

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05964

研究課題名(和文)下垂体の性腺刺激ホルモン分泌調節におけるアネキシンA1の役割に関する研究

研究課題名(英文) Study on the role of annexin A1 in the regulation of gonadotropin secretion from the pituitary gland

研究代表者

村田 拓也 (Murata, Takuya)

岡山理科大学・獣医学部・准教授

研究者番号：70281186

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)：本研究の目的は、下垂体でのアネキシンA1 (ANXA1) の役割について解明することである。ゴナドトロフ由来の細胞において、GnRHはANXA5と比べてより大きくANXA1を変動させ、FSH発現を特異的に促進する因子であるアクチピンは、ANXA5の発現を抑制し、GnRHによるANXA1発現の増加をさらに増強した。雌ラットの下垂体のANXA1、ANXA5、ビタミンD受容体、アクチピンサブユニットの発現において、いくつかの因子間で強い正の相関がみられた。これらのことは、ANXA1とA5との異なる調節系や作用の存在とそれらの調節にアクチピン、ビタミンD3が関与している可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

繁殖は、動物が種を維持する上で必須であり、畜産において繁殖機能のコントロールは重要な課題である。雌性動物の繁殖機能は、視床下部 下垂体 卵巣を軸として制御されている。下垂体で発現しているアネキシンA1 (ANXA1) とA5は、視床下部から放出されるホルモンにより調節され、下垂体から分泌される性腺刺激ホルモンの分泌調節に関わっていると考えられている。本研究により、ANXA1とA5は調節系および作用において類似性が高いと考えられてきたが、両者間の異なる調節系や作用の存在とそれらの調節にアクチピン、ビタミンD3が関与している可能性、および下垂体機能の複雑な局所調節が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the role of annexin A1 (ANXA1) in the pituitary gland. In gonadotroph-derived cells, GnRH increased ANXA1 expression to a greater extent than ANXA5, and activin, a factor that specifically promotes FSH expression, suppressed ANXA5 expression and further enhanced the GnRH-induced increase in ANXA1 expression. Strong positive correlations were observed between several factors in the expression of ANXA1, ANXA5, vitamin D receptor, and activin subunits in the pituitary gland of female rats. These findings suggest the existence of different regulatory systems and actions for ANXA1 and A5, and that activin and vitamin D3 may be involved in their regulation.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：アネキシン 下垂体 性腺刺激ホルモン ビタミンD受容体 アクチピン

1. 研究開始当初の背景

繁殖は、動物が種を維持する上で必須であり、畜産において、繁殖機能のコントロールは重要な課題である。雌性動物の繁殖機能は、視床下部 下垂体 卵巣を軸として制御されている。視床下部から放出される性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) は、下垂体の性腺刺激ホルモン産生細胞 (ゴナドトロフ) を刺激し、性腺刺激ホルモンである黄体形成ホルモン (LH) と卵胞刺激ホルモン (FSH) の分泌を促進する。

アネキシンは、カルシウム依存性リン脂質結合タンパク質ファミリーであり、現在 12 種類のアネキシンが報告されている。中でも、アネキシン A5 (ANXA5) は、下垂体のゴナドトロフに発現し、LH および FSH 分泌を促進する。また、GnRH により産生が刺激され、mitogen activated protein kinase (MAPK) を介していることが明らかになっている。ANXA5 は、細胞外に放出されたのちに、ゴナドトロフに作用するとされているが、その作用機序については未だ明らかになっていない。

LβT2 細胞は、1996 年 Mellon らによって樹立されたマウスゴナドトロフ株化細胞である[1]。LβT2 細胞は、LH、FSH、GnRH レセプター (GnRHR) に加え、アクチビン、インヒピンなどが発現し、正常なゴナドトロフの特徴を多く保持している。そのためゴナドトロフ研究には非常に有用な細胞である。最近、この LβT2 細胞を GnRH で刺激すると、通常の培養ではほとんど検出されない ANXA1 の発現が著増することがわかった[2]。しかし、ANXA1 が下垂体からの LH 分泌に促進的に働くことは確認されたが、どのように LH 分泌を調節するのか、ANXA5 と相互作用があるのかは明らかになっていない。

