



# Expression of adrenomedullin by human granulosa lutein cells and its effect on progesterone production

森山, 俊武

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2147

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002147>

※ 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）	もり やま とし たけ 森 山 俊 武	（島根県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第1290号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成12年3月31日	
学位論文題目	Expression of adrenomedullin by human granulosa lutein cells and its effect on progesterone production （ヒト顆粒膜黄体細胞におけるアドレノメデュリンの発現ならびにそのプロゲステロン産生に及ぼす影響に関する検討）	
審査委員	主査 教授 丸 尾 猛 教授 尾 原 秀 史      教授 横 山 光 宏	

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 緒言

アドレノメデュリンは新しい生理活性ペプチドとして、1993年にヒト褐色細胞腫より発見された。アドレノメデュリンの生理作用は、長時間持続する血管拡張性降圧作用や利尿作用、アルドステロン産生抑制・ACTH分泌抑制・エンドセリン産生抑制作用、さらには、オートクリン/パラクリン因子として細胞増殖、アポトーシス抑制作用など多岐にわたっている。さらにラット卵巣において、アドレノメデュリンが顆粒膜細胞の分化に関与しているとの報告もなされている。しかしながら生殖生理学において、特に卵胞の発育・退行のメカニズムについては、様々な成長因子やサイトカインが関与していることが報告されているが、いまだ十分には解明されていない。そこで今回、ヒト卵巣における卵胞の発育・退行のメカニズムにアドレノメデュリンがいかなる役割を果たしているのかを解明する目的で、アドレノメデュリンの卵巣における発現の有無、組織局在およびその生物作用について検討した。

### 研究方法

#### 1 材料

(a) 浮遊顆粒膜細胞を含む卵胞液ならびに血液は、体外受精・胚移植のため卵胞刺激を行った不妊症患者15人よりインフォームド・コンセントを得た上で採卵時に採取した。

(b) 卵巣組織は早期子宮頸癌患者の根治術時に摘出した正常卵巣より採取し、インフォームド・コンセントを得た上で使用した。

#### 2 卵胞液中および血漿中アドレノメデュリン濃度の測定

卵胞液と血液には採取時にEDTAおよびAprotininを添加し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。Sep Pack C18カートリッジを用いてサンプルからアドレノメデュリン蛋白を抽出し、その濃度をアドレノメデュリン特異抗体を用いたRIA法により測定した。

#### 3 顆粒膜細胞におけるアドレノメデュリン mRNA 発現に関する検討

採卵時に採取した顆粒膜細胞から、guanidine isothianate 法にて totalRNA を抽出した。アドレノメデュリン特異的プライマーを用いた RT-PCR 法により、顆粒膜細胞におけるアドレノメデュリン mRNA の発現について検討した。さらに、PCR 産物の塩基配列を dideoxy 法により確認した。

#### 4 培養顆粒膜黄体細胞によるアドレノメデュリン産生・分泌に関する検討

採卵時に採取した顆粒膜細胞をトリプシン EDTA 処理後、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養し、さらに [<sup>35</sup>S]methionine-cysteine 存在下で6時間培養を継続した。培養液中に分泌された<sup>35</sup>S 標識タンパクを抗アドレノメデュリン特異抗体により免疫沈降させ、SDSPage にて分離・固定した。

#### 5 卵巣組織におけるアドレノメデュリン発現の免疫組織学的検討

手術時に採取した正常卵巣を4%ホルマリンで固定後に切片を作成し、抗ヒトアドレノメデュリン抗体を用いた avidin-biotin 法による免疫組織染色を行った。

#### 6 アドレノメデュリンのプロゲステロン産生に及ぼす影響に関する検討

採卵時に採取した顆粒膜細胞をトリプシン EDTA 処理後、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養して得られた培養顆粒膜黄体細胞に、10<sup>-10</sup>~10<sup>-6</sup>mol/L のアドレノメデュリンを添加して16時間継続培養を行った。培養液中に分泌されたプロゲステロン濃度を RIA 法にて測定した。

### 研究成績

#### 1 卵胞液中および血漿中アドレノメデュリン濃度

卵胞液中アドレノメデュリン濃度は41.2±5.0pmol/L と、血漿中アドレノメデュリン濃度16.7±4.4 pmol/L に比し、有意に高値であった (p<0.01)。

#### 2 顆粒膜細胞におけるアドレノメデュリン mRNA 発現

顆粒膜細胞由来 RNA を用いた RT-PCR により、プライマーから想定されるアドレノメデュリン mRNA に相当する410bp のバンドが認められた。このバンドの塩基配列は、報告されたヒト・アドレノメデュリンの塩基配列と一致した。一方、reverse transcriptase を反応に加えなかったコントロール群では、このバンドは認められなかった。

