

令和 5 年 4 月 9 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16494

研究課題名（和文）哺乳類特異的なGnRHに対する下垂体脱感作メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of mammalian-specific pituitary desensitization mechanism to GnRH

研究代表者

國村 有弓（Kunimura, Yuyu）

日本医科大学・大学院医学研究科・ポストドクター

研究者番号：60801488

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、哺乳類で欠損しているGnRH受容体の一部配列を修復したモデル動物を複製することで下垂体の脱感作作用を明らかにすることを目的とした。作出したマウスではゲノムレベルでは挿入されていたものの、挿入配列が原因でRNAの高次構造が影響を受け最終的に受容体の一部が欠損してしまったことから想定したノックイン動物が作出されなかった。2021年12月にGnRH受容体のC末端配列を修復したマウスを用いた論文が海外の研究グループより発表されたため、本研究では動物の新たな作出は行わず実験終了とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでin vitroでしか行われていなかったGnRH-RのC末端の修復をマウスを用いて行い、少なくともゲノムレベルでは挿入が確認された。偶然にも一部配列がイントロンとして認識されてしまったことによる欠損と考えられることから、サイレント変異の編集などにより予定したノックイン動物が得られる可能性がある。GnRH受容体のexon3の126塩基欠損はGnRH受容体ノックアウトに近い表現型を示すことも示された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the desensitizing effect of the pituitary by creating a model animal by adding a carboxy-terminal tail to the normally tailless GnRH-R. The produced knock-in mice showed abnormal reproductive function, and were lacked some sequences of the GnRH receptor. In December 2021, an overseas research group published an article using mice with a restored C-terminal sequence of the GnRH receptor. Thus, the study was terminated without generating a new animal model.

研究分野：生殖神経内分泌

キーワード：GnRH受容体 下垂体 脱感作

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の妊娠には、未成熟な卵胞が成熟する卵胞発育と、成熟卵胞から卵子が排出される排卵が必須である。これは視床下部—下垂体—性腺 (HPG) 軸により制御されている (図 1)。視床下部のキスペプチンニューロンが性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) の分泌を促し、脳下垂体に働きかけることで黄体形成ホルモン (LH) がパルス状に分泌される。LH により卵胞が発育し、エストラジオール (E2) が分泌される。卵胞が成熟し、血中 E2 濃度が閾値を超えると E2 の視床下部へのフィードバックにより GnRH と LH の一過性の大量放出 (LH サージ) が起こり、排卵が引き起こされる。

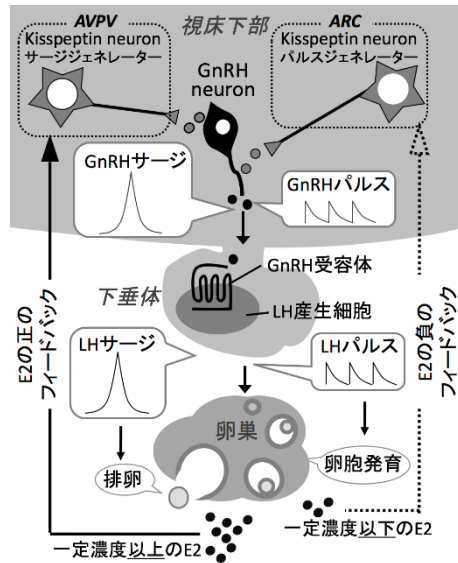


図 1: HPG 軸による生殖機能の制御
哺乳類の卵胞発育と排卵は、視床下部—下垂体—性腺 (HPG) 軸によって制御されている。

申請者はこれまで、加齢に伴う生殖機能低下のメカニズム解明を目的に研究を行ってきた (Kunimura et al., Neurobiology of Aging, 2017)。加えて、加齢に伴い低下する排卵機能の原因は視床下部にあるとの仮説のもと検証を行ったが、予想に反して視床下部ではなく下垂体の感受性低下が原因である可能性を支持するデータが得られた。下垂体の感受性低下は不妊治療にも用いられる現象の一つで、下垂体の GnRH-R の発現低下 (脱感作) によると考えられている。哺乳類の GnRH-R は非常に特殊な作用を示すことから、申請者はこの特徴が生殖機能の低下を引き起こす原因なのではないかと考えた。

GnRH-R は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の一つである。一般的な GPCR ではリガンド結合後に C 末端領域がリン酸化されることによって受容体が細胞内に取り込まれ (internalization)、一時的に感受性が低下する (脱感作) (図 2)。この速やかな脱感作とそれに続く受容体のリサイクリングが持続的なシグナル受容を可能にしている。一方、ヒトを含む哺乳類の GnRH-R では、internalization に障害があることで持続的なシグナル反応に反応できず、数分間の GnRH 暴露の後には下垂体の感受性低下が引き起こされることが報告されている (McArdle et al., 1995)。

