



Thyroid hormone synergizes with follicle stimulating hormone to inhibit apoptosis in porcine granulosa cells selectively from small follicles

Asahara, Saiko

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Date of Publication)

2013-04-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3049

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003049>

※ 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。



【 1 4 7 】

氏 名・（本 籍） 浅原 彩子 （ 大阪府 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博い第1607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16年3月31日

【 学位論文題目 】

Thyroid Hormone Synergizes with Follicle Stimulating
Hormone to Inhibit Apoptosis in Porcine Granulosa
Cells Selectively from Small Follicles

（甲状腺ホルモンは卵胞刺激ホルモンと協調し、各発育
段階卵胞のうち、選択的に小卵胞由来顆粒膜細胞の
アポトーシスを抑制する）

審 査 委 員

主 査 教 授 千原 和夫

教 授 守殿 貞夫

教 授 尾原 秀史

緒言

甲状腺機能異常を有する女性は、高率に月経異常や不妊症を合併するが、甲状腺機能を改善することにより月経異常も正常化し妊娠に結びつく症例が数多く見られる。また、動物実験で甲状腺摘出や抗甲状腺剤投与によって卵胞発育の停止と黄体形成の減少ないし消失をきたすことが知られている。以上のことから、甲状腺機能は卵巣機能と密接な関りを有すると考えられる。その機序として卵巣顆粒膜細胞に存在する甲状腺ホルモン受容体を介し、甲状腺ホルモンが顆粒膜細胞の機能発現に関与していると推察される。

我々は、ブタ顆粒膜細胞培養系で、甲状腺ホルモンが、follicle stimulating hormone (FSH) の作用増強因子として、顆粒膜細胞の機能分化に重要な luteinizing hormone (LH) / chorionic gonadotropin (CG) 受容体誘導を促進し、顆粒膜細胞でのステロイド産生の key enzyme である 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) とアロマターゼの誘導を促進することを報告してきた。さらに興味深いことに、この実験系で顆粒膜細胞の機能分化に対し促進効果を示した L-triiodothyronine (T_3) の培養液中の濃度は、生理的血中濃度 (10^{-8} M) とほぼ一致していた。

卵胞の発育過程においては、単一排卵に向けて主席卵胞選択と卵胞成熟が進行する一方で、主席卵胞以外の卵胞に対しては、卵胞の退行と閉鎖を誘導する機構が作動していると考えられる。近年、これらの卵胞の退行、閉鎖に顆粒膜細胞のアポトーシスに関与していることが明らかとなってきた。

甲状腺ホルモンは、さまざまな細胞、例えばヒトリンパ球や雛鶏の骨格筋細胞、両生類の腸上皮細胞や骨格筋細胞などにおいて、特に個体発生の過程での細胞の増殖とアポトーシス調節に重要な役割を果たしている。しかし、甲状腺ホルモンが、顆粒膜細胞の増殖とアポトーシスにどのように関与しているかは未だ明らかではない。そこで我々は、甲状腺ホルモンがブタ卵巣顆粒膜細胞の増殖とアポトーシスに及ぼす作用について検討を行った。

研究材料と研究方法

ブタ顆粒膜細胞の分離・培養

ブタ卵巣中の卵胞を発育段階別に、小卵胞 (径 1~2mm)、中卵胞 (径 3~5mm)、大卵胞 (径 6~11mm) に分類し、Channing らの needle aspiration 法に従い、それぞれ卵胞液を採取し顆粒膜細胞を遠心分離した。10%FBS 添加 DMEM/F12 で顆粒膜細胞を 37°C で 48 時間前培養した後に、培養液を FBS 無添加 DMEM/F12 に変更し、20ng/ml ブタ FSH 存在下および非存在下で T_3

