

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780263

研究課題名（和文） 黄体のGnRHによる黄体退行機序の解明とこれを利用した  
黄体の寿命の人為的調節研究課題名（英文） Clarification of local GnRH-induced luteolysis in the rat ovary  
and challenge to control the corpus luteum life span

研究代表者

米澤 智洋 (YONEZAWA, TOMOHIRO)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：10433715

研究成果の概要（和文）：ラットでは、黄体形成後2日半以内にプロラクチン(PRL)の刺激を受ければ黄体は機能化するが、それ以降ではPRL刺激を受けたとしても黄体は退行してしまう。本研究は、この時期特異的な黄体の運命決定機構について調べた。その結果、卵巣局所に発現するゴナドトロピン放出ホルモンが黄体のPRL受容体アイソフォームの発現比率を変化させていること、この発現比率を人為的に調節すれば、黄体の運命を変えられることが示された。

研究成果の概要（英文）：The corpus luteum regresses rapidly if prolactin is not adequately supplied until the afternoon on diestrus 2. In this study, we focused on the mechanisms of time-specific determination of the corpus luteum life span in rats. Eventually, we clarified that 1) local gonadotropin-releasing hormone could alter the expression ratio of prolactin receptor isoforms in corpus luteum, and 2) we could control the duration of luteal phase by changing that expression ratio artificially.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、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、エストロジェン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 黄体の機能化不全や退行遅延による繁殖障害の改善は、家畜をはじめとする全ての哺乳類の繁殖にとって大変重要な課題である。研究代表者は、ラットをモデル動物に用い、黄体の形成と退行の分子生物学的メカニズムを明らかにする研究を行っている。

(2) 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(D2)の午前までに、プロラクチン(PRL)の刺激があれば黄体は機能化するが、それ以降にPRL刺激があっても黄体は速やかに退行することが知られている。この時間特異的な黄体の運命変化が何によってもたらされているのかはわかっていない。

(3) 研究代表者らはこれまでに、卵巣内に発現するゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)

が黄体の退行因子として働くことを明らかにしてきた。また、GnRH が性周期黄体において、PRL 感受性を低下させ、黄体をアポトーシスに導く可能性も示してきた。これらの結果は GnRH と PRL の感受性の変化が黄体の運命決定に強く関わっている可能性を示している。

## 2. 研究の目的

(1) そこで本研究では、黄体局所に発現するゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)がPRL受容体の発現に及ぼす影響について *in vitro*, *in vivo* 両方の系を用いながら詳しく検討し、黄体の運命を決定する分子機構を明らかにすることを目的とした。

(2) さらに、得られた分子機構を応用して、黄体の寿命を人為的に操作することに挑戦した。

## 3. 研究の方法

(1) まず、内分泌系の変化が黄体に与える変化をキャンセルし、黄体局所でおこる変化を詳細に観察するために、器官培養系を用いて実験を行なった。Wistar-Imamichi 系成熟雌ラットの D2 午前の卵巣から黄体を摘出し、40% O<sub>2</sub> 5% CO<sub>2</sub> の条件下にて、培養液で満たしたウェル内のトランズウェル上に静置した。その後、GnRH のアゴニスト(GnRH<sub>a</sub>)もしくはアンタゴニスト(Cetrorelix)を12時間前処理したうえでPRLを加え、培養開始より48時間後に黄体および培養上清を回収し、遺伝子発現、免疫組織化学染色、および培養液中プロゲステロン濃度を観察・測定した。

(2) 同様の実験を個体レベルでも行なった。GnRH<sub>a</sub>を満たした浸透圧ミニポンプを発情期のWistar-Imamichi 成熟雌ラットに留置し、シリコンチューブのガイドカテーテルを装着することで卵巣特異的に試薬を作用させた。その後、2週間にわたり膣スミアおよび日々の血中プロゲステロン濃度を観察した。また、このとき加えてPRLを投与した場合の黄体機能についても調べた。

