

ヒト卵巣顆粒膜細胞における GnIH の生理作用

大石 元^{1,2)}, 矢野 哲¹⁾, 武谷 雄二¹⁾, 筒井 和義³⁾,
George E. Bentley⁴⁾, Peter CK Leung²⁾

1) 東京大学医学部産科婦人科

2) British Columbia 大学産婦人科

3) 早稲田大学教育・総合科学学術院生物学教室

4) カリフォルニア大学バークレイ校 Helen Willis Neuroscience Institute

はじめに

脊椎動物の生殖腺の発達と機能は、ゴナドトロピンの放出を刺激する脳ホルモンであるゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) が視床下部ニューロンより分泌されることにより、正に制御されている。一方で生殖腺刺激ホルモンを抑制する脳ホルモンの存在は長く不明であったが、2000年にゴナドトロピンの放出を抑制する新規の脳ホルモンである GnIH がウズラの視床下部より単離同定され、GnIH (gonadotropin-inhibitory hormone) と名付けられた [1]。

鳥類においては下垂体のゴナドトロピン放出を抑制するニューロペプチドとして同定された一方、哺乳類では GnIH の同族ペプチドとして RFRP-3 (RF-amide related peptide-3) が同定されており中枢神経系や性腺での発現が報告されているが、その機能は不明である [2]。また RFRP-3 の受容体として GPR147 が同定されている [3]。

GnIH の作用点として視床下部 GnRH ニューロンの抑制、下垂体前葉のゴナドトロピン分泌細胞の抑制、性腺での直接的な抑制作用などが報告されている [4]。GnIH の生殖腺抑制作用は、視床下部での GnRH あるいは下垂体レベルでのあるいはゴナドトロピン放出の抑制が最も寄与する因子であると考えられているが、性腺での GnIH および GnIH 受容体の局在が明らかになったことから GnIH の局所作用の関与もありうる (図1) [5-8]。哺乳類では RFRP-3 のラット精巣あるいはマウス卵巣での直接作用が報告されており、どちらの報告でもステロイド合成が抑制され、生殖機能抑制に働くものと考えられている [9, 10]。

ヒトあるいは霊長類では GPR147 および RFRP-3 が視床下部で同定されているが、その機能は明らかにならず、生理的意義も不明である [11, 12]。今回われわれは性腺での GnIH の局所作用に着目し、ヒト卵巣顆粒膜細胞における RFRP-3 の局在と直接的な生理作用を明らかにした。

ヒト卵巣顆粒膜細胞における RFRP-3 とその受容体の発現

体外受精を受ける患者の同意を得たうえで、採卵時に得られる黄体化顆粒膜細胞の初代培養系を用いた。RT-PCR 法およびウエスタンブロッティング法により黄体化顆粒膜細胞での RFRP-3 とその受容体である GPR147 の発現を確認した (図2)。

また正常ヒト卵巣組織切片で免疫組織染色を行い、顆粒膜細胞での RFRP-3 および GPR147 の局在を認めた。GPR147 は顆粒膜細胞層に局在し一部莢膜細胞層にも存在しており、発育卵胞および黄体で発現していた。一方で、RFRP-3 は発育卵胞と黄体の顆粒膜細胞層で発現を認めた (図3)。両者ともに卵胞期後期の成熟卵胞から黄体期での発現を認め、顆粒膜細胞層で両者が共存しており、局所での作用が予想された。

ヒト顆粒膜細胞での RFRP-3 の作用

ヒト生殖における RFRP-3 系の機能を明らかにするために、体外受精患者から得たヒト黄体化顆粒膜細胞の初期培養系を使用した。RFRP-3 とともに 8-Br-cAMP, Forskolin, FSH または LH を添加し、プロゲステロン生成量および細胞内 cAMP 濃度と StAR (steroidogenic acute regulatory protein) の発現量の変化をそれぞれ ELISA 法と Real Time qPCR 法にて測定したところ、FSH, LH, Forskolin にて誘導されたプロゲステロン合成、細胞内 cAMP 濃度、StAR の発現量は RFRP-3 処

連絡先：大石 元，東京大学医学部産科婦人科
〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1
TEL：03-5800-8657
FAX：03-3816-2017
hooishi-tky@umin.ac.jp

