

機関番号：15201

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20791144

研究課題名 (和文) 下垂体ゴナドトロピン特異的合成メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Study for the differential regulation of pituitary gonadotropins

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

研究成果の概要 (和文)：

Perifusion system を用いて GnRH をパルス状に投与し、高頻度刺激及び低頻度刺激間での単一ゴナドトロピン産生細胞における PACAP 及び PAC1 受容体発現を検討した。GnRH を直接添加する GnRH 静止刺激において、GnRH は細胞内 PACAP 発現及び PAC1 受容体発現を促進した。パルス状刺激では、高頻度 GnRH 刺激に比べ低頻度 GnRH 刺激において PACAP 及び PAC1 受容体発現が増加した。PACAP は濃度依存的に LH 及び FSH サブユニット発現を増加させ、PAC1 受容体はその発現量に比例してゴナドトロピン発現を増加させた。GnRH のパルス頻度依存性ゴナドトロピン発現機構に PACAP 及びその受容体発現が関与する可能性が考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Gene expression for PACAP and its own PAC1 receptor (PAC1R) were examined by pulsatile GnRH stimulation using perifusion system. In static culture, GnRH stimulated the expression of PACAP and PAC1R in gonadotroph cell line, LbT2. In pulsatile GnRH stimulation, low frequency of GnRH pulse preferentially increased PACAP and PAC1R expressions compared to that by low frequency GnRH pulse. PACAP increased both LH and FSH subunits dose-dependent manners. PACAP and PAC1R might be involved in GnRH pulse frequency-dependent gonadotropin subunit expressions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
2009 年度	1,000,000 円	300,000 円	1,300,000 円
2010 年度	800,000 円	240,000 円	1,040,000 円
年度			
年度			
総計	2,900,000 円	870,000 円	3,770,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：ゴナドトロピン、下垂体、GnRH、生殖内分泌、PACAP

## 1. 研究開始当初の背景

視床下部 GnRH は律動的 (パルス状) に分泌

され、月経周期の時期によりその分泌周期と振幅を変化させている。GnRH はパルス頻度の違いにより性腺刺激ホルモン LH 及び FSH

分泌を制御しており、高頻度 GnRH パルスでは LH が優位に、低頻度 GnRH パルスでは FSH が優位に分泌される。しかし、そのメカニズムについては依然不明である。

## 2. 研究の目的

LH と FSH は視床下部 GnRH により主に制御されており、GnRH は月経周期でその分泌頻度を変化させて、ゴナドトロピン産生細胞から LH と FSH の 2 つのホルモンを特異的にコントロールしている。GnRH という 1 つの生理活性物質が LH、FSH の 2 つのホルモンをいかにして特異的に制御しうるのには依然不明である。Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) は視床下部及び下垂体局所に存在し、ゴナドトロピン産生能を持つ。GnRH はゴナドトロピン産生細胞において PACAP 及びその受容体である PAC1 受容体発現を促進することが分かっている。今回我々は PACAP によるゴナドトロピン制御、GnRH パルスの頻度の違いによる PACAP 及び PAC1 受容体発現について検討し、ゴナドトロピン産生との関係について検討した。

## 3. 研究の方法

細胞：ゴナドトロピン産生細胞株 L $\beta$ T2 細胞  
刺激：GnRH 及び PACAP38  
刺激方法：静止刺激及び Perifusion system を用いたパルス状刺激  
検討項目： $\alpha$ 、LH $\beta$ 、FSH $\beta$  サブユニットプロモーター活性、GnRH 受容体、PAC1 受容体、フォリスタチン発現、細胞内 cAMP 濃度、Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 活性

## 4. 研究成果

(1) PACAP の細胞内情報伝達経路について  
L $\beta$ T2 細胞に PACAP (100nM) を添加すると細胞内の cAMP は著明に増加した。また、MKP キナーゼファミリーの一つである ERK 活性は刺激後 10 分をピークに増加した。PACAP による ERK 活性化反応は PKA 阻害剤により完全に抑制され、cAMP/PKA 依存性であることが分かった。