(3) 次に、PRLの感受性の変化が生じるメカニズムを明らかにするために、Wistar-Imamichi 系成熟雌ラットの性周期、および偽妊娠各時期の黄体から総RNAとタンパク質を抽出し、GnRH、GnRHシグナルのバイオマーカーであるアネキシンA5(Anxa5)、PRL受容体アイソフォームの発現量をRealtime RT-PCRおよびウェスタンブロット法を用いて測定した。

(4) 最後に、上記の実験結果をもとに、PRL受容体アイソフォームの発現を人為的に調

節することで、黄体期の延長に挑戦した。実験にはBalb/cJ成熟雌マウスを用いた。PRL受容体mRNAのある配列に特異的に結合することで、アイソフォーム特異的に発現を阻害する試薬を開発し(特許出願準備中)、この試薬を満たした浸透圧ミニポンプを発情期の雌マウスの皮下に留置した。その後、1週間にわたり膣スミアを確認し、卵巣・血液を採取して遺伝子発現、免疫組織化学染色および血清中プロゲステロン濃度を観察・測定した。

## 4. 研究成果

(1) 器官培養実験系において、Cetrorelixを前処置した黄体では、PRLの添加によって、組織中プロゲステロン産生酵素転写活性と培養上清中のプロゲステロン濃度が増加し、アポトーシスシグナルであるBaxおよびCleaved caspase 3のタンパク質発現が減少した。一方、GnRH<sub>a</sub>を前処置した場合には、それらの変化はどれも消失した。この結果は、GnRHが黄体のPRLに対する感受性を変化させる事で黄体の運命を決定することを強く示唆している。

(2) 個体レベルで行なった同様の実験においても、GnRHのPRL感受性に対する強い関与が示唆された。GnRH<sub>a</sub>を浸透圧ポンプにより卵巣に連続的に投与したラットでは、早い段階での黄体のアポトーシスが観察された。さらに、D2の午前からPRLを1日2回投与したとしても、プロゲステロン分泌の増加は認められなかった。

(3) 性周期および偽妊娠各時期のmRNA発現およびタンパク質発現量を黄体の時間経過とともに観察したところ、PRL受容体ショートフォームの発現は初期から中期に増加し、後期に速やかに低下した。一方、ロングフォームは初期から中期に増加し、後期も黄体期の終了直前まで高いまま維持されていた。以上より、黄体におけるPRLの感受性の変化はPRL受容体のアイソフォーム発現比率の変化がもたらす可能性が示された。

(4) この成果をもとに、PRL受容体ロングフォームのみの発現を特異的に抑制することで、黄体期の延長に挑戦した。特別な試薬(特許出願準備中)を持続的に投与したところ、そのマウスは約1週間にわたりロングフォームの発現が低下し、発情休止期の膣スミアが観察された。このとおり、PRL受容体ロングフォームの発現制御によって黄体の寿命を人為的に制御できる可能性を示すことに成功した。このときの黄体における遺伝子発現、免疫組織化学染色および血清中プロゲステロン濃度などについては現在調査中であ

る。

(5) 以上、本研究により、黄体の運命決定に PRL 受容体のアイソフォーム発現変化が強く関与すること、この発現比率を調節すれば、黄体の寿命の人為的な制御が可能であることが明らかになった。これらの成果は、家畜および全ての哺乳類の黄体機能化不全や退行遅延による繁殖障害の改善などに応用が期待できる。

