



# Multiple inhibitory effects of a lutenizing hormone releasing hormone agonist on hCG-dependent steroidogenesis and on FSH-dependent responses in ovarian cells in vivo and in vitro

大谷, 徹郎

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1984-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0449

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000449>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	おお    たに    てつ    お 大    谷    徹    郎      （兵庫県）
学位の種類	医   学   博   士
学位記番号	医博い第 410 号
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の日付	昭和 59 年 3 月 31 日
学位論文題目	<b>Multiple Inhibitory Effects of a Lutenizing Hormone— Releasing Hormone Agonist on hCG—dependent Steroido— genesis and on FSH—dependent Responses in Ovarian Cells in vivo and in vitro</b> (LH-RHアナログの卵巣での hCG及びFSHの作用発現 抑制作用に関する <i>in vivo</i> ならびに <i>in vitro</i> 実験系での基礎 的検討)
審   査   委   員	主査 教授   望   月   眞   人 教授   岩   井   誠   三   教授   藤   田   拓   男

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 緒   言

LH-RHが下垂体からの Gonadotropin を放出させることは周知の事実である。ところがこのものが同時に paradoxical な性腺機能抑制作用をも合わせ持つことが最近明らかにされつつある。

そこで、生物活性の強い LH-RHアナログ〔D-Leu<sub>6</sub>, des-Gly-NH<sub>2</sub><sup>10</sup>〕 LH-RHethylamide（以下 LH-RHa と略す）を用いて、下垂体摘除幼若雌ラット，ならびに *in vitro* 培養下のブタ顆粒膜細胞への作用を検討し，LH-RHの性腺機能抑制作用の機序を解明せんとした。

### 実験方法ならびに結果

1) 幼若雌ラットにおける〔<sup>125</sup>I〕標識 LH-RHa 投与後の各種臓器への取り込みの検討。

Lactoperoxidase 法で標識した〔<sup>125</sup>I〕LH-RHa を単独で，あるいは多量の非標識 LH-RHa と共に幼若雌ラットに投与し，下垂体，卵巣，子宮，肝への特異的取り込みの有無について検討した。

下垂体及び卵巣への〔<sup>125</sup>I〕LH-RHa の取り込みは非標識 LH-RHa の同時投与によって抑制された。しかしながら，肝及び子宮における取り込みは非標識 LH-RHa の同時投与によって抑制されなかった（図 1）。

2) 下垂体摘除幼若雌ラットにおける FSHの作用発現に及ぼす LH-RHa の影響。

diethylstilbesterol(DES)処理下垂体摘除幼若雌ラットに FSH を単独で，あるいは LH-RHa と共に 3 日間投与し，投与後の卵巣重量ならびに卵巣〔<sup>125</sup>I〕hCG 結合能を測定した。

FSH 単独投与時にみられた卵巣重量の増加，卵巣〔<sup>125</sup>I〕hCG 結合能の増加は，LH-RHa の同

時投与によって抑制された（図2）。

### 3) 下垂体摘除幼若雌ラットにおける hCG の作用発現に及ぼす LH-RHa の影響

下垂体摘除幼若雌ラットに hCG を単独で、あるいは LH-RHa と共に投与し、投与後の卵巢重量及び血清プロゲステロン値を測定した。

hCG 単独投与群でみられる卵巢重量の増加、ならびに血清プロゲステロン値の上昇は、LH-RHa の同時投与によって抑制された（図3）。

### 4) *in vitro* 培養ラット黄体細胞における hCG の作用発現に及ぼす LH-RHa の影響。

PMSG-hCG 処理ラット（Parlow ラット）卵巢より得た黄体細胞を、hCG, LH-RHa それぞれの存在下、あるいは非存在下に 3 時間 incubate し、培養液中のプロゲステロン量を測定した。

hCG 単独投与の際にみられた、培養液中プロゲステロン量の増加は、LH-RHa の同時投与によって抑制された（図4）。

### 5) *in vitro* 培養ブタ顆粒膜細胞における LH/ hCG リセプターの induction に及ぼす LH-RHa の影響。

屠殺直後のブタ卵巢の small follicle（直径 1～3 mm）より、Channing の needle aspiration 法で得たブタ顆粒膜細胞を、FSH, insulin, LH-RHa それぞれの存在下、あるいは非存在下に 6 日間培養し、培養細胞の [ $^{125}$  I] hCG 結合能を経時的に測定した。

FSH と insulin の存在下に認められたブタ顆粒膜細胞 hCG リセプターの induction は、LH-RHa の同時投与によって抑制されることが認められた。（図5）

