

平成 21 年 6 月 11 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2006 年度～2009 年度  
 課題番号：18791166  
 研究課題名 (和文) GnRH 神経細胞におけるエストロゲン・プロゲステロン調節遺伝子の解析  
 研究課題名 (英文) The analysis of estrogen/progesterone responding genes in GnRH neuronal cells

研究代表者  
 吉田 浩 (YOSHIDA HIROSHI)  
 横浜市立大学市民総合医療センター 婦人科 助教  
 研究者番号 50405007

研究成果の概要：GT1 細胞を用いたマイクロアレイ法にてエストロゲンまたは・およびプロゲステロンにより調節される遺伝子をスクリーニングした。その中で NO synthetase 3 に着目し GT1 細胞内での発現パターンと分泌調節へのかかわりについて検討した。さらに calcium sensing receptor の豊富な発現を認め、同様にその発現パターンと分泌調節への関係について検討した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,900,000	0	1,900,000
2007 年度	700,000	0	700,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	150,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科

キーワード：生殖医学

1. 研究開始当初の背景 GnRH は視床下部よりパルス状に分泌され、下垂体ホルモンである性腺刺激ホルモン (FSH) あるいは黄体化ホルモン (LH) の分泌を制御し、生殖機能維持において根幹をなすホルモンである。GnRH のパルス周期の変化は生殖機能発現に極めて密接に関与していると考えられている。GnRH パルス周期の変化はどのようなメカニズムで生じるのかはほとんど研究されていない。GnRH のパルス状分泌の周期の決定因子として GnRH 神経細胞の興奮性が重要である。エストロゲンあるいはプロゲステロンがその興奮性を制御している蛋白の発現調

節に強く関与していると予想し、GnRH 分泌細胞において性ステロイドにより発現制御されている遺伝子を解析しその機能について検討することを目的とする。

2. 研究の目的 エストロゲンあるいはプロゲステロンがその興奮性を制御している蛋白の発現調節に強く関与していると予想し、GnRH 分泌細胞において性ステロイドにより発現制御されている遺伝子を解析しその機能について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) DNA マイクロアレイ法による GT1 細胞における性ステロイド調節性遺伝子の解析  
(2) Northern blot、Real time PCR 法による遺伝子発現調節の確認 (3) siRNA アデノウイルスの作成およびアデノウイルスを用いた発現調節が確認された遺伝子の GT1 細胞における機能解析 (4) 蛍光カルシウム試薬による Calcium Oscillation の観察 (5) 細胞還流装置による GnRH パルスの観察

4. 研究成果 まずマウス GnRH 神経細胞株である GT1 細胞を、0.01~100nM まで段階的にエストラジオールにて刺激を行なった。total RNA を抽出し、エストロゲン受容体 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) 及びプロゲステロン受容体の発現誘導について半定量 PCR 法を用いて検討した。GT1 細胞にはエストロゲン受容体  $\alpha$  および  $\beta$  が発現しており、これらはエストロゲン添加による発現調節を受けていなかった。一方プロゲステロン受容体は、エストロゲン非存在下ではほとんど発現していないのに対し、エストロゲン添加によりおおむね濃度依存性に発現が誘導されることが明らかとなった。これらの結果をもとに、GT1 細胞をエストロゲン無添加のもと、100nM エストラジオールにて刺激を行なったものから DNA マイクロアレイ法にてエストロゲンによる発現調節を受ける遺伝子のスクリーニングを行った。また、同様にしてエストロゲン 100nM 及びプロゲステロン 10pM 刺激下における誘導遺伝子のスクリーニングを DNA マイクロアレイ法にて検討した。DNA マイクロアレイ法により、エストロゲン添加により有意に発現が増加あるいは減少する遺伝子はそれぞれおよそ 150 個存在した。また同様にしてプロゲステロンにより誘導される遺伝子についてもほぼ同様の遺伝子発現の変化を示すことが明らかとなった。興味深い遺伝子として、NO synthetase 3 (NOS3) が挙げられる。本遺伝子は、今回のマイクロアレイ法により GT1 細胞においてエストロゲン存在下で有意に増加し、プロゲステロン存在下で減少する結果が得られた。性ステロイドによる GT1 細胞における NOS3 発現調節を real time PCR 法を用いて検討した。NOS3 遺伝子はエストロゲン存在下でおよそ 1.5~2.1 倍に増加した。一方、予想に反してプロゲステロン存在下ではその発現量に変化が見られなかった

さらに、NOS3 遺伝子特異的にノックダウンさせる siRNA を 3 種デザインし、目的遺伝子のノックダウン効率を直接 GT1 細胞へ遺伝子導入することにより検定した。この中でもっとも低濃度で NOS3 発現を抑えられた siRNA はほぼ 100% の NOS3 蛋白発現抑制が見られた。これを元に、GT1 細胞内で siRNA 発現を導入する組み替えアデノウイルス作成を開始した。あらかじめ他施設より