#### 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 10 件)

- ① Yonezawa T, Takahashi A, Imai S, Okitsu A, Komiyama S, Irimajiri M, Matsuura A, Yamazaki A, Hodate K. Effects of outdoor housing of piglets on behavior, stress reaction and meat characteristics. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences* (査読有) 25: 886-894, 2012.
- ② Abe T, Toida D, Satoh H, Yonezawa T, Kawaminami M, Kurusu S. An early single dose of progesterone agonist attenuates endogenous progesterone surge and reduces ovulation rate in immature rat model of induced ovulation. *Steroids* (査読有) 76: 1116-1125, 2011. DOI: 10.1016/j.steroids.2011.04.019
- ③ Yonezawa T, Higashi M, Yoshioka K, Mutoh K. Distribution of aromatase and sex steroid receptors in the baculum during the rat life cycle: effects of estrogen during the early development of the baculum. *Biology of Reproduction* (査読有) 85: 105-112, 2011. DOI: 10.1095/biolreprod.110.089508
- ④ Yonezawa T, Mogi K, Li JY, Sako R, Manabe N, Yamanouchi K, Nishihara M. Effects of estrogen on growth hormone pulsatility in peripheral blood and neuropeptide profiles in the cerebrospinal fluid of goats. *Journal of Reproduction and Development* (査読有) 57: 280-287, 2011.
- ⑤ Mori D, Ogino N, Yonezawa T, Kawaminami M, Kurusu S. Anti-ovulatory effects of RU486 and trilostane involve impaired cyclooxygenase-2 expression and mitotic activity of follicular granulosa cells in rats. *Prostaglandins*

and other Lipid Mediators (査読有) 94: 118-123, 2011. DOI: org/10.1016/j.prostaglandins.2011.02.002

- ⑥ Kurusu S, Sonoda N, Nakahara M, Yonezawa T, Kawaminami M. Evidence suggesting multiple promoting roles of luteal group IVA phospholipase A(2) in prostaglandin F(2alpha)-induced regression in pseudopregnant rats. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* (査読有) 93: 37-43, 2010.
- ⑦ Hashimoto O, Yonezawa T, Sugiyama Y, Kawaminami M, Hasegawa Y. Molecular cloning and expression of canine prolactin gene. *Experimental Animals* (査読有) 59: 643-646, 2010.

〔学会発表〕(計 28 件)

- ① 寺島涼太、米澤智洋、久留主志朗、加藤たか子、加藤幸雄、汾陽光盛 ギナドトロフ細胞株 (LβT2) におけるマウス欠失型 myxovirus (influenza virus) resistance 1 (Mx1) 遺伝子発現のインターフェロンαによる促進とスプライシング調節 第 152 回日本獣医学会 2011/9/20 大阪府立大学
- ② 尾崎 優、ドワンザイ・リエンラクオン、植木紘史、米澤智洋、久留主志朗、長谷川喜久、Bent Brachvogel、Ernst Pöschl、汾陽光盛 アネキシン A5 ノックアウトマウスで観察された乳腺の発育不全 第 152 回日本獣医学会 2011/9/19 大阪府立大学
- ③ 植木 紘史、西村育広、Duangjai Rieanrakwong、米澤智洋、久留主志朗、長谷川喜久、Bent Brachvogel、Ernst Paschl、汾陽光盛 母体の産生するアネキシン A5 による血栓形成と胎児消失抑止機能 第 152 回日本獣医学会 2011/9/19 大阪府立大学
- ④ 塩谷篤史、米澤智洋、久留主志朗、汾陽光盛 ラット偽妊娠に分泌されるプロラクチンはゴナドトロピン放出ホルモンの黄体プロラクチン受容体発現低下作用を抑制する 第 152 回日本獣医学会 2011/9/19 大阪府立大学
- ⑤ 一瀬龍太郎、米澤智洋、長谷川喜久、久留主志朗、汾陽光盛 hypogonadal マウスを用いたゴナドトロピン放出ホルモンを介さないメタスチン作用の探索 第 104 回日本繁殖生物学会 2011/9/16 岩手

