

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：35302  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2017～2019  
課題番号：17K08128  
研究課題名(和文) 卵巣におけるキスペプチンネットワークの機能

研究課題名(英文) Kisspeptin net work in the ovary

#### 研究代表者

汾陽 光盛 (Kawaminami, Mitsumori)

岡山理科大学・獣医学部・教授

研究者番号：00153007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：GnRHがキスペプチンと共に卵巣に発現している。卵巣におけるキスペプチン発現について関連遺伝子と共に検討した。ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)を投与して黄体化を誘起する幼若ラットモデルと顆粒層細胞の初代培養系を用いて、1) hCG投与によって、卵巣のGnRHとANXA5発現の増加すること、2) hCGとGnRHは、相加的に顆粒層細胞のLH受容体発現を促進し、FSH受容体発現を有意に抑制すること、3) 卵巣のGnRHが、キスペプチン、ダイノルフィン、ニューロキニンBの合成を促進することが明らかになり、黄体化にGnRHが重要な役割を担っていることが示唆された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣での周期的な排卵や黄体形成と退行過程は、主に下垂体ホルモンによって調節されていることは明らかだが、卵巣局所に発現する生理活性物質の役割については不明な部分が大きく残されている。正常な排卵周期の遂行は勿論、多嚢胞性卵巣や卵胞嚢腫などの卵巣疾患の病理発生機序には不明な部分が多く残されており、卵巣局所での生理活性物質の動態について解明が待たれる。本研究は、視床下部下垂体系で発見されたキスペプチン、GnRHについて、卵巣での動態と機能相関について基礎的知見を加えたものである。

研究成果の概要(英文)：GnRH is expressed in the ovary with kisspeptin. The expression of kisspeptin with related genes in the ovary was studied. Immature female rat model of luteinization by human chorionic gonadotropin (hCG) and the primary culture of granulosa cells were used. 1) hCG administration increased GnRH and ANXA5 expression in the ovaries. 2) hCG and GnRH additively promote LH receptor expression in granulosa cells, while FSH receptor expression was significantly suppressed. 3) It was demonstrated that GnRH production is first promoted by LH surge and followed by the synthesis of kisspeptin, dynorphin and neurokinin B by GnRH. These results suggest that GnRH plays an important role in luteinization.

研究分野：獣医生理学

キーワード：GnRH 卵巣 アネキシンA5 キスペプチン ダイノルフィン NKB 顆粒層細胞 hCG

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

GnRH が、生殖を調節する視床下部ホルモンであることはあまりにも有名である。近年、ほ乳類の視床下部で、このGnRH ニューロンの活動を調節する新規の神経ペプチドとしてキスペプチンが同定された。キスペプチンニューロンは、前腹側室周囲核 (AVPV) と弓状核 (ARC) に存在し、それぞれGnRH サージとGnRH パルスの形成を調節している。ARC のキスペプチンニューロンは、ニューロキニンB とダイノルフィンと同時に発現しており、キスペプチンを含む3者が、協調してGnRHのパルス状分泌を調節している。ARC のキスペプチンニューロンを3つの分泌物を略して、特にKNDy ニューロンと呼ぶことがある。キスペプチンは、少なくともほ乳類では、生殖制御の最上位の調節系として注目されている。視床下部の神経ペプチドとして注目されているキスペプチンだが、そもそもメラノーマの転移 (metastasis) を抑制する遺伝子 (KISS1) 産物として発見され、メタスチン (metastin) とも呼ばれる。腫瘍の転移にどのような機序で関わっているのかは不明だが、GnRH もキスペプチンも中枢神経系以外の様々な末梢組織に発現していることから、神経伝達物質として以外のキスペプチンの機能を明らかにする必要がある。

我々は最近ラットを用い、キスペプチンが、卵巣顆粒層細胞に特異的に発現していること、排卵前のLH サージによって発現が著しく促進されることを発見した。驚くことに顆粒層細胞では、ニューロキニンB とダイノルフィンも合成され、それぞれLH サージで増加することが明らかになった。すなわち、顆粒層細胞が視床下部ARC のKNDy ニューロンと同様の性質を持っていることが示された。末梢組織におけるキスペプチンとGnRHの関係、及びGnRHの機能は不明である。そもそもゴナドトロピンを作らない末梢組織では、GnRHの標的細胞を同定することも難しいからである。我々は申請時まで、アネキシンA5 (ANXA5) 合成が、下垂体でGnRHによって特異的に促進されること、ANXA5 がゴナドトロピン分泌促進作用を増強することを発見していた。アネキシンは、ほ乳類に12種類存在するカルシウム-リン脂質結合蛋白質ファミリーである。ANXA5 が末梢組織でもGnRH によって発現の増加することから、ANXA5 をGnRH 作用のバイオマーカーとして利用することが可能で、卵巣では、黄体退行時に黄体細胞のアポトーシスにGnRH が関わっていることを明らかにしていた。排卵前の顆粒層細胞でもANXA5 合成が増加することを確かめており、顆粒層細胞が黄体細胞に分化する過程でキスペプチンを始めとするGnRH やKNDy と呼ばれる視床下部神経ペプチドの関与することは間違いないと考えられた。