### 6) ブタ顆粒膜細胞での hCG 刺激による細胞内 cyclic AMP 蓄積に及ぼす LH-RHa の影響。

同様のブタ顆粒細胞に hCG を LH-RHa と共に、あるいは単独で添加し、経時的に細胞内 cyclic AMP 濃度を測定した。

hCG 単独添加の際には急速な細胞内 cyclic AMP の増加がみられたのに対し、LH-RHa を同時添加した際には、細胞内 cyclic AMP の上昇は遅延する傾向が認められた（図6）。

## 考 察

以上の諸成績を総合勘案すると、LH-RHa は *in vivo* においても *in vitro* においても卵巢機能抑制作用を有することが明らかとなった。LH-RH が卵巢機能を抑制する機序としては、1) 下垂体が過剰刺激によって脱感作され、LH の放出が抑制される、2) LH-RH 刺激による持続的な血中 LH レベルの上昇の結果、卵巢の LH/hCG リセプターが down regulation を受け減少する、3) LH-RH が卵巢に直接的に作用する、等が考えられる。

本研究ではまず、下垂体摘除幼若雌ラットを用いた *in vivo* の実験系において、2 つの gonadotropin の個別的作用、すなわち hCG 刺激による卵巢重量の増加やプロゲステロン産生の促進、さらに FSH 刺激による卵巢重量の増加や、LH/hCG リセプターの induction のいずれをも抑制することを示した。この *in vivo* 実験系では、下垂体摘除ラットを用いており、LH-RHa は間脳—下垂体—卵巢系に関係なく、直接的に卵巢に働き、その機能を抑制すると考えられた。さらに正常幼若雌ラットにおいて、 [ $^{125}$  I] 標識 LH-RHa の特異的取り込みが下垂体だけでなく、卵巢にも認められたことか

ら、卵巣にも LH-RH の特異的リセプターが存在し、これを介して LH-RH が直接卵巣に作用する可能性が強く示唆された。

これらの *in vivo* での実験結果をもとに、さらに *in vitro* の実験系を用いて、その作用機序について検討を加えた。

まず *in vitro* 培養ラット黄体細胞において hCG 刺激によるプロゲステロン産生が、LH-RHa によって抑制されたことから、LH-RHa は直接卵巣に作用していることが裏付けられた。また、ブタ顆粒膜細胞培養系において、FSH と insulin の存在下に認められた hCG リセプターの induction は、LH-RHa の同時投与によって抑制された。このことより、LH-RHa の卵巣機能抑制の作用機序の 1 つとして、hCG リセプター発現の抑制が関与していることが示唆された。さらに hCG 刺激による細胞内 cyclic AMP 量の増加が、LH-RHa の同時投与によって遅延したことより LH-RHa の卵巣での直接作用の機序として、hCG がリセプターと結合した後の adenylate cyclase を介しての cyclic AMP の細胞内蓄積の抑制が関与している可能性が示唆された。

LH-RH の発見以来、LH-RH を排卵誘発を目的として不妊婦人に投与する試みが数多くなされているが、芳しい成績は得られておらず、本研究において証明した LH-RHa の paradoxical な卵巣機能抑制作用が、その原因の一翼を担っているであろうと推察される。

現在 LH-RH analogue のこのような卵巣機能抑制作用はすでに子宮内膜症への治療に導入されつつあるが、他方 fertility control の臨床応用にも期待されるところである。

# 付 図

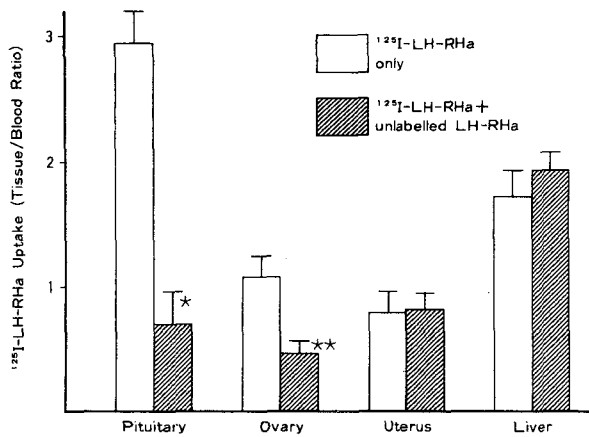


図1 幼若雌ラットへの〔 $^{125}\text{I}$ 〕

LH-RHa 経静脈投与 30 分後の下垂体、  
 卵巣、子宮、肝での〔 $^{125}\text{I}$ 〕LH-RHa  
 の放射活性。

斜線は多量の非標識LH-RHa を同  
 時投与した群を示す。

(\* は  $P < 0.05$  の有意差を示す)

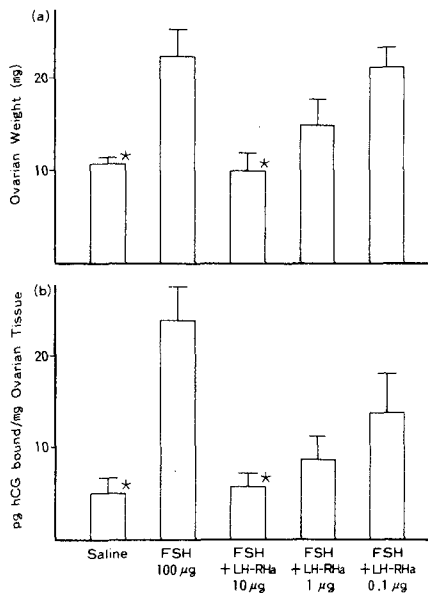


図2 FSH, FSH + LH-RHa ある  
 いはコントロールとして生理食塩水を  
 1 日 2 回 3 日間投与した DES 処理下  
 垂体摘除幼若雌ラット卵巣の(a) 重量  
 (b) 〔 $^{125}\text{I}$ 〕hCG 結合能。

(\* は FSH 単独投与群に対する  $P < 0.01$  の有意差を示す)

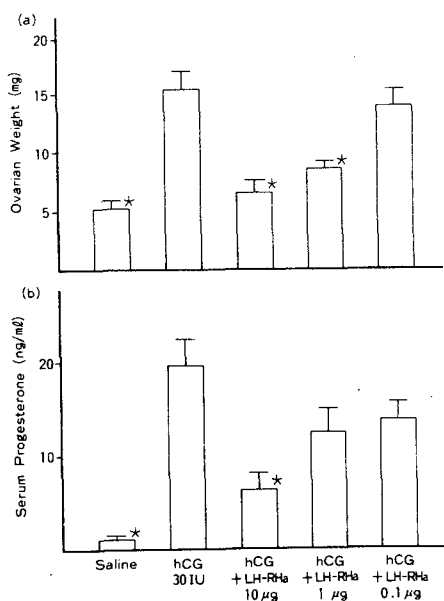


図3 hCG, hCG + LH-RHaあるいはコントロールとして生理食塩水を1日2回3日間投与した下垂体摘除幼若雌ラット(a) 卵巣重量 (b)血清プロゲステロン量。  
(\*はhCG単独投与群に対する $P < 0.01$ の有意差を示す)

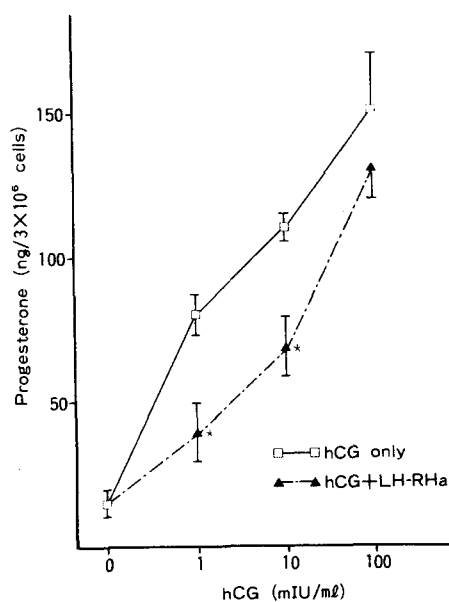


図4 ラット黄体細胞のhCG刺激によるプロゲステロン産生。  
(□—□)はLH-RHa非添加群,  
(▲---▲)はLH-RHa 10µg/ml添加群を示す。  
(\*は $P < 0.05$ の有意差を示す)

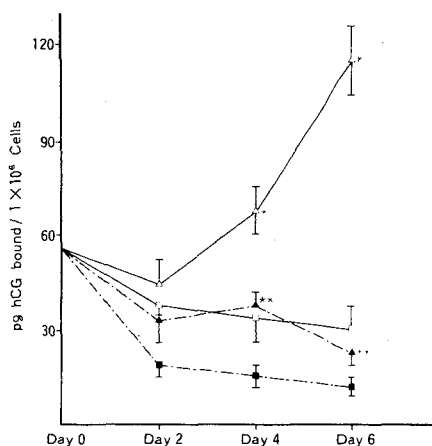


図5 顆培養ブタ顆粒膜細胞の〔<sup>125</sup>I〕hCG 結合能

(■—■)はコントロール群,  
(□—□)は insulin 単独添加群,  
(△—△)は FSHとinsulin の同時添加群,  
(▲—▲)は FSH, insulin と LH-RHa の同時添加群を示す。

( \* はコントロール群に比し  $P < 0.01$  の有意差, \* \* は insulin と FSH の同時投与群に比し  $P < 0.01$  の有意差を示す)

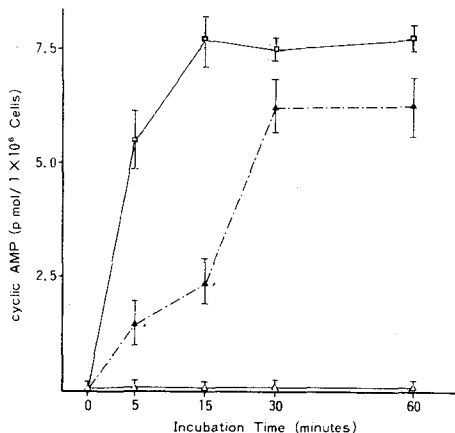


図6 ブタ顆粒膜細胞への hCG 添加後の細胞内 cyclin AMP 量。

(□—□)は hCG 単独投与群,  
(▲—▲)は hCG と LH-RHa の同時投与群, (△—△)はコントロール群を示す。

( \* は hCG 単独投与群に比し  $P < 0.01$  の有意差を示す)

## 論文審査の結果の要旨

下垂体からのゴナドトロピン放出作用を有するペプチドホルモンであるLH-RHおよびそのアナログが同時にパラドキシカルな性腺機能抑制作用をもちあわせているという事が近年注目されている。しかしその作用機作については未だ充分に解明されていない。

そこで本申請者は、下垂体摘除幼若ラット(雌)を用いた *in vivo* 実験系ならびにラット黄体細胞およびブタ顆粒膜細胞を用いた *in vitro* 実験系の両面から、そのメカニズムを解析した。

まず、下垂体摘除幼若雌ラットに  $^{125}$  I 標識 LH-RH アナログを投与し、各臓器への特異的取り込みを比較検討した。その結果、 $^{125}$  I 標識 LH-RH アナログの特異的取り込みは、下垂体以外にも卵巣に認められ、卵巣には LH-RH リセプターの存在する可能性が強く示唆された。

つぎに、下垂体摘除幼若雌ラットに FSH と LH-RH アナログを同時に投与し、卵巣重量ならびに卵巣  $^{125}$  I hCG 結合能を測定し、FSH の作用発現におよぼす LH-RH アナログの影響を検討した。その結果、LH-RH アナログは FSH 刺激による卵巣重量の増加、ならびに  $^{125}$  I 標識 hCG 結合能の増加を容量反応的に抑制することが認められた。

また同様に hCG と LH-RH アナログを同時に投与し、hCG の作用発現におよぼす LH-RH アナログの影響につき検討を加えた。その結果、LH-RH アナログは hCG 刺激による卵巣重量の増加および血清プロゲステロン値の上昇を容量反応的に抑制することが認められた。

これらの *in vivo* 実験系の成績を基礎として以下の *in vitro* の実験系でさらに研究を進めた。

まず、ラット黄体細胞での hCG 刺激によるプロゲステロン分泌におよぼす LH-RH アナログの生物効果をしらべたところ、LH-RH アナログは *in vitro* の系においても hCG 刺激によるプロゲステロン産生を抑制した。

ブタ顆粒膜細胞培養系での FSH およびインスリンによる hCG リセプターの誘導におよぼす LH-RH アナログの作用を検討したところ、FSH とインスリンのみを投与した群では培養4日目以降でも  $^{125}$  I 標識 hCG 結合能の増加がみられたのに対し、LH-RH アナログ同時投与群ではこの増加が抑制された。

さらに hCG 刺激によるブタ顆粒膜細胞内 cyclic AMP 蓄積におよぼす LH-RH アナログの影響を検討したところ、LH-RH アナログは cyclic AMP の蓄積を遅延させる傾向をしめした。

以上の成績より、LH-RH アナログは卵巣に存在する特異的リセプターを介して、hCG リセプターの誘導の抑制ならびに細胞内 cyclic AMP 蓄積の抑制を基盤として、hCG/LH 及び FSH の作用発現を抑制することがあきらかになった。

この研究は、LH-RH アナログの性腺機能抑制作用の作用機作に関して、重要な知見を得たものであり、きわめて斬新ですぐれたものであると認める。

よって、本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認めた。