- ⑥ ラウハラッチャダタニン ティタリー、寺島涼太、米澤智洋、久留主志朗、汾陽光盛 Changes in number of ovarian mast cells during estrous cycle, pseudopregnancy and pregnancy of rats: implications for the expression of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the ovary 第104回日本繁殖生物学会 2011/9/16 岩手
- ⑦ Rieanrakwong D, Ueki H, Ozaki Y, Yonezawa T, Kurusu S, Hasegawa Y, Brachvogel B, Pöschl E, Kawaminami M Annexin A5 is required for the development of the mammary gland 6th International Conference on Annexins 2011/8/31 Barcelona, Spain
- ⑧ Ueki H, Nishimura Y, Rieanrakwong D, Yonezawa T, Kurusu S, Hasegawa Y, Brachvogel B, Pöschl E, Kawaminami M Maternal annexin A5 is required for preventing placental thrombosis and fetal loss 6th International Conference on Annexins 2011/8/31 Barcelona, Spain
- ⑨ 寺島涼太、米澤智洋、久留主志朗、加藤たか子、加藤幸雄、汾陽光盛 インターフェロン $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) による myxovirus resistance 1 (Mx1) 偽遺伝子のゴナドトロフ細胞株 (L $\beta$ T2) における転写調節 第26回日本下垂体研究会 2011/8/25 岡山県
- ⑩ 寺島涼太、米澤智洋、久留主志朗、汾陽光盛 マウス欠失型 myxovirus (influenza virus) resistance 1 (Mx1) 遺伝子発現のサプライシング調節 第24回北里大学バイオサイエンスフォーラム 2011/8/24 相模原
- ⑪ 増田加奈子、北尾駿輔、米澤智洋、久留主志朗、汾陽光盛 性周期回帰のラット卵巣における autotaxin の発現 第24回北里大学バイオサイエンスフォーラム 2011/8/24 相模原
- ⑫ 佐藤弘法、米澤智洋、久留主志朗、汾陽光盛 ラットの分娩に関わる prostaglandin F2a 合成経路の検索: 免疫組織化学的検討 第24回北里大学バイオサイエンスフォーラム 2011/8/24 相模原
- ⑬ Kawaminami M, Laoharatchathanin T, Rieanrakwong D, Terashima R, Yonezawa T, Kurusu S, Hasegawa Y Mast cells may be a source of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the ovary The Endocrine Society's 93rd Annual Meeting 2011/6/5 Boston, Massachusetts
- ⑭ Yonezawa T, Shioya A, Kurusu S, Kawaminami M Changes in corpus luteal expression of prolactin receptors during luteal phase of rats: implication of local gonadotropin releasing hormone (GnRH) expression The Endocrine Society's 93rd Annual Meeting 2011/6/5 Boston, Massachusetts
- ⑮ 植木紘史、西村育広、Duangjai Rieanrakwong, 米澤智洋、久留主志朗、Ernst Pöschl, 汾陽光盛 アネキシンA5 ノックアウトマウスで見られる産仔数減少の発現機序 第151回日本獣医学会 2011年3月30日 東京農工大学(東京)
- ⑯ 米澤智洋、坂田恭平、小形次人、長谷川喜久、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がプロラクチンの黄体機能化作用に及ぼす影響 第151回日本獣医学会 2011年3月30日 東京農工大学(東京)
- ⑰ 米澤智洋、坂田恭平、塩谷篤史、久留主志朗、汾陽光盛 ゴナドトロピン放出ホルモンが黄体のプロラクチン受容体アイソフォーム発現に及ぼす影響 第150回日本獣医学会 2010年9月16日 帯広畜産大学(北海道)
- ⑱ 渡邊あい子、米澤智洋、一瀬龍太郎、久留主志朗、長谷川喜久、汾陽光盛 Hypogonadal マウス下垂体におけるA5の発現と分布にゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)が及ぼす影響 第103回日本繁殖生物学会 2010年9月2日 北里大学(青森県)
- ⑲ 植木紘史、西村育広、リエンラクオン・ドワンザイ、米澤智洋、久留主志朗、エルンストパーセル、汾陽光盛 アネキシンA5 ノックアウトマウス (AX5K0) で見られた産仔数の減少 第103回日本繁殖生物学会 2010年9月2日 北里大学(青森県)
- ⑳ 徳廣志帆、関根秀男、米澤智洋、久留主志朗、長谷川喜久、汾陽光盛 性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)プロモーターに接合したEGFP遺伝子導入ラットを用いたGnRH産生細胞の観察 第103回日本繁殖生物学会 2010年9月2日 北里大学(青森県)
- 21 ラウハラッチャダタニン・ティタリー、

