

博士論文

ヒト黄体化顆粒層細胞における
細胞生存性に及ぼす
ヒト絨毛性ゴナドトロピンの影響に関する研究

平成27年9月

平田 麗

岡山大学大学院
環境生命科学研究科

目次

第1章 序論

第2章 ヒト黄体化顆粒層細胞培養の確立

第1節 緒言

第2節 材料と方法

第3節 結果

第4節 考察

第3章 ヒト黄体化顆粒層細胞の生存性に及ぼす hCG および P4 の影響

第1節 緒言

第2節 材料と方法

第3節 結果

第4節 考察

第4章 ヒト黄体化顆粒層細胞における細胞死に関する検討

第1節 緒言

第2節 材料と方法

第3節 結果

第4節 考察

第5章 総合考察

謝辞

試薬および緩衝液一覧

参考文献

第 1 章 序論

日本における不妊治療を受ける患者は年々増加しており、体外受精により出産に至った児は年間 3 万人を超える（日本産科婦人科学会平成 25 年度倫理委員会・登録・調査小委員会報告、2014）。しかしながら、体外受精による妊娠および出産率の向上は頭打ちとなっており、着床および妊娠維持機構の解明は早急に解決すべき課題である。

ヒトを含む多くの哺乳動物において、排卵後に形成される黄体は妊娠の成立と維持に必須のプロゲステロン (P4) を分泌する一過性の内分泌器官である (Schams と Berisha、2004)。黄体は P4 に加え、アンドロジェンやエストラジオール (E2) を多く分泌し、黄体期の主なステロイドホルモン産生源である。また、妊娠が成立しなかった場合、次周期の卵胞発育を再開するために、黄体はすみやかに退行しなければならない (Niswendert ら、2000)。以上のように黄体の形成、発育、退行および黄体維持機構は妊娠の成立と維持に深く関与しており、その制御機構の解明はヒトの生殖医療技術向上に繋がることが期待される。

1-1. 卵胞の黄体化

顆粒層細胞および卵胞内膜細胞の黄体化は視床下部由来の黄体化形成ホルモン (LH) により引き起こされる (Duncan ら、2009)。LH が LH レセプター (LHr) に結合することにより adenylyate cyclase および phospholipase C が刺激される。この adenylyate cyclase の活性化により protein kinase A の活性化が引き起こされ、phospholipase C の活性化により、inositol trisphosphatediacylglycerol (IP₃) および diacylglycerol (DG) が生成される。IP₃ は小胞体に作用し Ca²⁺ が放出され、DG は protein kinase C の活性化を引き起こす。これら protein kinase の活性化によりタンパク質のリン酸化が起こり、酵素の活性化や遺伝子発現な

どが誘導される (Davis、1994)。

ヒトにおいて、主席卵胞から分泌される E2 は LH サージ直前に急激に増加し、排卵期にピークに達する。一方、P4 分泌は LH サージまで 低く、排卵期でもわずかな増加にとどまる (Christenson と Devoto、2003)。LH サージから 24-36 時間以内に卵母細胞の減数分裂再開、また卵母細胞の基底膜と顆粒層細胞との gap junction の結合が緩み卵胞壁が崩壊することによる排卵、さらに顆粒層細胞の黄体化ならびに黄体発育が開始する (Rodgers ら、2003)。

排卵前の顆粒層細胞は細胞周期促進に関連するタンパク質である cyclin B や卵胞刺激ホルモンレセプター (FSHr)、ステロイド産生酵素である 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) および aromatase を発現している。発育卵胞の顆粒層細胞における LHr 発現は FSH により誘導され、LH サージにより cyclin や他の遺伝子が増加し、細胞増殖が阻害されることが報告されている (Rodger ら、1998; Jirawatnotai ら、2003; Filicori ら、2005)。また、LH サージにより顆粒層細胞および卵胞内膜細胞の黄体化が開始することにより、血中 P4 濃度が増加し、さらに顆粒層細胞における LHr および P4 レセプター (PR) 発現が増加する (Takao ら、1997; Suzuki ら、1994)。

1-2. ステロイド生成

ヒト黄体はステロイド産生細胞 (小型および大型黄体細胞) および非ステロイド産生細胞 (血管内皮、免疫および繊維芽細胞) から構成されており、このうち約 30% がステロイド産生細胞である (Carrasco ら、1996)。小型黄体細胞は卵胞内膜細胞が、大型黄体細胞は顆粒層細胞が分化したものである (Smith ら、1994)。

P4 合成には主に steroidogenic acute regulatory protein (StAR) および二つの酵素、P450 cholesterol side-chain cleavage (P450scc) ならびに 3 β -HSD、が関係して

いる。StAR は LH 刺激により生成され、すべてのステロイドホルモンの前駆物質であるコレステロールをミトコンドリア内へと輸送するタンパク質である (Arakane ら、1998)。StAR により輸送されたコレステロールがミトコンドリア内膜に位置する P450ssc により pregnenolone へ変換され、その後、滑面小胞体上の 3 β -HSD により P4 へ変換される (Smith ら、1994)。LH サージ前、ヒト顆粒層細胞には StAR が存在せず、コレステロール前駆体から P4 を合成することができない (Chaffin ら、2000)。一方、排卵前のヒト卵胞内膜細胞には多くの StAR と E2 生成に必要な酵素がすべて存在し、ステロイドホルモンの一種であるアンドロジェンが生成される (Kiriakidou ら、1996)。卵胞内膜細胞で生成されたアンドロジェンが卵胞の基底膜を通過し顆粒層細胞へアロマターゼ基質として供給されることにより、顆粒層細胞でエストロジェンが産生される (2 細胞機構)。LH サージによる黄体化に伴いコレステロールをアンドロジェンに変換する 17 α -hydroxylase (C17、C20 lyase) (P450_{17 α}) 活性が低下することにより P4 合成が増加し、E2 合成は低下する (Voutilainen ら、1986)。ヒト黄体において、StAR タンパク質発現は初期ならびに中期黄体に最も高く、卵胞膜-黄体細胞での StAR 発現は黄体期に関わらず顆粒層-黄体細胞に比べ高い。免疫組織化学的手法を用いた研究では、StAR 発現は初期黄体で中程度、黄体中期で増加、黄体後期で減少していた (Devoto ら、2001)。また、ヒト黄体内の 3 β -HSD 発現は黄体初期に最も高く、中期および後期は低下していた (Duncan ら、1999)。これら StAR および 3 β -HSD の発現変化は血中 P4 濃度の変化と一致している。

1-3. 黄体退行

非妊娠周期に起こる黄体退行は機能的退行および構造的退行の二つの局面から成る (Stocco ら、2007)。機能的退行として黄体の P4 産生能が低下し、その後、細胞死を伴う構造的退行が起こる。黄体退行のメカニズムは明らかでない

が、脳からの LH パルスおよび黄体細胞の LHr 発現が低下していないにも関わらず黄体退行が起こることから、LH レセプターよりも下流の因子がステロイド合成機能ならびに黄体の構造的退行に関与していることが示唆されている (Duncan ら、1996)。

機能的黄体退行の主な特徴は黄体の P4 産生能の減少であり、それは StAR の遺伝子およびタンパク質発現の減少と関連している。StAR 発現の減少は他のステロイド合成酵素発現の低下より先行しており、黄体の P4 産生に StAR が重大な役割を果たしていることを示している (Ronen-Fuhrmann ら、1998)。実際、ヒト黄体後期に hCG を投与することにより血中 P4 および E2 濃度だけでなく、低下していた StAR 発現が黄体中期の水準にまで回復する (Kohen ら、2003)。また、反芻動物において、子宮からのプロスタグランディン F2 α (PGF2 α) が強力な黄体退行因子であることが知られている (Neuvians ら、2004)。しかし、ヒト子宮を摘出しても黄体は退行し排卵が維持されることから、ヒトにおいて、子宮由来の PGF2 α は黄体退行の必須因子ではないと考えられている (Neill ら、1969; Beling ら、1970; Metcalf ら、1992)。ヒトでは黄体からも PGF2 α が産生されるが、黄体中期にピークとなり黄体退行と関連するとした報告 (Patwardhan と Lanthier、1985) や関連はないとする報告 (Challis ら、1976; Swanston ら、1977) があり見解は一致しておらず、黄体退行における PGF2 α の生理的役割は定かではない。また、エストロジェンはヒト黄体細胞の 3 β -HSD 活性を阻害することが報告されている (Vega ら、1994)。さらに、in vitro において 腫瘍壊死因子 (TNF α) が黄体細胞のアポトーシスを誘導すること (Matsubara ら、2000)、また TNF α を産生するマクロファージが退行期黄体内で増加することが示されている (Suzuki ら、1998)。PGF2 α 、エストロジェン、TNF α だけでなくインターロイキン-1 β 、エンドセリン、monocyte chemoattractant および活性酸素種なども黄体退行に関与する可能性が示されている (Devoto ら、2002)。

構造的黄体退行には細胞死が関与し、実際に後期-退行期のヒト黄体において、初期-中期と比較しアポトーシス細胞数が増加する (Shikone ら、1996; Yuan と Giudice、1997; Vaskivuo ら、2002)。しかし、ヒト黄体の生死を調節する遺伝子発現に関する見解は一致していない。黄体のステージに関わらず細胞生存因子である BCL-2 発現は一定であったとの報告 (Rodger ら、1995) がある一方、BCL-2 発現は黄体後期に減少し、さらに子宮外妊娠の黄体では増加したとの報告がある (Sugino ら、2000)。また、アポトーシス促進タンパク質である Bax は黄体期を通じヒト黄体内で変化しないとの報告 (Rodger ら、1998) や、退行黄体あるいは非妊娠黄体では増加したとの報告 (Sugino ら、2000) もあり、構造的黄体退行のアポトーシスを制御するメカニズムは未だ明らかでない。一方、サルやヒトにおいて、退行黄体にアポトーシスとは異なる細胞死であるオートファジーやネクローシスが誘導されることが報告されている (Fraser ら、1999; Del Canto ら、2007)。退行黄体内のアポトーシス陽性細胞数は 5%-7% と非常に少ないとする報告 (Vega ら、2000) もあり、アポトーシスとは異なる細胞死を含めた構造的黄体退行機構の解明には更なる検討が必要である。

1-4. 妊娠周期における黄体維持機構

ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) は着床した受精卵の栄養膜細胞から分泌される糖タンパク質であり、LH と相同性が高く、LHr に結合することにより作用する。女性へ β -hCG 抗体を投与し内因性の hCG を不活性化させることにより 血中 P4 濃度が減少し月経が発来したことから、hCG が黄体維持作用を有することが示された (Pal と Singh、2001)。血中 hCG は着床時期 (排卵後 8 日目) 頃から測定可能であり、妊娠 12 週まで連続的に増加する。経膈超音波により測定された黄体サイズは初期妊娠時に急激に増加するが、P4 および E2 の増加割合と一致しない。一方、黄体サイズと 血中 hCG 濃度は正の相関関係に

ある。これらのことから初期妊娠の黄体の成長は主に非ステロイド合成細胞の増殖によることが示唆される (Glock ら、1995)。

妊娠黄体における機能的および構造的変化について不明点が多い。黄体後期に LH または hCG を投与することにより黄体が維持される (Zelevnik、1998)。また hCG 投与により後期黄体の StAR の mRNA およびタンパク質発現量が、血漿 P4 濃度と同様に中期黄体の水準まで上昇すること (Kohen ら、2003)、ヒト黄体化顆粒層細胞における hCG によるアポトーシスの抑制はアポトーシスシグナルとして知られる Fas 経路だけでなく Bcl/Bax 経路の阻害により調節されていることが報告された (Matsubara ら、2000)。

黄体局所における P4 の役割の詳細は明らかでない。ヒト黄体には P4 レセプターが発現しており、黄体後期では減少する (Ottander ら、2000)。また、ヒトおよびサル黄体組織中 P4 濃度は後期黄体で低下する (Vega ら、1987; Hild-Petito と Fazleabas、1997)。これまで P4 は培養黄体化顆粒層細胞の生存性を高め (Makrigiannakis ら、2000)、LHr 発現およびステロイド産生酵素発現に影響すると報告されている (Jones ら、1992; Chaffin ら、2000)。すなわち、P4 が黄体細胞の生存性や機能における直接的な黄体維持作用を有していることが考えられる (Stouffer、2003)。しかしながら、黄体後期に低下した PRs 発現は hCG を投与しても回復しないことから (Duncan ら、2005)、妊娠時の黄体維持機構における P4 の役割の解明には更なる検討が必要である。

以上のような知見から、hCG は P4 を介して黄体の生存を調節している可能性があるが、その詳細は不明である。また、ヒト黄体の維持および退行機構の解明には黄体細胞の培養系による研究が不可欠であるが、正常なヒト黄体細胞の入手は容易でなく、多数のサンプルを集めることは困難である。そこで本研究では、ヒト黄体機能調節メカニズムの一端を解明する目的で、ヒト黄体モデルとしてヒト黄体化顆粒層細胞 (hLGCs) の培養条件を確立し、その生存性に及

ばす hCG の影響を検討した。

第 2 章 ヒト黄体化顆粒層細胞の培養条件の確立

第 1 節 緒言

序論でも述べたように、ヒト黄体の維持および退行機構の解明には黄体細胞の培養系による研究が不可欠である。しかし、正常なヒト黄体細胞の入手は容易でなく、多数のサンプルを集めることは困難である。一方、体外受精の採卵時に得られる hLGCs を用いた研究は Stangel ら (1970) による報告を含め、現在まで多くなされている。

hLGCs の培養はその実験の目的に合わせ様々な条件で行われている。例えば Taketani ら (2008) は細胞を培養開始後、ただちに成長ホルモンを添加し 24 時間後の P4 産生量を測定し hLGCs に及ぼす成長ホルモンの影響を検討した。Engmann ら (2006) は Matrigel matrix をコートした培養プレートへ hLGCs を播種し 3 日間培養後に試験物質を添加し、その後の生存性を検討した。一般的に培養容器底面にコーティングされた細胞外基質は細胞の足場となり、細胞の接着や増殖を促進することが知られている (Emerman と Pitelka, 1977; Yang と Nandi, 1983)。細胞外基質としてはコラーゲン、ラミニンおよびファイブロネクチンなどが代表的であり、内皮細胞、肝細胞、筋細胞など多様な細胞の培養に用いられている。また初代培養細胞の機能は培養期間によって変化することが知られている。例えば、初代培養肝細胞はグリコーゲンの合成と分解を含むほぼすべての肝機能を有し生体内と同等レベルの機能発現が見られるが、これらの機能は培養開始後の数日間しか維持されない (Okamoto, 1998)。またラット培養黄体細胞において培養開始 2 日目までは上皮成長因子が P4 分泌を増加させるが、3 日目には刺激しないことから (Tekpetey ら, 1995)、培養日数が細胞のホルモン分泌能に影響することが考えられる。さらに、年齢が増加すると卵巣機能が低下することがよく知られている (Pellicer ら, 1995)。ヒト卵丘細胞の

