

ゴナドトロピン刺激による Leydig 細胞の増殖を支える分子機構

白石 晃司

宇部興産中央病院泌尿器科

はじめに

LH/hCG は Leydig 細胞においてテストステロン合成を促すリガンドとして中心的な役割を担う。LH/hCG の除去によりテストステロン合成の低下およびそれに関与する細胞内小器官の減少や細胞の萎縮が生じ [1], Leydig 細胞自体がアポトーシスにて消失する [2] ことから, LH/hCG は Leydig 細胞の機能維持やその生存に必須の分子である。思春期および成人において精子形成および男性化の維持に有効な血中テストステロン濃度を維持するためには, 個々の Leydig 細胞による十分な分泌のみならず, その細胞数の絶対的増加が必要となる。しかし精巣内で分化増殖を活発に繰り返している細胞は圧倒的に精細管内の精細胞であり, *in vivo* では細胞内増殖シグナルの代表である extracellular signal regulated kinase (ERK) の活性化も主に精細胞に認められ, 分化増殖を行う Leydig や Sertoli 細胞の割合は比較的小ないため [3], 増殖という観点からの Leydig 細胞の研究については未解明な点が多い。

Hardy らはラット Leydig 細胞の成熟段階を progenitor, immature, mature に分類し [4], 以後 primary culture を用いた増殖因子や細胞動態の研究が盛んに行われるようになった。また *in vivo* の研究については Leydig 細胞の由来は何か, 胎生期から大人にいたる発達過程のどの時期に分化増殖が生じるのかなどを調べるべく ethane-1, 2-dimethyl sulphate (EDS) 投与や下垂体摘除ラットなどを用いた細胞動態的研究が散見されるが, 増殖にいたる細胞内シグナル伝達に関する研究は非常に少ない。FSH, Leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL-6), platelet-derived growth factor (PDGF), Kit ligand, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), transforming growth factor α (TGF α), TGF β , androgen, thyroid hormone などが Leydig 細胞の分化増殖に関与する

といわれているが [5, 6], 本稿では LH/hCG 刺激に伴う LH レセプターを介した Leydig 細胞の増殖機構について概説する。

LH/hCG は Leydig 細胞を増殖させる

LH/hCG の投与により Leydig 細胞の分化増殖が促進されることは以前より知られていたが [7, 8], LH レセプターの活性化が Leydig 細胞の増殖に関与することは LH レセプターの不活性化変異により Leydig 細胞の hypoplasia をきたし, 活性型変異により hyperplasia をきたすことより明らかとなった [9]。さらに GnRH のノックアウトつまり LH の除去により Leydig 細胞数は 10% 程度まで減少すると報告され [10], LH レセプターのノックアウトにより Leydig 細胞の hypoplasia を生じることとも確認されている [11, 12]。また報告例は少ないものの, リガンドである LH β サブユニットの構造異常を認めた患者の精巣生検像でも Leydig 細胞の十分な増殖は認められない [13-15] ことから, LH レセプターからのシグナルが Leydig 細胞の増殖に重要な役割を担うことがわかってきた。ラット Leydig 細胞 primary culture (以下ラット Leydig 細胞) において hCG 刺激にて [3 H] チミジンアッセイにて ERK 依存性に細胞増殖が生じる [16-19]。また immature Leydig 細胞に比べ, より未分化な progenitor Leydig 細胞の方が増殖活性が高い [16]。

LH/hCG による Ras および ERK の活性化

Mitogen activated protein kinase (MAPK) の代表的分子である ERK (それぞれ分子量 44 および 42 kDa の ERK1 と ERK2) は哺乳類のほとんどすべての細胞に恒常的に発現しており, さまざまな growth factor の刺激により細胞増殖にかかわる分子として, もっとも研究されている。多くの細胞では ERK は epidermal growth factor (EGF) レセプターに代表されるチロシンキナーゼ型レセプター (receptor tyrosine kinase; RTK) の下流で活性化され, 細胞質内または核内でその下流の分子

連絡先: 白石晃司, 山口大学大学院医学系研究科泌尿器科学分野

〒755-8505 山口県宇部市南小串1-1-1

TEL: 0836-22-2275

FAX: 0836-22-2276

E-mail: sirakkkay@aol.com

に作用する。基本的にはリン酸化されたチロシンがいくつかのアダプター分子や酵素と SH2 および SH3 ドメインを介してドッキングする (Shc-Grb2-Sos 複合体など) (図 1) [20]。G タンパク共役型レセプター (G protein-coupled receptor; GPCR) 刺激による ERK の活性化については $\beta 2$ アドレナリンレセプターなどを中心に研究が進められ、LH レセプターについても顆粒膜細胞の cell line [21] および primary culture [22, 23], また Leydig 細胞の cell line [20, 24] および primary culture [16, 25] にて ERK が活性化されることが報告されている。Ras の活性化に続き MAPK kinase kinase (MAPKKK) である Raf, MAPK kinase (MAPKK) である MEK, そして ERK の活性化へとカスケードが進む (図 2)。Ras も広義には G タンパクと称されるが 7 回膜貫通型

