

平成22年 6月10日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780210
 研究課題名（和文） 卵胞発育シグナルとしての局所ゴナドトロピン放出ホルモンによる
 黄体退行機序の解明
 研究課題名（英文） Mechanisms of luteolysis via local GnRH as a follicular developing
 signal.
 研究代表者
 米澤 智洋 (YONEZAWA TOMOHIRO)
 北里大学・獣医学部獣医学科・講師
 研究者番号：10433715

研究成果の概要（和文）：ラットでは、黄体形成から3日目にあたる発情休止期2日目の午後に黄体の退行が決定する。本研究によって、黄体局所にこの時期特異的に発現するメタスチン、ゴナドトロピン放出ホルモンが黄体のアポトーシスを引き起こすこと、そしてそれらの発現は次回排卵のための発育卵胞から分泌されるエストロゲンが引き金であることが明らかとなった。この発見は繁殖障害の軽減や不妊治療につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：Corpora lutea in rats start to regress in the afternoon of diestrus 2. In the present study, metastin and gonadotropin releasing hormone were expressed stage-specifically, which was caused by estrogen from next-developing follicles. These findings could make contributions to avoidance of breeding disorders and fertility treatments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：ゴナドトロピン放出ホルモン、アネキシンA5、黄体退行、メタスチン、アポトーシス、卵巣、性周期、エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の卵巣は、卵胞発育、排卵、黄体形成、その退行が周期的に繰り返される、極めて動的な器官である。この周期的変化には障害も生じやすく、黄体退行遅延をはじめとす

る卵巣周期不全は深刻な社会問題となっている。本研究の代表者は、分子生物学的知見および内分泌学的知見の豊富なラットを用いて、この問題を解決することを企図している。

ラットの黄体は、黄体形成から3日目にあたる発情休止期2日目の午前までに、プロラクチン(PRL)の刺激を受けることで、十数日間にわたりプロゲステロン産生能が維持される。ところが、同日の午後以降にPRLの刺激を開始しても効果は無く、黄体はアポトーシスを起こし、退行する。すなわち、発情休止期2日目には、黄体細胞に不可逆的な機能変化が起り、黄体の退行が運命づけられている。しかし、この機能変化が何によってもたらされているのかはまるで解っていない。

これまでに代表者らは、黄体局所に発現するゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)と、それによって発現の増加するアネキシン5 (AX5)が、黄体の退行に密接に関与すること、これらの遺伝子発現の上昇は、次世代の卵胞発育時期と一致してみられることを示してきた。GnRH拮抗阻害薬を卵巣嚢内に局所投与すると、AX5の発現が抑制されるとともに、アポトーシスを起こす黄体細胞が消失し、発情休止期が持続することを明らかにした。これらの成果は、黄体細胞に存在するGnRHとAX5の時期特異的な増加が、黄体の退行に必須であることを示唆している。また、近年、GnRHの促進物質であるMetastinが発見された。視床下部Metastin産生ニューロンはエストロゲンにより分泌制御され、排卵のためのGnRHサージを引き起こしていると考えられている。MetastinもGnRHと同様、卵巣を含む様々な末梢組織中に発現が認められているにもかかわらず、繁殖生理学的な機能との関連については未解明のままである。

2. 研究の目的

本研究では、GnRH-AX5系を時期特異的に活性化するメカニズムを追究するとともに、GnRH-AX5系の活性化からアポトーシスが起きるまでのシグナル因子を同定することで、卵胞発育シグナルとしての黄体局所のGnRHによる黄体退行の制御機構を解明することとした。

具体的には、(1)黄体退行過程における卵巣のMetastin、GnRH、AX5の発現動態、(2)卵巣局所におけるエストロジェンの作用による黄体退行の制御、(3)黄体細胞の不可逆的な機能変化に関連する細胞内物質の探索、(4)GnRH-AX5系を抑制するPRLの作用点の解明、の4課題に取り組み、黄体退行時におけるGnRH-AX5系とこれに関連する生理活性物質の相互作用について追究することとした。

