

論文内容の要旨

論文題目 コレステロール硫酸によるプロゲステロン産生調節機序の解析

指導教員 武谷 雄二教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

堤 亮

【緒言】

プロゲステロンは着床などの生殖現象を制御する重要な性ステロイドホルモンの一つで、主として卵巣・胎盤から分泌される。プロゲステロン産生の異常は不妊症や黄体機能不全の原因になると考えられ、プロゲステロンの産生調節機構の解明は生殖内分泌において重要な課題である。子宮内膜においてコレステロール硫酸（CS）の含有量が性周期で変化し、着床現象との関連が注目されている。コレステロール硫酸とプロゲステロンの関連は未解明な部分が多いが、最近副腎において、コレステロール硫酸がプロゲステロン産生に関係する可能性が示された。卵巣・胎盤におけるコレステロール硫酸によるプロゲステロン産生調節について検討した。

【方法】

①CS の KGN 細胞のプロゲステロン産生抑制作用について
卵巣ステロイド産生のモデルとしてヒト顆粒膜細胞腫由来の細胞株 KGN 細胞を用いた。培養液中に 10 μ M CS, 10 μ M Cholesterol, 1mM 8-bromo-cAMP を単

独及び同時添加し 24 時間培養した。培養液中のプロゲステロン濃度は Enzyme linked fluorescent assay により測定した。プロゲステロン産生関連遺伝子である StAR protein、Ferredoxin、 Ferredoxin reductase、P450_{scc}、3βHSD2 の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR にて評価した。また Western blot 法にて StAR protein の発現を検討した。

② ラット卵巣における SULT2B1b・STS について

幼若ラットに過排卵刺激を行い、顆粒膜細胞の初代培養を行った。培養液中に CS, 8-bromo-cAMP を単独及び同時添加し培養し、24 時間後のプロゲステロン濃度を測定した。生体内での卵巣中の CS の変化を検討するため、ラット卵巣の過排卵周期（幼若ラットに PMSG を投与後 48 時間に hCG を投与した）における SULT2B1b(CS 合成酵素)と STS (CS 分解酵素) の mRNA 発現量の変化を定量的 RT-PCR にて検討した。また SULT2B1b と STS のラット卵巣における局在を in situ hybridization 法にて検討した。

③ CS の JEG-3 細胞におけるプロゲステロン産生促進作用

胎盤ステロイド産生のモデルとしてヒト絨毛癌由来の細胞株 JEG-3 細胞を用いた。培養液中に CS, 8-bromo-cAMP を単独及び同時添加し 24 時間培養した。培養液中のプロゲステロン濃度を測定し、プロゲステロン産生関連遺伝子である MLN64、Ferredoxin、 Ferredoxin reductase、P450_{scc}、3βHSD1 の発現量を定量的 RT-PCR にて評価した。

④ CS・Cholesterol と Cholesterol 輸送蛋白との結合

プロゲステロン産生の律速段階で働くコレステロール運搬体 StAR protein と MLN64 との CS・コレステロールとの結合性の違いを表面プラスモン共鳴法により検討した。結合曲線の解析より、KD：解離定数を算出した。StAR protein と MLN64 の STARTdomain のリコンビナント蛋白を精製して実験に用いた。

【結果】

①CS+cAMP 添加群では cAMP 添加群に比してプロゲステロン濃度は 70%まで有意に減少した。StAR protein mRNA 発現量は CS+cAMP 添加群では cAMP 添加群に比して 54%まで有意に発現が減少した。P450_{scc} mRNA 発現量は CS+cAMP 添加群では cAMP 添加群に比して 60%まで有意に発現が減少した。Ferredoxin・Ferredoxin reductase・3βHSD2 mRNA 発現量は CS の添加による発現の変化は認めなかった。Western blot 法による検討では CS+cAMP 添加群では cAMP 添加群に比して StAR protein の発現の低下を認めた。

②ラット顆粒膜細胞培養系において cAMP+CS 添加群は cAMP 添加群に比較して 64%にプロゲステロン濃度は有意に減少した。ラット卵巣における SULT2B1b mRNA はコントロール群に比して PMSG 投与群(24h 35%,48h

56%)・hCG 投与群(24h 17%,48h 35%,72h 55%,96h 34%)共に有意な発現量の減少を認めた。ラット卵巣における STS mRNA はコントロール群に比して hCG 投与群(48h 14 倍,72h 10 倍,96h 7 倍)では有意な発現量の増加を認めた。in situ hybridization 法にて SULT2B1b は卵巣間質・莢膜細胞にその発現の局在を確認した。同様に STS は卵巣間質・莢膜細胞にその発現の局在を確認した。