ビタミン D レセプター (VDR) は、卵巣、下垂体、子宮、胎盤など繁殖に関わる組織に発現している。VDR ノックアウト (KO) マウスが不妊になることは知られているが、下垂体への活性型ビタミン D (VD) の作用については未だ明らかにされていない。我々は、ラット下垂体の *Vdr* の mRNA 量が、血中エストロジェン濃度が高くなる発情前期に、非発情期と比べて有意に低下すること、そして卵巣摘出ラットにエストロジェンを投与すると有意に低下することを明らかにした。これは、VD が、性周期中に変動し、下垂体機能に何らかの影響を及ぼしている可能性を示している。マウスの雌の下垂体において、*Vdr*、*Anxa1*、*Anxa5* の mRNA 量が、どの 2 因子間においても正の相関があることがわかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ANXA1 の ANXA5 および VDR との関連に注目し、下垂体からの LH および FSH の分泌において、ANXA1 がどのような役割を果たしているのかを解明することである。

- (1) LβT2 細胞における *Anxa1* の発現を *Anxa5* の発現と比較し検討する。
- (2) 性周期中の雌ラットの下垂体に発現する *Anxa1*、*Anxa5*、*Vdr* および他の下垂体前葉の因子の発現を調べ、因子間の相関の有無を調べる。

3. 研究の方法

(1) LβT2 細胞において、GnRH アゴニスト (GnRHa) により増加する *Anxa1* と *Anxa5* がどのようなメカニズムで増加しているのかを調べるために、protein kinase C (PKC) activator (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate; TPA)、PKC inhibitor (GF109203)、および MEK inhibitor (PD98059) で LβT2 細胞を処置し、*Anxa1* と *Anxa5* の発現を real time PCR 法で調べた。

(2) 下垂体の局所因子による調節を調べるために、アクチビンで LβT2 細胞を刺激し、*Anxa1* と *Anxa5* の発現を real time PCR 法で調べた。

(3) 性周期中のラット下垂体における *Anxa1*、*Anxa5*、*Vdr*、アクチビンβB サブユニット (*Actbb*)、LH β サブユニット (*Lhb*)、FSH β サブユニット (*Fshb*) の発現を real time PCR 法で測定し、因子間の相関の有無を調べた

4. 研究成果

LβT2 細胞において、10 nM GnRHa が *Anxa1* と *Anxa5* の発現にどのような作用があるのかを調べるために GnRHa 処置後、1、3、6、12、24、48 時間の *Anxa1* と *Anxa5* の mRNA 量を測定した。GnRHa による刺激は、*Anxa1* と *Anxa5* の mRNA 量をそれぞれ処置後 3 時間および 1 時間で有意に増加させた。その後、両者の mRNA 量は、6 時間まで増加し、24 時間までこれらの有意に高いレベルは維持され、48 時間後に低下した。*Anxa1* mRNA 量は、*Anxa5* mRNA 量に比べて大きく増加していた。

TPA は、2 時間のインキュベーション後に *Anxa1* および *Anxa5* の mRNA 発現を有意に増加させたが、dbcAMP は *Anxa1* または *Anxa5* の mRNA 発現に影響を与えなかった。さらに、GF109203 (PKC inhibitor) および PD98059 (MEK inhibitor) は、GnRHa で増加した *Anxa1* および *Anxa5* mRNA 発現を有意に抑制した (図 1)。これは、GnRHa により誘導される *Anxa1* および *Anxa5* の発現に MEK-MAPK 系が関わっていることを示している。

TPA 用量が *Anxa1* および *Anxa5* の mRNA 発現に及ぼす影響を調べたところ、*Anxa1* mRNA 量は用量依存的に 100 nM から 10 μM まで大幅に増加したが、*Anxa5* mRNA は 10 nM から 1 μM まで大幅に増加した (図 2A、B)。これは、*Anxa1* と *Anxa5* の間に TPA に対する反応性の違いがあることを示している。次に、TPA 刺激後の *Anxa1* および *Anxa5* mRNA 発現の経時変化を調べた。細胞は 2 つの異なる用量の TPA (10 nM および 1 μM) で 48 時間処理した。これらの mRNA 量の変化は GnRH 刺激後に観察されたものと同様で、1 時間または 3 時間から大幅に増加し始め、6~12 時間の間にピークレベルに達するまで増加し続け、48 時間までに基礎レベルに戻った (図 2C、D)。1 μM TPA での *Anxa1* mRNA 発現の経時変化も GnRH で処理した細胞のものと類似していたが、ピークは約 6 時間後に観察された (図 6C)。 *Anxa1* の mRNA 量 (6~12 時間) 1 μM TPA 処理の刺激効果は 1 nM よりも大きく増加したが、*Anxa5* では大きな増加として観察されなかった。この変化は濃度の異なる GnRH による刺激でも類似の変化がみられ、ANXA1 がより大きく変動することにより作用を調節している可能性を示していると考えられる。

