

平成 22 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390252

研究課題名（和文） Metastin/Kisspeptin の機能、特に生殖機能制御に関する研究

研究課題名（英文） Study for physiological function of metastin/kisspeptin with special reference to reproduction.

研究代表者

井上 金治（INOUE KINJI）

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：50091963

研究成果の概要（和文）：メタスチン/キスペプチンの生理機能、特に生殖機能制御への解明を目指して研究がすすめられた。我々の免疫細胞化学的な研究からメタスチンは脳の前腹側室周囲核（AVPV）と弓状核（Arc）の神経細胞で産生され、AVPV ではエストロゲンの正の制御、Arc では負の制御を受けていることが明らかになっている。そして、脳においては GnRH 神経を介して LH のサージやパルス状の分泌を促し、排卵や性成熟にかかわると考えられている。本研究ではこのメタスチンの発現にかかわる時計遺伝子を明らかにすることに成功した。また、これらの時計遺伝子によるメタスチン異伝子の発現制御を解明した。一方、メタスチンによる GnRH 神経の制御部位は明らかになっていなかったが、免疫細胞化学的手法により、視床下部の正中隆起部位においてメタスチンと GnRH 神経が密に接することを明らかにし、メタスチンは正中隆起部において GnRH 神経を制御していることが示唆された。一方、メタスチンはがん転移にかかわる物質として発見されたが、その機構は充分には研究されていない。今回、メタスチンが種々のがん細胞に作用して、シグナル伝達分子 ERK1/2 を活性化することを明らかにした。この作用はメタスチン受容体 GPR54 の発現と相関する。また、メタスチンはがん細胞の増殖やアポトーシスに影響を与えなかったが乳がん細胞や膵がん細胞の運動能を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We previously found that metastin/kisspeptin is produced in anteroventral periventricular nucleus (AVPV) and arcuate nucleus (Arc.) in the hypothalamus. It is also revealed that metastin gene (kiss-1) expression in AVPV is positively and Arc is negatively regulated by estrogen and may be involved in ovulation and gonadal development through the surge or pulse mode release of GnRH/LH. In this study we found a clock gene which regulates metastin gene expression. The clock gene (Dbp) shows not only additive effects with E2 and its nuclear receptor ERα on the expression of metastin, but correlation of spatio-temporal expression pattern between Dbp and metastin. These results strongly suggest Dbp is key regulator, which set a time of LH surge.

In this study we also performed immunocytochemical study for metastin and GnRH neurons

and found that metastin and GnRH nerve fibers closely contacted at median eminence, which strongly suggest that metastin may regulate GnRH neurons in median eminence. On the other hand, metastin is found as a peptide which suppresses metastasis of cancer cells however, the effect of metastin on metastasis is not well studied. In this study we found that metastin activates ERK1/2 gene in many kind of cancer cells. We also found that metastin has no effect on the cancer cell proliferation and apoptosis however, it inhibited migration of a mammary carcinoma and a lung carcinoma cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	12,700,000	3,810,000	16,510,000

研究分野：医歯薬学

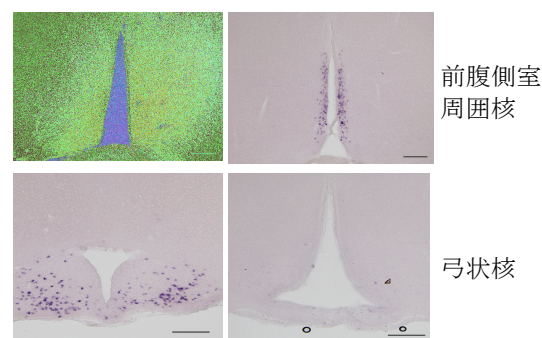
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：メタスチン キスペプチン 生殖制御 時計遺伝子 がん転移

