

## 卵丘細胞における ADAM17 発現変化と その EGF like factor 系を介した卵丘細胞の 膨潤に果たす役割

The ADAM17 expression in cumulus cells, and its  
physiological role of protease activity on cumulus  
expansion via EGFR signaling pathway

山下 泰尚<sup>1</sup>・西堀 正英<sup>1</sup>

JoAnne S. RICHARDS<sup>2</sup>・島田 昌之<sup>1</sup>

Yasuhiro YAMASHITA<sup>1</sup>, Masahide NISHIBORI<sup>1</sup>

JoAnne S. RICHARDS<sup>2</sup> and Masayuki SHIMADA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>広島大学院生物圏科学研究科

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology, Baylor College of Medicine,  
Texas, USA

<sup>1</sup>Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University,

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology, Baylor College of Medicine,  
Texas, USA

### 【目的】

我々は、マウス卵丘細胞卵子複合体 (COC) の体外培養時において、卵丘細胞の膨潤は、FSH, LHの刺激により発現する EGF-like growth factor (AREG, EREG) により誘起されること、この AREG, EREG の発現は、PGE<sub>2</sub> あるいは progesterone により誘導され、卵丘細胞の膨潤に関与することを報告したり、この AREG, EREG は、細胞膜貫通型のタンパク質であり、それらがシグナルを下流へ伝えるためには、細胞膜から EGF 活性を有するドメインが切断、分泌されることが必要である。近年、Sahin *et al.* は、*Adam17*<sup>-/-</sup> マウスの胚性細胞を用いて、ADAM17 が、AREG, EREG を切断することを認めた<sup>2)</sup>。従って、ブタ COC の体外培養時においても卵丘細胞において ADAM17 は発現し、AREG および EREG の切断を促し、卵丘細胞を膨潤させると考えられる。本研究では、ブタ COC の体外培養系をモデルとして、ADAM17 の発現とその発現制御機構、卵丘細胞の膨潤に果たす役割について検討した。

### 【方法】

(実験1) 未成熟雌ブタの卵胞から COCs を採取し、FSH, LH 添加培地で 40 時間まで培養した。培養後、卵丘細胞から Total RNA あるいはタンパク質を抽出し、RT-PCR 法による *Adam17* mRNA の経時的発現変化、western blotting 法による ADAM17 検出、および ADAM17 活性測定を行った。

(実験2) ADAM17 の役割を検討するために、ADAM17 阻害剤 (TAPI-2) および非特異的 metalloprotease 抑制剤 (galardin) が、AREG および EREG の下流シグナル系であるリン酸化 ERK1/2 および卵丘細胞の膨潤に及ぼす影響を検討した。

(実験3) ADAM17 の詳細な役割を追求する目的で、*Adam17* siRNA を遺伝子導入したラット顆粒層細胞における LH に対する細胞応答への影響を検出した。

### 【結果】

(実験1) ブタ COC を 40 時間まで培養したときの卵丘細胞における *Adam17* mRNA の経時的発現変化は、卵胞から回収した直後の *Adam17* mRNA の発現量は低い値であったが、5 時間、10 時間、あるいは 20 時間培養することによりその発現量は有意に増加し、培養時間を 30 時間、あるいは 40 時間まで延長すると低下した。Western blotting 解析の結果、ADAM17 発現は、5 時間あるいは 10 時間の培養により高い値を示し、その後 40 時間培養したときにおいても高い発現量は維持されていた。ADAM17 活性においても、ADAM17 発現と同様に、5 時間培養した区において活性値が増加し、その活性値は、培養 40 時間まで高い値を示した。

(実験2) COC を 40 時間まで培養した結果、FSH, LH の刺激により増加する ADAM17 の高い活性値は、TAPI-2 あるいは Galardin により有意に低下した。また、TAPI-2 および Galardin により AREG, EREG が誘起するリン酸化 ERK1/2、標的遺伝子の発現、および卵丘細胞の膨潤が抑制され、それらの抑制効果は、活性型 AREG を培地に添加することにより回復した。

(実験3) FSH/LH でラット顆粒層細胞を刺激すると、*Areg*, *Ereg*, *Adam17*, および ERK1/2 のリン酸化は増加した。この *Adam17* mRNA の発現の増加は、*Adam17* siRNA を遺伝子導入により半減し、ERK1/2 のリン酸化とその標的遺伝子である *Ptgs2*, *Tnfaip6*, *Has2* の発現が有意に低下した。

### 【結論】

以上の結果から、FSH, LH の刺激により卵丘細胞において ADAM17 が発現し、活性化されること、活性化された ADAM17 が EGF-like growth factor の分泌を促進する結果、卵丘細胞の ERK1/2 が活性化され、その標的遺伝子の発現が増加し、その結果卵丘細胞の膨潤が誘導されることがはじめて明らかとなった。

### 【文献】

- 1) Shimada, *et al.*, 2006 Mol Endocrinol.
- 2) Sahin, *et al.*, 2004 J Cell Biol.
- 3) Shimada, *et al.*, 2004 Endocrinology.
- 4) Yamashita, *et al.*, 2005 Endocrinology.