FSH 発現を特異的に促進する因子であるアクチピンが、LβT2 細胞における *Anxa1* および *Anxa5* の発現に及ぼす影響について調べた。0.4 ng/mL および 4 ng/mL のアクチピン A 処理では、用量依存的に *Anxa5* mRNA 量が減少した (図 3B)。一方、*Anxa1* mRNA 量は、40 ng/mL までの濃度のアクチピン A 処理による影響を受けなかった (図 3A)。次に、4 ng/mL のアクチピン A 処理後の mRNA 量の経時変化を調べた。*Anxa1* の mRNA 量は有意に変化しなかったが、*Anxa5* mRNA 量は、処理後 6 時間から有意に減少し、24 時間まで徐々に低下し、48 時間まで低いレベルが維持された。

次に、4 ng/mL アクチピン A が GnRH により誘導される *Anxa1*、および *Anxa5* の発現に及ぼす影響を調べた。GnRH (10 nM) は *Anxa1* mRNA 量を増加させ、

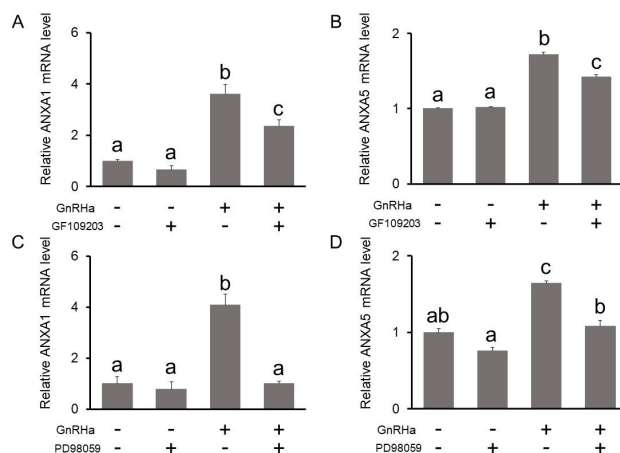


図 1 GnRH で誘導される *Anxa1* および *Anxa5* 発現に対する PKC inhibitor と MEK inhibitor の効果

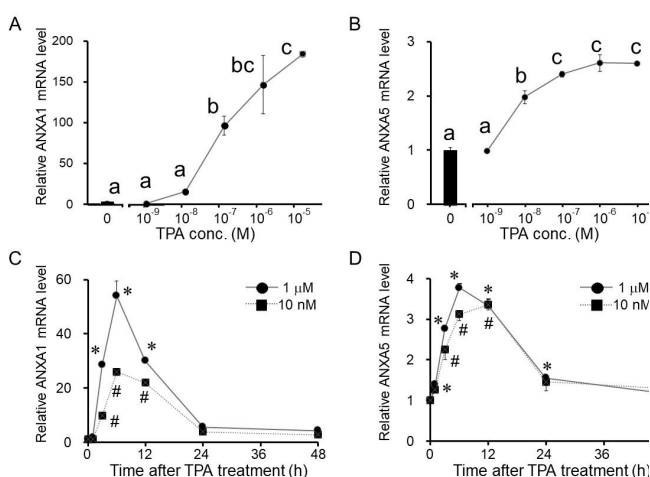


図 2 TPA により誘導される *Anxa1* および *Anxa5* 発現. 異なる濃度の TPA の効果を 2 時間培養で調べ (AB)、2 種類の濃度の TPA の経時変化を 48 時間で調べた (CD)。

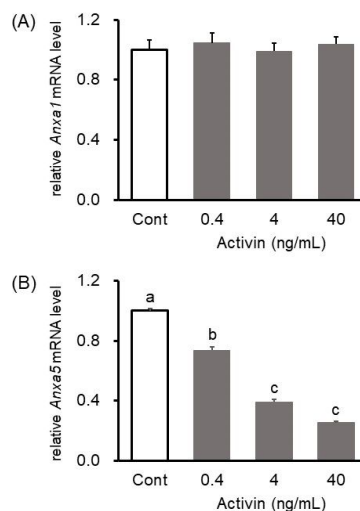


図 3 アクチピンにより誘導される *Anxa1* および *Anxa5* 発現. 異なる濃度のアクチピンで 24 時間培養を行った。

アクチビン A での前処理により、この増加は GnRHa 刺激のみの場合と比較して約 7 倍に増加した (図 4A)。GnRHa により誘導される *Anxa5* mRNA 量に対しては、アクチビン A の処置の影響はみられなかった (図 5B)。このように、アクチビンは L T2 細胞において *Anxa5* の発現を抑制するのに対し、GnRHa による *Anxa1* 発現の増加をさらに増強することが明らかになった。