1. 研究開始当初の背景

メタスチンは当初ガン転移、すなわちメタステシス (metastasis) に関与すると考えられ、その名がつけられたが、研究が進むにつれ、視床下部—下垂体—生殖腺軸を制御する因子であることが明らかとなった。本研究ではメタスチンの生理機能の解析を目的としてメタスチン分泌と生体時計との関連、メタスチン神経の形態学的な解析、メタスチンとがん転移との関連などを調べた。我々はこれまでにメタスチンが主に前腹側室周囲核 (AVPV) と弓状核 (Arc) に発現することを明らかにした。また、メタスチンが GnRH 神経を介して下垂体の性腺刺激ホルモン産生細胞の機能を制御し、排卵や性成熟を制御することを見出した。興味深いことにメタスチンを産生する2つの核はエストロゲンにより異なった制御を受けることを明らかにした。すなわち AVPV ではエストロゲンにより正の制御を受け、Arc では負の制御を受ける (図1)。しかし、メタスチンの産生や分泌の制御にはさらに未解決の多くの問題がある。特に排卵時におけるメタスチン遺伝子発現制御機構の解明は重要である。排卵を誘発する LH サージはエストロゲンから正のフィードバックを受けるとともに、概日リズムにより制御されていると考えられている。すなわち、卵巣を除去後にエストロ

ゲンを排卵時の濃度に高めたマウスやラットでは LH やその分泌制御する GnRH のサージ状分泌は毎日夕刻に起きる。



エストロゲン (-) エストロゲン (+)
 図1、エストロゲンによる弓状核及び前腹側室周囲核におけるメタスチン発現の差異：

このような LH サージの発生時刻制御は概日リズムの中枢振動体である視交叉上核により直接的に行われていると考えられた。視交叉上核の破壊は LH サージを消失するだけでなく、視交叉上核から分泌される神経ペプチドである AVP (Arginine vasopressin) や VIP (Vasoactive intestinal peptide) はエストロゲンの血中濃度の高い発情前期に GnRH ニューロンからの GnRH サージ状分泌を促すことが示された。

様々なホルモンや生理現象に見られる概日リズムは中枢振動体である視交叉上核と各組織に存在する末梢振動体が内的に同期することにより制御されていると考えられている。中枢と末梢振動体は共に時計遺伝子群により制御され、自律的に振動していると考えられている。そのため LH サージの時刻決定は視交叉上核が担っていると考えられてきたが、中枢振動体と末梢振動体の内的同調のために視交叉上核が機能しているだけで、時刻決定の重要な働きはむしろ末梢、すなわち AVPV 領域の細胞が担っている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

上述したように、これまで LH サージの時刻制御と視交叉上核の関与を示す結果は多数報告されていたが、メタスチン陽性細胞における時計遺伝子の制御やメタスチン発現への働きは不明であった。そのため、本研究では時計遺伝子によるメタスチン発現の制御について検討を行った。

3. 研究の方法

メタスチンプロモーターのクローニング
マウスメタスチンプロモーターを翻訳開始地点より上流 5kb を pGL3 ベクターにクローニングし、ルシフェラーゼ活性の測定に用いた。

プロモーター活性の測定

転写調節因子である時計遺伝子 (Bmal1, Clock, Dbp, Rev-erb, ROR) の発現ベクターによるメタスチンプロモーターの転写活性をルシフェラーゼアッセイにより検討した。

in situ hybridization法による Avpv 領域の雌ラットの Avpv 領域におけるメタスチン、時計遺伝子及びエストロゲンレセプターの発現を発情間期と発情前期の早朝 (ZT21) と夕刻 (ZT9) でそれぞれ比較検討した。

4. 研究成果

概日リズム時計遺伝子によるメタスチン転写活性因子を検出するため、メタスチンプロモーターをクローニングし、ルシフェラーゼ解析を行った結果、時計遺伝子の中で唯一 Dbp のみが転写活性を有していた (図 2)。この効果はエストロゲンと ERα による作用と相加的に反応し、Dbp 結合サイトを欠いたプロモーターでは Dbp の作用が消失した (図 3)。以上のことから、メタスチンの発現制御は時計遺伝子の Dbp が関与していることが示唆された。

