

(様式4)

学位論文の内容の要旨

諏訪 裕人 印

(学位論文のタイトル)

Retinoic acid enhances progesterone production via the cAMP/PKA signaling pathway in immature rat granulosa cells

(レチノイン酸はサイクリックAMP/プロテインキナーゼAシグナル経路を介して未熟ラット顆粒膜細胞のプロゲステロン産生を増加させる)

(学位論文の要旨)

【緒言】 卵巣機能はゴナドトロピンと種々の局所因子によって調節されており、その一つにレチノイン酸がある。レチノイン酸はビタミンA誘導体で、レチノイン酸受容体とレチノイド受容体のリガンドとして作用する。レチノイン酸は胚の発生や卵の成熟に重要な役割を果たすことが知られている。近年、アクチビンがレチノイン酸経路を調節して卵巣顆粒膜細胞の増殖に影響を及ぼしていることが報告された。また、種々のステロイド産生細胞においてレチノイン酸がステロイド産生を増加させることが複数の報告で示されている。本論文では、ラット未熟顆粒膜細胞におけるプロゲステロン産生に及ぼすレチノイン酸の効果について検討した。

【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。本細胞系に全トランス型レチノイン酸を添加し、プロゲステロン産生に及ぼす影響について検討した。

【結果】

ラット顆粒膜細胞にはレチノイン酸受容体、レチノイド受容体、retinaldehyde dehydrogenase (RALDH)のmRNAが発現している

まず、本細胞系においてレチノイン酸受容体、レチノイド受容体、RALDHのmRNAが発現しているかどうかをRT-PCR法を用いて確認した。その結果、ラット未熟顆粒膜細胞には*Rar* α , *Rar* γ , *Rxr* α , *Rxr* β , *Raldh1*のmRNAが発現していることが確認された。一方、*Rar* β , *Rxr* γ , *Raldh2*, *Raldh3*のmRNA発現はわずかであった。

ラット顆粒膜細胞においてレチノイン酸はsteroidogenic acute regulatory protein (*StAR*)と*Cyp11a1*のmRNA発現の増強を介してプロゲステロン産生を増加させる

次いで、本培養系において、レチノイン酸がプロゲステロン産生に及ぼす効果を検討した。本培養系にレチノイン酸を添加し、培養液中のプロゲステロン量をELISA法で測定したところ、レチノイン酸添加群は非添加群に比べて有意にプロゲステロン量が増加した。このメカニズムを調べるべく、レチノイン酸がプロゲステロン産生に関わる*StAR*, *Cyp11a1*, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD)の各mRNA発現に及ぼす影響を定量的RT-PCR法を用いて検討した。その結果、レチノイン酸は*StAR*, *Cyp11a1*のmRNA発現を増強させ、3 β -HSDのmRNA発現には影響しないこ

とが確認された。

ラット顆粒膜細胞においてレチノイン酸は細胞内cAMPを増加させ、protein kinase A (PKA) と cAMP response-element binding protein (CREB) のシグナルを活性化する

次いで、本培養系においてレチノイン酸がcAMPに及ぼす効果を検討した。本培養系にレチノイン酸を添加し、細胞内cAMPをELISA法を用いて検討したところ、レチノイン酸添加群は非添加群に比べて有意に細胞内cAMPが増加した。また、本培養系においてレチノイン酸がCREBのリン酸化を増強させることをWestern blot法を用いて確認した。

ラット顆粒膜細胞におけるレチノイン酸によるプロゲステロン産生の増加はPKA経路を介する

次いで、レチノイン酸によるcAMP/PKA/CREBシグナルの活性化が、プロゲステロン産生の増加に関係しているかどうかを検討した。PKA阻害剤であるH-89を共添加して*StAR*、*Cyp11a1*のmRNA発現及びプロゲステロン産生を調べたところ、H-89の共添加によってレチノイン酸による*StAR*、*Cyp11a1*のmRNA発現増強効果及びプロゲステロン産生増加効果は打ち消された。このことから、レチノイン酸によるプロゲステロン産生増加効果はPKA経路を介すると考えられた。

【考察】ラット未熟顆粒膜細胞の培養系において、レチノイン酸はプロゲステロン産生を増加させた。このメカニズムとして、レチノイン酸は*StAR*と*Cyp11a1*のmRNA発現を増強させることが判明した。また、レチノイン酸は細胞内cAMP濃度を増加させ、CREBをリン酸化させることも確認された。PKA阻害剤であるH-89の共添加によって、レチノイン酸による*StAR*と*Cyp11a1*のmRNA発現の増強が抑制され、プロゲステロン産生増加が認められなくなったことより、レチノイン酸はcAMP/PKA経路を介してプロゲステロン産生を増加させたものと考えられた。

【結論】ラット未熟顆粒膜細胞において、レチノイン酸はcAMP/PKA経路を介してプロゲステロン産生を増加させることが示された。