③JEG-3 細胞ではプロゲステロン濃度は cAMP+CS 添加群において cAMP 添加群の 1.9 倍に有意に増加した。MLN64・Ferredoxin reductase・ β HSD1 mRNA 発現量は cAMP、CS 添加による変化を認めなかった。P450scc mRNA 発現量は cAMP 添加群、cAMP+CS の添加群において各々無添加群の 7.7 倍、9 倍まで増加を認めたが、両群間では有意な差を認めなかった。

④CS と StAR protein との KD 値 8.6×10^{-4} 、CS と MLN64 との KD 値は 4.48×10^{-4} であった。Cholesterol と StAR protein との KD 値は 3.5×10^{-5} 、Cholesterol と MLN64 との KD 値は 1.58×10^{-5} であった。CS に対する結合性は StAR も MLN64 もほぼ同レベルであった。またコレステロールに対する結合性も StAR も MLN64 もほぼ同レベルであった。

【考察】

ヒト顆粒膜細胞腫由来で KGN 細胞の培養系において、プロゲステロン産生関連遺伝子の StAR protein と P450scc mRNA の発現量は CS により減少し、CS によるプロゲステロン産生抑制はこれらの遺伝子発現の抑制によることが示唆された。さらに Western blot 法による検討によって CS により KGN 細胞の StAR protein 蛋白の発現量も減少していることが明らかになった。これらの成績から CS は卵巣ステロイド産生においてプロゲステロン産生関連遺伝子抑制によりプロゲステロン産生を低下させる、制御的因子であることが示唆された。

StAR protein はミトコンドリア内のコレステロール輸送に関わる蛋白であるが、プロゲステロン産生における律速段階の 1 つとされている。菅原らの報告によると、CS は副腎ステロイド産生のモデルである副腎癌由来 H295R 細胞において StAR protein 遺伝子発現を抑制することを報告し、CS とステロイドホルモン産生に関連があることを明らかにし、注目された。本研究の卵巣モデルとあわせると、CS が StAR protein 発現を介してステロイドホルモン分泌を抑制的に調節することが、複数の細胞系において示された事になり、興味深い。

次に生体内での卵巣ステロイド産生に対する CS の作用を検討するために、ラット顆粒膜細胞培養系において実験を行った。その結果、cAMP+CS 添加群は cAMP 添加群に比較してプロゲステロン濃度は有意に減少した。ラット顆粒膜細胞でも KGN 細胞と同様に CS はプロゲステロン産生の制御的因子である可能性が示唆された。更に CS 合成酵素(SULT2B1b)と分解酵素(STS)の mRNA 発現

量の検討を行い、過排卵誘発による卵巣周期により卵巣中の CS 含有量が変化するかを検討した。SULT2B1b mRNA はコントロール群に比して PMSG 投与群・hCG 投与群では有意な発現量の減少を認めた。ラット卵巣における STS mRNA はコントロール群に比して hCG 投与群では有意な発現量の増加を認めた。幼若期には CS がより多く産生されていることが考えられた。またゴナドトロピンにより CS 産生が低下することによりステロイド産生が促進される可能性が考えられた。ラット卵巣では幼若期において CS が多く存在することでプロゲステロン産生を抑制している事が考えられた。また *in situ hybridization* 法による検討で幼若期の卵巣で卵巣間質・莖膜細胞において CS が産生されていることが示唆された。

ヒト顆粒膜細胞由来の KGN 細胞やラット顆粒膜細胞では CS がプロゲステロン産生に抑制的に働く事が示されたが、胎盤ステロイド産生のモデルとして用いられる JEG-3 細胞では、CS はプロゲステロン産生を促進した。JEG-3 細胞では CS は MLN64、P450_{scc} 等のプロゲステロン産生に関連する蛋白の遺伝子発現に影響を与えなかった。過去の報告では CS が胎盤においてプロゲステロン産生の基質として働いていると報告されているが、JEG-3 細胞でも同様に CS がプロゲステロン産生の基質として働いていることが推察された。

Cholesterol 輸送蛋白である StAR protein と MLN64 との CS・Cholesterol との結合性の違いが、プロゲステロン産生の促進・抑制に働いている可能性が仮説として考えられた。そこで、StAR protein と MLN64 と CS・Cholesterol の親和性を表面プラスモン共鳴法により検討した。今回の実験では夾雑蛋白は完全に除去できなかったが、CS に対する結合性は StAR も MLN64 もほぼ同レベルであった。またコレステロールに対する結合性も StAR も MLN64 もほぼ同レベルであった。したがって CS の KGN 細胞と JEG-3 細胞に対する作用の相違は、StAR protein と MLN64 との CS・コレステロールとの結合性の相違に起因するという仮説は否定的であった。