3. 研究の方法

(1)黄体退行過程における卵巣のMetastin、GnRH、AX5の発現動態

成熟雌Wistar-Imamichi系ラットを実験に供し、性周期の各段階の卵巣、および副生殖器官を摘出した。得られたサンプルは、Metastin、GnRH、AX5についてReal-time PCRもしくは免疫組織化学染色を行ない、各遺伝子の時空間的な転写発現量の動態を調べた。

(2)卵巣局所におけるエストロジェンの作用による黄体退行の制御

次回性周期の卵胞によるエストロゲンによって黄体退行を発動することができるか、in vivo実験にて検証した。エストロゲン、もしくはMetastinを7日間駆出型のオスモティックミニポンプで卵巣に局所的に投与し、血中ホルモン分泌動態の測定と性周期の検定を行うとともに、卵巣の免疫組織化学染色による形態観察をおこなった。

(3)黄体細胞の不可逆的な機能変化に関連する細胞内物質の探索

発情休止期2日目午前PRL投与/対照投与群を作成し、投与より2日後に卵巣を摘出して、黄体の各種遺伝子転写量について解析した。さらに、同様のサンプルからタンパク質を抽出し、変化の認められたアポトーシス関連因子についてウェスタンブロットを行うことで発現量の変化を調べた。

(4)GnRH-AX5系を抑制するPRLの作用点の解明

黄体の器官培養系を用いて実験を行った。培養液中にPRL、Metastin、GnRHもしくはその拮抗阻害薬を添加し、黄体細胞のアポトーシス関連因子の発現変化をReal-time RT-PCRおよびウェスタンブロット法を用いて測定した。

4. 研究成果

(1)黄体退行過程における卵巣のMetastin、GnRH、AX5の発現動態

成熟雌ラットの性周期の各段階の黄体において、GnRH-AX5系の遺伝子が黄体退行の決定する発情休止期2日目午後から特異的に増加すること、そしてこれらのタンパクはアポトーシスシグナル陽性細胞に近接して存在することが示された。さらに、GnRHの発現を促すとされるMetastinが黄体に発現することも明らかにした。また、乳腺にも同様にGnRHとAX5を発現する細胞が存在することを発見した。

(2)卵巣局所におけるエストロジェンの作用による黄体退行の制御

エストロゲン、もしくはMetastinをオスモティックミニポンプで卵巣に局所的に投与したところ、黄体のGnRH、AX5発現が増

加するとともに、アポトーシス細胞が観察された。エストロジェンの拮抗阻害薬を投与したところ、GnRH、AX5 の発現低下とアポトーシスの減少がみられた。その過程に、いくつかの脂質メディエータが関与している可能性が示された。その際、エストロジェンの骨成長への影響も serendipitous に発見した。

(3) 黄体細胞の不可逆的な機能変化に関連する細胞内物質の探索

発情休止期 2 日目午前に PRL を投与し、さらにその 2 日後に卵巣を摘出して、黄体の各種遺伝子転写量について解析したところ、GnRH、AX5 の発現低下とアポトーシスの減少が観察された。このときの黄体を用いてウェスタンブロットをおこなったところ、Bcl-2、Bax のアポトーシス関連因子の関与が示唆された。

(4) GnRH-AX5 系を抑制する PRL の作用点の解明

発情休止期 2 日目午前の黄体を摘出し、GnRH の存在下で器官培養したところ、内在性の GnRH、AX5 の発現が増加するとともに、Bcl-2、Bax のアポトーシス関連因子の関与が示唆された。黄体細胞の器官培養系を用いることによって、GnRH によって Bcl-2、Bax、Caspase 3 の活性が変動し、アポトーシスが実行されることを明らかにした。

黄体の器官培養に GnRH もしくはその拮抗阻害薬を添加し、アポトーシス実行因子である Caspase 3 の活性を調べたところ、GnRH の前処理によって PRL による Caspase 3 の減少が抑制された。

(5) まとめ

本研究によって、黄体に発現している GnRH-AX5 系の黄体機能調節における役割、とくに黄体退行を開始する端緒となるメカニズムを明らかにした。黄体の退行によって初めて次回排卵が可能になることを考慮すれば、本研究の成果を応用することで、卵巣周期の人為操作に新規の技術を確立できる可能性は高い。繁殖障害の軽減・繁殖効率の向上だけでなく、卵巣疾患の治療などの不妊治療にもつながることが期待できる。

