

機関番号：15201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591916

研究課題名 (和文)

ゴナドトロピン分泌における大脳視床下部生理活性物質の作用機序に関する研究

研究課題名 (英文)

The role of hypothalamic neuropeptides in the regulation of gonadotropins

研究代表者

宮崎 康二 (MIYAZAKI KOHJI)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：50145322

研究成果の概要 (和文)：

静止刺激において GnRH は刺激 60 分後より MKP1 発現を増加させた。GnRH パルス刺激において MKP1 発現は高頻度 GnRH 刺激において低頻度刺激に比べて優位に増加した。高頻度 GnRH 刺激では刺激開始 2 時間後 (GnRH パルス 4 回) より MKP1 の発現を認めたが、低頻度 GnRH 刺では 12 時間後 (GnRH パルス 6 回) も発現は認めなかった。GnRH 投与量を増加させても低頻度 GnRH パルス刺激において MKP1 発現は増強せず、高頻度 GnRH パルス刺激のみに発現を認めた。各 GnRH パルスにて一過性の ERK リン酸化—脱リン酸化反応が生じるが、この時 MKP1 発現の変動は認めなかった。MKP1 発現には GnRH パルスの間隔及びパルス数の両方が重要であると考えられた。MKP1 発現は高頻度 GnRH 刺激に特異的に生じることから、GnRH パルス頻度依存的ゴナドトロピンサブユニット発現に関与する可能性がある。

研究成果の概要 (英文)：

In this present study, we examined the expression of MKP-1 by GnRH stimulation and investigated the possible role of MKP-1 on gonadotropin gene expression using gonadotroph cell line, LβT2 cells. MKP-1 expression was remarkably increased 60 minutes after GnRH stimulation and ERK activation was gradually decreased after 60 minutes. GnRH-induced ERK activation was completely inhibited in the presence of U0126, a MEK inhibitor, whereas GnRH-induced MKP-1 expression was partially inhibited by U0126. GnRH-induced MKP-1 induction was inhibited by dose dependently in the presence of triptolide, a diterpenoid triepoxide. On the other hand, ERK activation was potentiated at this time by this compound. U0126 prevented GnRH-stimulated gonadotropin LHβ and FSHβ subunit promoter activity by dose dependently. Whereas, GnRH-stimulated LHb and FSHb promoter activities were almost completely inhibited by triptolide. In addition, under pulsatile GnRH stimulation, MKP-1 expression was observed in high frequency GnRH pulse which preferentially increase LHb, but not in low frequency pulse under which FSHb preferentially increased. Our study demonstrated that MKP-1 induced by GnRH works not only as an ERK-inactivating phosphatase, but also as an important mediator which control gonadotropin subunit gene expressions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000 円	360,000 円	1,560,000 円
2009 年度	1,200,000 円	360,000 円	1,560,000 円
2010 年度	1,000,000 円	300,000 円	1,300,000 円
年度			
年度			
総計	3,400,000 円	1,020,000 円	4,420,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：ゴナドトロピン、下垂体、GnRH、ERK、MKP

1. 研究開始当初の背景

成人女性の内分泌機構は視床下部-下垂体-卵巣系により制御されており、視床下部から分泌されるゴナドトロピン放出因子 (GnRH) が下垂体前葉に作用し、下垂体前葉からゴナドトロピンが分泌され、ゴナドトロピンは卵巣から性ステロイドホルモンを分泌させる。この視床下部-下垂体-卵巣間のネットワークが正常に働くことが、生殖可能年齢の女性における卵巣発育及び排卵をもたらすことになる。月経異常あるいは不妊を訴えて来院する女性の中で排卵障害を有する割合は高く、中でも視床下部-下垂体機能異常による機能不全の頻度は高く、ゴナドトロピン分泌へ至る視床下部-下垂体間の調節機構の詳細を知ることはゴナドトロピン分泌不全や多嚢胞性卵巣症候群に代表される分泌異常症の病態を解明し、新たな治療法を確立する上で重要であると考えられる。