雌ラットの性周期は、発情前期 (Proestrus, P) 発情期 (Estrus, E) 発情休止期 1 日目 (Diestrus1, D1) 発情休止期 2 日目 (D2) の 4 日から成る。発情周期の各日 (10:00-12:00 h) における雌ラットの下垂体前葉における *Anxa1*、*Anxa5*、*Vdr*、アクチビン関連遺伝子であるインヒピン α サブユニット (*Inha*)、 β B サブユニット (*Actbb*) そして性腺刺激ホルモンである LH の β サブユニット (*Lhb*)、FSH の β サブユニット (*Fshb*) の発現について調べた。*Anxa1*、*Anxa5*、および *Vdr* の発現は、D1 および D2 よりも P において有意に低かった (図 5A - C)。*Inha* の発現は、D2 よりも P で有意に低く、*Actbb* の発現は D1 および D2 に比べて E で有意に低かった。*Lhb* の発現は D2 で最も高く、周期が E に進むにつれて徐々に低下した。*Fshb* の発現は、他の時期よりも D1 期で有意に高かった。

雌ラットの下垂体前葉における各遺伝子の発現の相関をピアソン分析を用いて評価した。*Anxa5* と *Inha*、*Anxa5* と *Actbb*、*Inha* と *Vdr*、*Inha* と *Actbb* の 4 つの組み合わせは、強い正の相関関係を示した ($0.77 < r < 0.82$, $p < 0.0001$, 図 5)。さらに、*Anxa1* と *Anxa5*、*Anxa1* と *Vdr*、*Anxa5* と *Vdr*、3 つの遺伝子ペア間の正の相関関係は中等度の有意性があつた ($0.70 < r < 0.76$, $p < 0.001$)。他の 7 つの遺伝子ペア、*Anxa1* と *Inha*、*Anxa1* と *Actbb*、*Vdr* と *Actbb* ($0.60 < r < 0.66$, $p < 0.01$, 表 2C) の間、および、*Anxa1* と *Fshb*、*Inha* と *Lhb*、*Actbb* と *Fshb*、*Actbb* と *Lhb* ($0.44 < r < 0.56$, $p < 0.05$) の間に有意な正の相関が認められた。

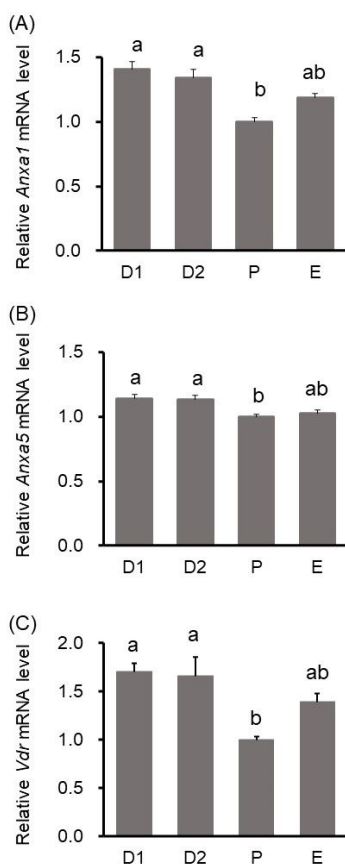


図 5 雌ラット下垂体における *Anxa1* および *Anxa5* mRNA 量の性周期中の変化。発情期 (E)、発情前期 (P) 発情休止期 (D1, D2)

