

ブタ卵丘細胞卵子複合体の膨潤におけるプロジェステロン依存性 ADAMTS-1 の意義

The progesterone-regulated gene expression of ADAMTS-1 plays important role in porcine cumulus-oocyte complex (COCs) expansion

島田 昌之¹・山下 泰尚¹・西堀 正英¹・森 崇英²

Masayuki SHIMADA¹, Yasuhisa YAMASHITA¹,

Masahide NISHIBORI¹ and Takahide MORI²

¹広島大学大学院生物圏科学研究科 ²醍醐渡辺クリニック

¹Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University,

²Daigo-Watanabe Clinic

【目的】

プロジェステロン (P_4) は、LHサージによる排卵誘起時の卵子減数分裂再開に必要な不可欠な因子である¹。我々は、ブタ卵子体外成熟培養系を用いて P_4 の作用を検討している。これまでに、cAMP-PKA依存的に分泌された P_4 が、卵丘細胞に新規に形成される progesterone receptor type A (PR-A)を刺激すること、この P_4 -PRの作用により卵丘細胞の増殖が停止し、LH receptor (LHR)形成、Gap Junctionの閉鎖、卵丘細胞の膨潤などの機能的な変化が誘導され、その結果卵子の減数分裂が再開することを明らかとしてきた^{2,3)}。最近、PR knockout mouseを用いた研究により、ADAMTS-1 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-like repeats -1)が、顆粒層細胞や卵丘細胞で P_4 依存的に合成・分泌されること、顆粒層細胞で分泌されたADAMTS-1は卵丘細胞間に蓄積することが報告された⁴⁾。この結果は、卵丘細胞卵子複合体 (COC) の体外培養時における P_4 の一つの役割を示唆すると共に、既存の体外成熟培養の不完全さを指摘するものである。本研究では、卵丘細胞および顆粒層細胞のADAMTS-1発現機構、発現量の解析、さらに、顆粒層細胞とCOCの共培養が卵丘細胞の膨潤に及ぼす影響と、それに対するmetalloprotease、および P_4 -PRの果たす役割について検討した。

【方法】

(実験1) 5-7ヶ月齢の雌ブタ卵巣の直径3-5 mmの卵胞から、壁顆粒層細胞とCOCsを回収した。壁顆粒層細胞は細胞を分離後、hypoxanthine (HX), FSH, testosterone, insulin添加NCSU37培地でコンフルエントになるまで培養した。500 ng/ml LHにより刺激し、各培養時間後に既報^{2,3)}に従ってTotal RNAを回収し、LHR, PR, ADAMTS-1 mRNAをRT-PCRにより検出した。COCsは、20 ng/ml FSH+500 ng/ml LH添加培地で培養した。

(実験2) コンフルエントな顆粒層細胞上にCOCを静

置し、COCと顆粒層細胞を完全に接着させるために20時間培養した。LH、あるいはLHに20 μ M RU486, 0.5 mM aminoglutethimide (AGT)、あるいは20 μ M metalloprotease inhibitor (Galardin)を添加した培地で培養し、24時間後の卵丘細胞の膨潤を観察した。

【結果】

(実験1) コンフルエントにまで培養した顆粒層細胞において、培地に添加したtestosteroneはestradiol 17β に変換され、 P_4 の合成も低い水準であった。また、LHR mRNAは検出されたが、PR, ADAMTS-1 mRNA量は低い値であった。この顆粒層細胞をLHにより刺激した結果、直ちにLHR mRNAは消失し、 P_4 合成量、PR mRNA量とADAMTS-1 mRNA量は、著しく増加した。ADAMTS-1 mRNA量は、培養8時間で最大値を示したが、この値はRU486の添加により有意に低下した。一方COCsにおいては、培養開始時にはPR, ADAMTS-1 mRNA共に検出されなかったが、培養8時間で降急激に増加し、その値は24時間まで維持されていた。この卵丘細胞におけるADAMTS-1発現もRU486により抑制された。

(実験2) コンフルエントな顆粒層細胞上に一つのCOCを入れ20時間培養した結果、卵丘細胞と顆粒層細胞は完全に接着した。この時、顆粒層細胞にはLHRが形成されていたが、卵丘細胞には存在していなかった。LH刺激40時間後のCOCは、COCs単体を培養した時に比較して、COCsの内層まで激しく卵丘細胞が膨潤していた。この卵丘細胞の膨潤は、RU486およびGalardinにより抑制された。

【結論】

本培養条件において、分離したブタ顆粒層細胞は、黄体化させずに初代培養することに成功した。この培養顆粒層細胞において、① LH刺激後 P_4 -PR依存的にADAMTS-1が発現すること、②顆粒層細胞とCOCsとの共培養は、顆粒層細胞が合成するADAMTS-1などのmetalloprotease familyを介してCOCsの顆粒層細胞からの剥離とその後の膨潤を促進することが明らかとなった。今後は、この共培養系により体外培養した卵子について、その減数分裂再開・進行や発生能などを詳細に検討する予定である。

【引用文献】

- 1) Mori T, et al. (1983) *Endocrinol Jap.*, 30, 593-599.
- 2) Shimada M and Nishibori M (2003) *J Mamm Ova Res*, 20, 113-117.
- 3) Shimada M, et al. (2004) *J Mol Endocrinol.*, (in press)
- 4) Russell DL, et al. (2003) *J Biol Chem.*, 278, 42330-42339.