## 2. 研究の目的

申請者は、視床下部で、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 神経の活動を調節するキスペプチンが、卵巣の顆粒層細胞にも発現し、排卵前のLH サージによって著しく発現の促進されることを発見・報告した。その産生調節や同じく卵巣でも産生される関連物質のニューロキニンB、ダイノルフィン、GnRH との相互関係、それらが排卵前に急増する生理的意義が未解明である。円滑な周期的排卵には下垂体ホルモンに加えて卵巣局所の調節機構が必須と考えられる。ヒトの多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) やウシの卵胞嚢腫など卵巣疾患は多く、卵巣局所の周期性調節機序の理解は極めて重要である。本研究では、キスペプチンとGnRH を始めニューロキニンB やダイノルフィンによる視床下部で見られる神経ペプチドネットワークの卵巣での機能を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

神経ペプチド間の相互作用と排卵から黄体形成までの卵巣での変化に占める神経ペプチドの役割を明らかにするために、1) 卵巣での神経ペプチド間の相互関係と機能、2) 黄体細胞への分化との関係、3) ステロイド産生への影響を明らかにする実験を行った。ラット顆粒層細胞の初代培養系とhCGで排卵を誘起する幼若ラットモデルを実験系として、遺伝子発現の変化をリアルタイムPCR で追跡した。ステロイド産生能を評価するためにプロジェステロンを測定した。機能分子の卵巣内での空間的関連を組織学的に解析する目的で免疫組織化学を行った。

#### 1) 卵巣での神経ペプチド間の相互関係について

- ① 顆粒層細胞の初代培養：幼若ラット（25 日齢）にeCG を投与し、卵胞発育を促進して2 日後に卵胞から顆粒層細胞を調整する。培養下でhCG を投与して黄体化を促し、それぞれのペプチド及び阻害薬を投与して神経ペプチドの遺伝子発現を測定する。キスペプチン作動薬（kiss10）、キスペプチン阻害薬（p234）、ニューロキニンB、ニューロキニンB 受容体（NK3R）阻害薬（SB222200）、ダイノルフィン、ダイノルフィン阻害薬として $\kappa$ オピオイド受容体アンタゴニスト、GnRH 作動薬、GnRH 拮抗阻害薬（Cetrorelix）を用い、それぞれの遺伝子発現に対する作用とhCG による促進作用に対する影響を調べる。
- ② 全ての因子が顆粒層細胞で発現していることを確かめているが、組織学的に局在を調べて、LHサージによって誘起される卵巣内での変化の実態を明らかにする。

2) 顆粒層細胞の黄体細胞への分化との関係 顆粒層細胞は、LH の作用を受けて細胞周期を停止し、G0/G1 期に止まり黄体細胞へと分化する。神経ペプチドネットワークがLH の下流でこの過程に役割を担っている可能性が高い。

- ① 細胞周期の解析：細胞周期の停止は、cyclinとcyclin-dependent kinases (Cdks)の抑制で起こる。Cdk を抑制するp21cip、 p27kip1 がLH サージによって増加する。p27kip1 ノックアウト動物では、黄体化の過程で顆粒層細胞の過形成が見られる。申請者は、キスペプチンの拮抗阻害薬であるp234を卵巣嚢内に微量投与することで、新生黄体の過剰増殖像を観察しており、キスペプチンとp27kip1 の関係を推定している。顆粒層細胞の初代培養系で、LH の細胞周期停止作用に対する神経ペプチドの影響を解析する。遺伝子発現解析とともにたんぱく質リン酸化をウエスタンブロット法で解析する。
- ② 黄体化に伴い変動する遺伝子の解析：LH サージ後に急増する遺伝子群の変化への各神経ペプチドの作用を明らかにする。リアルタイムPCR とウエスタンブロット法を用いる。