GPCR と共役した G タンパクとは別の分子ファミリーとして Rap, Rho, Rab, Ran および Arf などとともに small G タンパクに分類される。GTP アーゼによる翻訳後脂質修飾の違いにより H-, K-, N-Ras などのアイソフォームが存在するが、われわれはマウスおよびラット Leydig 細胞においてタンパクレベルでは K- および N-Ras の存在を確認した。また Ras のドミナントネガティブ変異体の overexpression により ERK の活性化が抑制されることは、MA-10 細胞にて報告されている [24]。

LH レセプターから Ras の活性化へ

Ras 活性化に伴う ERK 活性化へのカスケードは癌細胞のみならず正常細胞においても普遍的に保存されている細胞増殖に関する主なシグナル経路である。Ras のアイソフォームに関係なく不活性型 Ras である GDP 結合型を活性型である GTP 結合型へ変換するのが Ras グアニンヌクレオチド交換因子 (Ras guanine nucleotide exchange factors; RasGEFs) で、その逆の負の調節因子が Ras GTP アーゼ活性化タンパク (Ras GTPase activating proteins; RasGAPs) である [26, 27] (図 3)。LH/hCG 刺激により EGF レセプターへのトランス活性化が生じるが、その際の RasGEFs の 1 つに Sos (son-of-sevenless) が含まれることは容易に理解できるが [20] (図 2, 3), LH/hCG 刺激による内因性の経路による Ras の活性化が RasGEFs の活性化によるものか RasGAPs の不活性化によるものかは不明である。代表的な RasGEFs である Ras-GRFs および Ras-GRPs はタンパクレベルで

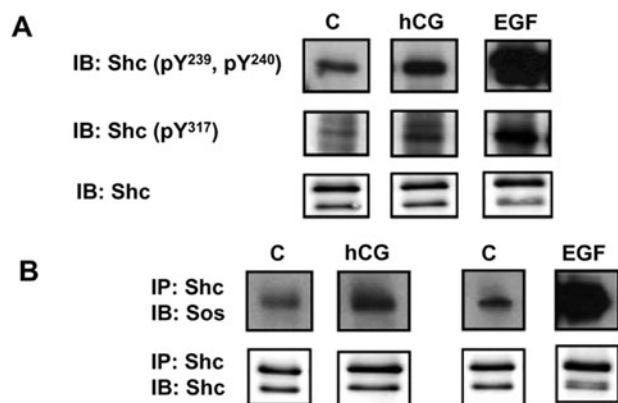


図 1 MA-10細胞における hCG または EGF 刺激による Shc のリン酸化 (活性化) (A) および Shc/ (Grb2) /Sos complex の形成 (B)。IB: immunoblot, IP: immunoprecipitation. (文献20より改変)。

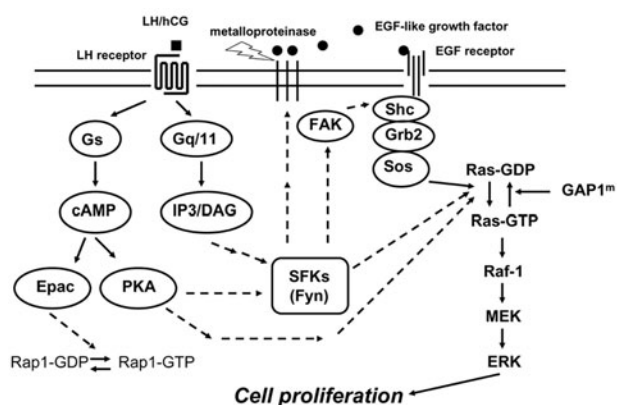


図 2 LH/hCG 刺激による Ras-ERK の活性化経路
 —: 関与が証明された経路,
 ----: 考えられうるが介在する分子が不明であったり Leydig 細胞では証明されていない経路。