プロテオーム解析により代謝、酸化的リン酸化および転写機構に関連する遺伝子ならびにタンパク質発現が年齢と相関すること (McReynolds ら、2012)、また高齢女性から採取された卵丘細胞において、卵胞発育を調節する抗ミュラー管ホルモン mRNA 発現が若齢女性と比較し高いことが報告されている (Kedem ら、2014)。これらのことから hLGCs のホルモン産生能に年齢が影響する可能性が考えられる。

そこで、黄体モデルとして用いるための hLGCs の培養条件の確立を目的とし、培養プレートに施すコラーゲンコートの有無および至適培養日数を検討した。また、女性年齢が hLGCs のホルモン分泌能に及ぼす影響を併せて検討した。尚、本研究は岡山二人クリニック倫理委員会の承認 (No. FC-2009-06-03-3) を得た後に実施した。

第 2 節 材料と方法

1. 黄体化顆粒層細胞の単離

研究への同意が得られた体外受精患者のうち、男性因子、卵管因子または原因不明により体外受精の適応と判断された症例のみを対象とした。性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH; Nafarelil, 150 単位/日, Fuji Pharma Co.,) アナログ併用調節卵巣刺激法のもとで卵胞発育観察を行い、主席卵胞径が 18 mm 以上に発育した時点で 10,000 IU hCG を筋肉内投与し、35.5 時間後に経膈超音波ガイド下に採卵した。卵母細胞回収後の卵胞液を遠心分離 ($200 \times g$, 5 分) し、上清を廃棄した。クリーンベンチ内で PBS (-) 3 ml を加え混和後、顆粒層細胞を単離するために 3 ml の 45% Isolate (Irvine Scientific; 99264) に重層し、遠心分離 ($200 \times g$, 20 分) した。境界面に集まった細胞を回収し、等量の PBS (-) を加え混和後遠心分離 ($200 \times g$, 5 分) し上清を廃棄した。細胞懸濁液中に混在する赤血球を溶血反応により除去する目的で Tris- NH_4Cl 緩衝液 5 ml を加え、穏やかに 30 回ピペッティングを行った後、直ちに遠心分離し、上清を廃棄した。約 3 ml の 10% 子牛血清 (CS, Invitrogen; #16170078)、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin (Invitrogen; #15750-060)、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amphotericin B (Sigma-Aldrich; #A9528) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium と Ham's nutrient mixture F-12 の 1:1 混合培養液 (DMEM/Ham's F-12, with 15 mM HEPES and L-Glutamine [Sigma-Aldrich; #D-8900]) に細胞を再懸濁し、再び遠心分離した後、上清を廃棄した。このような遠心洗浄処理を 3 回行った後、DMEM/Ham's F-12 を 1 ml 加え、24 G カテラン針を接続したシリンジで 50 回吸排出を繰り返し、細胞を単離した。こうして得られた黄体化顆粒層細胞懸濁液の一部を 0.4% トリパンブルー溶液で染色し、血球計算器を用いて生細胞数を算定した。生細胞が 2×10^5 cells/ml になるように培養プレートへ播種し、以下の実験に用いた。

実験 1. 培養プレートにおけるコラーゲンコート有無による接着性の検討

単離した hLGCs を生細胞数が 2×10^5 cells/ml になるように 48 穴培養プレート (Greiner, #677180) に播種した。培養プレートは無処理プレートと播種 1 時間前にコラーゲンコートした培養プレートをそれぞれ用いた。播種 24 時間後、非接着細胞および赤血球の除去のため培養液で 2 回洗浄し、顕微鏡下 (Olympus, IX70) で細胞の接着状態を観察した。

実験 2. hLGCs の P4 および E2 分泌に及ぼす培養期間の影響

コラーゲンコートした 48 穴培養プレートに細胞を播種し、24 時間後に非接着細胞および赤血球の除去のため培養液を交換し、その後 24 時間ごとに培養液を交換した。5 日目まで培養を継続し、24 時間ごとに回収した上清中の P4 および E2 濃度を酵素免疫測定法 (EIA) により測定した。

実験 3. 年齢別の hLGCs の P4 産生量の検討

コラーゲンコートした 48 穴培養プレートに細胞を播種し 3 日間培養後、培養液を 0.1% BSA (Roche Diagnostics; #15408)、sodium selenite (Sigma-Aldrich; #S5261; 5 ng/ml)、holo-transferrin (Sigma-Aldrich; #T3400; 5 μ g/ml) を含む DMEM/Ham's F-12 phenol red free と交換し、hCG (Fuji Pharma; 100 IU/ml) を添加し、さらに 24 時間培養した。培養終了後に上清を回収し、P4 濃度を測定するまで -30°C で保存した。また、上清を回収した培養プレートは DNA 量を測定するまで -30°C で保存した。

2. コラーゲンコート処理

ラット尾部由来コラーゲンを 0.1% (W/V) コラーゲン溶液となるよう 0.1 M 酢酸液中に滴下した。使用直前に 0.1% コラーゲン溶液と 0.1 M 酢酸を 1:9 の

割合で混合し、48 穴培養プレートに 250 μ l/well となるよう分注し 1 時間静置した。静置後、コラーゲン溶液を吸引除去し、PBS (-) により 2 回洗浄、DMEM/Ham's F-12 により 1 回洗浄を行った。

3. Cell viability test

培養 24 時間後、1-methoxy PMS (Dojindo; #345-04001) と WST-1 (Dojindo; #342-06451) を 1 : 9 の割合で混合した発色液を加え、37°C、5% CO₂、95% in air 気相条件下で 1 時間インキュベートした。インキュベート終了後、各 well の吸光度を波長 450 nm で測定した (BIORAD Model 450 microplate)。細胞生存率は無添加区を基準として以下に示す式にしたがって算出した。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = (\text{添加区の吸光度}) \times 100 / (\text{無添加区の吸光度})$$

4. EIA 用イムノプレートの作成

96 穴イムノプレート (Nunc; #442404) に Coating buffer (緩衝液一覧参照) で希釈した二次抗体を 100 μ l/well ずつ分注し、室温で 2 時間インキュベートした。二次抗体として、P4 測定用プレートに 13.2 μ g/ml に希釈した anti-rabbit-IgG (H+L)-goat (生化学工業; 50 μ g/ml) を使用した。その後、デカントすることにより、プレートに結合しなかった二次抗体を除去し、さらに well 中で非特異的に蛋白質が結合する箇所をなくす目的で、0.1% BSA を含む Assay buffer (緩衝液一覧参照) を 250 μ l/well ずつ分注し、室温で 30 分間インキュベートした。二次抗体をコートしたプレートは測定に使用するまで 4°C で保存した。測定の際には 0.1% BSA を含む Assay buffer をデカントし、0.05% Tween 80 で 2 回洗浄した後、プレートをキムタオル上にたたきつけることによって、well 内の Tween 80 を完全に除去した。

5. ホルモン 濃度の測定

P4 濃度の測定は、Okuda ら (1997) の方法に従った。P4 測定用の二次抗体をコートしたプレートに P4 標準液 (0.39-100 ng/ml) または培養上清の希釈サンプルを 20 μ l/well ずつ加え、10 万倍に希釈した抗 P4 ウサギ血清 (OK-1; 岡山大学 奥田潔博士作成) を 100 μ l/well ずつ分注し、遮光下にて 20 万倍に希釈した P4-HRP を 100 μ l/well ずつ分注した後、4°C で一晩インキュベートした。サンプルの希釈倍率は 1000 倍とした。なお、標準液、サンプル、OK-1 ならびに P4-HRP は Assay buffer で希釈した。

エストラジオール 17- β (E2) 濃度の測定は、Fujita ら (1996) の方法に従った。E2 用の二次抗体をコートしたプレートに E2 標準液 (0.03125-8 ng/ml) または培養上清の希釈サンプルを 30 μ l/well ずつ加え、5 万倍に希釈した抗 E2 ヒツジ血清 (GDN#244;コロラド州立大学 Gorodon D. Niswender 博士より供与) を 100 μ l/well ずつ分注し、4°C で一晩インキュベートした。インキュベート終了後、遮光下にて 3 万倍に希釈した E2-HRP を 100 μ l/well ずつ分注した後、4°C で 4 時間インキュベートした。なお、標準液は DMEM/Ham's F-12 phenol red free、OK-1 ならびに E2-HRP は Assay buffer で希釈した。

インキュベート終了後、プレート内の反応液をデカントし、0.05% Tween 80 で 4 回洗浄した。プレートをキムタオル上にたたきつけることによって、Tween 80 を完全に除去した後、Substrate buffer A および B (緩衝液一覧参照) の 1:1 混合液を 150 μ l/well ずつ氷冷下で分注し、35°C、40 分間振盪しながら遮光条件下でインキュベートした。発色反応の後、反応を停止させる目的で 4N H₂SO₄ を 50 μ l/well ずつ加え、各 well の吸光度を波長 450 nm で測定した (BIORAD Model 450 Microplate Reader)。サンプル中のホルモン濃度は、標準液の吸光度に基づいて作成した標準曲線より算定した。

6. DNA 量の測定

培養終了後、上清を回収した 48 well 培養プレートは 10 秒間超音波処理することにより細胞膜ならびに核膜を破壊した。また、標準液に子ウシ胸腺由来 DNA (Sigma-Aldrich; #D1501; 40 µg/ml) を、使用時に 1.25-40 µg/ml となるように 7 段階に希釈して用いた。このようにして得られた測定用サンプルあるいは標準液 150 µl を 96 穴プレート (Greiner; #655076) に分注し、続いて蛍光色素 bis-benzimide (Sigma-Aldrich; #B2883; 1 µg/ml) 100 µl を加えて遮光氷冷下で 10 分間振盪させながら反応させた。その後ただちに分光蛍光光度計 (Fluoroskan Ascent, Labsystems) で各 well の蛍光強度を測定した。測定器の励起波長は 356 nm、蛍光波長は 458 nm に設定した。標準液の測定値より標準曲線を作成してサンプル中の DNA 量を算定した。

7. 統計処理

結果は同一実験区ごとに平均値 $\pm$ 標準誤差で表し、各実験区間の有意差検定は分散分析後、Tukey's multiple comparison test を用いて行った。

第 3 節 結果

1. 培養プレートにおけるコラーゲンコートの有無による接着性の検討

単離した hLGCs をコラーゲンコート無しの培養プレートに播種したところ、細胞間の間隙が広く接着率が低かった。コラーゲンコートした培養プレートでは隙間なく細胞が接着および伸長し、接着率の高いことが示された (Fig. 1)。

2. ホルモン分泌能に及ぼす培養期間の検討

P4 分泌量は培養 48 時間から 96 時間までは一定であったが、培養 120 時間で低下した (Fig. 2A)。E2 分泌量は培養 72 時間が最も多く、培養 72 時間 と比べ 120 時間培養では分泌量が低下した (Fig. 2B)。

3. 年齢別の hLGCs の P4 産生量の検討

hLGCs を採取した症例の年齢は 27 歳から 39 歳であった。症例別の DNA あたりの P4 分泌量にはばらつきが大きく、年齢による相関は認められなかった。また、P4 産生量に及ぼす hCG の影響に、年齢による差異は認められなかった (Fig. 3)。

Figure 1

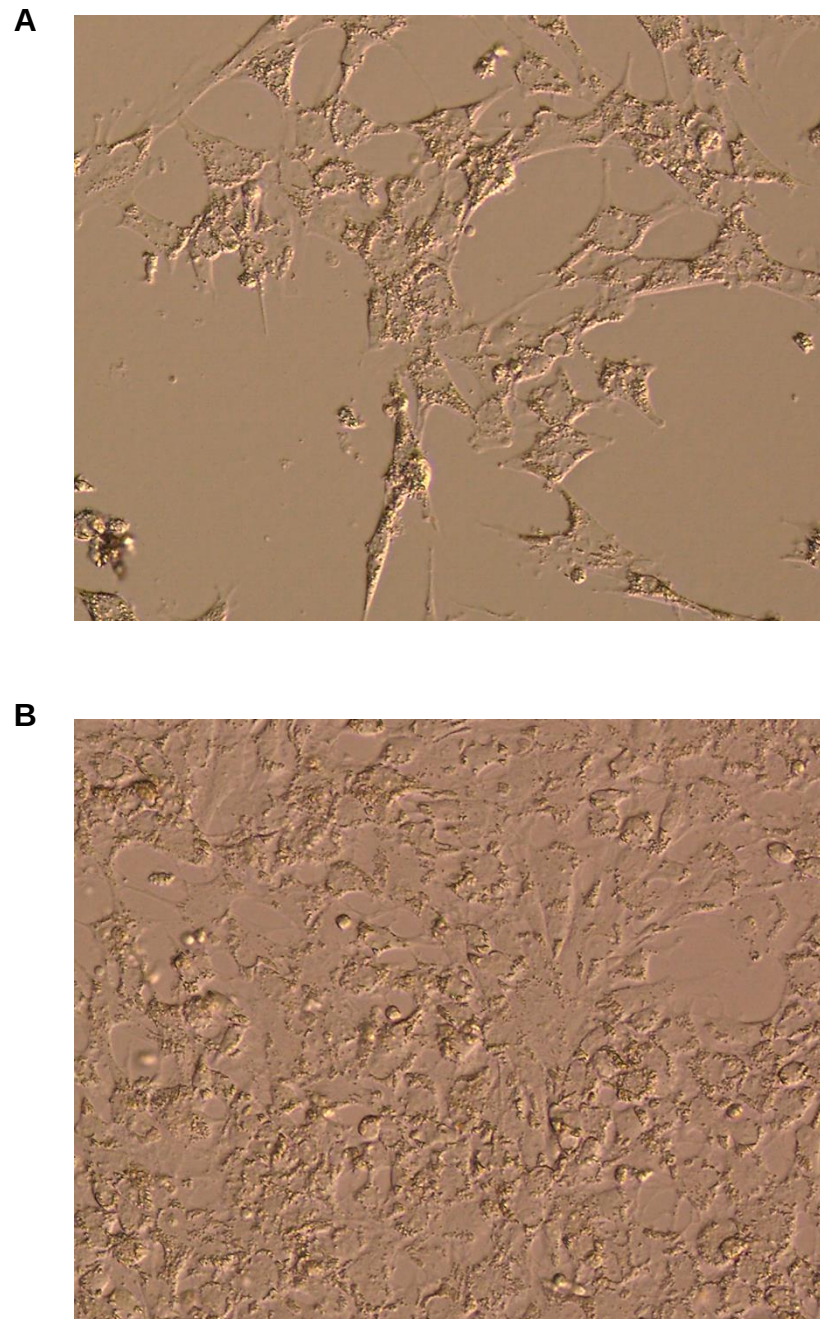


Fig. 1 Adhesion of hLGCs. 2×10^5 cells were plated on non-coated plates (A) or precoated with collagen (B). The plates were incubated at 37 C for 24 h, and the wells were washed to remove unattached cells. Photomicrographs were then taken of the plates using microscope equipped with relief contrast objectives. Total magnification is 400x.