#### 3) 黄体細胞のステロイド産生能に対する影響

- ① プロジェステロンの測定：プロジェステロンを測定することでステロイド産生能を評価できる。顆粒層細胞の初代培養系を用い、hCG で黄体化を促し、各神経ペプチドのプロジェステロン合成に対する影響を調べる。

### 4. 研究成果

未成熟雌ラット（25日齢）に妊馬血清性性腺刺激ホルモン（PMSG）を投与して卵胞を發育させ、2日後に（hCG：ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン）を投与して黄体化を誘起するという幼若ラットモデルと顆粒層細胞の初代培養系を用いて実験を行った。

1）hCG投与によって黄体化が起こり、ステロイド合成能の促進される時、卵巢のGnRH mRNA発現が有意に増加し、顆粒層細胞にANXA5の発現することが明らかになった。2）初代培養顆粒層細胞で、hCGのプロジェステロン合成促進作用を、GnRHおよびGnRHアゴニストが抑制し、hCGとGnRHに相互作用のあることが明らかになった。3）hCGとGnRHは、相加的に顆粒層細胞のLH受容体発現を促進し、FSH受容体発現を有意に抑制した。4）黄体化に関する遺伝子（p21、p27、FOXO1、プロラクチン受容体）の発現に対する作用もhCGとGnRHは相加的だった。これらの結果から、LHによって顆粒層細胞から黄体細胞へ分化する多くの過程にGnRHの介在することが明らかになった。

顆粒層細胞では、GnRHがキスペプチン発現を促進すること、視床下部とは異なりキスペプチンはGnRH発現に影響しないこと、GnRHはニューロキニンBとダイノルフィンの発現も促進した結果は、LHサーージ後の顆粒層細胞黄体化の過程でこれら神経ホルモンが相互作用していることを示唆している。

以上の如く、GnRHとキスペプチン、ダイノルフィン、ニューロキニンBの顆粒層細胞内発現に着目し、これら全ての視床下部因子が顆粒層細胞に発現していること、hCGによって発現の増加することをインビボ、インビトロで明らかにした。更にGnRHがキスペプチン発現を促進すること、視床下部とは異なりキスペプチンはGnRH発現に影響しないことを明らかにした。hCGを投与した動物の卵巢で各遺伝子の発現を調べ、hCGによってまずGnRH合成が刺激され、次いでGnRHがキスペプチン、ダイノルフィン発現を増強していることが示唆された。即ちLHサーージ後に卵巢では、まずGnRH産生が促進され、次いでキスペプチン、ダイノルフィン、ニューロキニンBの合成が促進されること、黄体化にGnRHが重要な役割を担っていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Doungrut T, Fungbun N, Laoharatchatathanin T, Terashima R, Kurusu S, and Kawaminami M.	4. 巻 64
2. 論文標題 Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist on human chorionic gonadotropin activity in granulosa cells of immature female rats.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Reprod Dev	6. 最初と最後の頁 129-134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2017-142. Epub 2017 Dec 15.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Fungbun N, Tungmahasuk D, Terashima R, Kurusu S, Kawaminami M	4. 巻 80(1)
2. 論文標題 Annexin A1 is a novel target gene of gonadotropin-releasing hormone in L T2 gonadotrope cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci.	6. 最初と最後の頁 116-124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.17-0569	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takeda T, Shirasaka M, Sugiyama M, Terashima R, Kawaminami M, Kurusu S	4. 巻 80(1)
2. 論文標題 In vivo evidence for possible up-regulating roles of lysophosphatidic acid around fertilization in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci.	6. 最初と最後の頁 41-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.17-0354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Funahashi R, Sakamoto T, Taguchi N, Naiki R, Kawaminami M, Kurusu S	4. 巻 79(6)
2. 論文標題 Possible role of PPAR in the negative regulation of ovulatory cascade and luteal development in rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci.	6. 最初と最後の頁 1043-1051
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.17-0162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 11件）