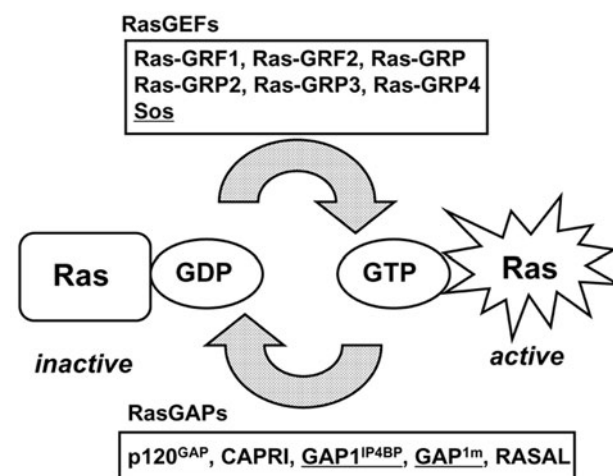


図 3 Ras 活性を調節する Ras-guanine nucleotide exchange factors (Ras-GEFs) と Ras-GTPase activating proteins (Ras-GAPs)。下線はラットおよびマウス Leydig 細胞において存在が確認されている分子。

は Leydig 細胞では確認されておらず, RasGAPs の 1 つである GAP^{IP4BP} は MA-10 およびラット Leydig 細胞でその存在を確認できたが LH/hCG 刺激や細胞増殖との関連は認められなかった。G_{αs}/adenylyl cyclase/cAMP 経路が MA-10 における内因性の Ras および ERK の活性化にもっとも関与する [24] (図 2)。細胞内 cAMP 上昇に引き続く Ras-ERK の活性化は非常に複雑であり, 細胞およびリガンド特異的である [28] が, 一般的には PKA 経路と cAMP によって直接活性化されるグアニンヌクレオチド交換因子である Epac (exchange protein directly activated by cAMP) 経路が重要な役割を果たす [28–30] (図 2)。活性化された Epac が Ras とは別の small G タンパクである Rap1 を活性化することは有名であり, Rap1 も Ras と共通のエフェクターをもつことが多く, その活性化も細胞の分化増殖などの重要な生理作用に関与する。われわれは MA-10 細胞およびラット Leydig 細胞において Rap1 が活性化されることをその下流のエフェクターである RalGDS を用いた pull-down アッセイにて確認しているが, Epac 経路を選択的に活性化する 8CPT-2Me-cAMP [29] では活性化されないことより, Leydig 細胞において Rap1 の活性化が Epac 経路であるかどうかは不明である (図 2)。また Epac の存在は MA-10 およびラット Leydig 細胞においてタンパクレベルで確認しているが, 同様に 8CPT-2Me-cAMP による刺激において ERK の活性化も認められず [16, 24], Epac の overexpression にても Ras および ERK の活性は影響されないため, Leydig 細胞における cAMP-Epac 経路の存在は不明である。

Leydig 細胞における Ras 活性を制御する GAP1^m

GAP1^m は RasGAP の 1 つであり, inositol 1, 3, 4, 5-tetrakisphosphate (IP₄) に結合し, EGF による刺激で PI 3 kinase 依存的に膜移行することが知られている [31, 32]。MA-10 細胞およびラット Leydig 細胞において内因性の GAP1^m の発現を認めた。MA-10 細胞に GAP1^m 野生型を overexpression したところ hCG 刺激に伴う Ras および ERK の活性化は抑制され, IP₄ に結合できない変異体 (R379C, R629C) を作成し overexpression したところ逆に Ras および ERK の活性化の亢進を認めた (図 4)。すなわち GAP1^m は MA-10 細胞において Ras-GAP として作用していると考えられた。一方で, GAP1^m が hCG 刺激 (EGF 刺激でも同様) に伴い Ras が活性化される場所である形質膜 (H-, K-Ras) やゴルジ体 (N-Ras) に translocation することから (図 5), GAP1^m は

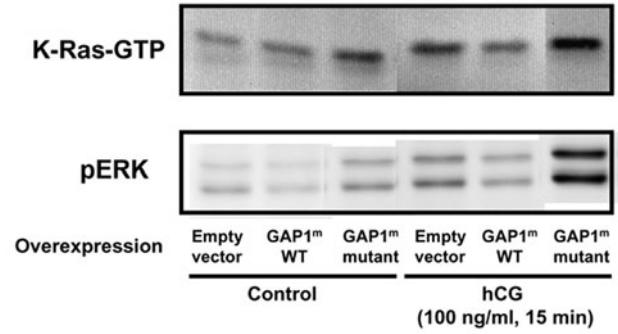


図 4 MA-10 細胞における GAP1^m wild-type (GAP1^mWT) または GAP1^m double mutant (R379C, R629C) (GAP1^mmutant) の overexpression による Ras および ERK 活性への影響。Ras 活性は GST-Raf1 を用いた K-Ras の pull-down assay, ERK 活性は anti-phospho-ERK1/2 による immunoblot を行った。
WT: wild type, mutant: R379C, R629C double mutant