Figure 2

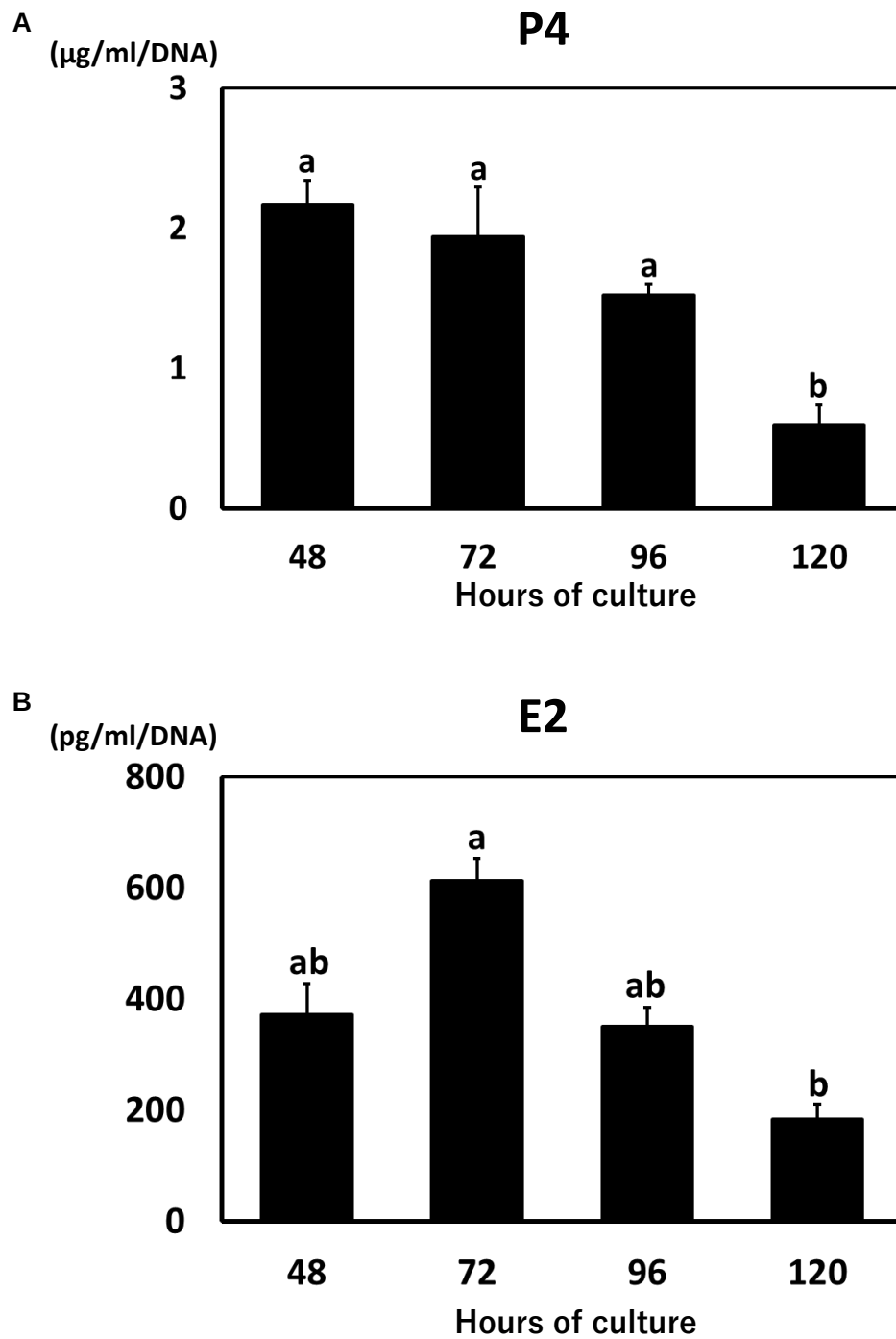


Fig. 2 Changes in concentration of P4 secretion (A) and E2 secretion (B). hLGCs were harvested on 24 h and were washed to remove unattached cells on 48 h.

Figure 3

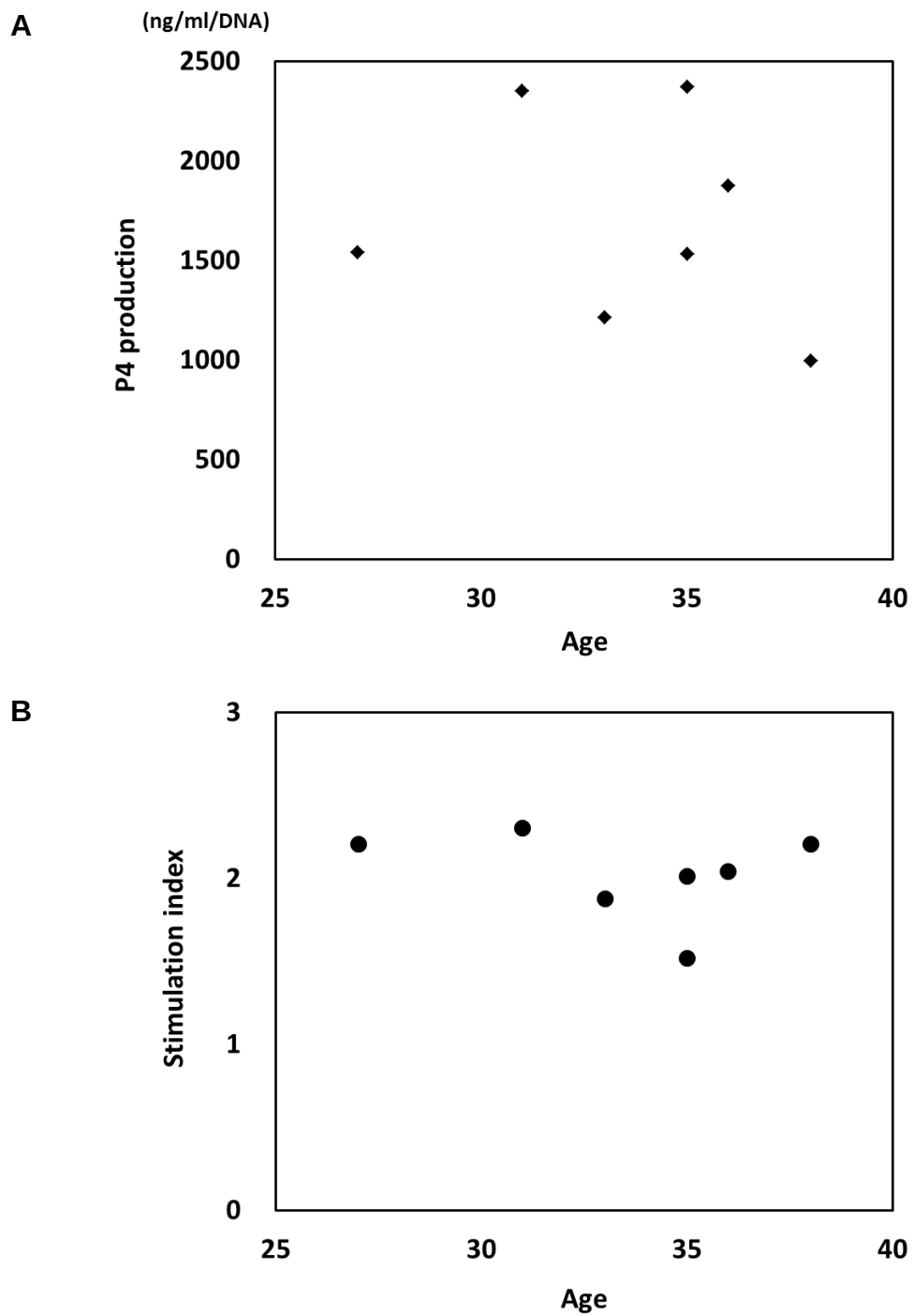


Fig. 3 Scatterplots of relation between age and P4 production (A) and stimulation index (B). The stimulation index is calculated as the ratio of progesterone concentration stimulated by hCG (100 IU/ml) to progesterone concentration in control.

第 4 節 考察

hLGCs の培養ではコラーゲンコートにより接着率が高まったことから、限られた細胞を効率よく培養するためにはコラーゲンコートが有効であることが確認された (Fig. 1)。また、24 時間毎の hLGCs におけるホルモン産生量を測定したところ、P4 および E2 とともに培養期間が延長すると産生量が低下した。hLGCs の増殖能は高くはないが培養日数の進行に従い細胞数は増加する (Goldman ら、1993)。それにもかかわらず産生ホルモン量が減少したことから、培養期間の延長により細胞の P4 産生能は低下すると考えられる。P4 および E2 産生量がともに培養 120 時間後には減少したことから、培養期間はホルモン産生能が保たれていた培養 96 時間までが適していると考えられた (Fig. 2)。

hLGCs の P4 産生能に及ぼす年齢の影響を検討したところ、症例による差が大きく、27-39 歳間では一定の傾向はなかった (Fig. 3A)。また、hCG (100 IU) 添加区における P4 産生量は無添加区に比べおよそ 2 倍に増加し、年齢に関わらず hCG に対する反応性は一定であった (Fig. 3B)。このことから、少なくとも 40 歳未満であれば年齢による P4 産生能および hCG に対する反応性は低下しないことが示された。

以上のことから、40 歳未満の正常な排卵周期を有する症例から採取した hLGCs はコラーゲンコートした培養プレートへ播種後 4 日目までの培養ではホルモン産生能が保持されていることから、黄体機能を研究するための細胞モデルとして使用できる可能性が示された。

第 3 章 ヒト黄体化顆粒層細胞の生存性に及ぼす

hCG および P4 の影響

第 1 節 緒言

hCG はヒト黄体の維持に重要であり、アデノシン三リン酸により誘導される hLGCs のアポトーシスを阻害すること (Park ら、2003)、またアポトーシス抑制タンパク質である Survivin の発現を増加させることにより生存因子として作用することが報告されている (Kumazawa ら、2005)。一方、ラットにおいて、hCG と相同性の高い LH が卵胞内膜細胞の caspases (CASP)s 活性を刺激しアポトーシスを誘導するとの報告があり (Yacobi ら、2004)、hCG が黄体に対し生存因子としてのみ作用するかは不明である。

また、hCG は黄体細胞の P4 分泌を刺激する作用を有している (Devoto ら、2008)。ウシ (Okuda ら、2004)、ラット (Peluso ら、2006) およびヒト (Engmann ら、2006) において、P4 が黄体細胞のアポトーシス抑制に作用することが報告されている。これらのことから、hCG の生存因子としての作用は P4 を介している可能性が考えられる。そこで、ヒト黄体維持機構の一端を解明する目的で、hLGCs をヒト黄体のモデルとして、その生存性に及ぼす hCG および P4 の影響を検討した。

第 2 節 材料と方法

1. hLGCs の単離および培養

第 1 章で得られた結果をもとに細胞単離した後、コラーゲンコートした培養プレートへ播種し、3 日間の培養した後、添加実験に用いた。

実験 1. ヒト黄体化顆粒層細胞の P4 分泌に及ぼす hCG の影響

48 穴培養プレートに播種した細胞の培養液を 0.1% BSA、sodium selenite (5 ng/ml)、holo-transferrin (5 µg/ml) を含む DMEM/Ham's F-12 phenol red free と交換し、hCG (0.1, 1, 10, 100 IU/ml) を添加し、さらに 24 時間培養した。培養終了後に上清を回収し、P4 濃度を測定するまで -30°C で保存した。また、上清を回収した培養プレートは DNA 量を測定するまで -30°C で保存した。

実験 2. ヒト黄体化顆粒層細胞の生存性に及ぼす hCG、OP または P4 の影響

96 穴培養プレートに播種した細胞の培養液を 0.1% BSA、sodium selenite、holo-transferrin を含む DMEM/Ham's F-12 phenol red free と交換し、hCG (0.1, 1, 10, 100 IU/ml)、P4 レセプターアンタゴニストである onapristone (OP; Schering AG; #ZK98299; 10, 25, 50, 100 µM) または P4 (Fuji Pharma; 1, 10, 25, 50 µM) を添加し、さらに 24 時間培養した。

実験 3. ヒト黄体化顆粒層細胞の生存性に及ぼす hCG および OP の影響

96 穴培養プレートに播種した細胞の培養液を 0.1% BSA、sodium selenite、holo-transferrin を含む DMEM/Ham's F-12 phenol red free と交換し、hCG (0.1, 1, 10, 100 IU/ml) および OP (25, 50, 100 µM) を単独または組合せて添加し、さらに 24 時間培養した。また細胞の形態的变化を捉えるため、培養後の各添加区の状態を倒立顕微鏡下 (Olympus, IX70, x10) にて撮影した。

実験 4. ヒト黄体化顆粒層細胞の P4 分泌に及ぼす OP の影響

48 穴培養プレートに播種した細胞の培養液を 0.1% BSA、sodium selenite、holo-transferrin を含む DMEM/Ham's F-12 phenol red free と交換し、hCG (100 IU/ml) および OP (100 µM) を単独または組合せて添加し、さらに 24 時間培養

した。培養終了後に上清を回収し、P4 濃度を測定するまで -30°C で保存した。
また、上清を回収した培養プレートは DNA 量を測定するまで -30°C で保存した。

