

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591119

研究課題名（和文）GnRHニューロンにおける思春期発来調節因子の新規機能解析と時間生理学的研究

研究課題名（英文）Functional and chronobiological analysis of factors for the timing of puberty in GnRH neurons

研究代表者

棚橋 祐典（TANAHASHI YUSUKE）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：50374228

研究成果の概要（和文）：*GnRH* 遺伝子もしくは時計遺伝子（*Per2/Bmal1*）プロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入した GT1-7 安定発現株を確立した。これを用いて、Kisspeptin 投与による両遺伝子発現の変化を検討したところ、転写レベルにおいて *GnRH* 遺伝子発現は増強されるが、時計遺伝子発現には変化がなかった。灌流系の細胞培養システムを用いて長期間の発光連続測定と同時に GnRH 分泌測定する系の開発を試みたが、現在まで確立はしていない。

研究成果の概要（英文）：We established stable transformed GT-7 cell line transfected with reporter plasmid which consists of GnRH or clock genes (*Per2/Bmal1*) promoter and luciferase gene. Using this plasmid, we examined the effect of kisspeptin to the transcription activity of GnRH gene or clock genes. Kisspeptin induced the transcription activity of GnRH, although it did not change that of clock genes. We also tried to establish the perfusion system for monitoring continuous luciferase activity as well as GnRH secretion. But it has not been completed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児内分泌学、生物時計

1. 研究開始当初の背景

Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) ニューロンは、性周期、排卵のリズムの中核である。同時に、ヒトでは思春期には GnRH 分泌が増強するがそのメカニズムは明らかではない。GnRH ニューロン由来の GT1-7

細胞では時計遺伝子の概日リズム振動がみられ、GnRH パルス状分泌を修飾するが、一方、Kisspeptin-GPR54 系は思春期発来因子として注目され、その遺伝子異常により性腺機能低下症を示すことから、その関与が明らかとなっている。

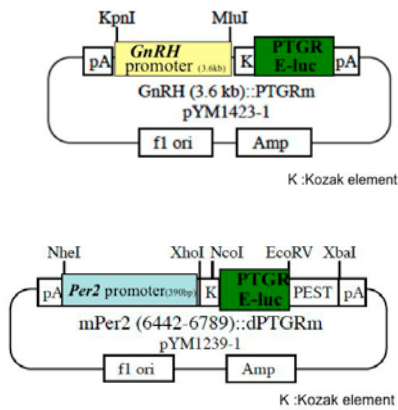
2. 研究の目的

GnRH ニューロンにおける生物時計概日振動と思春期発来との関連を明らかにするために、GT1-7 細胞における時計遺伝子と **GnRH** 遺伝子転写活性および **GnRH** 分泌に対する **Kisspeptin** の反応性を検討する

3. 研究の方法

(1) 細胞培養：GT1-7 細胞は 5% CO₂ 下 37°C 10%FBS 含有 DMEM 培地にて培養した。

(2) 発光レポータープラスミド:mGnRH プロモーター領域 (3.6kbp) 下流に緑色発光帯域を持つ発光甲虫由来ルシフェラーゼ (E-Luc PTGR) 挿入したベクターを構築した。 mPer2 プロモーター (350bp) のレポータープラスミド (下図) および Bmal1 プロモーター (915bp) のプラスミドも同様に構築した。



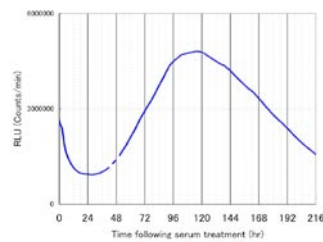
(3) 安定発現株のための遺伝子導入:GT1-7 細胞に Lipofectamine2000 を用いたリポフェクション法にて、GnRH-PTGR 安定発現株を得た。時計遺伝子の安定発現株は (Per2-PTGR、Bmal1-PTGR 安定発現株を確立するためには、レトロウィルスベクターキット Retro-X Q Vector (Clontech) を使用した。

(4) 発光発光測定用培地に交換し連続測定: 35mm dish において、安定発現株に振動誘発を加え、ディッシュ型ルミノメーター KronosAB-2500 (ATTO) または Lumicycle にて 37°C 下 (大気中) 10 分間隔での 1 時間の発光連続測定をおこなった。