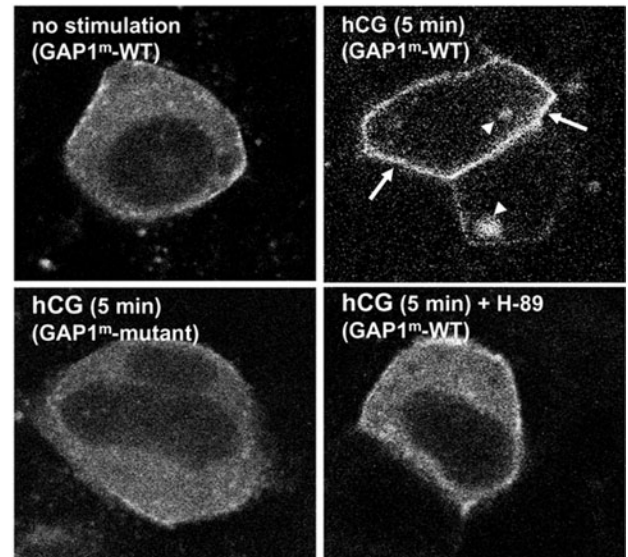


図 5 hCG 刺激による GAP1^m の translocation. GFP-GAP1^m wild-type (GAP1^mWT) または GFP-GAP1^m double mutant (R379C, R629C) (GAP1^mmutant) を MA-10 細胞に overexpression. 矢印: 細胞膜, 矢頭: ゴルジ体

活性化された Ras の過活動を制御している可能性がある。この translocation も PKA 依存性であり (図 5), LH/hCG 刺激による G_{αs}/adenylyl cyclase/cAMP 経路の活性化により Ras の活性化と不活性化が同時に生じ, 巧妙にその活性化が制御されていることが示唆された。なお, Ras の活性化については cAMP を介する内因性の経路以外に以下に述べるトランス活性化の関与も重要である。

Src とその活性化

非受容体型チロシンキナーゼは細胞の増殖, 分化およ

びアポトーシスにおけるシグナル伝達において重要で、なかでも Src family kinases (SFKs) はその代表である。ゴナドトロピン刺激により卵巣での Src 活性は亢進し、Src ノックアウト雌マウスは卵巣発育不全と排卵障害をきたし不妊となる [33]。また Src は FSH 刺激に伴うラット granulosa 細胞の分化において中心的な役割を担う [34]。Src, Lck, Fyn, Lyn および Yes が含まれ、N 末端のユニークドメインに続き共通した SH2, SH3 といったタンパク複合体の形成に重要なドメインとキナーゼドメインを有する。Leydig 細胞には Src [35, 36], Fyn および Yes [37] がタンパクレベルで確認されている。MA-10細胞に Fyn の活性変異型でなく野生型を overexpression しただけで Ras および ERK の活性化を認めた [20]。そのように Src は細胞増殖と関連が深く、Leydig 細胞においても Ras の上流で機能していることは報告されていたが [20, 35], EGF 刺激よりもむしろ LH/hCG 刺激においては強い Src (MA-10細胞では Fyn) の活性化を認めた [37]。さらに Src のインヒビターである PP2 やドミナントネガティブ Fyn にて LH/hCG による ERK の活性化は強く阻害されるのに対し、EGF 刺激による ERK の活性化は影響を受けなかったことより [16, 20], Leydig 細胞における Src (Fyn) は LH/hCG による内因性つまり cAMP-PKA を介するシグナル伝達系および以下に述べるトランス活性化において重要であることが示唆された。cAMP-PKA-Csk 経路がさまざまな細胞において Src を活性化する経路として報告されているが、MA-10およびラット Leydig 細胞においては証明できなかった。LH/hCG による Gp/11の活性化が Src (Fyn) の活性化に関与しているが [37] (図2), その活性化にいたる詳しい経路や Src (Fyn) が Ras を活性化する機序については、Leydig 細胞においては不明である。

GPCR と RTK の cross-talk : トランス活性化

トランス活性化は、GPCR から RTK へまたは RTK から GPCR へのシグナルが Ras-ERK 経路などを活性化させるための別の切り替え過程であり [38, 39], この細胞外を経由するという斬新なシグナル伝達系についての研究が autocrine/paracrine のみならず癌の増殖などの研究に貢献してきたことは明らかである。GPCR の刺激により主に $G_{\beta/\gamma}$ および $G_{i/o}$ の活性化され細胞膜に結合した前駆体からの EGF-like growth factor の遊離が引き起こされ (図2), その結果、RTK へのトランス活性化が生じることが知られている [38-40]。この現象は、一般的には転写翻訳を介した新規なタンパク合成は伴わ