#### 3 培養顆粒膜黄体細胞によるアドレノメデュリン産生・分泌

[<sup>35</sup>S] methionine-cysteine で標識した顆粒膜細胞培養液を抗ヒト・アドレノメデュリン抗体で免疫沈降し電気泳動したところ、約6kDa の位置に成熟アドレノメデュリン蛋白に相当するバンドを認めた。

#### 4 卵巣組織におけるアドレノメデュリンの発現態度

卵巣顆粒膜細胞におけるアドレノメデュリンの発現を検討したところ、分化、発育程度の低い primordial follicle, preantral follicle の顆粒膜細胞にはアドレノメデュリンの発現をほとんど認めなかったのに対し、dominant follicle の顆粒膜細胞にはアドレノメデュリンの発現を認めた。アドレノメデュリンの発現は顆粒膜黄体細胞でより強くなり、黄体中期の顆粒膜黄体細胞で最も強い発現を認め、黄体の退行とともに減弱した。

#### 5 アドレノメデュリンのプロゲステロン産生に及ぼす影響

培養顆粒膜黄体細胞によるプロゲステロン産生は添加したアドレノメデュリンの濃度依存的に増加することを認めた。

### 考察

preovulatory follicle の卵胞液中のアドレノメデュリン濃度は、血漿中のそれに比し有意に高いことが認められた。この事実は、アドレノメデュリンが卵胞を構成する顆粒膜細胞あるいは莢膜細胞で産

生されて卵胞液中に分泌されていることを示しており、アドレノメデュリンが局所因子として卵巣機能に関与している可能性が示唆された。さらに、preovulatory follicle の顆粒膜細胞でアドレノメデュリン mRNA の発現を認め、またアドレノメデュリン蛋白の産生・分泌が顆粒膜黄体細胞に認められたことより、顆粒膜細胞の分化にアドレノメデュリンが関与している可能性が考えられた。免疫組織学的検討において、アドレノメデュリンが黄体中期の顆粒膜黄体細胞で最も強く発現し、黄体の退行とともに減弱したことは、顆粒膜細胞の黄体化にアドレノメデュリンが関与している可能性を示唆しているといえる。そこで黄体機能の指標となるプロゲステロン産生とアドレノメデュリンとの関連について検討したところ、アドレノメデュリンは顆粒膜黄体細胞のプロゲステロン産生を促進することが認められた。黄体は性周期において排卵後の卵胞から分化して形成されるが、機能的には主にプロゲステロンの産生・分泌を担っている。これらの知見より、アドレノメデュリンが卵巣内局所調節因子として黄体機能の活性化に関与していることが示唆される。

### 論文審査の結果の要旨

卵巣での卵胞の発育・退行のメカニズムには、様々な成長因子やサイトカインの関与が指摘されているが、いまだ十分には解明されていない。本研究では、ヒト卵巣における卵胞の発育・退行のメカニズムにアドレノメデュリンがいかなる影響を及ぼすかを検討した。浮遊顆粒膜細胞を含む卵胞液ならびに血液は体外受精・胚移植のため卵胞刺激を行った不妊症患者より採卵時に、また卵巣組織は早期子宮頸癌患者の根治術時に摘出した正常卵巣より採取した。

preovulatory follicle の卵巣液中アドレノメデュリン濃度は、血漿中のそれに比し有意に高かった。また採取した顆粒膜細胞から totalRNA を抽出し、アドレノメデュリン特異的プライマーを用いた RT-PCR 法により顆粒膜細胞でのアドレノメデュリン mRNA の発現を認めた。 [<sup>35</sup>S] methionine-cysteine で標識した顆粒膜細胞培養液を抗ヒト・メアドレノメデュリン抗体で免疫沈降し電気泳動したところ、培養顆粒膜黄体細胞でのアドレノメデュリン産生・分泌が明らかとなった。卵巣におけるアドレノメデュリン発現の免疫組織学的検討では、分化、発育程度の低い primordial follicle, preantral follicle の顆粒膜細胞にはその発現をほとんど認めなかったが、dominant follicle の顆粒膜細胞ではその発現を認め、発現態度は黄体中期の顆粒膜黄体細胞で最も強く、黄体の退行とともに減弱した。そこで黄体機能の指標となるプロゲステロン産生に関して検討すると、培養顆粒膜黄体細胞によるプロゲステロン産生は、添加したアドレノメデュリンの濃度依存的に増加することを認めた。以上より、アドレノメデュリンが卵巣内局所調節因子として、黄体機能の活性化に関与していると考えられる。

本研究は、従来明らかでなかったアドレノメデュリンの卵胞発育・退行への関与について新しい重要な知見を得たものとして、価値ある集積であると認める。よって本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。