(2) PACAP によるゴナドトロピンサブユニット発現への影響

ルシフェラーゼベクターを用いたプロモーターアッセイでは、PACAP はゴナドトロピン $\alpha$  サブユニットプロモーターを強く活性化させたが、LH $\beta$  及び FSH $\beta$  プロモーターに有意な活性化は認められなかった。一方 RT-PCR 用いた mRNA 定量で

は PACAP により 3 つのゴナドトロピンサブユニットは全て増加し、中でも $\alpha$  サブユニットが著明に増加した。PACAP による $\alpha$  サブユニット発現は、MEK 阻害剤及び PKA 阻害剤で抑制され、またドーパミン D2 受容体アゴニストで抑制された。

(3) PACAP の刺激頻度依存性ゴナドトロピン発現

Perifusion system を用いて 30 分間隔で 5 分間の PACAP パルスを還流させる高頻度 PACAP パルスと、120 分間隔のパルスを与える低頻度 PACAP パルスにて細胞を刺激した。高頻度 PACAP パルス刺激では FSH $\beta$  に比べて LH $\beta$  が優位に増加、一方低頻度 PACAP 刺激においては FSH $\beta$  が優位に増加し、PACAP においても GnRH と同様にパルス頻度依存性のゴナドトロピンサブユニット発現が生じた。

(4) GnRH 及び PACAP パルス状刺激によるフォリスタチン発現の変化

アクチビンは FSH の特異的分泌促進物質であるが、フォリスタチンはアクチビンと結合してその作用を抑制する。高頻度 GnRH パルス刺激においてフォリスタチン mRNA は著明に上昇し、低頻度 GnRH パルス状刺激においては上昇しなかった。PACAP 刺激でも同様に高頻度 PACAP パルス状刺激においてはフォリスタチン遺伝子発現が著明に増加した。GnRH 及び PACAP 双方の高頻度パルス依存性 LH $\beta$  サブユニット発現は、フォリスタチンによる FSH $\beta$  サブユニットの抑制に起因する可能性が示された。

(5) GnRH 及び PACAP パルス状刺激による受容体発現の変化

GnRH 静止刺激により GnRH 受容体及び PACAP 受容体 (PAC1 受容体) 共に増加した。GnRH パルス状刺激において、GnRH 受容体は低頻度刺激において高頻度刺激よりも増加したが、PAC1 受容体発現は低頻度 GnRH パルス刺激で増加した。また GnRH により PACAP 賛成が促進され、PACAP 発現も低頻度 GnRH 刺激で増加した。一方、高頻度パルス状 PACAP 刺激で GnRH 受容体は著明に増加したが、低頻度 PACAP 刺激で GnRH 受容体の増加は認められなかった。また、PACAP 受容体自体は低頻度 PACAP パルス状刺激で著明に増加した。