ず恒常的に発現している不活性な増殖因子前駆体がメタロプロテアーゼにより切断され細胞外へ遊離する結果として生じる [39] (図2)。このようなトランス活性化により1つの刺激によるシグナル伝達系の範囲は大幅に広がり、きわめて多様な刺激に応答することが可能となる。EGF-like growth factor のみならずチロシンキナーゼ型レセプターのリガンドであるインスリン、IGF-1, VEGF, PDGF レセプターなどは、 β 2-アドレナリン、 μ -オピオイドレセプターなどもトランス活性化に関与していることが報告されている [41]。われわれは hCG/LH 刺激に対する ERK の活性化においてトランス活性化が存在するか否かを確認するため、Pierce らの方法を改良し [40] 異なる Leydig 細胞を培養する co-culture の実験系を確立した [42] (図6)。LH レセプターをもつ MA-10細胞ともたない I-10細胞 (いずれもマウス由来の Leydig cell line) を同じプレート上で培養し同時に hCG 刺激を行うと、LHR をもたない I-10での細胞内でのイベントは MA-10細胞からの何らかの juxtacrine または autocrine 作用によるものと考えられる。それぞれ異なる分子量のタグをつけた ERK (myc-ERK および GFP-ERK) を発現させることにより ERK の活性化がどちらの細胞由来であるかを区別できる。I-10細胞に EGFR を発現することによりその ERK 活性は増強し、EGFR のインヒビターである AG1478や、I-10細胞にドミナントネガティブ Shc を overexpression することにより強力にその活性が阻害されることから、ドナーである MA-10細胞からの EGF-like growth factor の放出が考えられた。さらに単培養で siRNA により MA-10細胞の EGFR をノックダウンした状態で hCG 刺激を行うと ERK の活性は70%程度まで抑制されたことより、LH レセプターからの EGF レセプターへのトランス活性化の存在が示唆された。このトランス活性化にも Src が重要な役割を果たしている

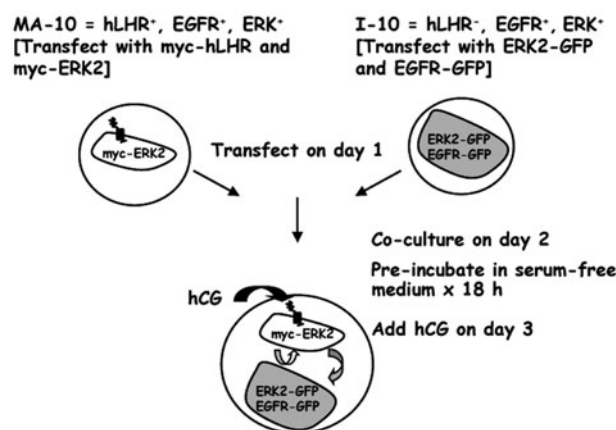


図6 Co-culture の模式図 (文献42より引用)

ことが知られている [43]. ドミナントネガティブ Fyn を MA-10細胞に発現させた場合は I-10細胞の ERK 活性が抑制されるのに対し, I-10細胞に発現させた場合はその ERK 活性に影響を与えなかったことより, Leydig 細胞においても Src のトランス活性化における関与が示された.

まとめ, 展望

以上より LH レセプターの活性化がゴナドトロピンによる Leydig 細胞の増殖に重要であることは明らかであるが, その複雑なシグナリング経路は解明され始めたばかりである. これら *in vitro* の実験では serum starvation を半日行った後に hCG にて刺激を行うが, 実際 *in vivo* では血中 LH 値は数十分間隔でのパルス状の変動を認め, その絶対値にも日内変動が存在する. しかし低容量の hCG/LH の存在下で培養し同様に hCG 刺激を行っても同様の結果が得られた. 35週齢 Sprague-Dawley ラットに hCG100単位を皮下注射すると, 2時間から12時間にかけて Leydig 細胞に ERK の活性化が認められた (図7). Leydig 細胞の細胞動態は germ cell ほど顕著ではないが, LH のパルス状分泌や日内変動により ERK の活性化および引き続いて生じる細胞分裂や増殖因子の分泌を常に繰り返し, 以上述べてきたような細胞内のイベントやトランス活性化は実際に *in vivo* でも生じていると考えられる. トランス活性化については当初 Leydig 細胞の増殖における juxtacrine/autocrine という観点から研究を進めたが *in vivo* では当然精巣内の他の細胞にも paracrine/endocrine 的に作用しうる. EGF-like growth factor の分泌は造精機能の発現維持において非常に重要である. これらは EGF, heparin-binding EGF, TGF α , amphiregulin, betacellulin および epiregulin とともにファミリーをなし, 共通のレセプターに作用する. EGF, TGF α および amphiregulin の triple null mutation をきたしたマウスにおいても造精機能は温存されていたことより [44], 細胞の生存増殖に必須の因子は機能的に重複した分子の存在により, ささまざまなストレスに対する傷害を免れていると考えられる [45]. hCG を含めさまざまな刺激により何が分泌されるかということについては研究中であるが, MA-10およびラット Leydig 細胞では RT-PCR にて, これらすべての EGF-like growth factor の発現を認めた. 一方, 精巣を構成するすべての細胞に EGF が overexpression された場合にはむしろ造精機能は低下することから [46], その発現の局在, 量およびタイミングについては今後の検討課題である. ま