(10^{-8} M) を添加し、37°C で 48 時間培養した。

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide [MTT] 法

96 穴平底マイクロプレートを用い、10%FBS 添加 DMEM/F12 中で顆粒膜細胞を 48 時間前培養した後に、培養液を FBS 無添加 DMEM/F12 に変更し、20ng/ml ブタ FSH 存在下および非存在下で T_3 (10^{-8} M) を添加し、48 時間培養した。次に、Mosmann 法に従い 10 μ l の MTT 液を加え、37°C で 4 時間培養したのち、100 μ L の イソプロピルアルコール/0.04N 塩酸 を加え発色させ、MTP-120 ELISA plate reader で 570 nm と 630 nm の波長でその吸光度を測定した。

Ki67 ならびに活性型 caspase-3 の免疫染色

2 穴培養スライドを用い、MTT 法と同様の条件下で顆粒膜細胞を培養後、Vectastain ABC キットを用い免疫染色をおこなった。染色後 1000 個以上の細胞をカウントし、それぞれ細胞増殖能とアポトーシスを評価した。

統計処理

各実験は 3 回施行し、各群の測定値は mean $\pm$ SEM で表記した。StatView 4.1 を用い one-way ANOVA にて統計処理をおこなった。P < 0.05 を統計学的有意差とした。

結果

1. ブタ顆粒膜細胞の生存率に及ぼす甲状腺ホルモンの影響

MTT 法を用いて、非添加対照群と添加群との吸光度比を生存率比として検討した結果、FSH の添加により、小、中、大いずれの卵胞由来の顆粒膜細胞においても生存率が有意に増加した。一方 T_3 単独の添加は、卵胞の発育段階にかかわらず顆粒膜細胞の生存率に有意差を生じなかった。FSH と T_3 同時添加群では、FSH 単独群と比べ、顆粒膜細胞の生存率に有意な差は見られなかった。また、FSH 添加による顆粒膜細胞の生存率の増加は、培養開始 48 時間後がもっとも顕著であり、培養開始 60 時間後も 48 時間後と同様の結果が得られた。したがって、この後の免疫染色による検討は培養開始後 48 時間後に行うこととした。

2. ブタ顆粒膜細胞の Ki67 発現に及ぼす甲状腺ホルモンの影響

小卵胞由来顆粒膜細胞では、FSH 添加により Ki67 陽性率が有意に増加したが、 T_3 単独添加群では、Ki67 陽性率に有意差は認められなかった。FSH と T_3 同時投与群では、FSH 単独添加群と比べ、Ki67 陽性率に有意差は見られなかった。中・大卵胞由来顆粒膜細胞では FSH や T_3 ならびに両者の同時添加によっても Ki67 陽性率に有意差は見られなかった。

3. ブタ顆粒膜細胞の活性型 caspase-3 発現に及ぼす甲状腺ホルモンの影響

小卵胞由来顆粒膜細胞では、活性型 caspase-3 陽性率は FSH 添加により有意に減少した。FSH と T_3 同時投与群では、FSH 単独添加群と比べ、活性型 caspase-3 陽性率は更に減少した。一方、 T_3 単独添加群では活性型 caspase-3 陽性率に有意差はみられなかった。中・大卵胞由来顆粒膜細胞では FSH や T_3 ならびに両者の同時添加によっても活性型 caspase-3 陽性率に有意差は見られなかった。

考察

甲状腺ホルモンは細胞の増殖や分化、細胞死などを調節し、脊椎動物の発達とホメオスタシスに寄与している。 T_3 は、ヒト末梢血リンパ球と同様にヒト T リンパ球由来培養細胞のアポトーシスを促進し、雛鶏の骨格筋細胞の増殖を抑制し、蛋白合成とアポトーシスを促進する。また、カエルの変態時の尾の退縮には、 T_3 によって誘導されるアポトーシスが必須である。カエルの変態時、食行動の変化に伴い、 T_3 は幼生型腸上皮の退縮と成体型腸上皮の増殖を促す。また、甲状腺ホルモンの欠乏や過剰は、中枢神経系の構造的、生化学的、機能的な発達に多大な影響を及ぼすことなどが報告されている。