実験 5. hCG および OP の組み合わせ添加により低下したヒト黄体化顆粒層細胞の生存性に及ぼす P4 の影響

96 穴培養プレートに播種した細胞の培養液を 0.1% BSA、sodium selenite、holo-transferrin を含む DMEM/Ham's F-12 phenol red free と交換し、hCG (50 IU/ml) および OP (50 μ M)、あるいは P4 と cortisol のアンタゴニストとして知られる RU486 (Sigma-Aldrich; #M8046; 50 μ M) に加え P4 (50 μ M) を単独または組合せて添加し、さらに 24 時間培養した。

2. 形態学的変化の観察

細胞の形態的变化を捉えるため、培養後の各添加区の状態を倒立顕微鏡下にて撮影した。

3. 統計処理

結果は同一実験区ごとに平均値 $\pm$ 標準誤差で表し、各実験区間の有意差検定は分散分析後、Williams' multiple comparison test、Tukey's multiple comparison test または Student's t-test を用いて行った。

第 3 節 結果

1. hLGCs の P4 分泌に及ぼす hCG の影響

24 時間後の無添加区における P4 分泌量は平均 $11.1 \pm 3.1 \mu\text{M}$ であったが、最小 $6.7 \mu\text{M}$ と最大 $17.5 \mu\text{M}$ であり、個人差が大きかった。hCG 添加により 0.1 IU/ml 以上のいずれの添加濃度においても P4 分泌は増加した ($P < 0.05$; Fig. 4)。

2. hLGCs の生存性に及ぼす hCG、OP または P4 の影響

hCG 100 IU/ml を添加した区において無添加区と比較し生存率が有意に増加した ($P < 0.05$; Fig. 5A)。また、OP $100 \mu\text{M}$ を添加した区において無添加区と比較し生存率が有意に低下した ($P < 0.05$; Fig. 5B)。一方、P4 は添加濃度に関わらず生存性に影響を及ぼさなかった (Fig. 5C)。

3. hLGCs の生存性に及ぼす hCG および OP の組み合わせ添加の影響

hCG および OP の組み合わせ添加により、hLGCs の生存率は著しく低下した ($P < 0.05$; Fig. 6A)。hCG 濃度による差はなかったが、OP 濃度依存的に細胞死が誘導されることが示された。

倒立顕微鏡下の観察では、培養プレートに伸展していた細胞が hCG 添加により収縮した一方、OP 単独添加では細胞の収縮はみられなかった。hCG および OP との組み合わせ添加により変性した細胞が多く認められた (Fig. 6B)。

4. hLGCs の P4 分泌に及ぼす OP の影響

hLGCs における P4 分泌は、hCG を単独または OP と組み合わせて添加した区において無添加区と比較し有意に高値だった ($P < 0.05$; Fig. 7)。また、hCG 単

独添加区と OP と組み合わせて添加した区に差は認められなかった ($P>0.05$; Fig. 7)。

5. hCG および OP との組み合わせ添加により誘起された生存率低下に及ぼす P4 の影響

hCG および OP との組み合わせ添加により低下した生存率は、P4 をさらに添加することにより control 区と同等の生存率となった (Fig. 8A)。また、OP と類似の P4 レセプターアンタゴニストである RU486 を組み合わせて添加することにより生存率が低下する傾向が認められた ($P = 0.083$; Fig. 8B)。また、hCG と RU486 の組み合わせ添加区に P4 を加えることにより hCG と RU486 の組み合わせ添加による生存率の低下が抑制される傾向がみられた (Fig. 8B)。

Figure 4

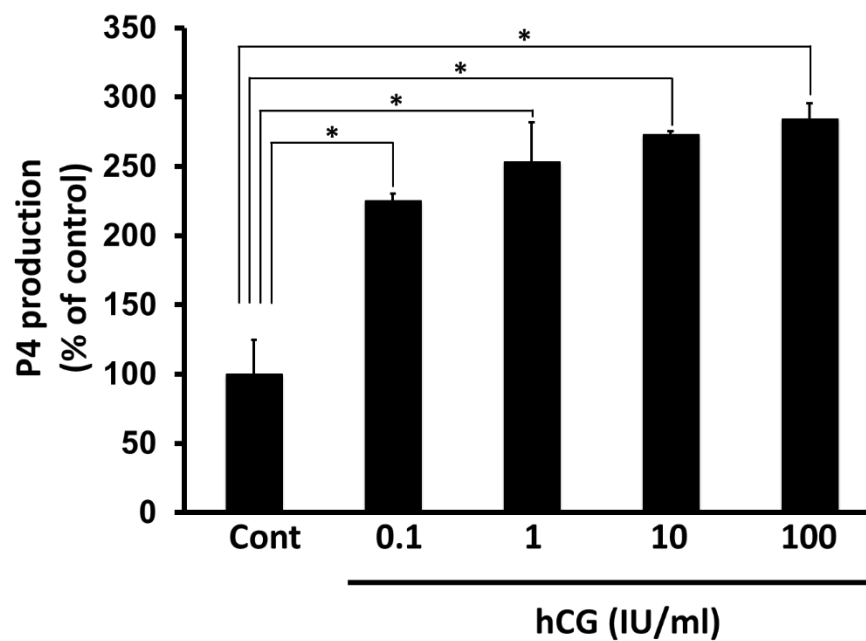


Fig. 4 Effects of hCG on P4 production by hLGCs. Cultured cells were exposed to hCG (0.1, 1, 10, 100 IU) for 24 h. The P4 concentration in control was $11.1 \pm 3.1 \mu\text{M}$ (min = $6.7 \mu\text{M}$, max = $17.5 \mu\text{M}$). Results are presented as mean $\pm$ SEM of four independent experiments, each done in triplicate and expressed as percentage of control set equal to 100. *; $P < 0.05$ versus control by ANOVA followed by Williams' multiple comparison test.

Figure 5

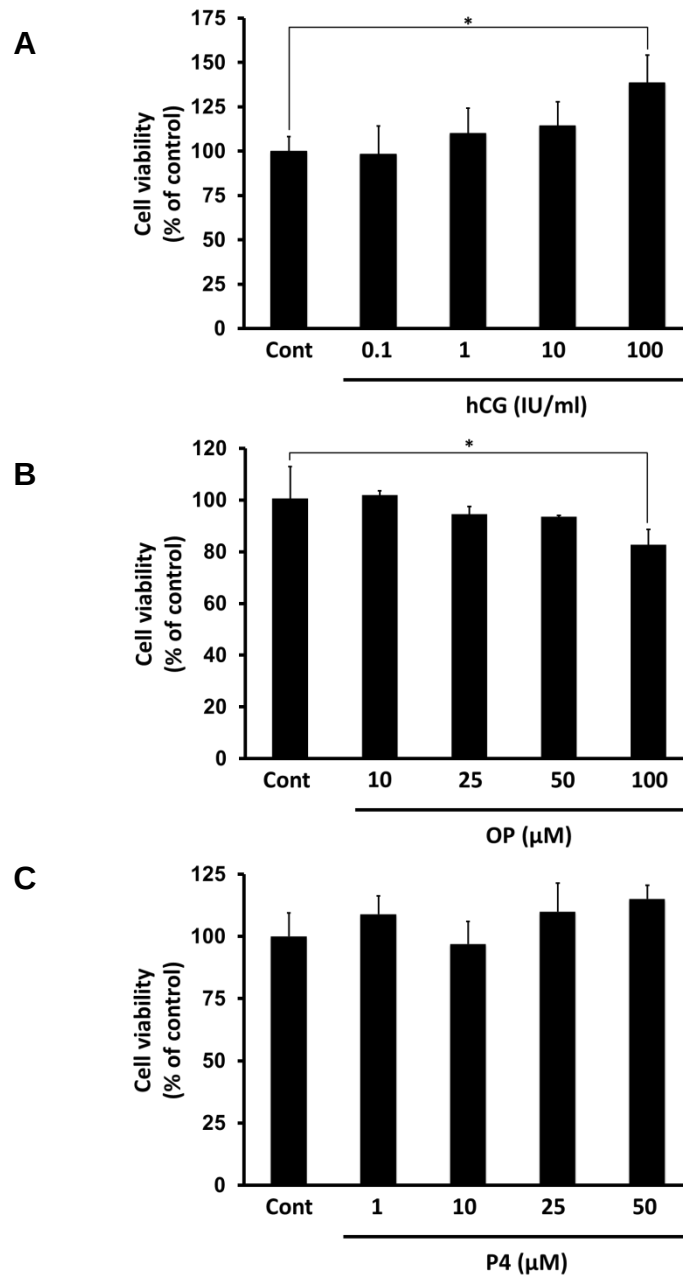


Fig. 5 Effect of hCG, OP, and P4 on cell viability. hLGCs were exposed to hCG (0.1, 1, 10, 100 IU/ml) (A) or to OP (0, 10, 25, 50, 100 μM) (B) or to P4 (1, 10, 25, 50 μM) for 24 h. After 24 h of culture, cell viability was determined at 450 nm in a WST-1 assay. Each value represents the mean $\pm$ SEM of four independent experiments, each done in triplicate. Results are expressed as percentage of control set equal to 100. * $P < 0.05$ versus control by ANOVA followed by Williams' multiple comparison test.

Figure 6

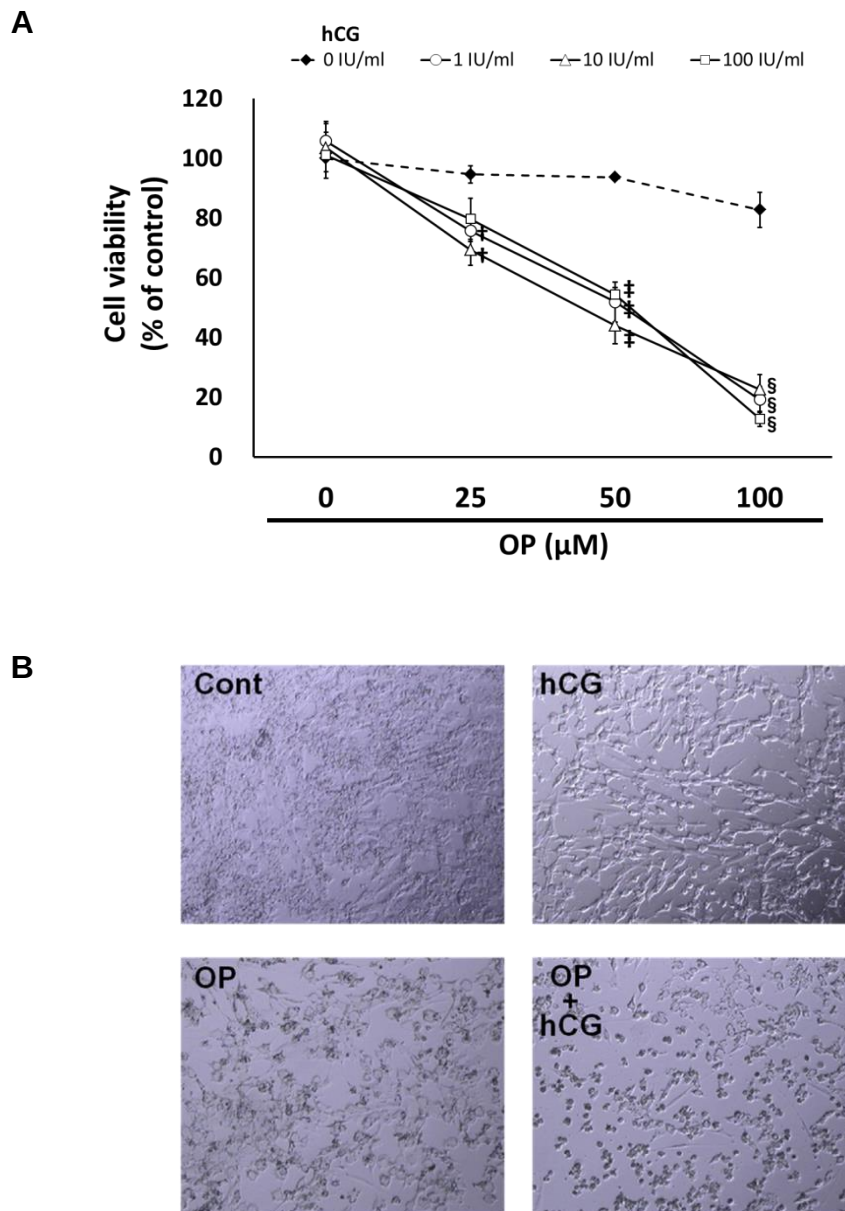


Fig. 6 Combined effects of hCG and OP on cell viability and morphological change. hLGCs were exposed to hCG (1, 10, 100 IU/ml) and/or OP (25, 50, 100 μM) for 24 h. (A) Cell viability was determined at 450 nm in a WST-1 assay. (B) Morphological change was observed under microscope (Olympus IX70) equipped with relief contrast objectives (10X). Cont) untreated (control), hCG) treatment with hCG (100 IU/ml), OP) treatment with OP (100 μM) and OP+hCG) treatment with hCG in combination with OP. Each value represents the mean $\pm$ SEM of three independent experiments, each done in triplicate. †; $P < 0.05$ vs. OP alone (25 μM), and ‡; $P < 0.05$ vs. OP alone (50 μM), and §; $P < 0.05$ vs. OP alone (100 μM) (Student's t-test).