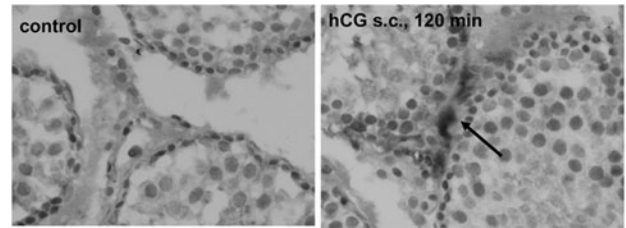


図7 hCG 投与 (100単位皮下注射後2時間) による *in vivo* でのラット (35週齢) Leydig 細胞における ERK の活性化 (免疫染色). 矢印: リン酸化 ERK 抗体陽性の Leydig 細胞. 連続切片にてこれらの細胞が 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 陽性であることを確認した.

た, EGF-like growth factor 以外にも hCG 投与にて Leydig 細胞を介した IL-1などの炎症性サイトカインの分泌が生じ [47], co-culture 系でもレシピエント細胞である I-10細胞に EGF レセプターを発現させなくても ERK の活性化はわずかに認められることから, EGF-like growth factor 以外の因子の分泌も予想される. hCG/LH 刺激により Leydig 細胞からさまざまな細胞の増殖分化にかかわる因子の分泌が生じ, Sertoli 細胞や精細胞へ作用しうると考えられる. hCG の投与量, タイミング, 間隔などの検討により, 以前は無効といわれた男性不妊症に対する hCG を用いた治療も, 単独または他の薬剤などとの組み合わせおよび対象患者の選択により, 十分に再検討される余地はあると考えられる. LH の構造異常 [48] や LH 分泌に伴う LH レセプターの発現パターンなどの分子生物学的機序も明らかにされつつあり [9, 49], hCG/FSH の自己注射が可能となりホルモン療法に対するコンプライアンスが改善した現在 [50], 性腺機能低下症や男性更年期のみならず Leydig 細胞を中心とした男性不妊症治療の今後の展開が期待される.

謝 辞

執筆の機会を与えてくださいました日本生殖内分泌学会理事, 武谷雄二教授ならびに広報理事, 峯岸 敬教授に御礼申し上げます. またヒトおよびラットを用いた研究の機会を与えてくださいました内藤克輔教授 (山口大), ならびに *in vitro* での実験の機会を与えてくださいました Mario Ascoli 教授 (University of Iowa) に感謝いたします.

引用文献

1. Wing TY, Ewing LL, Zirkin BR (1984) Effects of luteinizing hormone withdrawal on Leydig cell smooth endoplasmic reticulum and steroidogenic reactions which convert pregnenolone to testosterone. *Endocrinology* 115, 2290-2296.
2. Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ (1993) Hor-