これは、数多く存在する GPCR の中で唯一、哺乳類の GnRH-R だけがリン酸化部位である C 末端を欠損しているからだと考えられているが抑制機序は不明である (Eidne et al., 1992)。実際、魚類から鳥類までの非哺乳類の GnRH-R には C 末端が存在し、哺乳類で見られる強い脱感作反応は示さない (Xinwei et al., 1998)。このことは GPCR の中でも哺乳類の GnRH-R が極めて特殊であることを示すと共に、哺乳類の生殖機能制御を繊細かつ複雑な仕組みにしている要因と考えられる。キスペプチンや LH パルスという複

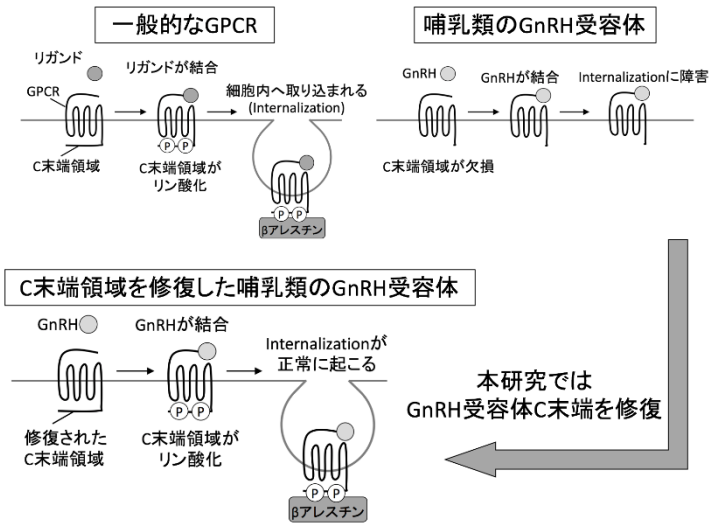


図 2: GnRH 受容体 C 末端領域の修復による作業仮説
一般的な GPCR では、細胞内ドメインの C 末端領域がリン酸化されることによって受容体が細胞内に取り込まれ、一時的に感受性が低下する (脱感作)。哺乳類の GnRH 受容体は C 末端領域を欠損しており internalization に障害があり持続的なシグナル反応に反応できない。本研究ではこの欠損した C 末端領域を修復する。

本研究では
GnRH 受容体 C 末端を修復

雑な機構で生殖機能を維持しているのは哺乳類のみであることも、GnRH による持続的な暴露が LH に対してかえって抑制的に作用してしまうという哺乳類の GnRH-R の特殊な事情に関係していると考えられる。実際に、テストステロン依存的に進行する前立腺がんの治療に GnRH アゴニストが使用されていることは、アゴニストがアンタゴニストとして作用するという一般の GPCR では起こりえない現象を利用している。GnRH-R の脱感作メカニズムについては 2000 年前後に *in vitro* の実験がいくつか報告されているのみで、詳細は明らかとなっていない。下垂体の正常な働きなしに生殖機能は維持されないことから、GnRH-R の脱感作メカニズムについて理解することは、ヒトの不妊治療を含む哺乳類の生殖機能について考える上で非常に重要である。先行研究より、申請者は下垂体の強い脱感作作用の原因は GnRH-R の C 末端領域が欠損していることによると仮説を立てた。そこで、この仮説を証明するために GnRH-R の C 末端を修復したノックイン(KI)動物の作製を試みる。

2. 研究の目的

本研究では、生殖機能低下の一因である下垂体の感受性低下メカニズムを *in vivo* の新しいモデルを作製することで明らかにすることを目的とする。GnRH-R の C 末端領域をもつ遺伝子改変マウスを作製し、(1)C 末端領域の修復が生殖機能全般に与える影響、(2)哺乳類の下垂体の脱感作は GnRH-R の C 末端欠損によるものか、(3)加齢に伴う生殖機能低下は GnRH-R の C 末端欠損によるものか、の 3 点について検証する。

3. 研究の方法

遺伝子ターゲティングによりマウス GnRH-R に Catfish の C 末端(Xinwei et al., 1998)を付加した KI マウスを作製した。作製支援は NPO 法人発生工学研究会に依頼した。ターゲティングベクターの作製、相同組換え体のスクリーニング、交配は申請者で行い、ES 細胞へのベクターの導入、ES 細胞の胚へのインジェクション、離乳までの飼育は発生工学研究会に依頼した。ノックインが確認されたマウス 4 匹(F0)を発生工学研究会より譲り受け、野生型マウスと交配させることで繁殖を試みた。生後発達に伴う体重変化、および雌マウスでは膣開口を、雄マウスでは肛門性器間距離(AGD)を調べるとともに、生殖腺(卵巣、子宮、精巣、精巣上体など)、ゲノム配列の確認を行った。血中テストステロン濃度は ELISA により測定した。また、逆転写 PCR をしてシーケンス解析を行った。