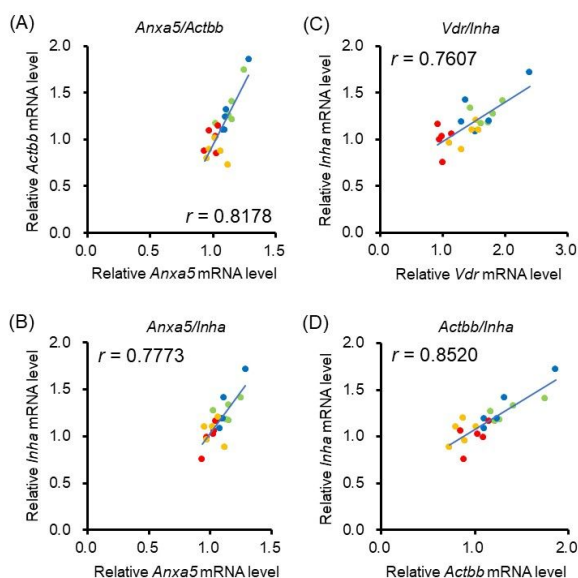


図 6 雌ラット下垂体で発現する遺伝子間の相関 *Anxa5* と *Actbb* (A)、*Anxa5* と *Inha* (B)、*Vdr* と *Inha* (C)、*Actbb* と *Inha* (D)

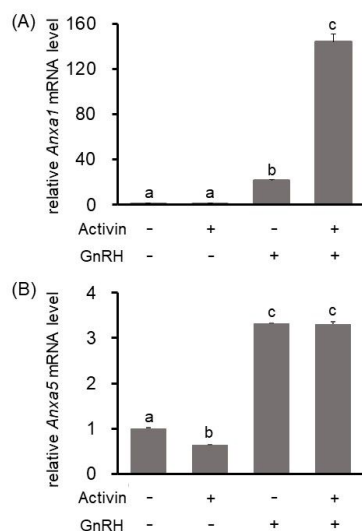


図 4 GnRH により誘導される *Anxa1* および *Anxa5* 発現に対するアクチビンの効果。

<引用文献>

1. Turgeon JL, Kimura Y, Waring DW, Mellon PL. Steroid and pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) regulation of luteinizing hormone and GnRH receptor in a novel gonadotrope cell line. *Mol Endoc* 10: 439-450, 1996.
2. Fungbun N, Tungmahasuk D, Terashima R, Kurusu S, Kawaminami M. Annexin A1 is a novel target gene of gonadotropin-releasing hormone in L β T2 gonadotrope cells. *J Vet Med Sci* 80: 116-124, 2018.

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 3 件)

1. T. Murata, S. Chiba, M. Kawaminami. The expression of Annexin A1 and A5 mRNA by gonadotropin-releasing hormone in L β T2 gonadotrope cells. **Endocrine J.** 69(3):283-290. 2022, doi: 10.1507/endocrj.EJ21-0397
2. T. Murata, S. Chiba, M. Kawaminami. Activin A specifically suppresses the expression of Annexin A5 mRNA and augments GnRH stimulation of A1 expression in L β T2 gonadotrope cells. **Endocrine J.** 69(10):1193-1200, 2022, doi: 10.1507/endocrj.EJ22-0095.
3. T. Murata, S. Chiba, M. Kawaminami. Changes in the expressions of annexin A1, annexin A5, inhibin/activin subunits, and vitamin D receptor mRNAs in pituitary glands of female rats during the estrous cycle: correlation analyses among these factors. **J Vet Med Sci.** 84(9):1288-1291, 2022, doi: 10.1292/jvms.22-0141.

[学会発表] (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

村田 拓也 (MURATA, Takuya)
岡山理科大学・獣医学部・准教授
研究者番号 : 7 0 2 8 1 1 8 6

(2) 研究分担者

汾陽 光盛 (KAWAMINAMI, Mitsumori)
岡山理科大学・獣医学部・教授
研究者番号 : 0 0 1 5 3 0 0 7

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takuya Murata, Shuichi Chiba, Mitsumori Kawaminami	4. 巻 69
2. 論文標題 The expression of Annexin A1 and A5 mRNA by gonadotropin-releasing hormone in L T2 gonadotrope cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 283-290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ21-0397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takuya Murata, Shuichi Chiba, Mitsumori Kawaminami	4. 巻 69
2. 論文標題 Activin A specifically suppresses the expression of annexin A5 mRNA and augments gonadotropin-releasing hormone stimulation of A1 expression in L T2 gonadotrope cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 1193-1200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ22-0095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takuya Murata, Shuichi Chiba, Mitsumori Kawaminami	4. 巻 84
2. 論文標題 Changes in the expressions of annexin A1, annexin A5, inhibin/activin subunits, and vitamin D receptor mRNAs in pituitary glands of female rats during the estrous cycle: correlation analyses among these factors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1065-1073
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.22-0141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
研究 分担 者	汾陽 光盛 (Kawaminami Mitsumori) (00153007)	岡山理科大学・獣医学部・教授 (35302)	

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
---------	---------