- monal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol* 7, 643-650.
3. Shiraishi K, Yoshida K, Naito K (2002) Activation of mitogen activated protein kinases and apoptosis of germ cells after vasectomy in the rat. *J Urol* 168, 1273-1278.
 4. Hardy MP, Zirkin BR, Ewing LL (1989) Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology* 127, 488-490.
 5. Mendis-Handagama SMLC, Ariyaratne HBS (2001) Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 65, 660-671.
 6. Ge R, Hardy MP (2007) Regulation of Leydig cells during pubertal development. In: Payne AH, Hardy MP (eds) *The Leydig Cell in Health and Disease*. Humana Press, New Jersey, pp. 55-70.
 7. Christensen AK, Peacock KC (1980) Increase in Leydig cell number in testes of adult rats treated chronically with an excess of human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod* 22, 383-391.
 8. Teerds KJ, de Rooij DG, Rommerts FFG, Wensing CJG (1988) The regulation of the proliferation and differentiation of rat Leydig cell precursor cells after EDS administration or daily hCG treatments. *J Androl* 9, 343-351.
 9. Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL (2002) The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev* 23, 141-174.
 10. Baker PJ, O'Shaughnessy PJ (2001) Role of gonadotropin in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. *Reproduction* 122, 227-234.
 11. Zhang F-P, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I (2001) Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol* 15, 172-183.
 12. Lei ZM, Mishra S, Zou W, Xu B, Foltz M, Li X, Rao CV (2001) Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol Endocrinol* 15, 184-200.
 13. Weiss J, Axelrod L, Whitcomb RW, Harris PE, Crowley WF, Jameson JL (1992) Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the β subunit of luteinizing hormone. *N Engl J Med* 326, 179-183.
 14. Shiraishi K, Naito K (2003) Fertile eunuch syndrome with the mutations (Trp8Arg and Ile15Thr) in the β subunit of luteinizing hormone. *Endocrine J* 50, 733-737.
 15. Valdes-Socin H, Salvi R, Daly AF, Gaillard RC, Quatresooz P, Tebeu PM, Pralong FP, Beckers A (2004) Hypogonadism in a patient with a mutation in the luteinizing hormone beta-subunit gene. *N Engl J Med* 351, 2619-2625.
 16. Shiraishi K, Ascoli M (2007) Lutropin/Choriogonadotropin stimulate the proliferation of primary culture of rat Leydig cells through a pathway that involves activation of the extracellularly regulated kinase 1/2 cascade. *Endocrinology* 148, 3214-3225.
 17. Khan SA, Khan SJ, Dorrington JH (1992) Interleukin-1 stimulates deoxyribonucleic acid synthesis in immature rat Leydig cells *in vitro*. *Endocrinology* 131, 1853-1857.
 18. Khan SA, Teerds K, Dorrington J (1992) Steroidogenesis inducing protein promotes deoxyribonucleic acid synthesis in Leydig cells from immature rats. *Endocrinology* 130, 599-606.
 19. Ge RS, Hardy MP (1997) Decreased cyclin A2 and increased cyclin G1 levels coincide with loss of proliferative capacity in rat Leydig cells during pubertal development. *Endocrinology* 138, 3719-3726.
 20. Shiraishi K, Ascoli M (2006) Activation of the lutropin/choriogonadotropin receptor (LHR) in MA-10 cells stimulates tyrosine kinase cascades that activate Ras and the extracellular signal regulated kinases (ERK1/2). *Endocrinology* 147, 3419-3427.
 21. Seger R, Hanoch T, Rosenberg R, Dantes A, Merz WE, Strauss III JF, Amsterdam A (2001) The ERK signaling cascade inhibits gonadotropin-stimulated steroidogenesis. *J Biol Chem* 276, 13957-13964.
 22. Cameron M, Foster J, Bukovsky A, Wimalasena J (1996) Activation of mitogen-activated protein kinases by gonadotropins and cyclic adenosine 5'-monophosphates in porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 55, 111-119.
 23. Salvador LM, Maizels E, Hales DB, Miyamoto E, Yamamoto H, Hunzicker-Dunn M (2002) Acute signaling by the LH receptor is independent of protein kinase C activation. *Endocrinology* 143, 2986-2994.
 24. Hirakawa T, Ascoli M (2003) The lutropin/choriogonadotropin receptor (LHR)-induced phosphorylation of the extracellular signal regulated kinases (ERKs) in Leydig cells is mediated by a protein kinase A-dependent activation of Ras. *Mol Endocrinol* 17, 2189-2200.
 25. Martinille N, Holst M, Soder O, Svechnikov K (2004) Extracellular signal-regulated kinases are involved in the acute activation of steroidogenesis in immature rat Leydig cells by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 145, 4629-4634.
 26. Cullen PJ, Lochyer PJ (2002) Integration of calcium and ras signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 339-348.
 27. Hancock JF (2003) Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 373-384.
 28. Stork PJS, Schmitt JM (2002) Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends in Cell Biol* 12, 258-266.
 29. Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, van Triest M, Schwede F, Genieser HG, Doskeland SO, Blank JL, Bos JL (2002) A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nature Cell Biol* 4, 901-906.
 30. Kopperud R, Krakstad C, Selheim F, Ove S, Doskeland SO (2003) cAMP effector mechanisms. Novel twists for an "old" signaling system. *FEBS Lett* 546, 121-126.
 31. Lockyer PJ, Bottomley JR, Reynolds JS, McNulty TJ, Venkateswarlu K, Potter BV, Dempsey CE, Cullen PJ (1997) Distinct subcellular localisations of the putative inositol 1, 3, 4, 5-tetrakisphosphate receptors GAP1IP4BP and GAP1m result from the -GAP1IP4BP PH domain directing plasma membrane targeting. *Curr Biol* 7, 1007-1010.
 32. Lockyer PJ, Wennstrom S, Kupzig S, Venkateswarlu K, Downward J, Cullen PJ (1999) Identification of the ras GTPase-activating protein GAP1(m) as a-phosphatidylinositol-

