

(様式4)

## 学位論文の内容の要旨

印

(学位論文のタイトル)

TNF- $\alpha$  Suppressed FSH-Induced LH Receptor Expression Through Transcriptional Regulation in Rat Granulosa Cells.(TNF- $\alpha$ はラット顆粒膜細胞におけるFSH誘導性LH受容体発現を転写活性を介して抑制する)

(学位論文の要旨)

【緒言】 Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )は卵巣顆粒膜細胞において生理的に産生され、排卵や卵の成熟に関与しているとされる。一方、多嚢胞性卵巣症候群を罹患する患者卵胞中や子宮内膜症を罹患する患者腹水中にはTNF- $\alpha$ が高濃度存在すると報告されており、これら疾患は排卵障害に伴う不妊の一因とも考えられている。LH受容体は下垂体ホルモンであるゴナドトロピンに反応し、卵成熟・排卵・ステロイド合成といった機能に関して重要な働きを持っている。LH受容体はFSH刺激を受けることにより発現するが、他にも種々の因子によって調節されている。そこで、LH受容体に及ぼすTNF- $\alpha$ の影響を検討した。

【方法】 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LH受容体発現のない未熟顆粒膜細胞であり、FSHを作用させることでFSH受容体を介して細胞内cAMP濃度が上昇し、LH受容体の発現が誘導される。そこにTNF- $\alpha$ をFSHと共添加することによるLH受容体発現への影響を分析した。

【結果】

**TNF- $\alpha$ はFSH誘導性LH受容体発現を減弱する**

TNF- $\alpha$ によるFSH誘導性LH受容体発現に対する影響を確認するため、顆粒膜細胞にFSHまたはFSH及びTNF- $\alpha$ の共添加を行い、LH受容体mRNA発現をquantitative PCRにて分析した。FSH単独群に比してFSH、TNF- $\alpha$ 共添加群はLH受容体mRNA発現が有意に減弱した。また、 $^{125}\text{I}$ -hCGを用いたbinding assayにより細胞膜蛋白レベルでも同様にLH受容体発現が減弱していることを確認した。また、8-Br-cAMPとTNF- $\alpha$ の共添加下でもLH受容体mRNA発現は減弱したことから、前述したFSH受容体を介した細胞内cAMP産生より下流シグナルにTNF- $\alpha$ が関与していることが明らかとなった。

**TNF- $\alpha$ はLH受容体の転写活性を減弱する**

LH受容体mRNAプロモーター領域 (5'末端非翻訳領域-1379/+1bp)を含むluciferase vectorを顆粒膜細胞にトランスフェクトし、FSH単独またはFSH及びTNF- $\alpha$ を共添加したところ、luciferase活性はFSH添加にて上昇したが、FSH及びTNF- $\alpha$ の共添加により減弱した。TNF- $\alpha$ はFSH存在下でLH受容体mRNA転写活性を抑制させ、LH受容体発現を減弱させることが明らかとなった。

**TNF- $\alpha$ はNF- $\kappa$ Bを介してLH受容体発現を減弱する**

TNF- $\alpha$ のLH受容体発現減弱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。FSHによるLH受容体の発現にはcAMP-PKA経路とPI3K/Akt経路が必要であり、TNF- $\alpha$ はp65を代表とするNF- $\kappa$ B経路を活性化する。まず、顆粒膜細胞にFSH、TNF- $\alpha$ を添加し、cAMP産生の変化について検討したところ、cAMP産生量には変化を及ぼさなかった。さらに、CREB及びAktのリン酸化の変化を検索したところ、TNF- $\alpha$ はFSHによるCREB及びAktのリン酸化には変化を生じさせなかった。また、p65はTNF- $\alpha$ 刺激により核内へ移行していることを確認した。そこで、NF- $\kappa$ B阻害剤を用いて、p65の核内への移行を阻害したところ、FSH誘導性LH受容体mRNAの減弱が抑制された。TNF- $\alpha$ によるLH受容体発現の減弱にはcAMP-CREB経路およびPI3K-Akt経路への関与は無く、NF- $\kappa$ B経路が関与していることが明らかとなった。

**TNF- $\alpha$ はp65をLH受容体プロモーター領域に結合させることで転写活性を減弱しうる**

TNF- $\alpha$ により核内へ移行するp65をChIP assayにて検討したところ、LH受容体プロモーター領域への結合が明らかとなった。また、p65はヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）を誘導するとされており、HDAC阻害剤を用いるとTNF- $\alpha$ によるLH受容体mRNA発現の減弱が抑制された。

【考察】 TNF- $\alpha$ はFSH誘導性LH受容体の発現を抑制的に影響することが判明した。これまでその機序に関しては解明されていなかったが、TNF- $\alpha$ がp65を誘導しLH受容体転写開始領域へ結合させることが示された。そして、p65の核内への移行を阻害することにより、TNF- $\alpha$ によるLH受容体発現の減弱を抑制することが出来たことから、p65が直接的もしくは間接的に転写活性を抑制していることが考えられた。また、p65と複合体を形成すると知られるHDACを阻害することによっても、TNF- $\alpha$ によるLH受容体の発現減弱を抑制することから、p65とHDACの関連が考えられた。

【結論】 ラット卵巣顆粒膜細胞の初代培養系モデルにおいて、TNF- $\alpha$ はFSH誘導性LH受容体発現を減弱した。LH受容体発現の減弱はLH受容体mRNA転写開始領域へのp65結合によるもので、HDACが脱アセチル化を引き起こすことで転写活性の抑制を生じている可能性が示唆された。