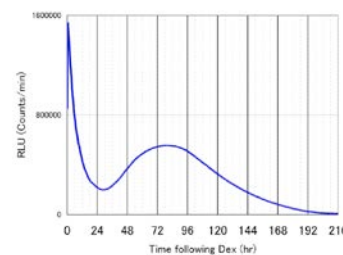
(5) 発光測定による遺伝子転写活性測定: 6well dish に各安定発現株を測定前日に 10⁵ 個ずつ 24 時間培養した後、Kissptin (Kp-10:ペプチド研) 10 nM 含有無血清培地 (Opti-MEMI) で 2 時間培養した。2 時間培養後に細胞を回収し、細胞破砕液中の発光測定をおこなった。

4. 研究成果

(1) GH-RH 安定発現株において、GnRH 遺伝子発現は明確な概日リズム振動は示さなかった。



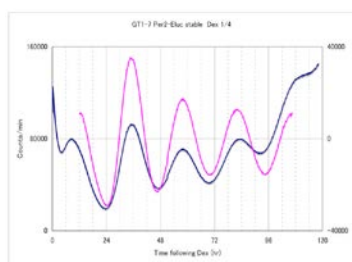
血清刺激による GnRH=PTGR 安定発現株の連続測定



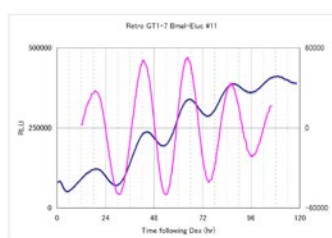
デキサメサゾン刺激による nRH=PTGR 安定発現株の連続測定

両者ともに明確な概日リズム振動はない。

(2) 時計遺伝子 (Per2, Bmal1) 安定発現株において、時計遺伝子は明確な概日リズム振動を示した。



時計遺伝子 (Per2) の概日リズム振動

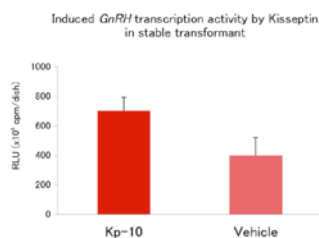


時計遺伝子 (Bmal1) の概日リズム振動

Per2、Bmal1 は両者とも明確な概日リズムを示し、それぞれ逆位相を示した。

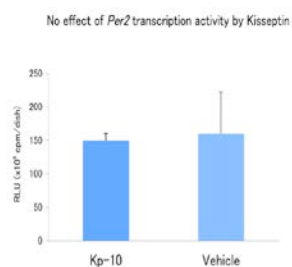
(3) Kisspeptin は GnRH 遺伝子転写活性を増強したが、時計遺伝子転写活性には影響を与えなかった

Kisspeptin 投与後の各安定発現株の発光を測定し、その転写活性を定量した。

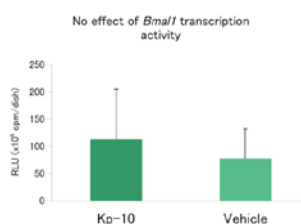


(図) GnRH 安定発現株

Kisspeptin 投与後有意に発光量は増加した。



(図) 時計遺伝子 (Per2) 安定発現株 Kisspeptin 投与後においても発光量は有意な変化はなかった。



(図) 時計遺伝子 (Bmal1) 安定発現株 Kisspeptin 投与後においても発光量は有意な変化はなかった。

以上の結果より、GnRH ニューロンにおいては、GnRH 遺伝子発現と時計遺伝子概日リズム振動との相互作用は少なくとも転写レベルにおいては明らかではないことがわかった。

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1件)

1, 棚橋祐典、藤枝憲二、本間さと、本間研一、ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) ニューロンにおいて、細胞自体の時計遺伝子概日リズム振動は GnRH 遺伝子発現に影響しない、ホルモンと臨床、査読無、58 巻、2010、1013 - 1018

〔学会発表〕（計2件）

1. 棚橋祐典、藤枝憲二、本間さと、本間研：GnRH ニューロンにおいて細胞自体の時計遺伝子概日リズム振動はGnRH 遺伝子発現に影響しない、第43回日本小児内分泌学会学術集会、2009/10/1-3、宇都宮市
2. 棚橋祐典、鈴木滋、松尾公美浩、本間さと、本間研一：GT1-7 細胞におけるKisspeptin に対するGnRH 遺伝子および分泌の概日リズム振動への影響の検討、第84回日本内分泌学会学術総会、2011/4/21-23、神戸市

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計0件）
- 取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

棚橋 祐典 (TANAHASHI YUSUKE)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：50374228

(2) 研究分担者

田島 敏広 (TAJIMA TOSHIHIRO)
北海道大学・医学研究科・講師
研究者番号：50333597
(H23→H24：連携研究者)

(3) 連携研究者

近江谷 克裕 (OHMIYA YOSHIHIRO)
独立行政法人産業技術総合研究所・主幹研究員
研究者番号：20223951