さらに本研究によって、GnRH によって引き起こされるアポトーシスが Bax・Bcl-2 経路を介して起こることが示された。代表者は、本研究で明らかにする黄体の退行メカニズムに関わる因子が、黄体のみならず、他の組織における GnRH を介した組織リモデリング機構にも重要な役割をもつことを期待している。

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 7 件)

- ① Yonezawa T. The mechanism of GH pulse generation; involvements of sex steroids and/or NPY. Proc Japan Soc Animal Nutr Met, 査読有 54 (2010): 13-24.
- ② Rieanrakwong D, Yonezawa T, Kurusu S, Kawaminami M. Immunohistochemical localization of annexin a5 in the mammary gland of rats: up-regulation of expression by pup removal. J Vet Med Sci, 査読有 72 (2010): 19-22.
- ③ Kurusu S, Tokunaga N, Yonezawa T, Kawaminami M. Group IVA phospholipase A(2) activity may mediate prostaglandin F(2alpha)-induced luteal regression in pseudopregnant rats. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 査読有 90 (2009): 55-62.
- ④ Kurusu S, Suzuki K, Taniguchi K, Yonezawa T, Kawaminami M. Structural regression of the rat corpus luteum of pregnancy: relationship with functional regression, apoptotic cell death, and the suckling stimulus. Zoolog Sci, 査読有 26 (2009): 729-734.
- ⑤ Kurusu S, Kamikubo M, Yonezawa T, Kawaminami M. Differential regulation of phospholipase A(2) activity and prostaglandin E(2) synthesis in activated and non-activated corpora lutea of lactation by the presence and absence of suckling stimulus in rats. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 査読有 90 (2009): 26-30.
- ⑥ Kurusu S, Jinno M, Ehara H, Yonezawa T, Kawaminami M. Inhibition of ovulation by a lipoxygenase inhibitor involves reduced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in gonadotropin-primed immature rats. Reproduction, 査読有 137 (2009): 59-66.
- ⑦ 米澤智洋. 第 24 回日本下垂体研究会の仕掛け. 比較内分泌学, 査読無 35 (2009): 333-334.

[学会発表] (計 30 件)