4. 研究成果

ノックイン動物(F0)4 匹のうち、1 匹のみが繁殖能力を有しており野生型マウスと交配させることで F1 世代を得ることができた。生後発達に伴う体重変化(図 3)および雌マウスの膣開口、雄マウスの AGD の確認を行ったところ、一部雌マウスに膣開口が見られなかった。ジェノタイプニングの結果、+/-マウスは雌雄共に繁殖能力を有し、外生殖器にも異常は見られなかったが、+/+マウスは雌雄共に野生型マウスと交配させても子が得られず、雄では外生殖器が非常に小さく(図 4)、雌では膣開口がみられないなどの異常がみられた。生殖腺を調べたところ、野生型マウスと比較して+/+マウスの雄では精巣、精巣上体が(図 5)、雌では卵巣、子宮が(図 6)非常に小さく、GnRH 受容体ノックアウトマウスとよく似た表現型がみられた。血中テストステロン濃度は野生型や+/-マウスと比較し、+/+マウスで非常に低い濃度がみられた(表 1)。さらに詳細に解析したところ、ゲノム上では計画通り GnRH 受容体の C 末端配列が挿入されていたが、逆転写 PCR を行ったところ、GnRH 受容体の配列の一部である 126 塩基が欠損していることがシーケンス解析により明らかとなった。42 アミノ酸欠失となることから翻訳は行われているものの、挿入配列が原因で RNA の高次構造が影響を受けスプライシングにも影響が出てしまったことが考えられた。

本研究では、これまでにない哺乳類と非哺乳類の GnRH-R の配列の違いという進化学的視点から生殖機能低下の解明にアプローチし、これまで *in vitro* でしか支持されていない仮説を、GnRH-R の C 末端を修復したノックイン動物の作製を世界で初めて試み *in vivo* で証明すること

で生殖制御の本質的な理解につなげることを学術的な独自性として実験を進めていた。しかし、2021年12月に、GnRH-Rに chicken のC末端配列を挿入したノックインマウスを用いた研究が海外のグループより発表されたことから (Chirine Toufaily *et al.* (2021) Addition of a carboxy-terminal tail to the normally tailless gonadotropin-releasing hormone receptor impairs fertility in female mice *eLife* 10:e72937.)、本研究はノックイン動物の再作製は行わず終了とすることにした。

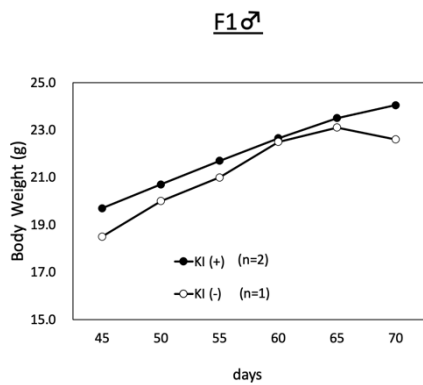


図 3:F1 雄マウスの体重変化の一例

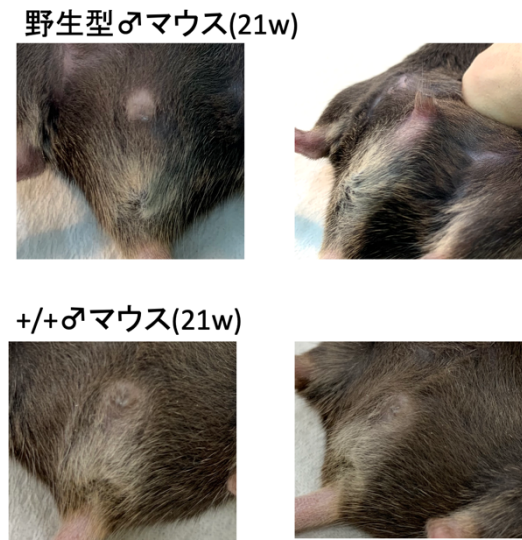


図 4:雄マウスの外生殖器の一例



図 5:雄マウスの精巣の一例

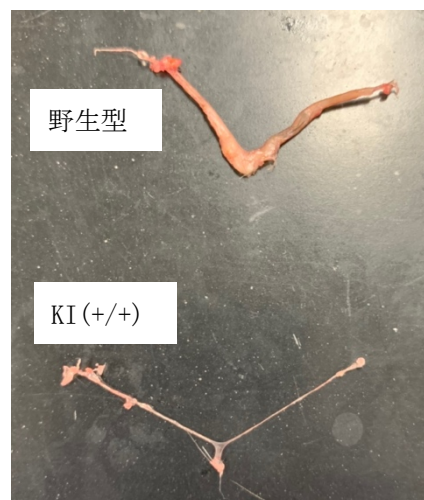


図 6:雌マウスの子宮と卵巣の一例

表 1:雄マウスの血中テストステロン濃度の一例

	T(ng/mL)
+/-	4.14
+/-	3.60
WT	1.62
WT	0.24
+/+	0.07
+/+	0.06

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------