(6) ゴナドトロピン発現における PACAP 受容体の影響

細胞表面の PAC1 受容体発現数が増大すると、同一濃度の PACAP に対するゴナドトロピン産生能が増加することを確認した

LH、FSH の特異的制御機構の詳細が完全に解

明できれば、臨床的に LH、FSH の分泌を個別に制御する事が可能となり、新たな排卵誘発方法の開発や、避妊法の確立につながるものと考えられる。

#### 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 13 件)

1. Kanasaki H, Oride A, Miyazaki K. Paracrine control of gonadotrophs by somatolactotrophs through TRH-induced follistatin production. The Open Neuroendocrinology Journal, in press, 2011
2. Kanasaki H, Purwana IN, Oride A, Mijiddorj T Miyazaki K. Possible Involvement of PACAP and PACAP type 1 Receptor in GnRH-Induced FSH  $\alpha$ -Subunit Gene Expression. Regulatory Peptides 167, 227-232, 2011
3. Purwana IN, Kanasaki H, Oride A, Mijiddorj T Miyazaki K. Induction of Dual Specificity Phosphatase 1 (DUSP1) by Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone Stimulation and the Role of Gonadotropin Subunit Expression. Biology of Reproduction, in press, 2011
4. Oride A, Kanasaki H, Purwana IN, Miyazaki K. Effects of metformin administration on plasma gonadotropin levels in women with infertility, with an in vitro study of the direct effects on the pituitary gonadotrophs. Pituitary 13; 236-241, 2010
5. Purwana IN, Kanasaki H, Oride A, Miyazaki K. Induction of Dual Specificity Phosphatase 1 (DUSP1) by Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) and the Role for Gonadotropin Subunit Gene Expression in Mouse Pituitary Gonadotroph LbetaT2 Cells. Biology of Reproduction 82; 352 – 362, 2010
6. Purwana IN, Kanasaki H, Oride A, Mijiddorj T, Shintani N, Hashimoto T, Baba A and Miyazaki K. GnRH-induced PACAP and PAC1 Receptor Expression in Pituitary Gonadotrophs: A Possible Role in the Regulation of Gonadotropin Subunit Gene Expression. Peptides 31; 1748-1755, 2010
7. Oride A, Kanasaki H, Purwana IN, Miyazaki K. Follistatin, induced by Thyrotropin-releasing hormone (TRH), plays no role in prolactin expression but affects gonadotropin FSH $\beta$  expression as a paracrine factor in pituitary somatolactotroph GH3 cells. Regulatory Peptides 156; 65-71, 2009
8. Kanasaki H, Mutiara S, Oride A, Purwana IN, Miyazaki K. Pulse frequency-dependent gonadotropin gene expression by adenylate cyclase-activation polypeptide 1 in perfused mouse pituitary L $\beta$ T2 cells. Biology of Reproduction 81; 465-472, 2009
9. Oride A, Kanasaki H, Purwana IN, Miyazaki K. Possible Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 (MKP-1) in Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH)-induced Prolactin Gene Expression. Biochemical and Biophysical Research Communications 382; 663-667, 2009
10. Mutiara S, Kanasaki H, Oride A, Shimasaki S, Yamamoto H, Miyazaki K: Follistatin gene expression by gonadotropin-releasing hormone: role for cyclic AMP and mitogen-activated protein kinase signaling pathway in clonal gonadotroph L $\beta$ T2 cells. Molecular and Cellular Endocrinology 307; 125-32, 2009
11. Oride A, Kanasaki H, Mutiara S, Purwana IN, Miyazaki K: Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) and Induction of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 1 (MKP1) by Perfused Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Stimulation in Rat Pituitary GH3 Cells. Molecular and Cellular Endocrinology 296; 78-86, 2008
12. Kanasaki H, Mutiara S, Oride A, Miyazaki K: Up-regulation of gonadotropin  $\alpha$ -subunit gene by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in clonal gonadotroph cells. Neuroendocrinology Letters 29; 529-535, 2008
13. Mutiara S, Kanasaki H, Harada T, Oride A, Miyazaki K: The Involvement of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Gonadotropin- Releasing Hormone Induced

Gonadotropin  $\alpha$ - and FSH $\beta$  Subunit Gene Expression in Clonal Gonadotroph L $\beta$ T2 Cells.

Molecular and Cellular Endocrinology 283; 1-11, 2008

〔学会発表〕（計 4 件）

1. ゴナドトロピン産生細胞における GnRH と PACAP の相互作用について  
金崎春彦、折出亜希、インドリ プルワナ、石川雅子、今村加代、片桐敦子、山上育子、中山健太郎、青木昭和、宮崎康二  
2010 年 4 月 23 日 第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会、東京
2. プロラクチン産生細胞におけるフォリスタチン発現とゴナドトロピン合成に対する影響について  
金崎春彦、折出亜希、インドリプルワナ、宮崎康二  
2009 年 4 月 3 日 第 61 回日本産科婦人科学会学術講演会、京都市
3. 中枢神経系に存在する Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)によるゴナドトロピンの産生調節  
金崎春彦  
シンポジウム 2（中枢神経関連物質の生殖機能へのかかわり）  
2009 年 4 月 3 日 第 61 回日本産科婦人科学会学術講演会、京都市
4. ゴナドトロピン産生細胞における PACAP の役割について  
金崎春彦、原田 崇、サンドラ ムティアラ、折出亜希、宮崎康二  
2008 年 4 月 12 日 第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会、横浜市

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

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：