

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：15201
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26462491
研究課題名(和文) GnRHニューロンに対する中枢性制御機構の解明

研究課題名(英文) Central control of GnRH neuron

研究代表者

金崎 春彦 (Kanasaki, Haruhiko)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：10325053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：視床下部GnRHニューロンは視床下部-下垂体-性腺軸(Hypothalamic-pituitary-gonadal axis; HPG axis)の中枢であり、下垂体からゴナドトロピンホルモンであるLuteinizing hormone (LH)とFollicle-stimulating hormone (FSH)を分泌させる。LH, FSHは卵巣に作用し、卵胞発育及び性ステロイド産生を促進する。2004年にGnRH分泌を制御するキスペプチンが発見され、HPG axisの詳細の解明が進んでいる。我々は本研究においてGnRHニューロンの制御機構の詳細に関して検討した。

研究成果の概要(英文)：Hypothalamic secretion of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) has been established as a principle pathway for initiating and integrating female reproductive function. GnRH stimulates the release of two gonadotropins which eventually stimulate the synthesis of sex steroids in association with follicular growth and ovulation. After the discovery of the indispensable role of kisspeptin in the development of human reproductive functions, our understanding of the neuroendocrine regulation of the HPG axis was revolutionized, and it is now recognized that kisspeptin acts upstream of GnRH and is responsible for sex steroid feedback mechanisms. Nevertheless, the detailed mechanisms underlying the regulation of homogeneous populations of GnRH neurons are still largely unknown. We studied how GnRH-producing cells respond to hypothalamic factors and how they are involved in GnRH synthesis.

研究分野：Neuroendocrinology

キーワード：GnRH Kisspeptin Hypothalamus

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胞発育及び排卵をもたらす。これまで生殖機能を司る中枢性ホルモンの頂点に GnRH が存在していた。GnRH ニューロンの自発的な興奮により GnRH がパルス状に分泌されると考えられてきた。2003年にフランスとアメリカのグループが低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の原因として、G 蛋白共役型受容体のひとつである GPR54 遺伝子の変異を発見した (PNAS 100:10972-10976, NEJM 349:1614-1627)。GPR54 ノックアウトマウスの性腺が著しく萎縮することから GPR54 のリガンドである「キスペプチン」が性腺機調節に重要なペプチドであることが分かった。しかしながらキスペプチンによる GnRH ニューロンへの直接作用に関しては依然不明であり、その詳細は分かっていない。

2. 研究の目的

マウス GnRH 産生ニューロン株 GT1-7 細胞を用いてキスペプチンの直接作用を知ることが目的とした。

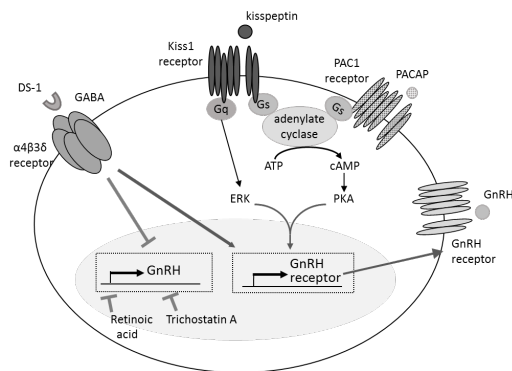
3. 研究の方法

GnRH 産生ニューロン株 GT1-7 細胞をキスペプチン及び GnRH が影響を受けると考えられる神経伝達物質で刺激し、GnRH 産生を含む細胞反応について検討した。

4. 研究成果

In vivo におけるキスペプチン作用の検討や、ノックアウトマウスあるいはラットを用いた実験結果より、キスペプチンは Kiss1R を介して GnRH ニューロンから GnRH 分泌をもたらす、その結果下垂体ゴナドトロピンが分泌されて生殖機能が制御されていることは間違いないと思われる。しかし、キスペプチンがどのような経路で GnRH 分泌を促進させるのか、GnRH 分泌以外の作用があるのか、単一の GnRH ニューロンにおけるキスペプチンの直接作用の詳細については依然不明な点が多い。神経細胞である GnRH ニューロンの単離培養は困難であり、GnRH 産生モデル細胞としてマウス視床下部細胞株 GT1-7 細胞が広く使用されてきた。我々は GT1-7 細胞に Kiss1R が存在する事、キスペプチンは GT1-7 細胞において Extracellular signal-regulated kinase (ERK)の活性化及

び cAMP/protein kinase A (PKA)の活性化を促進する事を明らかにし、キスペプチンが GT1-7 細胞膜上の GnRH 受容体発現を増加させることが分かった。しかし、GT1-7 細胞は Kiss1R を発現するものの、内因性の Kiss1R 受容体は機能しておらず、その効果は Kiss1R を強制発現させた場合に限られるなど、GnRH ニューロンのモデル細胞として限界があることが分かった。一方で GnRH 及びキスペプチンニューロンの制御機構を調べるために行ったラット胎児脳初代培養細胞においては、これらの初代培養細胞の中に GnRH 発現細胞、キスペプチン発現細胞が存在すること、従来言われてきたように GnRH はエストラジオールの直接のターゲットにはならず、キスペプチンの発現量がエストラジオールで増加することが分かった。また同時にラット胎児脳初代培養細胞においてキスペプチンは GnRH 発現を増加させ、キスペプチン自体 GnRH の刺激によりその発現が増加する事も明らかにした。その他、視床下部因子である Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) や GABA ニューロンが GnRH 発現に関する知見が得られた。またレチノイン酸及びヒストン脱アセチル化酵素であるトリコスタチン A が GnRH 合成を抑制する事も分かった。



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 17件)

Mijiddorj T, Kanasaki H, Oride A, Sukhbaatar U, Hara T and Kyo S: Interaction Between Kisspeptin and ADCYAP1 on the Expression of Pituitary Gonadotropin Subunits: A Study Using Mouse Pituitary LbetaT2 Cells. Biol Reprod, in press, 2017

Kanasaki H, Mijiddorj T, Oride A, Sukhbaatar U, Hara T and Kyo S: Pulsatile kisspeptin effectively stimulates gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons.