Figure 7

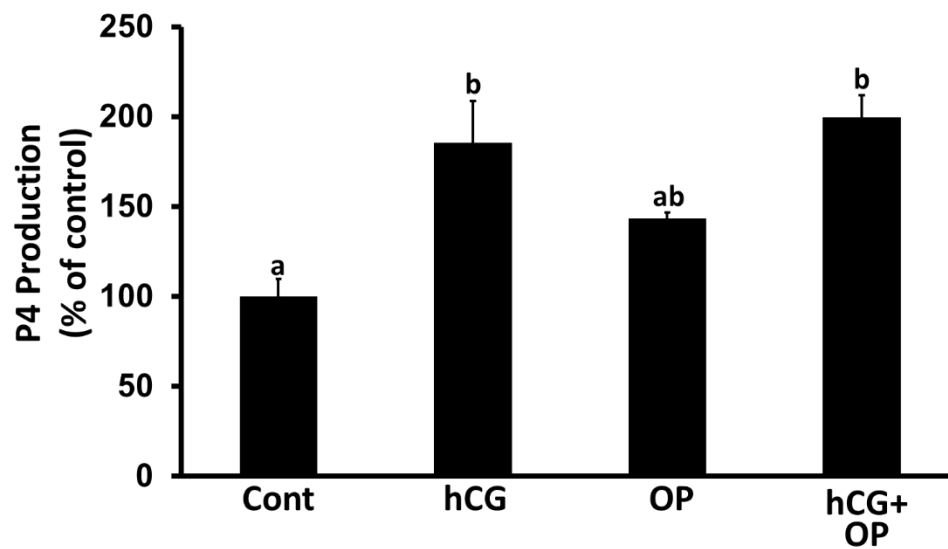


Fig. 7 Effects of hCG and/or OP on P4 production by hLGCs. Cultured cells were exposed to hCG (100 IU) and/or OP (100 μ M) for 24 h. Each value represents the mean $\pm$ SEM of four independent experiments, each done in triplicate. Results are expressed as percentage of control set equal to 100. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$), as determined by ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

Figure 8

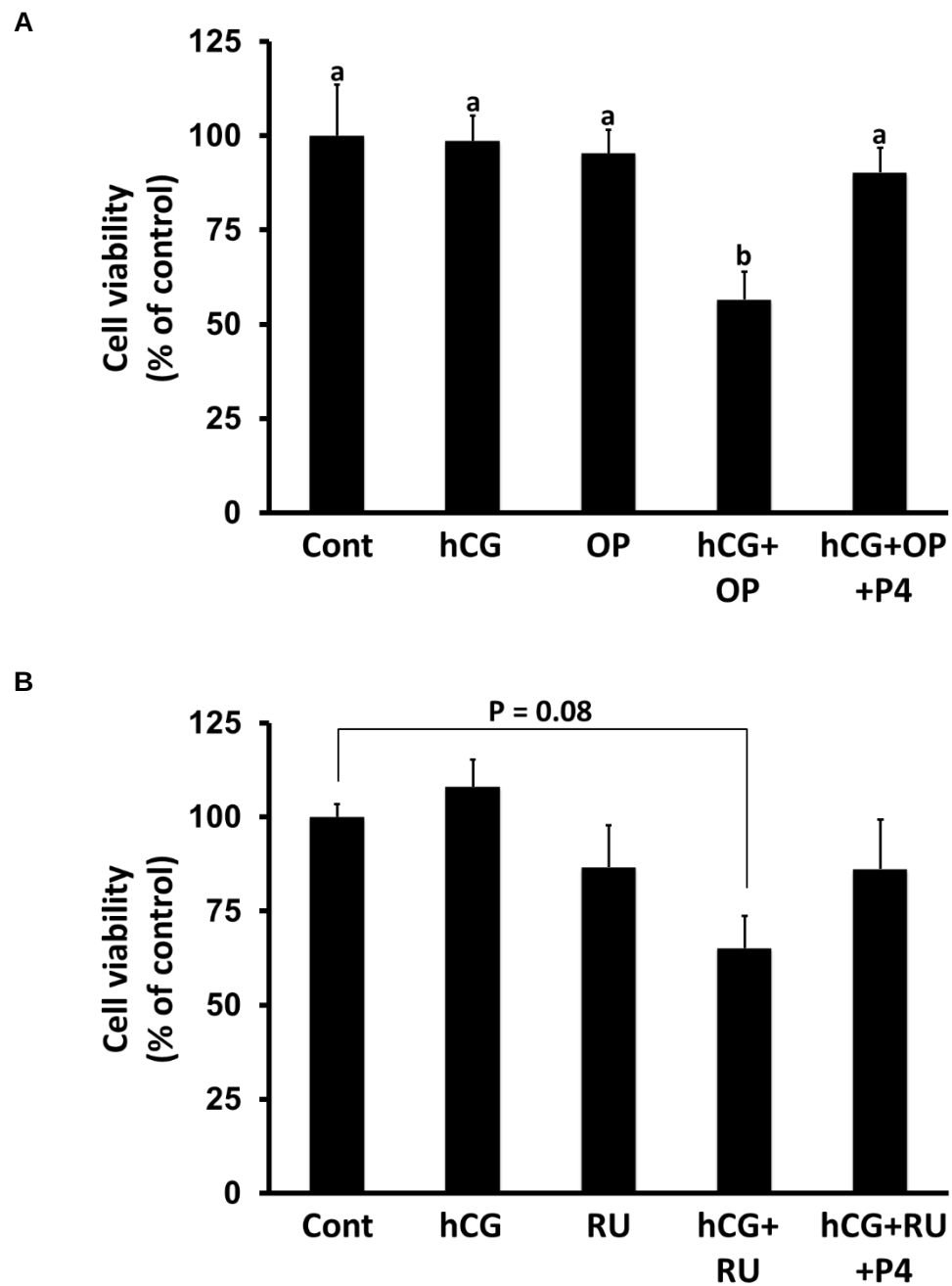


Fig. 8 Effect of P4 on the reduction in cell viability caused by hCG plus P4 receptor antagonists. Cultured cells were exposed to hCG (50 IU/ml), P4 (50 μ M), OP (50 μ M) (A) or RU486 (50 μ M) (B) each or together for 24 h. Cell viability was determined at 450 nm in a WST-1 assay. Each value represents the mean $\pm$ SEM of three or more independent experiments, each done in triplicate. Results are expressed as percentage of control set equal to 100. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$), as determined by ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

第 4 節 考察

黄体のモデルとして LH 感作を受けた hLGCs を用い、その細胞生存性に及ぼす hCG、P4 および特異的な P4 レセプターアンタゴニストである OP の影響を調べた結果、hCG は細胞生存率を増加させたが、P4 は影響せず、OP は減少させた ($P < 0.05$; Fig. 5)。OP 添加により細胞生存率が低下したことから、P4 は hLGCs の生存性維持に作用していることが示されたが、P4 を直接添加しても生存性の増加は認められなかった。hLGCs は P4 産生細胞であり無添加区の P4 量は $11.1 \pm 3.1 \mu\text{M}$ であったが、生体の黄体からの P4 分泌量は $0.21 \pm 0.05 \mu\text{M}$ との報告 (Khan-Dawood ら、1989) と比較すると培養液中の P4 濃度は非常に高濃度であった。このことから生存に十分量の P4 が培養液中にすでに存在したため、P4 添加による細胞生存性の増強効果が示されなかったと考えられる。hLGCs の生存性維持に hCG および P4 が重要であることが示唆されたため、次に、hCG の P4 を介さない作用が及ぼす細胞生存性への影響を検討した。hCG と OP を共添加すると細胞死が強く誘導され、OP 添加濃度に依存して誘導されることが示された (Fig. 6A)。また、顕微鏡下での観察でも hCG および OP との共添加により委縮し変性した細胞が多く認められた (Fig. 6B)。hLGCs において hCG および P4 レセプターアンタゴニストとの組み合わせ添加により細胞死が誘導されることがこれまでも報告されているが (Engmann ら、2006; Myers ら、2007)、本研究により P4 作用が阻害されることにより誘導される細胞死には hCG の存在が重要であり、hCG が細胞死誘導に関与する可能性が示された。

OP と類似の P4 レセプターアンタゴニストである RU486 は P4 合成を阻害するという報告 (Dimattina ら、1986) がある一方、妊娠ラットの P4 分泌を刺激するとの報告もある (Telleria と Deis、1994)。そこで OP が hLGCs の P4 分泌能に及ぼす影響を調べた結果、OP 単独では無添加区と同等の P4 産生量であ

り、hCG 単独および hCG + OP 添加により有意に増加した (Fig. 7)。このことは培養 hLGCs において OP は P4 合成に影響を与えず、また hCG の P4 分泌刺激は OP による作用を受けないことを示している。これらのことから、本研究において誘導された細胞死の原因が P4 分泌量の低下でないことが確認された。

P4 レセプターアンタゴニストは P4 レセプターへの結合阻害としての作用だけでなく他の作用を有することが報告されている (Perusquía ら、2009; Perusquía ら、2011)。そのため、今回誘導された細胞死が P4 作用を阻害した結果であることを確認する目的で、hCG + OP に P4 を加え競合させることにより OP 作用を弱めたところ、生存率の低下が抑制された (Fig. 8A)。つまり、誘導された細胞死は P4 作用の阻害が原因であることが示された。さらに、OP とタイプの異なるアンタゴニストである RU486 を用い同様の実験を行ったところ、hCG + RU486 添加により生存性が低下する傾向がみられ、さらに P4 添加により生存率低下が抑えられる傾向がみられた (Fig. 8B)。OP はタイプ I に分類される P4 receptor modulator であり、より純粋な P4 レセプターアンタゴニストとされている (Klein-Hitpass ら、1991; Elger ら、2000)。RU486 はタイプ II に分類され、一部アゴニストの作用を持つとされており、このタイプの違いにより OP がより強い細胞死を引き起こしたのかもしれない。これらのことから hCG 存在下に P4 作用が抑制されると hCG により細胞死が誘導されることが示唆された。

hCG が細胞死誘導因子として作用する一つの可能性として reactive oxygen species (ROS) を介した経路が考えられる。ROS は黄体退行を促進させることが知られ (Vega ら、1995; Tanaka ら、2000)、退行期のラット黄体では酸化ストレスの指標である過酸化脂質の増加がみられる (Shimamura ら、1995)。退行期の黄体における ROS の増加には、黄体細胞内の ROS を特異的に消去する酵素である

superoxide dismutase (SOD) の低下、マクロファージの増加、PGF2 α の増加、卵巣血流の低下が関与している (Shimamura ら, 1995; Sugino ら, 2000)。また P4 生成に関係する酵素の一つである P450scc が NADPH より放出された電子を受け取り ROS を発生させることが報告された (Hanukoglu ら, 1993; Rapoport ら, 1995)。さらにラットにおいて、LH 刺激により P450scc が活性化され ROS が増加することが示されたことから (Yacobi ら, 2007)、LH と構造および作用が類似の hCG でも同様の作用を示す可能性が考えられる。一方、ウサギ黄体において hCG は SOD 発現を増加させること (Dharmarajan ら, 1999)、またヒト子宮内膜間質細胞において P4 が Mn-SOD 発現を増加させるという報告がある (Matsuoka ら, 2010)。LH/hCG は ROS およびその消去酵素である SOD 両方を増加させ、また LH/hCG により刺激された P4 は SOD 発現を増加させることから、これらのバランスにより黄体の維持または退行のメカニズムが調節されているのかもしれない。

以上の結果から、in vitro の hLGCs において、hCG は P4 を介して hLGCs の生存を維持する一方、P4 を介さず hLGCs の細胞死を誘導することで黄体機能を制御する可能性が示された。

第 4 章 ヒト黄体化顆粒層細胞における細胞死に関する検討

第 1 節 緒言

第 3 章より、hLGCs において hCG 存在時に P4 作用が阻害されると著しい細胞死が誘導されることが示された。細胞死は主にアポトーシス、オートファジーおよびネクロプトーシスに分類される (Kroemer ら、2009)。アポトーシスとは 1972 年に病理学者であった Kerr らにより提唱され、核・細胞質の濃縮・断片化、周辺細胞による迅速な取り込み、散発的・孤立的な発生などの形態学的特徴を示し、遺伝子レベルで制御される細胞死とされている。アポトーシスの最終実行因子である caspase-3 (CASP3) は正常細胞中の proenzyme として存在し、自己のタンパク質分解によって活性化されるか、活性化 CASP8 といった他の caspase により切断され活性化される。この活性化によりさまざまなタンパク質が分解され、不可逆的なアポトーシスが引き起こされることが知られている (Kaufmann ら、1993; Earnshaw ら、1999)。一方、オートファジーは細胞質構成成分を非選択的に分解する経路であり (Dunn、1994)、栄養飢餓などの細胞内ストレスを受けると小胞体様の二重膜 (隔離膜) であるオートファゴソームが細胞質の一部を取り囲む (Baba ら、1995)。このオートファゴソームの外膜には microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) が局在し、オートファゴソームとリソソームが融合しリソソーム由来の加水分解酵素により内容物が分解され、飢餓に応じたアミノ酸の供給だけでなく異常構造タンパク質のクリアランス機構を担っていると考えられている (Mizushima ら、2008)。

霊長類の構造的黄体退行にはアポトーシスが関与しているという報告 (Shikone ら、1996) がある一方、電子顕微鏡を用いた研究では霊長類の構造的黄体退行ではオートファジーが主なメカニズムであるとの指摘もある (Fraser ら、1999)。hCG 存在時に P4 結合を阻害することにより引き起こされた細胞死

のメカニズムを明らかにするため、アポトーシスならびにオートファジーの指標である CASP3 および LC3 発現量の変化を検討した。

第 2 節 材料と方法

1. hLGCs の単離および培養

第 1 章で得られた結果をもとに細胞単離した。単離後はコラーゲンコートした培養プレートへ播種し、3 日間の培養後に以下の実験に用いた。

実験 1. hLGCs の CASP3 activity に及ぼす hCG および OP の影響

96 穴培養プレートに播種した細胞の培養液を 0.1% BSA、sodium selenite、holo-transferrin を含む DMEM/Ham's F-12 phenol red free と交換し、hCG (100 IU/ml) および OP (100 μ M) を単独または組合せて添加し、さらに 24 時間培養し CASP3 activity を測定した。

実験 2. hLGCs の cleaved CASP3 タンパク発現に及ぼす hCG および OP の影響

Cell culture flask に播種した細胞の培養液を 0.1% BSA、sodium selenite、holo-transferrin を含む DMEM/Ham's F-12 phenol red free と交換し、hCG (100 IU/ml) および OP (100 μ M) を単独または組合せて添加し、さらに 24 時間培養した。0.25% trypsin により hLGCs を回収し、遠心分離 (180 x g, 4°C, 10 min) した。上清を廃棄した後、細胞数が 10^6 - 10^7 個あたり protease inhibitor (Complete Mini; Roche; #1836153) を含む CellLyticTM-M (Sigma-Aldrich; #C2978) を 125 μ l 加え、室温で 15 分間インキュベートし、細胞を溶解した。培養終了後、遠心 (15000 x g, 室温, 15 min) して得られた上清を回収し、タンパク質発現の測定まで -30°C で保存した。

実験 3. hLGCs の LC3 mRNA 発現に及ぼす hCG および OP の影響

24 穴培養プレートに播種した細胞の培養液を 0.1% BSA、sodium selenite、holo-transferrin を含む DMEM/Ham's F-12 phenol red free と交換し、hCG (100 IU/ml) および OP (100 μ M) を単独または組合せて添加し、さらに 24 時間培養した。培養終了後に上清を回収し、250 μ l の TRIZOL Reagent (Invitrogen; #15596-026) を加えて 4 well 毎に細胞溶解液を回収し、1 ml/tube となるように調整した後、total RNA の抽出まで -80°C で保存した。