甲状腺機能異常は生殖器の分化異常とも関連するとされている。甲状腺ホルモンは、拡散により血中より卵胞液中に移行するとされており、卵胞液中の濃度は血清中の濃度とほぼ同一である。甲状腺ホルモンの作用は、核内の甲状腺ホルモン受容体を介しておこり、ヒトやラット、ブタなどで顆粒膜細胞の核内に甲状腺ホルモン受容体の発現が報告されている。甲状腺機能異常は、顆粒膜細胞における性ステロイド産生に異常をきたし、月経異常、不妊症などの生殖機能異常に関係することが明らかとなっている。しかし、顆粒膜細胞の増殖とアポトーシスに関する甲状腺ホルモンの影響に関する報告はない。

今回の我々の成績では、 T_3 単独では、いずれの発育段階の卵胞由来の顆粒膜細胞においても、MTT 法を指標とした細胞生存率や免疫染色法による Ki67

陽性率、活性型 caspase-3 陽性率に影響を与えなかった。一方、FSH は、小卵胞由来顆粒膜細胞において、細胞生存率や Ki67 陽性率を有意に増加させ、活性型 caspase-3 陽性率を低下させた。小卵胞由来顆粒膜細胞において、FSH と T_3 同時投与群では、FSH 単独投与群と比べ、細胞生存率や Ki67 陽性率に有意差はなかったが、活性型 caspase-3 陽性率はさらに減少した。これらの結果は小卵胞由来顆粒膜細胞において、 T_3 は FSH と協調して、アポトーシスを抑制することを示唆する。

以前に我々は、ブタ卵巢顆粒膜細胞における甲状腺ホルモン受容体の発現は、卵胞の発育段階により異なること、すなわち小卵胞由来の未分化な顆粒膜細胞の T_3 受容体数は、大卵胞由来顆粒膜細胞の T_3 受容体数に比して多いことを報告した。また、甲状腺ホルモンの受容体には α 、 β の二つのアイソフォームが存在し、それぞれスプライシングの違いにより、サブタイプを有する。甲状腺ホルモン β 受容体 mRNA レベルは、両生類の変態時に尾が退縮するときに上昇し、変態の終了と共に低下する。マウスの胎児では、足と顔において、甲状腺ホルモン $\beta 1$ 受容体 mRNA レベルが上昇する。一方、Wakim らはヒト顆粒膜細胞において、甲状腺ホルモン $\beta 1$ 受容体よりも、甲状腺ホルモン $\alpha 1$ 受容体が多く発現していると報告している。甲状腺ホルモン α 受容体は甲状腺ホルモン β 受容体よりも、甲状腺ホルモン反応性のプロモーター領域の転写活性が高い。従って、甲状腺ホルモン受容体数ならびに各アイソフォームの発現頻度が卵胞の各発育段階毎に異なることが、小卵胞由来の顆粒膜細胞において T_3 が FSH と協調し活性型 caspase-3 陽性率を減少させたことと関連している可能性が推察される。

以上のことから、ブタ卵巢顆粒膜細胞において、甲状腺ホルモンは細胞増殖には影響しないが、FSH と協調して、小卵胞由来顆粒膜細胞のアポトーシスを抑制することが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1608号	氏名	浅原彩子
論文題目	Thyroid Hormone Synergizes with Follicle Stimulating Hormone to Inhibit Apoptosis in Porcine Granulosa Cells Selectively from Small Follicles 甲状腺ホルモンは卵胞刺激ホルモンと協調し、各発育段階卵胞のうち、 選択的に小卵胞由来顆粒膜細胞のアポトーシスを抑制する		
審査委員	主査 千原和夫 副査 子規貞夫 副査 尾崎常史		
審査終了日	平成16年3月18日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