2. 研究の目的

ゴナドトロピンサブユニット発現に Extracellular signal-regulated kinase (ERK) の活性化が重要とされているが、MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1) は ERK を脱リン酸化して不活性化する。GnRH は視床下部よりパルス状に分泌され、高頻度 GnRH 刺激では LH 優位、低頻度 GnRH 刺激では FSH が優位に発現することが知られている。GnRH による MKP1 発現及び GnRH パルスの頻度と MKP1 発現について検討し、GnRH パルス頻度依存性ゴナドトロピンサブユニット発現機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ゴナドトロピン産生モデル細胞として LbT2 細胞を用い、刺激は Perfusion system を用い、5 分間の GnRH 刺激を 30 分間隔で行う高頻度 GnRH パルス刺激と 120 分間隔で行う低頻度 GnRH パルス状刺激を行った。MKP1 発現および ERK 活性化はウェスタンブロッティング法にて測定した。

4. 研究成果

(1) GnRH による ERK 活性化反応及び MKP1 発現

GnRH 受容体は Gq 蛋白共役型受容体であり、GnRH の結合により PLCβ を介して IP3、ジアシルグリセロール (DG) を産生させ、DG がプロテインキナーゼ C を介して ERK を活性化する。GnRH を直接細胞に添加する静止刺激におい

て ERK は刺激 10 分後をピークに活性化され、活性は 1 時間後以降減弱した。一方 ERK 脱リン酸化酵素である MKP1 は GnRH 刺激後 60 分後より発現を認め、発現は 2 時間以降も持続した。MKP1 発現に伴い ERK が不活性化されるパターンが明らかになった。

(2) MKP1 発現は ERK 依存性である

GnRH により MKP1 発現が起こるが、ERK 阻害剤 (MEK 阻害剤) の存在下では、GnRH による MKP1 発現が起こらなかった。また GnRH による MKP1 発現は MEK 阻害剤により濃度依存性に抑制された。このことは MKP1 は ERK 脱リン酸化酵素であるが、その発現が ERK に依存することが明らかとなった。

(3) MEK 阻害剤によるゴナドトロピン発現及び MKP1 阻害剤トリプトライドの効果

ゴナドトロピンサブユニット発現に ERK 活性化が重要であると言われている。つまり GnRH による LHβ、FSHβ プロモーター活性化反応は MEK 阻害剤の存在下でほぼ抑制される。MKP1 発現阻害剤トリプトライド存在下で、MKP1 発現は抑制され、同時に ERK 活性化反応は増強する。しかし、ERK 増強によってもゴナドトロピンプロモーター活性の増加は見られず、逆にゴナドトロピン発現がほぼ抑制された。このことは ERK 活性は重要であるが、ERK 依存性に発現する MKP1 そのものもゴナドトロピンサブユニット発現に何らかの役割を果たしている可能性が考えられた。

(4) パルス状 GnRH 刺激と MKP1 発現

静止 GnRH 刺激では GnRH 刺激 60 分後以降に MKP1 発現が見られた。視床下部 GnRH は生体内においてはパルス状に分泌されており、静止・持続的な刺激形態はあり得ない。また、ゴナドトロピン LHβ 及び FSHβ サブユニットは高頻度 GnRH パルスでは LHβ 優位、低頻度 GnRH パルス刺激では FSHβ が優位に発現するという GnRH パルス頻度依存性ゴナドトロピンサブユニット発現能を持つ。30 分毎に 5 分間の GnRH パルスを投与する高頻度刺激と、120 分毎に投与する低頻度刺激を細胞に 12 時間加えたと、12 時間後、高頻度 GnRH 刺激にのみ MKP1 発現を認めた。GnRH 濃度を 4 倍にして低頻度刺激を加えても、MKP1 発現は生じなかった。

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 13 件)

1. Kanasaki H, Oride A, Miyazaki K. Paracrine control of gonadotrophs by somatolactotrophs through TRH-induced follistatin production. The Open Neuroendocrinology Journal, in press, 2011
2. Kanasaki H, Purwana IN, Oride A, Mijiddorj T Miyazaki K. Possible Involvement of PACAP and PACAP type 1 Receptor in GnRH-Induced FSH α -Subunit Gene Expression. Regulatory Peptides 167, 227-232, 2011
3. Purwana IN, Kanasaki H, Oride A, Mijiddorj T Miyazaki K. Induction of Dual Specificity Phosphatase 1 (DUSP1) by Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone Stimulation and the Role of Gonadotropin Subunit Expression. Biology of Reproduction, in press, 2011
4. Oride A, Kanasaki H, Purwana IN, Miyazaki K. Effects of metformin administration on plasma gonadotropin levels in women with infertility, with an in vitro study of the direct effects on the pituitary gonadotrophs. Pituitary 13; 236-241, 2010
5. Purwana IN, Kanasaki H, Oride A, Miyazaki K. Induction of Dual Specificity Phosphatase 1 (DUSP1) by Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) and the Role for Gonadotropin Subunit Gene Expression in Mouse Pituitary Gonadotroph LbetaT2 Cells. Biology of Reproduction 82; 352 – 362, 2010
6. Purwana IN, Kanasaki H, Oride A, Mijiddorj T, Shintani N, Hashimoto T, Baba A and Miyazaki K. GnRH-induced PACAP and PAC1 Receptor Expression in Pituitary Gonadotrophs: A Possible Role in the Regulation of Gonadotropin Subunit Gene Expression. Peptides 31; 1748-1755, 2010
7. Oride A, Kanasaki H, Purwana IN, Miyazaki K. Follistatin, induced by Thyrotropin-releasing hormone (TRH), plays no role in prolactin expression but affects gonadotropin FSH β expression as a paracrine factor in pituitary somatolactotroph GH3 cells. Regulatory Peptides 156; 65-71, 2009
8. Kanasaki H, Mutiara S, Oride A, Purwana IN, Miyazaki K. Pulse frequency-dependent gonadotropin gene expression by adenylate cyclase-activation polypeptide 1 in perfused mouse pituitary L β T2 cells. Biology of Reproduction 81; 465-472, 2009
9. Oride A, Kanasaki H, Purwana IN, Miyazaki K. Possible Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 (MKP-1) in Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH)-induced Prolactin Gene Expression. Biochemical and Biophysical Research Communications 382; 663-667, 2009
10. Mutiara S, Kanasaki H, Oride A Shimasaki S, Yamamoto H, Miyazaki K: Follistatin gene expression by gonadotropin-releasing hormone: role for cyclic AMP and mitogen-activated protein kinase signaling pathway in clonal gonadotroph L β T2 cells. Molecular and Cellular Endocrinology 307; 125-32, 2009
11. Oride A, Kanasaki H, Mutiara S, Purwana IN, Miyazaki K: Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) and Induction of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 1 (MKP1) by Perfused Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Stimulation in Rat Pituitary GH3 Cells. Molecular and Cellular Endocrinology 296; 78-86, 2008
12. Kanasaki H, Mutiara S, Oride A, Miyazaki K: Up-regulation of gonadotropin α -subunit gene by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in clonal gonadotroph cells. Neuroendocrinology Letters 29; 529-535, 2008
13. Mutiara S, Kanasaki H, Harada T, Oride A, Miyazaki K: The Involvement of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Gonadotropin- Releasing Hormone Induced Gonadotropin α - and FSH β Subunit Gene Expression in Clonal Gonadotroph L β T2 Cells. Molecular and Cellular Endocrinology 283; 1-11, 2008

〔学会発表〕（計 4 件）

1. ギナドトロピン産生細胞における GnRH と PACAP の相互作用について
金崎春彦、折出亜希、インドリ プルワナ、石川雅子、今村加代、片桐敦子、山上育子、中山健太郎、青木昭和、宮崎康二
2010 年 4 月 23 日 第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会、東京
2. プロラクチン産生細胞におけるフォリスタチン発現とギナドトロピン合成に対する影響について
金崎春彦、折出亜希、インドリプルワナ、宮崎康二
2009 年 4 月 3 日 第 61 回日本産科婦人科学会学術講演会、京都市
3. 中枢神経系に存在する Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) によるギナドトロピンの産生調節
金崎春彦
シンポジウム 2（中枢神経関連物質の生殖機能へのかかわり）
2009 年 4 月 3 日 第 61 回日本産科婦人科学会学術講演会、京都市
4. ギナドトロピン産生細胞における PACAP の役割について
金崎春彦、原田 崇、サンドラ ムティアラ、折出亜希、宮崎康二
2008 年 4 月 12 日 第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会、横浜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 康二 (MIYAZAKI KOHJI)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：50145322

(2) 研究分担者

金崎 春彦 (KANASAKI HARUHIKO)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：10325053

折出 亜希 (ORIDE AKI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：00423278

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