2. CASP3 activity

CASP3 活性は SensoLyte[®] Homogeneous AMC Caspase-3/7 Assay kit (AnaSpec; #71118) を用い、取扱説明書に従い測定した。細胞培養を 96 穴プレートで行った後、acetyl-DEVD-amido-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) を含む基質反応液 50 μ l を加えた。37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間培養後に、Ultramark microplate reader (Bio-Rad Laboratories) を用い蛍光強度 (Ex/Em=354/442 nm) を測定した。

3. Cleaved CASP3 protein analysis

hLGCs における Cleaved CASP3 タンパク質発現を Western blotting analysis により測定した。培養細胞を lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% glycerol [Sigma-Aldrich; #G7757] and Complete protease inhibitor cocktail [Roche Diagnostics], pH 7.4) 200 μ l で溶解した。溶解されたタンパク質濃度は BSA を標準とする Osnes ら (1993) の方法により測定した。タンパク質は SDS gel loading buffer (50 mM Tris-HCl, 2% SDS [Nacalai Tesque; #31607-94], 13% glycerol and 1% β -mercaptoethanol [Wako Pure Chemical Industries; #137-06862], pH 6.8) に溶解させ、95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分間加熱した。サンプル (30 μ g タンパク質) を 10% SDS-PAGE gel へアプライし 200V、1 時間電気泳動を行った。

分離されたタンパク質を transfer buffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 20%

methanol, pH 8.3) 内で 250 mA、3 時間電気泳動し 0.2- μ m nitrocellulose membrane (Invitrogen; #LC2000) へブロットティングした。メンブランを TBS-T (0.1% Tween 20 in TBS [25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, pH 7.5]) で洗浄し、blocking buffer (PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal; Toyobo; # NKB-101) 中で室温、3 時間培養した。ブロッキング後、メンブランは cleaved CASP3 タンパク質 (17, 19 kDa) および β -actin (internal standard; 45 kDa) をそれぞれ測定するために 2 つに切り離した。メンブランをそれぞれ cleaved CASP3 (Cell Signaling Technology; #9661; diluted 1:1,000 in Can Get Signal) あるいは β -actin (Sigma-Aldrich; #A2228; diluted 1:4,000 in TBS-T) の一次抗体に浸漬し一晩室温で培養した。次に、メンブランを TBS-T で 10 分間 3 回洗浄し、cleaved CASP3 (anti-rabbit HRP-linked whole antibody produced in goat [diluted 1:10,000 in TBS-T]; Assay Designs) あるいは β -actin (anti-mouse HRP-linked whole antibody produced in sheep [diluted 1:40 000 in TBS-T]; Amersham Biosciences; #NA931) をそれぞれ二次抗体として用い 1.5 時間培養した。TBS により室温で 10 分間、3 回洗浄し、ECL Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences; #RPN2109) を用いタンパク質発現を解析した。

4. Total RNA の抽出

hLGCs を単離培養後、添加実験を行った後に細胞溶解液を回収し以下の処理を行った。

タンパク質を除去する目的で、上清または黄体細胞融解液に対し 1/5 量のクロロホルムを加え、十分に攪拌し (15-30 秒間)、室温で 2-3 分間静置した後、遠心分離した (12,000 x g, 4°C, 10 min)。遠心分離終了後、水層、タンパク質を含む中間層およびクロロホルム層の 3 層に分離しているのを確認した後、最上層の水層のみを回収した。次に RNA をアルコールと塩で凝集させて沈殿を得る

ために、最終濃度が 0.1 M 以上になるように 3 M Na-acetate を加えた後に 500 μ l の 2-プロパノールを加えて十分に攪拌し、室温で 10 分放置した後、遠心分離 (12,000 x g, 4°C, 10 min)、上清を除去した。さらに、得られた沈殿物から塩を取り除くため、75% エタノールを 1 ml 加え軽く攪拌した後、遠心分離 (7,500 x g, 4°C, 5 min) し、上清のエタノールを廃棄した。得られた RNA の沈渣に 500 μ l の Tris-EDTA buffer を加え、RNA を溶解した後、溶液中の RNA 量を分光光度計 (Gene Quant pro, 吸光度 260 nm) により測定し、一本鎖 cDNA の作成まで -80°C で保存した。

5. 一本鎖 cDNA の作成

3. で作成した RNA 溶液を Prime Script™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa; #6110A) を用いて一本鎖 cDNA を合成した。cDNA 溶液は、PCR まで -30°C で保存した。

6. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT - PCR)

4. で作成した cDNA 溶液 2 μ l を DEPC 水を用いて 25 倍に希釈し、PCR の鋳型とした。スタンダードには 4. で作成した cDNA 溶液 25 μ l に DEPC 水を加え 2 倍希釈した溶液を Std 1000 とし、さらに Std 1000 を順々に希釈して 10 段階を作成した (Std 1000, 500, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1)。25 倍希釈した cDNA 溶液またはスタンダード cDNA 溶液 (Std 500-1) 2 μ l を SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa; #RR081A) に含まれる Table 1 溶液と混合して PCR 反応液 (20 μ l) を作成した。PCR 反応は、95°C, 3 min その後 94°C, 15 sec (熱変性)、55°C, 20 sec (アニーリング)、72°C, 15 sec (伸長反応) を 1 サイクルとして計 45 サイクルの処理を行った。ACTB はハウスキーピング遺伝子であり、内部標準

として *LC3* mRNA 発現量の増減を評価するための指標として用いた。プライマーは以下に示す通りである。

LC3 (GenBank no.; NM_032514, 140 bp)

forward: 5'-CAGAGAGCTCCTGGTTCCTG-3'

reverse: 5'-GAGGGACAACCCTAACACGA-3'

ACTB (GenBank no.; AY582799.1, 107 bp)

forward: 5'-ATGTGGCCGAGGACTTTGATT-3'

reverse: 5'-AGTGGGGTGGCTTTTAGGATG-3'

7. 統計処理

結果は同一実験区ごとに平均値 ± 標準誤差で表し、各実験区間の有意差検定は分散分析後、Williams' multiple comparison test、Tukey's multiple comparison test または Student's t-test を用いて行った。

第 3 節 結果

1. hLGCs の CASP3 activity に及ぼす hCG および OP の影響

control 区の CASP3 activity を 100%とすると、hCG 区では 68% であった。hCG+OP 区では control 区および hCG 単独区と比較し、有意に高い CASP3 activity を示した ($P<0.05$; Fig. 9)。

2. hLGCs の CASP3 タンパク質発現に及ぼす hCG および OP の影響

control 区および hCG 単独区では Cleaved CASP3 タンパク質発現はわずかであったが、OP 単独区では発現が確認され、さらに hCG+OP 区において強い発現が認められた (Fig. 10)。

3. hLGCs の LC3 mRNA 発現 に及ぼす hCG および OP の影響

各添加区における LC3 mRNA 発現に有意な差は認められなかった (Fig. 11)。

Figure 9

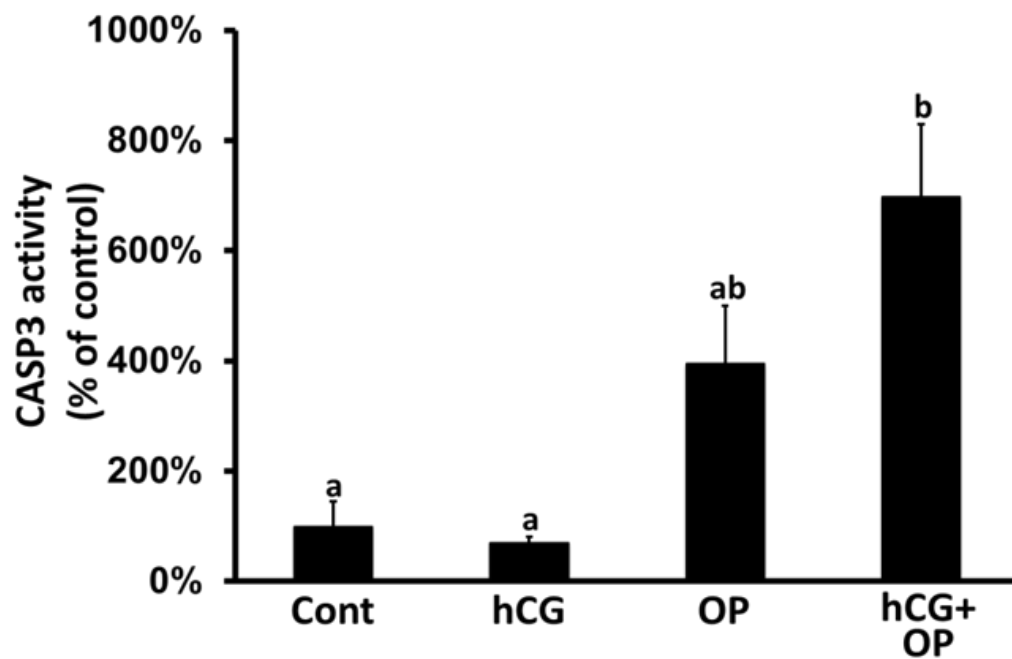


Fig. 9 Effects of hCG and/or OP on CASP3 activity in cultured hLGCs. Cultured cells were exposed to hCG (100 IU) and/or OP (100 μ M) for 24 h. CASP3 activity was measured using the CASP3-specific substrate DEVD-AMC. Each value represents the mean $\pm$ SEM of three independent experiments, each done in triplicate. Results are expressed as the percentage of the control, which was set as 100. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) as determined by ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

Figure 10

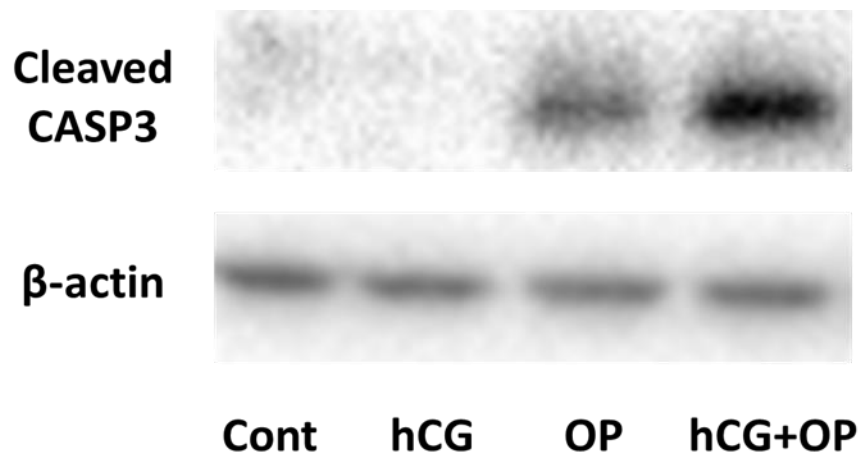


Fig. 10 Effects of hCG and/or OP on CASP3 expression in cultured hLGCs. Cultured cells were exposed to hCG (100 IU) and/or OP (100 μ M) for 24 h. Protein expression of cleaved CASP3 was determined by western blot analysis of cleaved CASP3 (17 and 19 kDa) and β -actin (45 kDa). Representative examples for cleaved CASP3 and β -actin are shown (n=3).

Figure 11

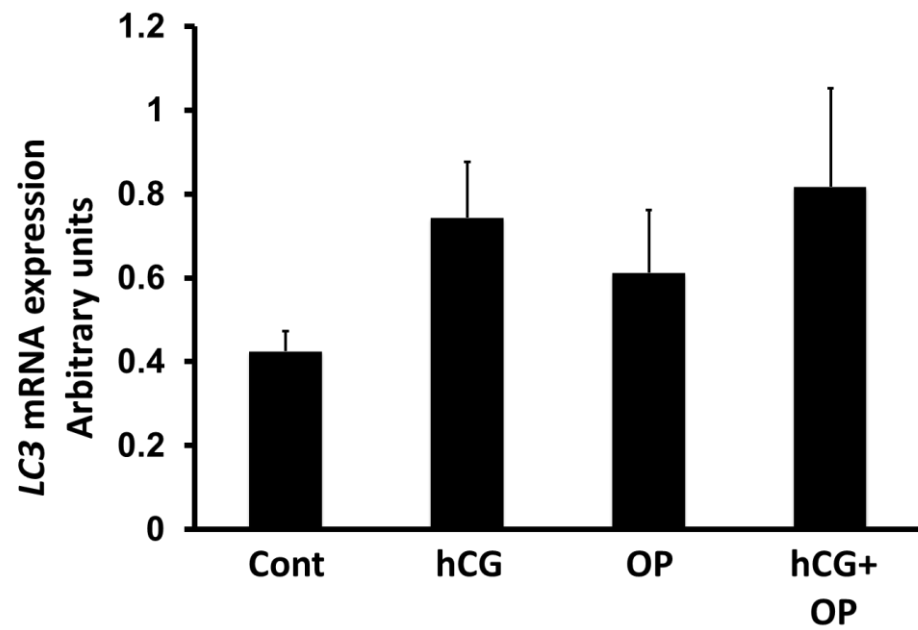


Fig. 11 Effects of hCG and/or OP on *LC3* mRNA expression in cultured hLGCs. Cultured cells were exposed to hCG (100 IU) and/or OP (100 μ M) for 24 h. Data are the mean $\pm$ SEM of three independent experiments and are expressed as the relative levels to *ACTB* mRNA levels. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) as determined by ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

第 4 節 考察

第 3 章により hCG と OP の組み合わせ添加により強い細胞死が誘導されたが、この組み合わせ添加区の CASP3 活性は有意に高く (Fig. 9)、さらに cleaved CASP3 タンパク質発現も高かった (Fig. 10)。この結果は Engmann ら (2006) による hCG と RU486 との組み合わせ添加によりアポトーシス陽性細胞が増加したとの報告と一致する。つまり、hCG 存在下で P4 作用が阻害されるとアポトーシスが誘導されることが示唆された。

オートファジーとは生理的な細胞死の一機序であり、細胞質構成成分を非選択的に分解する経路である (Dunn、1994)。黄体退行は自然に組織が消滅することから、アポトーシス以外にオートファジーも関与している可能性が考えられ、hCG および OP の単独または組み合わせ添加による LC3 mRNA 発現量を比較したが、有意な差は認められなかった (Fig. 11)。オートファジーの指標としてオートファゴソームの膜上に存在する LC3 mRNA 発現を評価したが、mRNA 発現だけではオートファジーの関与を完全に否定することはできず、LC3 タンパク質発現ならびに電子顕微鏡下による細胞の形態的な観察を含め追加検討が必要であると考ええる。

