

(様式4)

学位論文の内容の要旨

今井 文晴



(学位論文のタイトル)

Interleukin-6 up-regulates the expression of rat luteinizing hormone receptors during granulosa cell differentiation

(IL-6によるラット顆粒膜細胞LH受容体発現増強効果について)

(学位論文の要旨)

【緒言】 interleukin-6 (IL-6) はB細胞分化誘導因子として同定され、免疫応答のみならず造血や炎症反応、種々の細胞の増殖・分化等に関わる細胞間情報伝達物質であり、生体において重要な役割を果たしていることが分かっている。婦人科領域においては、IL-6が排卵障害の一因となる子宮内膜症を有する患者の腹水中に有意に増加していることが知られている。一方LH受容体を含むゴナドトロピン受容体は排卵や卵巣黄体機能維持など卵巣機能調節に重要であり、以前よりわれわれは種々のファクターによる顆粒膜細胞ゴナドトロピン受容体の発現に対する影響を検討してきた。今回本研究ではIL-6が顆粒膜細胞LH受容体発現にどのような影響を与えているか、ラットモデルを使用し実験を進めた。

IL-6 による顆粒膜細胞LH受容体発現増強効果

実験には21日齢幼若雌ラットにdiethylstilbestrol (DES) を4日間投与した後、卵巣から顆粒膜細胞を単離し、無血清培地で初代培養した細胞系を用いた。この細胞系は未熟顆粒膜細胞であり、無血清培地では時間経過を追ってもLH受容体の発現は認めない。一方FSH受容体は培養開始時点で発現しており、この培養細胞にFSHを作用させると、元来発現しているFSH受容体を介して細胞内cAMP濃度が上昇し、LH受容体の発現誘導が惹起される。IL-6によるこのFSH誘導性のLH受容体発現に対する影響を確認するため、無血清培地に培養された顆粒膜細胞にFSH単独またはFSH及びIL-6同時添加をおこないLH受容体mRNA発現を検索した。FSH単独群に比してFSH、IL-6同時添加群はLH受容体mRNA発現が有意に増強しており、また¹²⁵I-hCGを用いたbinding assayにより細胞膜蛋白レベルでも同様にLH受容体発現が増強していることが確認された。一方IL-6単独添加ではLH受容体発現は認めなかった。またcAMPアナログ製剤である8-Br-cAMP存在下でもIL-6はLH受容体発現増強したことから、前述したFSH受容体からの細胞内cAMP産生より下流シグナルにIL-6が関与していることも確認された。

IL-6による顆粒膜細胞IL-6受容体発現上昇効果

IL-6受容体はIL-6受容体 α 鎖 (IL-6R α) およびgp130と呼ばれる細胞膜貫通分子の2量体より成

り立っている。このうちIL-6R α mRNA発現をFSH単独またはFSH及びIL-6同時添加群で比較した。IL-6R α mRNA発現はFSHにより上昇し、IL-6添加により相乗的に発現増強することが分かった。顆粒膜細胞においてはFSH存在下でIL-6の分泌が上昇することが知られており、われわれの研究結果と併せて考えると、FSH共存下ではIL-6がIL-6R α 発現を上昇させ、かつIL-6分泌も上昇するというautocrine regulationが顆粒膜細胞に存在していることが示唆された。

IL-6によるLH受容体mRNA転写活性上昇効果

LH受容体mRNAプロモーター領域（5'末端非翻訳領域-281/+1bp）を含むluciferase vectorを顆粒膜細胞にtransfectionし、FSHまたはFSH及びIL-6同時添加したところ、luciferase活性はFSH添加にて上昇し、さらにFSH及びIL-6同時添加により相乗的に活性が上昇した。一方IL-6単独ではこの活性上昇を認めなかった。IL-6はFSH存在下でLH受容体mRNA転写活性を上昇させ、LH受容体発現増強を惹起させるメカニズムが明らかとなった。

JAK/STATシグナル伝達系を介したIL-6によるLH受容体発現増強効果

IL-6のFSH存在下でのLH受容体発現増強に寄与するシグナル伝達系を、western blotならびにシグナル伝達阻害剤を用いて検索した。IL-6の下流シグナルにはERK1/2を含むMAPK経路と、JAK/STAT経路が知られている。まず顆粒膜細胞にFSH、IL-6、FSH及びIL-6を添加し、ERK1/2及びSTAT3のリン酸化を検索しIL-6によるERK1/2及びSTAT3、FSHによるERK1/2のリン酸化を確認した。さらにERK1/2、STAT3阻害剤存在下でwestern blotをおこないそれぞれのシグナルのリン酸化が特異的に阻害されている条件を設定し、この条件でそれぞれのシグナル伝達阻害剤がFSH及びIL-6添加によるLH受容体mRNA発現増強効果にどのように影響するかさらに検討した。ERK1/2阻害剤存在下ではIL-6によるLH受容体mRNA発現に有意な変化が認められなかった一方、JAK/STAT3阻害剤存在下では有意にIL-6による発現増強効果が抑制された。この結果よりIL-6によるLH受容体発現増強にはJAK/STAT経路が関与していることが明らかとなった。

【結語】

今回ラット顆粒膜細胞モデルを用いたわれわれの実験により、IL-6がFSH誘導性のLH受容体発現増強効果を有することがわかり、LH受容体mRNA転写活性上昇がこの発現増強効果の一因であると考えられた。またIL-6はJAK/STATシグナルを通じてこの効果を発現していることも明らかとなった。今後はIL-6によるLH受容体発現上昇が、卵巣機能を含めた生殖機能にどのように影響を及ぼしているのか不妊治療患者の卵胞液サンプルなどを利用し（院内倫理委員会審査済）検討を進めていく予定である。