1. 発表者名 汾陽光盛
2. 発表標題 GnRH-アネキシンA5研究で見えた性腺刺激ホルモン分泌調節の新機構
3. 学会等名 日本下垂体研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 汾陽光盛、Numfa Fungbun、寺島涼太、田中優希、久留主志朗
2. 発表標題 新規のGonadotropin releasing hormone (GnRH)感受性たんぱく質アネキシンANXA1
3. 学会等名 日本アネキシン研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 汾陽光盛
2. 発表標題 GnRHの生理機能
3. 学会等名 日本獣医師会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Numfa Fungbun, Ryota Terashima, Shiro Kurusu, Mitsumori Kawaminami
2. 発表標題 Distribution of Annexin A1 (ANXA1) in the Anterior Pituitary Tissue and the Effect on LH Secretion
3. 学会等名 ENDO2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Doungrut Tungmahasuk, Ryota Terashima, Shiro Kurusu, Mitsumori Kawaminami
2. 発表標題 Augmentation of granulosa cell expression of kisspeptin/metastin, neurokinin B, dynorphin and GnRH by hCG: interrelationship between peptides and effects on progesterone synthesis in female rats
3. 学会等名 the 99th Annual Meeting of the Endocrine Society ( 国際学会 )
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fungbun N, Sugiyama M, Terashima R, Kurusu S, Kawaminami M
2. 発表標題 GnRH Yields Membrane Particles Containing Annexin A5 (ANXA5) from Gonadotrophs and Their Enhancement of LH Release
3. 学会等名 the 99th Annual Meeting of the Endocrine Society ( 国際学会 )
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Doungrut Tungmahasuk, Ryota Terashima, Shiro Kurusu, Mitsumori Kawaminami
2. 発表標題 GnRH-ANXA5 suppression of progesterone synthesis and cell growth in the primary culture of granulosa cells
3. 学会等名 International conference on annexins ( 国際学会 )
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kawaminami M, Terashima R, Kurusu S
2. 発表標題 Involvement of ANXA5 in Gonadotrophin releasing hormone (GnRH) action in the endocrine pancreas
3. 学会等名 International conference on annexins ( 招待講演 ) ( 国際学会 )
4. 発表年 2017年

1 . 発表者名 Shirasaka M, Masuda K, Toda M, Sugiyama M, Terashima R, Kawaminami M, Kurusu S
2 . 発表標題 Autotaxin (ATX) in the circulating blood in pregnant rats: multiple sources and possible regulatory role in parturition
3 . 学会等名 Fourth World Congress of Reproductive Biology ( 国際学会 )
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Kawaminami M, Sekine H, Yamasaki K, Wakai M, Hirose H, Amano K, Terashima R, Kurusu S
2 . 発表標題 Luteinizing hormone stimulation of GnRH expression in the testicular interstitial cells
3 . 学会等名 Fourth World Congress of Reproductive Biology ( 国際学会 )
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Kawaminami M, Terashima R, Kurusu S
2 . 発表標題 Pancreatic GnRH is essential for constitutive expression of insulin in islet b cells
3 . 学会等名 the 99th Annual Meeting of the Endocrine Society ( 国際学会 )
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Kawaminami M, Laoharatchathanin T, Terashima R, Kurusu S
2 . 発表標題 Prolactin decreases mast cell number in the ovary of female rats
3 . 学会等名 FASEB meeting on Growth Hormone/Prolactin Family in Biology and Disease ( 国際学会 )
4 . 発表年 2017年



1. 発表者名 Terashima R, Kurusu S, Kawaminami M
2. 発表標題 The expression of Nr4a3 is augmented by Gonadotrophin releasing hormone (GnRH) and suppressed by ANXA5 in the pituitary gonadotroph: Inhibitory action of Nr4a3 on follicle stimulating hormone subunit expression
3. 学会等名 International Conference on Annexins (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fungbun N, Sugiyama M, Terashima R, Kurusu S, Kawaminami M
2. 発表標題 Gonadotrophin releasing hormone (GnRH) stimulation of extracellular vesicle formation containing ANXA5 from pituitary gonadotrophs
3. 学会等名 International Conference on Annexins (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 寺島涼太、池尾真人、長尾大喜、久留主志朗、汾陽光盛
2. 発表標題 発情前期ラットの下垂体における性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) による核内受容体Nr4a3の発現促進
3. 学会等名 第160回日本獣医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 久留主志朗、船橋諒平、坂本貴信、田口範人、内木諒介、寺島涼太、汾陽光盛
2. 発表標題 ラットの排卵カスケードと黄体発育に対するPPAR の負の調節作用
3. 学会等名 第160回日本獣医学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 インスリン分泌刺激剤	発明者 汾陽光盛	権利者 北里大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-171992	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	久留主 志朗  (Kurusu Shiro)  (50215076)	北里大学・獣医学部・教授   (32607)	
研究 分担者	寺島 涼太  (Terashima Ryota)  (50733630)	北里大学・獣医学部・助教   (32607)	