

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 6 月 10 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791533

研究課題名（和文）LH、FSH 合成・分泌制御機構の解明

研究課題名（英文）Study for the mechanism of LH and FSH synthesis and secretion

研究代表者

折出 亜希 (ORIDE AKI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：00423278

研究成果の概要（和文）：下垂体前葉から分泌される LH と FSH は、主に視床下部からの GnRH により制御され、高頻度 GnRH 刺激では LH 優位、低頻度 GnRH 刺激では FSH が優位に発現することが知られている。ゴナドトロピン発現には Extracellular signal-regulated kinase (ERK) が重要な役割を担っている。MAP kinase phosphatase 1 (MKP1) は ERK を脱リン酸化して不活化する。LβT2 細胞では MKP1 発現は低頻度 GnRH 刺激より高頻度 GnRH 刺激で優位に増加しことから、MKP1 が GnRH パルス頻度依存性ゴナドトロピン発現に関与する可能性が示された。また Pituitary adenylate cyclase-activation polypeptide (PACAP) もゴナドトロピンサブユニットを発現させるが、高頻度 PACAP パルス刺激では LHβ が、低頻度パルス刺激では FSHβ 発現が優位に発現した。以上の結果より PACAP もまた GnRH と同様にゴナドトロピンの特異的産生に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Gonadotropins are synthesized and secreted, which is under GnRH regulation. GnRH pulse frequency determines specific gonadotropin subunit gene expression. In pituitary gonadotrophs, GnRH induces expression of the Extracellular signal-regulated kinase (ERK) dephosphorylating enzyme, MAP kinase phosphatase 1 (MKP1). MKP-1 is specifically expressed following high-frequency GnRH pulses and that this effect may participate in the differential regulation of gonadotropin subunit expression. In addition to hypothalamic GnRH, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) also regulates gonadotropin gene expression. High-frequency PACAP pulse preferentially increased *Lhb*, whereas low-frequency PACAP pulses specifically increased *Fshb*. It suggest that PACAP is involved in the differential regulation of gonadotropin subunit gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：生殖内分泌

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：生殖医学、下垂体、ゴナドトロピン

1. 研究開始当初の背景

生殖年齢にある女性において、その生殖内分泌機構は視床下部-下垂体-卵巣系により制御されている。つまり、視床下部から分泌されるゴナドトロピン放出因子が下垂体前葉に作用し、下垂体前葉からゴナドトロピン(Luteinizing hormone (LH), Follicle-stimulating hormone (FSH))が分泌され、ゴナドトロピンは卵巣から性ステロイドホルモンを分泌させる。この視床下部-下垂体-卵巣間のネットワークが卵胞発育や排卵にとって重要である。

視床下部から分泌される性腺刺激ホルモン放出ホルモン(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。すなわちしかしGnRHという1つの生理活性物質が、単一ゴナドトロピン産生細胞から異なった2つのホルモンを特異的に制御する詳細なメカニズムについては不明である。またGnRHがLH、FSHの分泌を制御していることは明らかであるが、GnRH以外にもゴナドトロピンを制御する生理活性物質が存在する。Pituitary Adenylate Cyclase-activation Polypeptide (PACAP)、アクチビン、フォリスタチン、ドーパミン、ゴナドトロピン放出抑制ホルモン(GnIH)などがその例である。これらの物質は単独あるいはGnRHと協調してゴナドトロピンを制御すると思われるが、これらの物質とGnRHパルス頻度依存性ゴナドトロピン発現における作用の詳細は不明である。

2. 研究の目的

GnRHパルス頻度の違いによるLH、FSH特異的合成・分泌メカニズム検討するために以下について検討することを目的とした。

(1) GnRHパルス頻度の違いによる細胞内情報伝達様式の違いについて

ゴナドトロピンサブユニット発現にExtracellular signal-regulated kinase(ERK)の活性化が重要であることはこれまでの研究により明らかである。ERKはGnRH受容体よりMAPキナーゼカスケードを介して最終的にリン酸化され、活性化される。活性化されたERKはやがてMKPにより脱リン酸化されて、非活性化される。GnRHパルス頻度の違いによりMKP-1及びMKP-2の誘導に違いが生じてERK活性化パターンが異なるのか、あるいは別の機序であるのか検討する。