以上のことから、hCG 存在時に P4 作用が阻害されると顕著な細胞死が誘導され、その細胞死はアポトーシスであることが示された。流産を繰り返す不育症の原因の一つに黄体機能不全があげられ、その割合は 17% であるとの報告がある (Stephenson ら、1996)。妊娠初期になんらかの原因で P4 産生の低下あるいは P4 作用が減弱すると黄体の構造的退行が誘起され、黄体機能不全により流産が引き起こされるのかもしれない。

第5章 総合考察

本研究では、ヒト黄体機能調節メカニズムの一端を解明する目的で、ヒト黄体のモデルとして hLGCs を用い、その細胞生存性に及ぼす hCG の影響を検討した。

まず hLGCs の培養条件の確立を目的とし、培養プレートに施すコラーゲンコートの有無、至適培養日数および採取女性の年齢が hLGCs のホルモン分泌能に及ぼす影響を検討した。コラーゲンコートにより hLGCs の接着率は増加し、培養 4 日目までは P4 および E2 分泌量が保たれ、40 歳未満の女性年齢による hLGCs の P4 産生量の低下はみられなかった。これらのことから、40 歳未満の正常な排卵周期を有する症例から採取した hLGCs はコラーゲンコートした培養プレートに播種後 4 日目までの培養ではホルモン分泌能が保持されていることが示され、以降の実験に黄体機能を研究するための細胞モデルとして用いた。

培養 hLGCs を用い、hCG および P4 による細胞生存性への影響を検討したところ、hCG 添加 (100 IU/ml) により有意に高い生存率であった。P4 (1, 10, 25, 50 μ M) は生存性に影響を及ぼさなかったが、P4 レセプターアンタゴニストである OP (100 μ M) により hLGCs の生存率が低下した。無添加区の培養液中の P4 濃度は $11.1 \pm 3.1 \mu$ M と生体内と比較し非常に高濃度であったことから、hLGCs は生存に必要な量の P4 を自身で分泌し細胞内に取り込むことで細胞の生存性を維持する可能性が示された。さらに、hLGCs に hCG (1, 10, 100 IU/ml) および OP (25, 50, 100 μ M) を共添加し 24 時間培養後の細胞生存率を測定した。hCG はいずれの濃度においても OP 100 μ M と組み合わせることで hLGCs の生存率を著しく低下させた ($P < 0.05$)。これらのことから、hCG 存在下で P4 作用が阻害されると急激な細胞死が誘導されることが示された。

霊長類の黄体退行にはアポトーシスが関与しているという報告 (Shikone ら、1996) やオートファジーが主なメカニズムであるとの指摘もある (Fraser ら、1999)。そこで、hCG 存在時に P4 結合が阻害されることで誘導される細胞死のメカニズムを明らかにするため、それぞれアポトーシスおよびオートファジーの指標である CASP3 および LC3 発現量の変化を検討した。その結果、LC3 mRNA 発現に差は認められなかったが、CASP3 活性は hCG と OP との共添加により有意に増加した ($P<0.05$)。また CASP3 タンパク質発現も hCG+OP 添加区において増加したことから、誘導された細胞死はアポトーシスであることが示された。hCG が細胞死誘導因子として作用する一つの可能性として活性酸素種 (ROS) を介した経路が考えられる。hCG と相同性の高い LH は ROS を増加させることが報告されており (Dharmarajan ら、1999)、hCG により刺激された P4 は SOD 発現を増加させることが報告されている (Matsuoka ら、2010)。hCG と hCG により刺激される P4 は ROS および SOD 産生のバランスを取り黄体を維持しているが、何らかの要因で P4 分泌が十分に刺激されない場合、hCG により発現が刺激される ROS の消去酵素である SOD が十分に発現せず、ROS の作用により黄体細胞のアポトーシス、すなわち構造的退行が誘起されるのかもしれない。

以上のことから、hCG は P4 を介し黄体の生存性を維持していることが示唆された。また、hCG 存在下で P4 作用が阻害されると強力なアポトーシスが誘導されたことは、妊娠初期に黄体が黄体機能不全に陥った場合、構造的黄体退行が誘導され流産が引き起こされる可能性を示している。これは、妊娠継続困難時には速やかに妊娠を終了させ、次の妊娠に備えるという生殖戦略の一つと考えられる。すなわち、hCG は P4 を介して黄体の生存を維持する一方、アポトーシスを誘導することで黄体機能を制御する可能性が示された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始適切なご指導、ご鞭撻を賜りました恩師岡山大学教授 奥田潔博士に深甚の謝辞を表します。

また、研究の基礎から指導していただいた法上拓生 博士に心より感謝いたします。さらに、研究活動への理解とサンプリングへ協力していただいた岡山二人クリニック院長 林伸旨医師はじめスタッフの皆様へ感謝いたします。

当研究室におきまして、日々の実験の指導をしていただいた諸先輩方ならびに実験に協力してくれた諸氏、またいつも笑顔で見守ってくださった瀬戸川恵子氏に改めて厚くお礼申し上げます。

試薬および緩衝液一覧

Table 1. Buffers for EIA

Coating buffer, pH 9.6

0.01 M $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	4.29 g
0.03 M NaHCO_3	2.93 g
Distilled water	1000 ml
Adjust pH to 9.6	

Assay buffer, pH 7.2

0.04 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.12 g
0.15 M NaCl	8.5 g
Distilled water	1000 ml
Adjust pH to 7.2	

使用時に 0.1% となるように BSA を添加する。

0.05% Tween 80 水溶液

Tween 80	0.5 g
Distilled water	1000 ml

Substrate buffer

<Buffer A> pH 5.0

0.01 M Urea hydrogen peroxide	0.25 g
0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.5 g
0.05 M Citric acid $\cdot \text{H}_2\text{O}$	2.575 g
Distilled water	250 ml

<Buffer B> pH 2.4

0.002 M Tetramethylbenzidin (TMB)	0.125 g
4% Dimethyl sulfoxide (DMSO)	10 ml
0.05 M Citric acid $\cdot \text{H}_2\text{O}$	2.575 g
Distilled water	240 ml

使用時に Buffer A、Buffer B を 1:1 で混合する (要遮光)。

Table 2. Buffers for DNA assay

DNA assay buffer		
0.05 M	NaH ₂ PO ₄	6.0 g
0.14 M	NaCl	8.0 g
2 mM	EDTA	0.7445 g
Distilled water		1000 ml
Bis-benzimide stock solution		
	Bis-benzimide	2 g
Distilled water		10 ml

要遮光。

Table 3. Buffer for RT-PCR

Reaction mixture for PCR

10 x Ex Taq TM buffer	2 mM
dNTP Mixture	0.2 mM
TaKaRa Ex Taq TM	0.125 µl
Forward primer	0.2 µM
Reverse primer	0.2 µM
cDNA sample	1 µl
Filled up to 25 µl with distilled water	

0.1% Brom phenol blue

7 M Urea	21.02 g
50% Sucrose	25.00 g
10 mM EDTA	0.186 g
Brom Phenol Blue	0.05 g
Filled up to 50 ml with distilled water	

3% agarose gel

Agarose	1.50 g
TAE buffer	50 ml

Ethidium bromide

Ethidium bromide	100 mg
TAE buffer	10 ml

Tris-acetate-EDTA bffer (TAE buffer)

Trizoma base	4.84 g
Acetic Anhydride	1.142 ml
0.5 M EDTA	2 ml
Distilled water	1000 l

Reagents and hormones

Reagents and hormones	Maker	Cat. No.
Acetic anhydride	ISHIZU SEIYAKU LTD,	030-5053
Aminoglutethimide	Sigma Chemical Co.	A9657
Amphotericin B	Sigma-Aldrich, Inc.	A9528
Agarose gel	TAKARA Co.	F0070
Ascorbic Acid	Wako Chemical Co.	013-12061
Brom Phenol Blue	Sigma Chemical Co.	B7051
BS-1	Sigma-Aldrich	L-2380
BSA (Fraction V)	Roche Diagnostics GmbH	735078
BSA	Sigma Chemical Co.	A7888
Bis-benzimide	Sigma Chemical Co.	B2883b
Calf Serum	Sigma Chemical Co.	C6278
CellLytic™-M	Sigma-Aldrich	C2978
Chloroform	Nacalai Tesque	084-26SP
Collagenase (Type I)	Sigma Chemical Co.	C0130
Complete Mini	Roche Diagnostics GmbH	1836153
Dullbecco's PBS	日本製薬	05193
DEPC water	Nacalai Tesque	364-15SP
DMEM/Ham's F-12		
Dynabeads M-450	Dynal ASA	140.04
Without phenol red	Sigma Chemical Co.	D2906
DMSO	Sigma Chemical Co.	D5879
DNase I (Type IV)	Sigma Chemical Co.	D5025
100 bp DNA Ladder	TOYOBO Co.	DNA-030
EDTA	Sigma Chemical Co.	E4378
EGTA	Sigma Chemical Co.	E4378
Ethanol	Nacalai Tesque	147-41SP
Ethidium bromide	Sigma Chemical Co.	E8751
Gentamicin	Invitrogen	15750-060
Glycerol	Sigma-Aldrich, Inc.	G5516
Griess reagent	Sigma-Aldrich, Inc.	G4410
H ₃ BO ₃	Nacalai Tesque	05215-05
hCG	Fuji Pharma	
HEPES	Sigma Chemical Co.	H9136

Insulin	Sigma Chemical Co.	I4011
iQ SYBR Green supermix	BIO-RAD	170-8880
Isolate	Irvine Science	99275
Onapristone	Schering AG	ZK98299;
Penicillin	Banyu Seiyaku Co.	
Prime Script™	TaKaRa	6110A
P4-HRP	Sigma Chemical Co.	P3659
2-Propanol	Nacalai Tesque	290-33SP
Sodium selenate	Sigma Chemical Co.	S5261
Streptomycin	Meiji Seika Co.	
SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR		
	Invitrogen	11904-018
TaKaRa Taq™	TaKaRa Co.	R001A
TMB	Boehringer Mannheim GmbH	784974
Holo-transferrin	Sigma Chemical Co.	T3400
Trizma® Base	Sigma Chemical Co.	T1378
TRIZOL Reagent	Invitrogen	15596-026
Trypan blue	Merck Co.	11732
Tween 80	Sigma Chemical Co.	P1754
Urea hydrogen peroxide	Sigma Chemical Co.	U1753

参考文献

Arakane F, Kallen CB, Watari H, Foster JA, Sepuri NB, Pain D, Staybrook SE, Lewis M, Gerton GL, Strauss JF 3rd. The mechanism of action of steroidogenic acute regulatory protein (StAR). StAR acts on the outside of mitochondria to stimulate steroidogenesis. *J Biol Chem* 1998; 273: 16339-16345.

Baba M, Osumi M, Ohsumi Y. Analysis of the membrane structures involved in autophagy in yeast by freeze-replica method. *Cell Struct Funct* 1995; 20: 465-471.

Beling CG, Marcus SL, Markham SM. Functional activity of the corpus luteum following hysterectomy. *J Clin Endocrinol Metab* 1970; 30: 30-39.

Carrasco I, Troncoso JL, Devoto L, Vega M. Differential steroidogenic response of human luteal cell subpopulations. *Hum Reprod* 1996; 11: 609-614.

Chaffin CL, Dissen GA, Stouffer RL. Hormonal regulation of steroidogenic enzyme expression in granulosa cells during the peri-ovulatory interval in monkeys *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 11-18.

Challis JR, Calder AA, Dilley A, Forster CS, Hillier K, Hunter DJ, McKenzie IZ, Thorburn GD. Production of prostaglandins E and F_{2a} by corpus luteum, corpora albicantes and stroma from the human ovary. *J Endocrinol* 1976; 68: 401-408.

Christenson LK, Devoto L. Cholesterol transport and steroidogenesis by the corpus luteum.

Reprod Biol Endocrinol 2003; 10: 1-9.

Davis JS. Mechanisms of hormone action: luteinizing hormone receptors and second-messenger pathways. Curr Opin Obstet Gynecol 1994; 6: 254-261.

Del Canto F, Sierralta W, Kohen P, Muñoz A, Strauss J III, Devoto L. Features of natural and GnRH antagonist-induced corpus luteum regression and effects of in vivo human chorionic gonadotropin. J Clin Endocrinol Metab 2007; 92: 4436-4443.

Devoto L, Kohen P, Gonzalez RR, Castro O, Retamales I, Vega M, Carvallo P, Christenson LK, Strauss JF 3rd. Expression of steroidogenic acute regulatory protein in the human corpus luteum throughout the luteal phase. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 5633-5639.

Devoto L, Vega M, Kohen P, Castro O, Carvallo P, Palomino A. Molecular regulation of progesterone secretion by the human corpus luteum throughout the menstrual cycle. J Reprod Immunol 2002; 55: 11-20.

Devoto L, Fuentes A, Kohen P, C-spedes P, Palomino A, Pommer R, Muñoz A, Strauss JF 3rd. The human corpus luteum: life cycle and function in natural cycles. Fertil Steril 2009; 92: 1067-1079.

Dharmarajan AM, Hisheh S, Singh B, Parkinson S, Tilly KI, Tilly JL. Antioxidants mimic the ability of chorionic gonadotropin to suppress apoptosis in the rabbit corpus luteum in vitro: a

novel role for superoxide dismutase in regulating bax expression. *Endocrinology* 1999; 140: 2555-2561.

Dimattina M, Albertson B, Seyler DE, Loriaux DL, Falk RJ. Effect of the antiprogestin RU486 on progesterone production by cultured human granulosa cells: inhibition of the ovarian 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Contraception* 1986; 34: 199-206.

Duncan WC, McNeilly AS, Fraser HM, Illingworth PJ. Luteinizing hormone receptor in the human corpus luteum: lack of down-regulation during maternal recognition of pregnancy. *Hum Reprod* 1996; 11: 2291-2297.

Duncan WC, Cowen GM, Illingworth PJ. Steroidogenic enzyme expression in human corpora lutea in the presence and absence of exogenous human chorionic gonadotrophin (hCG). *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 291-298.

Duncan WC, Gay E, Maybin JA. The effect of luteal rescue with human chorionic gonadotrophin (hCG) on human luteal-cell progesterone receptors. *Reproduction* 2005; 130: 83-93.

Duncan WC, Myers M, Dickinson RE, Driesche S, Fraser HM. Paracrine regulation of luteal development and luteolysis in the primate. *Anim Reprod* 2009; 6: 34-46.

Dunn WA Jr. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol* 1994; 4: 139-143.

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 383-424.

Elger W, Bartley J, Schneider B, Kaufmann G, Schubert G, Chwalisz K. Endocrine pharmacological characterization of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators with respect to PR-agonistic and antagonistic activity. *Steroids* 2000; 65: 713-723.

Emerman JT, Pitelka DR. Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. *In vitro* 1977; 13: 316-328.

Engmann L, Losel R, Wehling M, Peluso JJ. Progesterone regulation of human granulosa/luteal cell viability by an RU486-independent mechanism. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4962-4968.

Filicori M, Cognigni GE, Gamberini E, Parmegiani L, Troilo E, Roset B. Efficacy of low-dose human chorionic gonadotropin alone to complete controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2005; 84: 394-401.

Fraser HM, Lunn SF, Harrison DJ, Kerr JB. Luteal regression in the primate: different forms of cell death during natural and gonadotropin-releasing hormone antagonist or prostaglandin analogue-induced luteolysis. *Biol Reprod* 1999; 61: 1468-1479.

Fujita Y, Okuda K, Horiwaki K, Naito C. In vitro differentiation of bovine granulosa cells obtained from small antral follicles. *J Reprod Dev* 1996; 42: 133-138.

Goldman S, Dirnfeld M, Abramovici H, Kraiem Z. Triiodothyronine (T3) modulates hCG-regulated progesterone secretion, cAMP accumulation and DNA content in cultured human luteinized granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 96: 125-131.

Hanukoglu I, Rapoport R, Weiner L, Sklan D. Electron leakage from the mitochondrial NADPH-adrenodoxin reductase-adrenodoxin-P450_{scc} (cholesterol side chain cleavage) system. *Arch Biochem Biophys* 1993; 305: 489-498.

Hild-Petito S, Fazleabas AT. Expression of steroid receptors and steroidogenic enzymes in the baboon (*Papio anubis*) corpus luteum during the menstrual cycle and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 955-962.

Jirawatnotai S1, Moons DS, Stocco CO, Franks R, Hales DB, Gibori G, Kiyokawa H. The cyclin-dependent kinase inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 cooperate to restrict proliferative life span in differentiating ovarian cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 7021-7027.

Jones LS, Ottobre JS, Pate JL. Progesterone regulation of luteinizing hormone receptors on cultured bovine luteal cells. *Mol Cell Endocrinol* 1992; 85: 33-39.

Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1993; 53: 3976-3985.

Kedem A, Yung Y, Yerushalmi GM, Haas J, Maman E, Hanochi M, Hemi R, Orvieto R, Dor J, Hourvitz A. Anti-Müllerian Hormone (AMH) level and expression in mural and cumulus cells in relation to age. *J Ovarian Res* 2014; 7: 113.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.

Khan-Dawood FS, Goldsmith LT, Weiss G, Dawood MY. Human corpus luteum secretion of relaxin, oxytocin, and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 627-631.

Kiriakidou M, McAllister JM, Sugawara T, Strauss JF 3rd. Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 4122-4128.

Klein-Hitpass L, Cato AC, Henderson D, Ryffel GU. Two types of antiprogesterins identified by their differential action in transcriptionally active extracts from T47D cells. *Nucleic Acids Research* 1991; 19: 1227-1234.

Kohen P, Castro O, Palomino A, Mu-oz A, Christenson LK, Sierralta W, Carvallo P, Strauss JF 3rd, Devoto L. The steroidogenic response and corpus luteum expression of the steroidogenic acute regulatory protein after human chorionic gonadotropin administration at different times in the human luteal phase. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3421-3430.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA,

- Malorni W, Nu-ez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009; 16: 3-11.
- Kumazawa Y, Kawamura K, Sato T, Sato N, Konishi Y, Shimizu Y, Fukuda J, Kodama H, Tanaka T. HCG up-regulates survivin mRNA in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 161-166.
- Makrigiannakis A, Coukos G, Christofidou-Solomidou M, Montas S, Coutifaris C. Progesterone is an autocrine/paracrine regulator of human granulosa cell survival in-vitro. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 900: 16-25.
- Matsubara H, Ikuta K, Ozaki Y, Suzuki Y, Suzuki N, Sato T, Suzumori K. Gonadotropins and cytokines affect luteal function through control of apoptosis in human luteinized granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1620-1626.
- Matsuoka A, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Taniguchi K, Asada H, Taketani T, Tamura H, Sugino N. Progesterone increases manganese superoxide dismutase expression via a cAMP-dependent signaling mediated by noncanonical Wnt5a pathway in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 291-299.
- McReynolds S, Dzieciatkowska M, McCallie BR, Mitchell SD, Stevens J, Hansen K, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Impact of maternal aging on the molecular signature of human cumulus cells. *Fertil Steril* 2012; 98: 1574-1580.

Metcalf MG, Braiden V, Livesey LH. Retention of normal ovarian function after hysterectomy. *J. Endocrinol* 1992; 135: 597-602.

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; 451: 1069-1075.

Myers M, Lamont MC, van den Driesche S, Mary N, Thong KJ, Hillier SG, Duncan WC. Role of luteal glucocorticoid metabolism during maternal recognition of pregnancy in women. *Endocrinology* 2007; 148: 5769-5779.

Neill JD, Johansson ED, Knobil E. Failure of hysterectomy to influence the normal pattern of cyclic progesterone secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 1969; 84: 464-465.

Neuvians TP, Schams D, Berisha B, Pfaffl MW. Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F2alpha-induced luteolysis in bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 2004; 70: 473-480.

Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 2000; 80: 1-29.

Okamoto M, Ishida Y, Keogh A, Strain A. Evaluation of the function of primary human hepatocytes co-cultured with the human hepatic stellate cell (HSC) line LI90. *Int J Artif Organs* 1998; 21: 353-359.

Okuda K, Uenoyama Y, Fujita Y, Iga K, Sakamoto K, Kimura T. Functional oxytocin receptors in bovine granulosa cells. *Biol Reprod* 1997; 56: 625-631.

Okuda K, Korzekwa A, Shibaya M, Murakami S, Nishimura R, Tsubouchi M, Woclawek-Potocka I, Skarzynski DJ. Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells. *Biol Reprod* 2004; 71: 2065-2071.

Osnes T, Sandstad O, Skar V, Osnes M, Kierulf P. Total protein in common duct bile measured by acetonitrile precipitation and a micro bicinchoninic acid (BCA) method. *Scand J Clin Lab Invest* 1993; 53: 757-763.

Ottander U, Hosokawa k, Link NT, Olofsson JL. A putative stimulatory role of progesterone acting via progesterone receptor in the steroidogenic cells of the human corpus luteum. *Biol Reprod* 2000; 62: 655-663.

Pal R, Singh O. Absence of corpus luteum rescue by chorionic gonadotropin in women immunized with a contraceptive vaccine. *Fertil Steril* 2001; 76: 332-336.

Park DW, Cho T, Kim MR, Kim YA, Min CK, Hwang KJ. ATP-induced apoptosis of human granulosa luteal cells cultured in vitro. *Fertil Steril* 2003; 80: 993-1002.

Patwardhan VV, Lanthier A. Luteal phase variation in endogenous concentrations of prostaglandin E2 and PGF2a and in the capacity for their in vitro formation in the human corpus luteum. *Prostaglandins* 1985; 30: 91-98.

Pellicer A, Simón C, Remohí J. Effects of aging on the female reproductive system. *Hum Reprod.* 1995; 10: 77-83.

Peluso JJ, Fernandez G, Pappalardo A, White BA. Characterization of a putative membrane receptor for progesterone in rat granulosa cells. *Biol Reprod* 2001; 65: 94-101.

Perusquía M, Espinoza J, Navarrete E. Nongenomic uterine relaxing effect of RU 486 (mifepristone) prior to its antiprogesterone activity in the human pregnancy. *Steroids* 2009; 74: 825-831.

Perusquía M, Espinoza J, de la Peña A. Mifepristone (RU 486) induces vasodilation and inhibits platelet aggregation: nongenomic and genomic action to cause hemorrhage. *Contraception* 2011; 84: 169-177.

Rapoport R, Sklan D, Hanukoglu I. Electron leakage from the adrenal cortex mitochondrial P450_{scc} and P450_{c11} systems: NADPH and steroid dependence. *Arch Biochem Biophys* 1995; 317: 412-416.

Rodger FE, Fraser HM, Duncan WC, Illingworth PJ. Immunolocalization of bcl-2 in the human corpus luteum. *Hum Reprod* 1995; 10: 1566-1570.

Rodger FE, Fraser HM, Krajewski S, Illingworth PJ. Production of the proto-oncogene BAX does not vary with changing in luteal function in women. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 27-32.

Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF, Russell DL. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction* 2003; 126: 415-424.

Ronen-Fuhrmann T, Timberg R, King SR, Hales KH, Hales DB, Stocco DM. Spatio-temporal expression patterns of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* 1998; 139: 303-315.

Schams D, Berisha B. Regulation of Corpus Luteum Function in Cattle - an Overview. *Reprod Dom Anim* 2004; 39: 241-251.

Shikone T, Yamoto M, Kokawa K, Yamashita K, Nishimori K, Nakano R. Apoptosis of human corpora lutea during cyclic luteal regression and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2376-2380.

Shimamura K, Sugino N, Yoshida Y, Nakamura Y, Ogino K, Kato H. Changes in lipid peroxide and antioxidant enzyme activities in corpora lutea during pseudopregnancy in rats. *J Reprod Fertil* 1995; 105: 253-257.

Smith MF, McIntush EW, Smith GW. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci* 1994; 72: 1857-1872.

Stangel JJ, Richart RM, Okagaki T, Cottral G. Nuclear DNA content of luteinized cells of the human ovary; granulosa lutein cells of the corpus luteum during the normal menstrual cycle and pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1970; 108: 543-549.

Stephenson MD. Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril* 1996; 66: 24-29.

Stocco C, Telleria C, Gibori G. The molecular control of corpus luteum formation, function and regression. *Endocr Rev* 2007; 28: 117-149.

Stouffer RL. Progesterone as a mediator of gonadotrophin action in the corpus luteum: beyond steroidogenesis. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 99-117.

Sugino N, Suzuki T, Kashida S, Karube A, Takiguchi S, Kato H. Expression of bcl-2 and bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4379-4386.

Sugino N, Takiguchi S, Kashida S, Karube A, Nakamura Y, Kato H. Superoxide dismutase expression in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 19-25.

Suzuki T, Sasano H, Kimura N, Tamura M, Fukaya T, Yajima A, Nagura H. Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and oestrogen receptors in the human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroidogenic enzymes. *Hum Reprod* 1994; 9: 1589-1595.

- Suzuki T, Sasano H, Takaya R, Fukaya T, Yajima A, Date F, Nagura H. Leukocytes in normal-cycling human ovaries: immunohistochemical distribution and characterization. *Hum Reprod* 1998; 13: 2186-2191.
- Swanston I, McNatty KP, Baird DT. Concentrations of prostaglandin F2a and steroids in the human corpus luteum. *J Endocrinol* 1977; 73: 115-122.
- Takao Y, Honda T, Ueda M, Hattori N, Yamada S, Maeda M, Fujiwara H, Mori T, Wimalasena J. Immunohistochemical localization of the LH/HCG receptor in human ovary: HCG enhances cell surface expression of LH/HCG receptor on luteinizing granulosa cells in vitro. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 569-578.
- Tanaka M, Miyazaki T, Tanigaki S, Kasai K, Minegishi K, Miyakoshi K, Ishimoto H, Yoshimura Y. Participation of reactive oxygen species in PGF2alpha-induced apoptosis in rat luteal cells. *J Reprod Fertil* 2000; 120: 239-245.
- Taketani T, Yamagata Y, Takasaki A, Matsuoka A, Tamura H, Sugino N. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1 on progesterone production in human luteinized granulosa cells. *Fertil Steril* 2008; 90: 744-748.
- Tekpetey FR, Singh B, Barbe G, Armstrong DT. Localization of epidermal growth factor (EGF) receptor in the rat corpus luteum, and EGF and transforming growth factor-alpha stimulation of luteal cell steroidogenesis in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 110: 95-102.

Telleria CM, Deis RP. Effect of RU486 on ovarian progesterone production at pro-oestrus and during pregnancy: a possible dual regulation of the biosynthesis of progesterone. *J Reprod Fertil* 1994; 102: 379-384.

Vaskivuo TE, Ottander U, Oduwole O, Isomaa V, Vihko P, Olofsson JI, Tapanainen JS. Role of apoptosis, apoptosis-related factors and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in human corpus luteum regression. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 194: 191-200.

Vega M, Devoto L, Navarro V, Castro O, Kohen P. In vitro net progesterone production by human corpora luteal: effects of human chorionic gonadotropin, dibutyryl adenosine 3',5'-monophosphate, cholera toxin, and forskolin. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65: 747-752.

Vega M, Carrasco I, Castillo T, Troncoso JL, Videla LA, Devoto L. Functional luteolysis in response to hydrogen peroxide in human luteal cells. *J Endocrinol* 1995; 147: 177-182.

Vega M, Devoto L, Castro O, Kohen P. Progesterone synthesis by human luteal cells: modulation by estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 466-469.

Vega M, Urrutia L, Iniguez G, Gabler F, Devoto L, Johnson MC. Nitric oxide induces apoptosis in the human corpus luteum in vitro. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 681-687.

Voutilainen R, Tapanainen J, Chung BC, Matteson KJ, Miller WL. Hormonal regulation of P450_{scc} (20,22-desmolase) and P450_{c17} (17 α -hydroxylase/17,20-lyase) in cultured human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63: 202-207.

Yacobi K, Wojtowicz A, Tsafiriri A, Gross A. Gonadotropins enhance caspase-3 and -7 activity and apoptosis in the theca-interstitial cells of rat preovulatory follicles in culture. *Endocrinology* 2004; 145: 1943-1951.

Yacobi K, Tsafiriri A, Gross A. Luteinizing hormone-induced caspase activation in rat preovulatory follicles is coupled to mitochondrial steroidogenesis. *Endocrinology* 2007; 148: 1717-1726.

Yang Y, Nandi S. Growth of cultured cells using collagen as substrate. *Int Rev Cytol* 1983; 81: 249-286.

Yuan W, Giudice LC. Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3148-3155.

Zelevnik AJ. In vivo responses of the primate corpus luteum to luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11002-11007.

日本産科婦人科学会平成 25 年度倫理委員会・登録・調査小委員会報告（2012 年分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および 2014 年 7 月における登録施設名）*日産婦誌* 2014; 66 : 2445-2481.