- ① Yonezawa T, Kurusu S, Kawaminami M. Estrogen induced luteal gonadotropin releasing hormone (GnRH) causes refractoriness of newly formed corpus luteum to prolactin in the estrous cycle of rats. The Endocrine Society's 91st Annual Meeting. 2009/6/11. Washington, DC.
- ② Kawaminami M, Hashimoto T, Terashima R, Yonezawa T, Hasegawa Y, Kurusu S. Myxovirus (influenza virus) resistance 1 (Mx1) is involved in the growth suppression of L β T2 gonadotrope cells by activin. The Endocrine Society's 91st Annual Meeting. 2009/6/11. Washington, DC.
- ③ Rieanrakwong D, Yonezawa T, Kurusu S, Hasegawa Y, Kawaminami M. Mobilization of mast cells to the mammary gland is prerequisite for mammary involution after lactation: mediation of gonadotropin releasing hormone and antagonism by prolactin. The Endocrine Society's 91st Annual Meeting. 2009/6/11. Washington, DC.
- ④ Kurusu S, Sonoda N, Nakahara M, Yonezawa T, Kawaminami M. Multiple protective effects of locally administered inhibitors of group IVA phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 on pseudopregnant rat corpus luteum from prostaglandin F2 α -induced regression. 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010). 2010/3/29. 国立京都国際会館.
- ⑤ 米澤智洋, 坂田恭平, 久留主志朗, 長谷川喜久, 汾陽光盛. ラット性周期黄体で産生される性腺刺激ホルモン放出ホルモンはプロラクチンの黄体刺激作用の感受性を低下させる. 第 24 回日本下垂体研究会. 2009/8/27. 青森県.
- ⑥ 西村育宏, ドワンザイ・リエンラクオン, 米澤智洋, 久留主志朗, 武藤頭一郎, 汾陽光盛. アネキシン A5 ノックアウトマウスの表現型解析. 第 24 回日本下垂体研究会. 2009/8/27. 青森県.
- ⑦ 渡邊あい子, 米澤智洋, 久留主志朗, 長谷川喜久, 汾陽光盛. Hypogonadal (hpg)マウスを用いた性腺刺激ホルモン放出ホルモンシグナルのバイオマーカーとしてのアネキシン A5 の可能性. 第 24 回日本下垂体研究会. 2009. 8. 27. 青森県.
- ⑧ 西村育宏, ドワンザイ・リエンラクオン, 米澤智洋, 久留主志朗, 武藤頭一郎, Ernst Poschl, 汾陽光盛. アネキシン A5 ノックアウトマウスの生殖機能. 第 148 回日本獣医学会. 2009/9/25. 鳥取大学.
- ⑨ Rieanrakwong D, Yonezawa T, Kurusu S, Hasegawa Y, Kawaminami M. Metastin regulation of gonadotropin releasing hormone (GnRH) production in the mast cell. 第 102 回日本繁殖生物学会. 2009/9/11. 近畿大学.
- ⑩ 藪田憲史, 中原理人, 米澤智洋, 久留主志朗, 汾陽光盛. Prostaglandin (PG) F2 α 誘導性の偽妊娠ラットの黄体退行における黄体内因性 PG の役割: phospholipase A2 及び cyclooxygenase 阻害薬の局所投与の効果. 第 102 回日本繁殖生物学会. 2009/9/11. 近畿大学.
- ⑪ 小形次人, 米澤智洋, 久留主志朗, 汾陽光盛. ラット性周期黄体に発現するゴナドトロピン放出ホルモンは Bax と Bcl-2 の発現を制御して黄体のアポトーシスを誘導する. 第 102 回日本繁殖生物学会. 2009/9/11. 近畿大学.
- ⑫ 米澤智洋, 久留主志朗, 汾陽光盛. Estrogen はラット性周期黄体の Metastin と性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) の発現を促進して黄体退行を引き起こす. 第 101 回日本繁殖生物学会. 2008/9/18. 九州大学.
- ⑬ Rieanrakwong D, Yonezawa T, Kurusu S, Hasegawa Y, Kawaminami M. Involvement of local gonadotropin releasing hormone (GnRH) in involution of lactating mammary epithelial cells of rats. 第 101 回日本繁殖生物学会. 2008/9/18. 九州大学.
- ⑭ Yonezawa T, Kurusu S, Kawaminami M. Involvement of corpus luteum metastin in gonadotropin releasing hormone (GnRH) induced luteolysis in cycling rats. The Endocrine Society's 90th Annual Meeting. 2008/6/16. California.
- ⑮ Kawaminami M, Onoyama I, Yonezawa T, Kurusu S. Gonadotropin releasing

hormone (GnRH) receptor stimulation of Mx1 gene expression causes suppression of L β T2 gonadotrope cell growth. The Endocrine Society's 90th Annual Meeting. 2008/6/16. California.

北里大学・獣医学部獣医学科・講師
研究者番号：10433715

- ⑩ Kurusu S, Jinno M, Ehara H, Yonezawa T, Kawaminami M. Inhibition of ovulation by a lipoxygenase inhibitor is associated with reduced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in gonadotropin-primed immature rat model. Gordon research conference. 2008/8/7. New Hampshire.
- ⑪ 汾陽光盛, 小野山一郎, 米澤智洋, 久留主志朗. 性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) による増殖調節. 第23回日本下垂体研究会. 2008. 8. 30. 東京.

[図書] (計3件)

- ① 米澤智洋 (分担執筆)、チクサン出版社、アポトーシス実験法 (獣医生化学実験 改訂第3版) 2009. p. 193-204.
- ② 米澤智洋 (分担執筆)、学窓社、繁殖内分泌に関する実習 (獣医生理学・生理化学懇談会編、実験で学ぶ生理学) 2009. p. 82-91.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：骨成長に対するエストロゲン作用の判定法
発明者：米澤智洋、武藤顕一郎
権利者：北里大学
種類：特許
番号：特願2009-109231
出願年月日：平成21年4月1日
国内外の別：国内.

[その他]

ホームページ：
<http://www2.vmas.kitasato-u.ac.jp/physiology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米澤 智洋 (YONEZAWA TOMOHIRO)