時間で、*Hsd3b1* mRNA 発現は LH 添加後 30 時間から 50 時間に掛けて有意に上昇した。*Star* mRNA 発現はどの培養時間区においても有意な変化は認められなかった。**実験 3:** *Cyp11a1* mRNA 発現は H89 あるいは U0126 区で有意に抑制された。また、*Cyp17a1* mRNA 発現も H89 区あるいは U0126 区で抑制された。**実験 4:** テストステロン濃度は H89 区あるいは U0126 区で抑制された。**実験 5:** 卵胞膜細胞を 10 時間培養し、LH 無添加 vs LH 添加区で解析を行ったところ、PKA により発現上昇し、MAPK3/1 を刺激する候補因子として肝細胞の増殖に関わることが近年報告された HGF が候補因子として見出された。

### ■ 結語

本実験により、ブタ卵胞膜細胞は LH の下流シグナル系の PKA 系と MAPK3/1 を介してアンドロゲン産生遺伝子群の発現上昇を誘導することが明らかになった。さらに PKA 系の活性化が短期培養時に、MAPK3/1 の活性化が長期培養時に生じていたことから、PKA により発現誘導し、MAPK3/1 をターゲットとする候補因子を探索した結果、HGF の発現上昇が認められた。今後は、LH-PKA 系を介して実際に卵胞膜細胞で HGF が発現するか、HGF の刺激により MAPK3/1 が活性化するか否かを検討することにより詳細なアンドロゲン産生機序が解明され、新規卵胞培養系の構築に貢献するものと考えられた。