(2) GnRH以外の生理活性物質に対する反応性はどうか

私達はLβT2細胞を用いて、GnRHと同様にPACAPもゴナドトロピンサブユニットを発現させることを報告した。PACAPの血中の動態は明らかではないが、GnRHと同様にパルス状に分泌されている可能性がある。PACAPをパルス状に投与し、頻度依存性ゴナドトロピン発現、および細胞内変化を検討する。

3. 研究の方法

生体内で存在するGnRHパルス頻度特異的LH、FSH合成メカニズムを検討するためにGnRHをパルス状に添加することが必要であり、当科にすでに設置してあるPerifusin systemを用い、5分間のGnRH刺激を30分間隔で行う高頻度GnRHパルス刺激と120分間隔で行う低頻度GnRHパルス刺激について検討を行った。

ゴナドトロピン産生細胞のモデル細胞としてLβT2細胞を使用し、ウエスタンブロット法による蛋白量の検討及びreal-time PCRを用いてmRNA量の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) ゴナドトロピンサブユニット発現にERKの活性化が重要であるが、MKP1はERKを脱リン酸化して不活化する。GnRHは視床下部よりパルス状に分泌され、高頻度GnRH刺激ではLH優位、低頻度GnRH刺激ではFSHが優位に発現することが知られており、GnRHパルスの刺激頻度とMKP1発現について検討を行った。静止刺激においてGnRHは刺激後60分よりMKP1発現を増加させた。GnRHパルス刺激においてMKP1発現は低頻度GnRH刺激より高頻度GnRH刺激で優位に増加した。高頻度GnRH刺激では刺激開始2時間後(GnRHパルス4回)よりMKP1の発現を認めたが、低頻度GnRH刺激では12時間後(GnRHパルス6回)でも発現は認めなかった。GnRH投与量を増加させても低頻度GnRHパルス刺激においてMKP1発現は増強せず、高頻度GnRHパルス刺激にのみ発現を認めた。各GnRHパルスにて一過性のERKリン酸化-脱リン酸化反応が生じるが、このときMKP1発現の変動は認めなかった。MKP1発現にはGnRHパルスの間隔及びパルス数の両方が重要であると考えられた。MKP1発現は高頻度GnRH刺激に特異的に生じることから、GnRHパルス頻度依存性ゴナドトロピンサブユニット発現に関与する可能性が示された。

(2) 最近の研究で、多くのほ乳動物においてキस्पペチンがGnRHの分泌を促進すること、

キスペプチン産生細胞が視床下部に広く分布し、GnRHニューロンと隣接して存在することが明らかになった。GnRHパルス分泌制御の主体がキスペプチンであることを示唆する研究結果が報告されたため、GnRHによるLH、FSHの分泌機構の解明を行うためにはGnRHニューロンに対するキスペプチンの作用について検討を行う必要があると考えられた。マウス視床下部由来のGT1-7細胞にはキスペプチン受容体であるGPR54が存在することが明らかになっていることより、GT1-7細胞を用いキスペプチンによるGnRH分泌機構について検討を行うこととした。GT1-7細胞をキスペプチンの濃度を変えて刺激したところ、GnRHmRNAの増加はみとめられなかった。培養細胞であるためGPR54受容体数が少ない可能性も考えられたため、GPR54を強制発現させてGT1-7細胞にキスペプチンを投与したが、やはりGnRHの発現は増加しなかった。このことよりGT1-7細胞ではGnRHの産生は行われていない可能性が考えられた。

(3) ゴナドトロピン分泌は主にGnRHにより制御されるが、GnRH以外の脳、視床下部ホルモンや生理活性物質によりゴナドトロピンが制御されている可能性も考えられる。そこでヒツジ視床下部からcAMPを活性化する物質として発見されたPituitary adenylate cyclase-activation polypeptide (PACAP)について、ゴナドトロピン産生調節に対する役割について検討を行った。LβT2細胞をGnRHで刺激するとPACAP及びPACAPの受容体であるPAC1-RのmRNAが増加した。LβT2細胞にPAC1-Rを発現させてPACAPで刺激をするとLHβ、FSHβサブユニットプロモーター活性が増加した。perifusion systemを使用しGnRHパルス頻度を変化させてPACAP mRNAの発現を検討したところ、30分に1回の高頻度刺激より120分に1回の低頻度刺激においてPACAP発現が増加した。視床下部で産生されているPACAPはGnRHと同様にパルス状に分泌されている可能性が考えられるため、PACAPをパルス状にLβT2細胞に投与し、ゴナドトロピン発現について検討を行った。高頻度PACAPパルス刺激ではLHβがFSHβに比べて優位に増加し、低頻度パルス刺激ではFSHβ発現がLHβに比べて優位に発現した。以上の結果よりPACAPもまたGnRHと同様にゴナドトロピンの特異的産生に関与している可能性が考えられた。

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5件)

- ① Kanasaki H, Purwana I, Oride A, Mijiddorj T, Miyazaki K, Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Activation and Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 1 Induction by Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone in Pituitary Gonadotrophs. *Journal of Signal Transduction*, 査読あり, 2012, 2012, 1-7
- ② Mijiddorj T, Kanasaki H, Purwana IN, Oride A, Sukhbaatar U, Miyazaki K, Role of Neurokinin B and Dynorphin A in pituitary gonadotroph and somatotroph cell lines. *Endocrine Journal*, 査読あり, 59, 2012, 631-640
- ③ Kanasaki H, Purwana IN, Mijiddorj T, Oride A, Miyazaki K, Possible involvement of PACAP and PACAP type 1 receptor in GnRH-induced FSH β -subunit gene expression. *Regulatory Peptides*, 査読あり, 167, 2011, 227-232
- ④ Purwana IN, Kanasaki H, Oride A, Mijiddorj T, Miyazaki K. Expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) type 1 receptor (PAC1R) potentiates the effects of GnRH on gonadotropin subunit gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読あり, 410, 2011, 295-300
- ⑤ Purwana IN, Kanasaki H, Oride A et al, GnRH-induced PACAP and PAC 1 receptor expression in pituitary gonadotrophs: a possible role in the regulation of gonadotropin subunit gene expression. *Peptides*, 査読あり, 31, 2010, 1748-1755

[学会発表] (計8件)

- ① 折出亜希、金崎春彦、ミジドルジ ツェルメグ、スクバツタル ウヌルジャルガル、宮崎康二、GnRH産生ニューロンにおけるキスペプチンによるGnRH受容体発現について、第17回日本生殖内分泌学会学術集会、2012年12月08日、東京ステーションコンファレンス(東京)
- ② Kanasaki H, Oride A, Miyazaki K, Expression of the Pituitary Adenylate C

yclase-Activating Polypeptide (PACAP)
Type 1 Receptor (PAC1R) Potentiates
the Effects of GnRH on Gonadotropin
Subunit Gene Expression, ENDO2012, 2
012年6月23日, Huston, USA

- ③ Oride A, Kanasaki H, Miyazaki K, Possible Involvement of PACAP and PACAP type 1 Receptor in GnRH-Induced FSH β -Subunit Gene Expression, ENDO2012, 2012年6月23日, Huston, USA
- ④ 金崎春彦, プルワナインドリ, 折出亜希, ミジドルジツェルメグ, 宮崎康二, GnRHパルス頻度依存性ゴナドトロピン産生・分泌調節における PACAP 及び PAC1 受容体の関与, 第84回日本内分泌学会, 2011年4月21日, 神戸国際会議場 (神戸)
- ⑤ プルワナインドリ, 金崎春彦, 折出亜希, ミジドルジツェルメグ, 宮崎康二, MAP kinase phosphatase1 (MKP1) は高頻度 GnRHパルス刺激で特異的に発現する, 第84回日本内分泌学会, 2011年4月21日, 神戸国際会議場 (神戸)
- ⑥ 折出亜希, 金崎春彦, プルワナインドリ, ミジドルジツェルメグ, 宮崎康二, TRH還流刺激による ERK 活性化反応及び MKP1 発現, 日本下垂体研究会第25回学術集会, 2010年8月19-21日, 伊良湖ガーデンホテル (愛知)
- ⑦ Oride A, Kanasaki H, Purwana IN, Miyazaki K, Activation of ERK and induction of MKP1 by perifused TRH stimulation; Possible role for prolactin gene expression in rat pituitary GH3 cells, ENDO2010, 2010年6月11日, San Diego, USA
- ⑧ 折出亜希, 金崎春彦, インドリ プルワナ, 宮崎康二, TRHによるMKP-1発現及びPRL産生機構への関与について, 第62回日本産科婦人科学会学術講演会, 2010年4月23日, 東京国際フォーラム (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

折出 亜希 (ORIDE AKI)
島根大学・医学部・産婦人科・助教
研究者番号: 00423278

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

ミジドルジツェルメグ (Mijiddorj Tselmeg)
島根大学医学部・大学院生
研究者番号: なし