Gynecol Endocrinol, in press, 2017
Mijiddorj T, **Kanasaki H**, Sukhbaatar U, **Oride A**, Hara T and Kyo S: Mutual regulation by GnRH and kisspeptin of their receptor expression and its impact on the gene expression of gonadotropin subunits. *Gen Comp Endocrinol* 246, 382-389, 2017
Mijiddorj T, **Kanasaki H**, Sukhbaatar U, **Oride A**, Ishihara T and Kyo S: Retinoic acid and retinaldehyde dehydrogenase are not involved in the specific induction of the follicle-stimulating hormone beta subunit by trichostatin A, a selective inhibitor of histone deacetylase. *Gen Comp Endocrinol* 242:59-65, 2017
Kanasaki H, **Oride A**, Mijiddorj T, Sukhbaatar U, Kyo S: How is GnRH regulated in GnRH-producing neurons? Studies using GT1-7 cells as a GnRH-producing cell model. *Gen Com Endocrinol* 247, 138-142, 2017
Sukhbaatar U, **Kanasaki H**, Mijiddorj T, **Oride A**, Hara T, Yamada T, Kyo S: Expression of GnRH and kisspeptin in primary cultures of fetal rat brain. *Reprod Sci* 24, 227-233, 2017
Kanasaki H, **Oride A**, Mijiddorj T, Sukhbaatar U, Kyo S: Interactions between two different G protein-coupled receptors in reproductive hormone-producing cells – the role of PACAP and its receptor PAC1R. *International Journal of Medical Science* 17, 1635, 2016
Oride A, **Kanasaki H**, Mijiddorj T, Sukhbaatar U, Yamada T, Kyo S: Expression and regulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in rat placental cells. *Reprod Sci* 23, 1080-1086, 2016
Kanasaki H, **Oride A** and Kyo S: Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in modulating hypothalamus-pituitary neuroendocrine functions in mouse cell models. *J Neuroendocrinol* 27: 1-7, 2015
Kanasaki H, **Oride A**, Mijiddorj T, Kyo S: Role of thyrotropin-releasing hormone in prolactin-producing cell models. *Neuropeptides* 54, 77-73, 2015
Sukhbaatar U, Mijiddorj T, **Oride A** and **Kanasaki H**: Stimulation of δ subunit-containing GABA_A receptor by DS1 increases GnRH receptor expression but reduces GnRH mRNA expression in GnRH-producing GT1-7

cells. *Endocrine* 49, 222-230, 2015
Mijiddorj T, **Kanasaki H**, Sukhbaatar U, **Oride A** and Kyo S: DS1, a δ subunit-containing GABA_A receptor agonist, increases gonadotropin subunit gene expression in pituitary gonadotrophs. *Biol Reprod* 92, 1-8, 2015
Kanasaki H, Mijiddorj T, Sukhbaatar U, **Oride A**, Ishihara T, Yamagami I, Kyo S: Possible involvement of retinaldehyde dehydrogenase in Trichostatin A-induced reduction of GnRH mRNA expression in GnRH-producing neurons. *Mol Cell Endocrinol* 413,113-119, 2015
Oride A, **Kanasaki H**, Mijiddorj T, Sukhbaatar U, Ishihara T, Kyo S: Regulation of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone expression in rat placenta: Study using primary cultures of rat placental cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2015,13:90 , 2015
Mijiddorj T, **Kanasaki H**, Sukhbaatar U, **Oride A**, Ishihara T and Kyo S: Retinoic acid and retinaldehyde dehydrogenase are not involved in the specific induction of the follicle-stimulating hormone beta subunit by trichostatin A, a selective inhibitor of histone deacetylase. *Gen Comp Endocrinol* 15, 30035-30036, 2015
Sukhbaatar U, **Kanasaki H**, Mijiddorj T, **Oride A**, Miyazaki K: Expression of gonadotropin-inhibitory hormone receptors in mouse pituitary gonadotroph L β T2 cells and hypothalamic gonadotropin-releasing hormone-producing GT1-7 cells. *Endocrine J* 61, 25-34, 2014
Oride A, **Kanasaki H**, Mijiddorj T, Sukhbaatar U, Miyazaki K: Trichostatin A specifically stimulates gonadotropin FSH β gene expression in gonadotroph L β T2 cells. *Endocrine J* 61:335-342, 2014

[学会発表](計 1 件)

Kanasaki H, **Oride A**, Mijiddorj T, Unurjargar S, Hara T, Ishihara T, Kyo S. Possible involvement of retinaldehyde dehydrogenase (RALDH) in Trichostatin A induced reduction of GnRH mRNA expression. IFFS/JSRM international meeting 2015, Pacifico Yokohama (Japan), 2015/4/25-29

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金崎春彦 (KANASAKI Haruhiko)
島根大学 医学部 講師
研究者番号：10325053

(2) 研究分担者

折出亜希 (Oride Aki)
島根大学 医学部 助教
研究者番号：00423278