甲状腺ホルモンが個体発生の過程で、様々な細胞の増殖や分化、細胞死などを制御する重要な役割を果たしていることはよく知られている。甲状腺ホルモン欠乏により引き起こされるクレチン症では、中枢神経系の構造的変化および機能面における大きな欠陥が生じることはあまりにも有名である。甲状腺機能異常は生殖器の分化および機能にも影響を及ぼす。卵巣の顆粒膜細胞には甲状腺ホルモン受容体が発現しており、甲状腺機能異常は顆粒膜細胞における性ステロイド産生に障害をきたし月経異常、不妊症などの生殖機能異常をきたすことが知られている。しかし、ダイナミックに変化する卵巣での卵胞発育、顆粒膜細胞の増殖とアポトーシスに果たして甲状腺ホルモンは関与しているのかどうかについてはほとんど研究がされていない。申請者達のグループは、以前にブタ卵巣顆粒膜細胞における甲状腺ホルモン受容体の発現が卵胞の発育段階により異なること、すなわち小卵胞由来の未分化な顆粒膜細胞の T3 受容体数が、大卵胞由来顆粒膜細胞の T3 受容体数に比して多いことを報告している。そこで申請者は、次のステップとして、甲状腺ホルモンがブタ卵巣顆粒膜細胞の増殖とアポトーシスに影響を及ぼすか否かを検討した。ブタ卵巣中の卵胞を発育段階別に、小・中・大卵胞に分け、それぞれ卵胞液を採取し顆粒膜細胞を遠心分離した。顆粒膜細胞を前培養後、ブタ FSH 存在下および非存在下で T3 を添加し更に培養した。MTT 法を用いて、非添加対照群と添加群の生存率比を比較すると、小、中、大いずれの卵胞由来の顆粒膜細胞においても FSH 添加により生存率が有意に増加した。一方 T3 単独の添加は、卵胞の発育段階にかかわらず顆粒膜細胞の生存率には影響を与えなかった。また FSH と T3 同時添加群においても、FSH 単独群と比べ、顆粒膜細胞の生存率に有意な差は見られなかった。顆粒膜細胞の増殖能を Ki67 陽性率で調べたところ、小卵胞由来顆粒膜細胞では、FSH 添加により Ki67 陽性率が有意に増加したが、T3 単独添加は影響を及ぼさず、また FSH と T3 同時投与群でも、FSH 単独添加群と比べ、Ki67 陽性率に影響を与えなかった。中・大卵胞由来顆粒膜細胞では FSH や T3 ならびに両者の同時添加によっても Ki67 陽性率に有意差はなかった。一方、アポトーシスの指標である活性型 caspase-3 陽性率は、小卵胞由来顆粒膜細胞で FSH 添加により有意に減少した。FSH と T3 同時投与群では、FSH 単独添加群と比べ、活性型 caspase-3 陽性率は更に減少した。しかし、T3 単独添加群では活性型 caspase-3 陽性率に影響はなく、中・大卵胞由来顆粒膜細胞では FSH や T3

ならびに両者の同時添加によっても活性型 caspase-3 陽性率に有意差は見られなかった。今回の申請者の成績では、T3 単独では、いずれの発育段階の卵胞由来の顆粒膜細胞においても、MTT 法を指標とした細胞生存率や免疫染色法による Ki67 陽性率、活性型 caspase-3 陽性率に影響を与えなかった。一方、FSH は、小卵胞由来顆粒膜細胞において、細胞生存率や Ki67 陽性率を有意に増加させ、活性型 caspase-3 陽性率を低下させた。小卵胞由来顆粒膜細胞において、FSH と T3 同時投与群では、FSH 単独投与群と比べ、細胞生存率や Ki67 陽性率に有意差はなかったが、活性型 caspase-3 陽性率をさらに減少させたことより、小卵胞由来顆粒膜細胞において T3 は FSH と協調してアポトーシスを抑制することを示唆している。

以上、本研究は、卵巢顆粒膜細胞の増殖およびアポトーシス制御について、甲状腺ホルモン T3 の役割を研究したものであるが、従来知られていなかった T3 が小卵胞由来顆粒膜細胞において FSH と協調してアポトーシスを抑制することを見出し、卵胞顆粒膜細胞のアポトーシス制御における T3 の役割について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。