次に AVPV 領域における Dbp と ERα の性周期と時刻依存的な発現を検討するため、発情間期と発情前期の ZT9 (5PM) と ZT21 (5AM) の

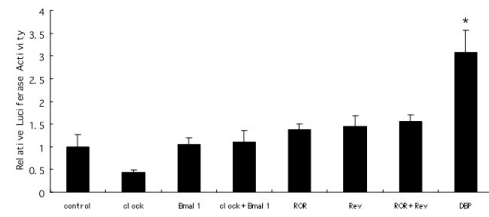


図 2 時計遺伝子によるメタスチンプロモーター活性の制御

2

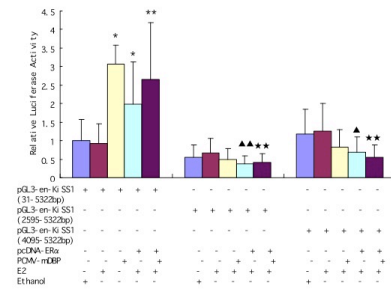


図 3 Dbp とエストロゲンによるメタスチンプロモーター活性の制御

4

Dbp の mRNA と ERα タンパクの発現を検討した (図 3)。

Dbp の発現は発情間期では有意な差はないものの ZT21 より ZT9 の方が高い値を示した。さらに、発情前期では ZT21 の発現する細胞

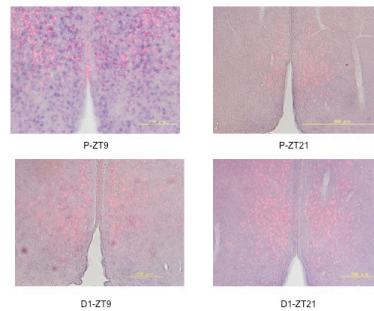


図 4 発情前期(P)と発情間期(D1)のZT9とZT21におけるAvpv領域のDbp mRNAとEraタンパクの二重染色

数は有意に増加し、また ERα と発現が共存する細胞数も有意に上昇した (図 4、5)。時計遺伝子の Dbp は Dbp binding site に結合し、転写を調節することが知られている。さらに、昼から夕方にかけて発現がピークを迎える遺伝子のプロモーター上にこのエレメントが存在し、Dbp がその制御に重要な働きを示すことが知られている。以上の結果からメタスチンが発情前期の夕方にサージ状に発現には時計遺伝子の Dbp が強く関与していると考えられた。

5

本研究ではメタスチン神経が GnRH 神経に作用する部位を免疫細胞学的に調べた。この結果、正中隆起部においてメタスチン神経と GnRH 神経が密に接する部位が観察された (図 6)。

これらの接触がシナプスによるものか否かは今後電子顕微起用レベルでの観察が必要である。

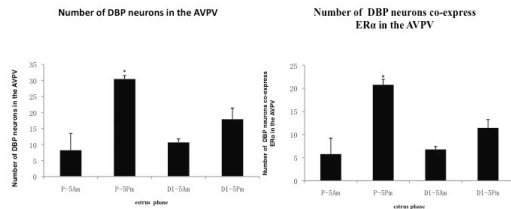


図 5. Avpv領域におけるDbpの発現細胞数とEraと共発現する細胞数

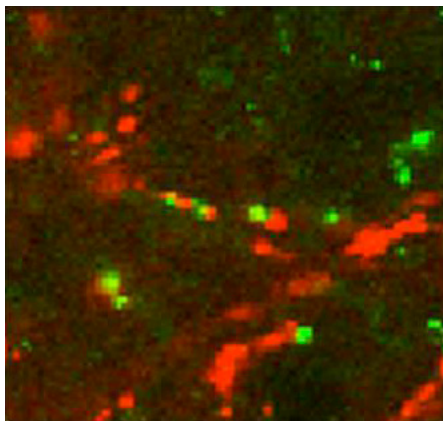


図 6、ラット正中隆起部におけるメタスチン神経(緑色蛍光)と GnRH(赤色蛍光)神経の接触

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 6 件)