- 3, 4, 5-trisphosphate-binding protein in vivo. *Curr Biol* 11, 265-268.
33. Roby KF, Son DS, Taylor CC, Montgomery-Rice V, Kirchoff J, Tang S, Terranova PF (2005) Alterations in reproductive function in SRC tyrosine kinase knockout mice. *Endocrine* 26, 169-176.
34. Wayne CM, Fan HY, Cheng X, Richards JS (2007) Follicle-stimulating hormone induces multiple signaling cascades: evidence that activation of Rous sarcoma oncogene, RAS, and the epidermal growth factor receptor are critical for granulosa cell differentiation. *Mol Endocrinol* 21, 1940-1957.
35. Taylor CC (2002) Src tyrosine kinase-induced loss of luteinizing hormone responsiveness is via a Ras-dependent, phosphatidylinositol-3-kinase independent pathway. *Biol Reprod* 67, 789-794.
36. Gye MC, Choi JK, Ahn HS, Kim YS (2005) Postnatal changes in the expression of p60c-Src in mouse testes. *Dev Growth Differ* 47, 233-242.
37. Mizutani T, Shiraishi K, Welsh T, Ascoli M (2006) Activation of the lutropin/choriogonadotropin receptor (LHR) in MA-10 cells leads to the tyrosine phosphorylation of the focal adhesion kinase (FAK) by a pathway that involves Src, family kinases. *Mol Endocrinol* 20, 619-630.
38. Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A (1997) Signal characteristics of G protein transactivated EGF receptor. *EMBO J* 16, 7032-7044.
39. Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402, 884-888.
40. Pierce KL, Tohgo A, Ahn S, Field ME, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2001) Epidermal growth factor (EGF) receptor-dependent ERK activation by G protein-coupled receptors: a co-culture system for identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding EGF shedding. *J Biol Chem*, 276, 23155-23160.
41. Gavi S, Shumay E, Wang HY, Malbon CC (2006) G-protein-coupled receptors and tyrosine kinases: crossroads in cell signaling and regulation. *Trends Endocrinol Metab* 17, 46-52.
42. Shiraishi K, Ascoli M (2008) A co-culture system reveals the involvement of intercellular pathways as mediators of the lutropin receptor (LHR)-stimulated ERK1/2 phosphorylation in Leydig cells. *Exp Cell Res* 314, 25-37.
43. Carpenter G (1999) Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J Cell Biol* 146, 697-702.
44. Luetke NC, Qiu TH, Fenton SE, Troyer KL, Riedel RF, Chang A, Lee DC (1999) Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Development* 126, 739-750.
45. Riese DJ 2nd, Stern DF (1998) Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 20, 41-48.
46. Wong RW, Kwan RW, Mak PH, Mak KK, Sham MH, Chan SY (2000) Overexpression of epidermal growth factor induced hypospermatogenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 275, 18297-18301.
47. Assmus M, Svechnikov K, von Euler M, Setchell B, Sultan T, Zetterström C, Holst M, Kiess W, Söder O (2005) Single subcutaneous administration of chorionic gonadotropin to rats induces a rapid and transient increase in testicular expression of pro-inflammatory cytokines. *Pediatr Res* 57, 896-901.
48. 白石晃司, 内藤克輔 (2005) 黄体化ホルモン β ポリペプチド (LH β). *生体の科学* 56, 524-525.
49. Dufau ML, Tsai-Morris CH, Hu ZZ, Buczeko E (1995) Structure and regulation of the luteinizing hormone receptor gene. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53, 283-291.
50. 岡田 弘, Japanese Male Hypogonadotropic Hypogonadism Study Group, O'Dea L, Decosterd G, Warne D (2006) 無精子であることを確認した低ゴナドトロピン性男子性腺機能低下症患者における精子形成誘導を目的とした遺伝子組み換え型ヒト卵胞刺激ホルモン (r-hFSH) と胎盤性性腺刺激ホルモン (hCG) 併用療法の臨床的検討. *ホと臨*, 54, 725-732.