- リエンラクオン・ドワンザイ, 寺島涼太, 米澤智洋, 久留主志朗, 長谷川喜久, 汾陽光盛 Mast cells may play a role in the ovary by producing gonadotropin releasing hormone (GnRH) 第103回日本繁殖生物学会 2010年9月2日 北里大学 (青森県)
- 22 坂田恭平, 米澤智洋, 塩谷篤史, 久留主志朗, 汾陽光盛 黄体局所のゴナドトロピン放出ホルモンプロラクチンの黄体機能化作用を抑制する 第103回日本繁殖生物学会 2010年9月2日 北里大学 (青森県)
- 23 リエンラクオン, ドワンザイ, 植木紘史, 西村育広, 米澤智洋, 久留主志朗, エルンストパーセル, 汾陽光盛 Annexin A5 is necessary for normal mammary development 第103回日本繁殖生物学会 2010年9月2日 北里大学 (青森県)
- 24 寺島涼太, 米澤智洋, 久留主志朗, 加藤たか子, 加藤幸雄, 汾陽光盛 変異 Myxovirus resistance 1 (Mx1) 遺伝子のゴナドトロフ増殖抑制への関与 第25回日本下垂体研究会 2010年8月19日 伊良湖ガーデンホテル (愛知県)
- 25 佐々木啓允, 米澤智洋, 久留主志朗, 汾陽光盛 卵巣摘出後のゴナドトロフ機能亢進とアネキシン A5 の発現増加 第25回日本下垂体研究会 2010年8月19日 伊良湖ガーデンホテル (愛知県)
- 26 寺島涼太, ドワンザイ・リエンラクオン, 米澤智洋, 久留主志朗, 汾陽光盛 マスト細胞の性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 産生による泌乳後乳腺組織のリモデリング調節機構 第23回北里大学バイオサイエンスフォーラム 2010年8月5日 北里大学 (青森県)
- 27 植木紘史, 西村育広, Duangiai Rieanrakwong, 米澤智洋, 久留主志朗, Ernst Poschl, 長谷川喜久, 汾陽光盛 マスト細胞の性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 産生による泌乳後乳腺組織のリモデリング調節機構 第23回北里大学バイオサイエンスフォーラム 2010年8月5日 北里大学 (青森県)
- 28 米澤智洋, 坂田恭平, 小形次人, 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黄体のプロラクチン応答性を抑制する 第23回北里大学バイオサイエンスフォーラム

2010年8月5日 北里大学 (青森県)

[産業財産権]  
○出願状況 (計3件)

①  
名称: 畜牛の飼育方法  
発明者: 米澤智洋、小笠原英毅、塩谷篤史、山田拓司、小野泰、畔柳正、實示戸雅之  
権利者: 北里大学  
種類: 特願  
番号: 2012-006050  
出願年月日: 2012年1月16日  
国内外の別: 国内

②  
名称: マウスの交配誘引剤、マウスの交配促進方法およびネズミ類の捕獲方法  
発明者: 米澤智洋、大畑素子  
権利者: 北里大学  
種類: 特願  
番号: 2011-219111  
出願年月日: 2011年10月3日  
国内外の別: 国内

③  
名称: 子豚の唾液採取方法及び唾液採取器具  
発明者: 米澤智洋、入交眞巳、高橋あさひ  
権利者: 北里大学  
種類: 特願  
番号: 2011-50243  
出願年月日: 2011年3月8日  
国内外の別: 国内

[その他]  
ホームページ等  
<http://www2.vmas.kitasato-u.ac.jp/physiology/YoneBranch/>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
米澤 智洋 (YONEZAWA, TOMOHIRO)  
北里大学・獣医学部・講師  
研究者番号: 10433715