1. Tomida, M., Mikami, I., Takeuchi, S., Nishimura, H., Akiyama, H. Serum levels of nicotinamide N-methyltransferase in patients with lung cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, Published online: 26 (2009)
2. Tomida, M., H., Ohtake, Yokota, T., Kobayashi, Y., Kurosumi, M. Stat3 up-regulates expression of nicotinamide

N-methyltransferase in human cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 134: 551-559 (2008)

3. Maeda K, Adachi S, Inoue K, Ohkura S, Tsukamura H.

Metastin/Kisspeptin and control of estrous cycle in rat. *Endocr.* ;8, 21-9. 2007

4. Yamada S, Uenoyama Y, Kinoshita M, Iwata K, Takase K, Matsui H, Adachi S, Inoue K, Maeda KI, Tsukamura H.

Inhibition of Metastin (Kisspeptin-54)-GPR 54 Signaling in the Arcuate Nucleus-Median Eminence Region during Lactation in Rats. *Endocrinology* ; 148, 2226-32 2007

5. Itakura E, Odaira K, Yokoyama K, Osuna M, Hara T, Inoue K.

Generation of transgenic rats expressing green fluorescent protein in S-100{beta} producing pituitary folliculo-stellate cells and brain astrocytes. *Endocrinology.* 148 1518-1523 2007

6、Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiura H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda K.

Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev* ;53, 367-78. 2007

[学会発表] (計 9 件)

1、富田幹夫、井上金治

メタスチンによる癌細胞のAkt活性と運動能の抑制

第68回日本癌学会学術集会 (2009, 10, 2) 横浜

2、井上金治

下垂体前葉細胞の分化とホルモン分泌制御機構

第24回日本下垂体研究会 特別講演

(2009, 8, 29) 三沢

3、加賀重仁、徐 枝芳、望月 明和、足立明人、井上 金治

ラット脳内におけるmetastin神経の形態学的解析 日本下垂体研究会学術集会

(2009, 8, 27) 三沢

4、井上金治

下垂体のホルモン分泌に関する最近の話題
小児成長研究会 特別講演 (2009, 7, 25) 東京

5、加賀重仁、井上金治

ラット脳内におけるmetastin神経の形態学的研究

第61回 日本動物学会関東支部大会

(2009, 3, 20) 浦和

6、井上金治

下垂体前葉細胞の増殖と分化の新たな展開

第19回 日本間脳下垂体腫瘍学会

(2009, 2, 27) 東京

7、Tomida, M.

NNMT, the product of a novel Stat3-regulated gene, as a serologic biomarker for non-small cell lung cancer (NSCLC)

第 67 回日本癌学会学術総会 (2008, 10, 29) 名古屋

8、井上金治

下垂体前葉の細胞学、研究の課題と展望

第 81 回 日本内分泌学会 学術総会
教育講演 (2008, 5, 17) 弘前

9、足立幸香、井上金治

GnRH/LH 分泌に対するエストロゲンフィードバックにおけるメタスチン/キスペプチン

の役割 第 80 回日本内分泌学会学術総会
(2007, 6, 15) 東京

〔雑誌論文〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 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◇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

井上 金治 (イノウエキンジ)
埼玉大学・理工学研究科・教授
研究者番号：50091963

(2) 研究分担者

足立 明人 (アダチアキヒト)
埼玉大学・理工学研究科・准教授
研究者番号：20351588

(3) 連携研究者

富田 幹夫 (トミタミキオ)
研究者番号：80142115