入手したコントロール実験用アデノウイルスでは GT1 細胞の GnRH 分泌に影響は見られなかったのに対し、新規作成した NOS3 siRNA 発現アデノウイルスは 1~5MOI においても細胞毒性が強いことがわかった。GT1 細胞への障害は予想以上に強く、増殖曲線に影響を及ぼすばかりでなく、細胞内カルシウム蛍光色素 Fura2 を簡易的に用い、観察したところ、カルシウムオシレーションの観察頻度も著しく低下していた。

細胞毒性により、一旦予定していた還流実験ではなく、static culture study への簡易的な実験系に変更したが、siRNA 発現アデノウイルスに感染させた GT1 細胞は培養皿から容易に剥脱してしまうなどのトラブルにより、いまだ実験結果が得られていない。今後も本実験系が継続できるのであれば、細胞接着剤、ビーズなどへの接着を考慮している。

さらに、今回のスクリーニングにより、calcium sensing receptor が豊富に発現していることが明らかとなった。本遺伝子はエストロゲン・プロゲステロンによる発現調節は示唆されていないものの、近年細胞間の情報伝達機構の一つとして報告されている蛋白である。

以下は、予備実験得られたデータである。GT1-7 より抽出した RNA を用い RT-PCR 法を用いて calcium sensing receptor の発現を検討した。図 1 にその結果を示す。左から 3 レーンに 1007bp の特異的バンドを検出した。

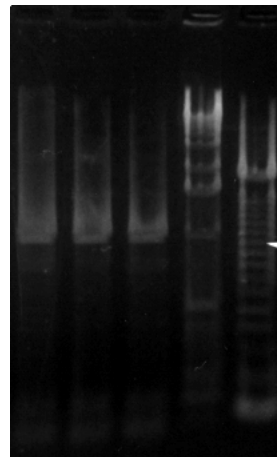


図 1

さらに、培養 GT1-7 細胞を抗 calcium sensing receptor 抗体を用い免疫染色を行った。細胞膜特異的に発現しているのがわかる (図 2)。

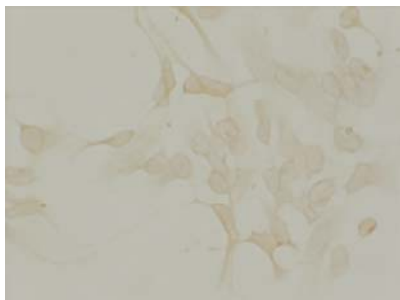


図 2  
また、calcium sensing receptor の非特異的の刺激剤 spermine を投与すると、GT1-7 細胞の細胞内カルシウム濃度が上昇することが確認された。

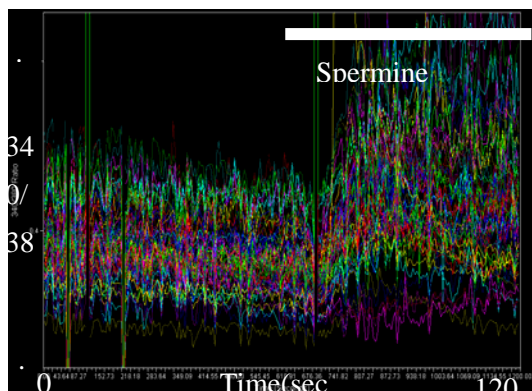
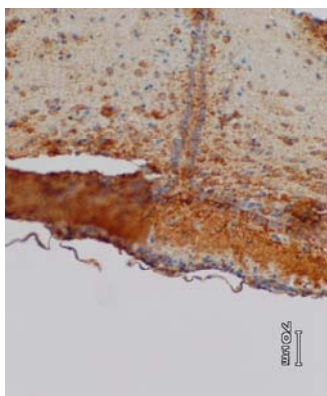


図 3,  
また、calcium sensing receptor はマウス脳 median eminence に豊富に発現していることがわかった (図 4)。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

B. E. Blackman, H. Yoshida, S. Paruthiyil and R. I. Weiner Frequency of intrinsic

pulsatile secretion is regulated by the expression of cyclic nucleotide gated channels in GT1 cells. *Endocrinology*. 2007 Jul;148(7):3299-306. (査読あり)

〔学会発表〕 (計 2 件)

1) Hiroshi Yoshida, Makiko Koyama, Hideya Sakakibara, Fumiki Hirahara Regulation of GnRH secretion from immortalized GnRH Neuronal Cell Line by Calcium Sensing Receptor. Annual meeting of American Endocrine Society, 2006, 6, Boston

2) 吉田 浩、神田義明、榊原秀也、平原史樹 マウス妊娠子宮におけるカルシウムセンシングレセプターの発現. 日本産科婦人科学会学術集会 2007.4 京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 浩 (YOSHIDA HIROSHI)

横浜市立大学市民総合医療センター婦人科 助教

研究者番号 50405007

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし