

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592404

研究課題名(和文) GnRHパルス頻度依存性特異的ゴナドトロピン発現機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of specific regulation of gonadotropin subunits expression by pulsatile GnRH stimulation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：高頻度GnRH刺激では低頻度GnRH刺激に比べてゴナドトロピン細胞内のPACAP及びPACAP受容体であるPAC1受容体発現が優位に増加する。またPACAPは単独でゴナドトロピンサブユニット発現能を持ち、その効果は濃度依存性であることから、下垂体局所で産生されるPACAPがオートクライン・パラクライン的に作用し、効果を発揮しているものと考えられた。PAC1受容体発現量の増加はPACAPの刺激効果を高めるだけでなく、GnRHの作用も増強させることが分かった。またPACAPはGnRHニューロン細胞株においてもその機能を修飾していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：PACAP and its receptor are expressed not only in the central nervous system, but also in peripheral organs and function to stimulate pituitary hormone synthesis and release as both hypothalamic-pituitary releasing factor as well as an autocrine-paracrine factor within the pituitary. PACAP stimulates the expression of the gonadotropin alpha, LH beta and FSH beta subunits as well as the GnRH receptor and its own PACAP type I receptor (PAC1R) in gonadotropin-secreting pituitary cells. In turn, GnRH, which has been known as a crucial component of gonadotropin secretion, stimulates the expression of PACAP and PAC1R in gonadotrophs. In addition, PAC1R presents in GnRH-producing neuronal cells and PACAP modulates the functions of GnRH neurons. It is evident that PACAP plays a role in reproductive function through regulating gonadotropins directly or indirectly by modulating GnRH release.

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：GnRH ゴナドトロピン

1. 研究開始当初の背景

下垂体ゴナドトロピンは主として視床下部 GnRH により制御されているが、視床下部 GnRH は律動的に分泌頻度と振幅を変えることで、LH、FSH の分泌を特異的に制御している。正常な月経周期においては、卵胞形成期に GnRH は比較的低頻度のパルス状に分泌され、FSH が優位に上昇して卵胞を刺激、排卵近くなると GnRH 分泌は高頻度パルス状に変化して LH サージをもたらす、排卵を誘発する。高頻度 GnRH パルスでは LH 優位、低頻度 GnRH パルスでは FSH 優位に分泌されるという GnRH パルス頻度特異性が存在する。一方 GnRH 産生ニューロンから GnRH がパルス状に分泌されるメカニズムについても依然不明であり、パルスの本質を解明する必要がある。

2. 研究の目的

GnRH パルス頻度特異的 LH 及び FSH β サブユニット発現メカニズムを検討する事を目的とし、視床下部ペプチドである PACAP 及びその受容体の関与について調べる事を目的とした。それに関連し、PACAP の GnRH ニューロンに対する作用についても検討した他、近年同定された gonadotropin inhibitory hormone (GnIH) の受容体発現について調べた。

3. 研究の方法

メディウムを持続還流可能とし、GnRH をパルス状に投与を行う perifusion system を用いた。ゴナドトロピン産生モデル細胞として L β T2 細胞、GnRH 産生ニューロンのモデル細胞として GT1-7 細胞を用いた。遺伝子発現の評価はルシフェラーゼベクターを用いた転写活性の評価及び mRNA の測定を行った。

4. 研究成果

(1) GnRH パルス刺激による PACAP 及び PAC1 受容体発現とゴナドトロピンサブユニット特異的発現への関与について

高頻度 GnRH 刺激では低頻度 GnRH 刺激に比べてゴナドトロピン細胞内の PACAP 及び PACAP 受容体である PAC1 受容体発現が優位に増加した。また PACAP は単独でゴナドトロピンサブユニット発現能を持ち、その効果は濃度依存性であることから、下垂体局所で産生される PACAP がオートクライン・パラクライン的に作用し、効果を発揮しているものと考えられた。このことは GnRH による FSH β 産生作用が PACAP の拮抗剤で阻害されることから明らかであった。また PAC1 受容体発現量の増加は PACAP の刺激効果を高めるだけでなく、GnRH の作用も増強させることが分かった。

(2) GnRH 産生ニューロンにおける PACAP の作用

GnRH ニューロンの産生株である GT1-7 細胞には PACAP の受容体が存在した。PACAP は GT1-7 細胞において ERK 経路及び cAMP/PKA 経路を活性化させることが分かった。また PACAP は GT1-7 細胞内に存在する GnRH 受容体を cAMP/PKA 依存的に増加させることも明らかとなった。これらの結果は視床下部 GnRH ニューロンが PACAP の作用で修飾されている可能性を示している。

(3) 下垂体ゴナドトロピン産生細胞及び GnRH 産生ニューロンにおける GnIH 受容体発現について

L β T2 細胞、下垂体前葉初代培養細胞、GT1-7 細胞には GnIH 受容体である GPR74、GPR147 の mRNA 発現を認めた。L β T2 細胞において GnRH は GPR74 発現を増加させた。下垂体初代培養細胞においても GnRH は GPR74、GPR147 を共に増加させた。パルス状 GnRH 刺激を行うと GPR74、GPR147 発現は低頻度 GnRH パルス刺激で高頻度 GnRH パルス刺激と比べてより優位に発現が増加した。視床下部 GT1-7 細胞に対し Perifusion system を用いてキスペプチンの間欠刺激(パルス刺激)を行うと GPR74、GPR147 共に発現が有意に増加した。L β T2 細胞において恒常活性化型 MEKK 及び PKA の細胞内への導入は、それぞれ単独で GPR74、GPR147 mRNA 発現を増加させた。一方 GT1-7 細胞においては MEKK 及び PKA の同時発現時のみ GPR74、GPR147 mRNA の発現が増加した。これらの結果より GnRH は下垂体ゴナドトロピン産生細胞において GnIH 受容体発現を制御し、キスペプチンは視床下部 GnRH ニューロンにおいて GnIH 受容体発現を制御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 10 件)

¹ Sukhbaatar U, Kanasaki H, Mijiddorj T, Oride A, Miyazaki K: Expression of gonadotropin-inhibitory hormone receptors in mouse pituitary gonadotroph L β T2 cells and hypothalamic gonadotropin-releasing hormone-producing GT1-7 cells. *Endocr J* 61,253-34, 2013

Sukhbaatar U, Kanasaki H, Mijiddorj T, Oride A, Miyazaki K: Kisspeptin induces expression of gonadotropin-releasing hormone receptor in GnRH-producing GT1-7 cells overexpressing G protein-coupled receptor 54. *Gen Comp Endocrinol* 194, 94-101, 2013

³ Kanasaki H, Mijiddorj T, Sukhbaatar U, Oride A, Miyazaki K: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) increases expression of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor in GnRH-producing GT1-7 cells overexpressing PACAP type I receptor.

Gen Comp Endocrinol 193: 95-102, 2013

⁴ Kanasaki H, Purwana IN, Oride A, Mijiddorj T, Sukhbaatar U, Miyazaki K: Circulating kisspeptin and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) do not correlate with gonadotropin serum levels.

Gynecol Endocrinol 29: 583-587, 2013

⁵ Kanasaki H, Purwana IN, Miyazaki K: Possible role of PACAP and its PAC1 receptor in the differential regulation of pituitary LH β - and FSH β - subunit gene expression by pulsatile GnRH stimulation.

Biol Reprod 88: 1-5, 2013

⁶ Mijiddorj T, Kanasaki H, Sukhbaatar U, Oride A, Purwana IN, Miyazaki K: Prolonged stimulation with thyrotropin-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide desensitize their receptor functions in prolactin-producing GH3 cells.

Mol Cell Endocrinol 365: 139-145, 2013

⁷ Son YL, Ubuka T, Millar RP, Kanasaki H, Tsutsui K: Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits GnRH-induced gonadotropin subunit gene transcriptions by inhibiting AC/cAMP/PKA-dependent ERK pathway in L β T2 cells. Endocrinology 153: 2332-2343, 2012

⁸ Mijiddorj T, Kanasaki H, Purwana IN, Oride A, Sukhbaatar U and Miyazaki K: Role of Neurokinin B and Dynorphin A in pituitary gonadotroph and somatolactotroph cell lines. Endocr J 59: 631-640, 2012

⁹ Kanasaki H, Purwana IN, Mijiddorj T, Sukhbaatar U, Oride A, Miyazaki K: Effects of estradiol and progesterone on gonadotropin LH β - and FSH β -subunit promoter activities in gonadotroph L β T2 cells.

Neuro Endocrinol Lett 33: 608-613, 2012

¹⁰ Mijiddorj T, Kanasaki H, Purwana IN, Oride A, Sukhbaatar U and Miyazaki K: Effects of estradiol and progesterone on prolactin transcriptional activity in somatolactotrophic cells. Endocr J 59: 867-879, 2012

{学会発表}(計 6 件)

1. Haruhiko Kanasaki, Tselmeg Mijiddorj, Unurjargar Sukhbaatar, Aki Oride, Kohji Miyazaki: Prolonger stimulation with thyrotropin-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide desensitize their receptor functions in prolactin-producing GH3 cells.

The Endocrine Society's 95th annual meeting. San Francisco, CA(USA), 6/17/2013

2. Tselmeg Mijiddorj, Haruhiko Kanasaki, Unurjargar Sukhbaatar, Aki Oride, Kohji Miyazaki: Stimulatory effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its PACAP type I receptor (PAC1R) on prolactin synthesis in rat pituitary

somatolactotroph GH3 cells

The Endocrine Society's 95th annual meeting. San Francisco, CA(USA), 6/17/2013

3. Haruhiko Kanasaki, Aki Oride, Tselmeg Mijiddorj, Unurjargar Sukhbaatar, Kohji Miyazaki: Circulating kisspeptin and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide do not correlate with gonadotropin serum levels.

2nd World Conference Kisspeptin, Tokyo, 11/6-9/2012

4. Haruhiko Kanasaki, Aki Oride, Indri Purwana, Tselmeg Mijiddorj, Unurjargar Sukhbaatar, Kohji Miyazaki: Expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) type 1 receptor (PAC1R) potentiates the effects of GnRH on gonadotropin subunit gene expression. The Endocrine Society's 94th annual meeting. Houston, TX (USA), 6/26/2012

5. Kanasaki H, Oride A, Purwana IN, Mijiddorj T and Miyazaki K: GnRH-induced PACAP and PAC1 Receptor Expression in Pituitary Gonadotrophs: A Possible Role in the Regulation of Gonadotropin Subunit Gene Expression

The Endocrine Society's 93rd annual meeting. Boston, MA (USA), 6/24/2011

6. Kanasaki H, Oride A, Purwana IN, Miyazaki K. Follistatin, induced by thyrotropin-releasing hormone (TRH), plays no role in prolactin expression but affects gonadotropin FSH β expression as a paracrine factor in pituitary somatolactotroph GH3 cells.

14th International Congress of Endocrinology (ICE2010), Kyoto(Japan), 2010/3/26-30

{図書}(計 1 件)

1. Haruhiko Kanasaki, Aki Oride Kohji Miyazaki: Specific regulation of gonadotropin LH β - and FSH β -subunit gene expression by pulsatile GnRH stimulation. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH): Production, Structure & Function: Nova Scientific Press, Inc (Ney York), 123-139, 2013

{産業財産権}

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

折出 亜希 (ORIDE, Aki)
島根大学 医学部 助教
研究者番号：00423278

(3) 連携研究者

()

研究者番号：