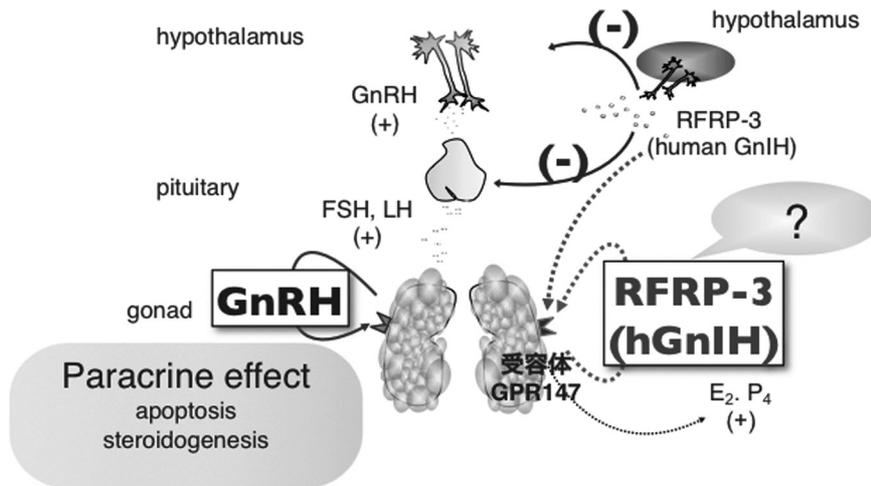


図1 性腺における RFRP-3の作用
本研究では GnRH と同様に性腺での局所的な生理作用をもつ可能性を検討した。

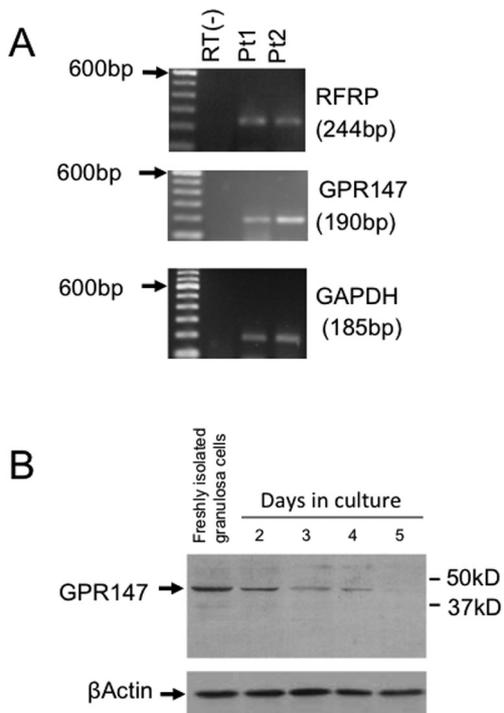


図2 ヒト黄体化顆粒膜細胞における RFRP-3と GPR147の発現
(A) 2人の別々の患者由来の細胞から得た細胞での発現を RT-PCR により検出。
(B) 顆粒膜細胞のタンパク抽出液の GPR147の発現をウエスタンブロットングにより検出。

理によって抑制された (図4-6)。8-Br-cAMPで誘導した場合および無刺激状態では、RFRP-3による抑制作用は認められなかった。以上より RFRP-3の作用は G 蛋白共役受容体である GPR147および G 蛋白 α サブユニットを介して、アデニルサイクラーゼを抑制的に制御していることが予想された。

プロゲステロン合成系における RFRP-3/GPR147の作用点

以上の仮説を明らかにするために、①黄体化顆粒膜細胞において GPR147を siRNA 法にてノックダウンし (図7)、②RFRP-3の受容体拮抗剤である RF 9を添加したところ (図8)、RFRP-3によるフォルスコリンまたはゴナドトロピンで刺激されたプロゲステロン生合成の抑制が解除されることが示された。さらに GPR147に会合する G 蛋白 $\beta\gamma$ サブユニットの阻害剤である百日咳毒素にて前処理したところ、同様に RFRP-3によるプロゲステロン生合成の上昇抑制作用が阻害された (図9)。

RFRP-3/GPR147によってプロゲステロン合成系が負に制御されており、その機序はゴナドトロピンによるアデニルサイクラーゼの活性化を抑制することによるものであることが明らかとなった。

RFRP-3/GPR147の発現の制御については、不明な点が多い。GPR147の発現量はフォルスコリンおよびゴナドトロピンの処理により変化せず、また RFRP-3処理でゴナドトロピン受容体の発現レベルも変化しなかった。GPR147とゴナドトロピン受容体は G 蛋白共役7回膜貫通型受容体であり、そのシグナルは受容体より下流で作用し、アデニルサイクラーゼの活性調節に収束しているものと予想された (図10)。

まとめ

われわれはヒト GnIH である RFRP-3はヒト卵巣において顆粒膜細胞に特異的に発現し、受容体である GPR147を介してゴナドトロピンのシグナル伝達系を抑制す

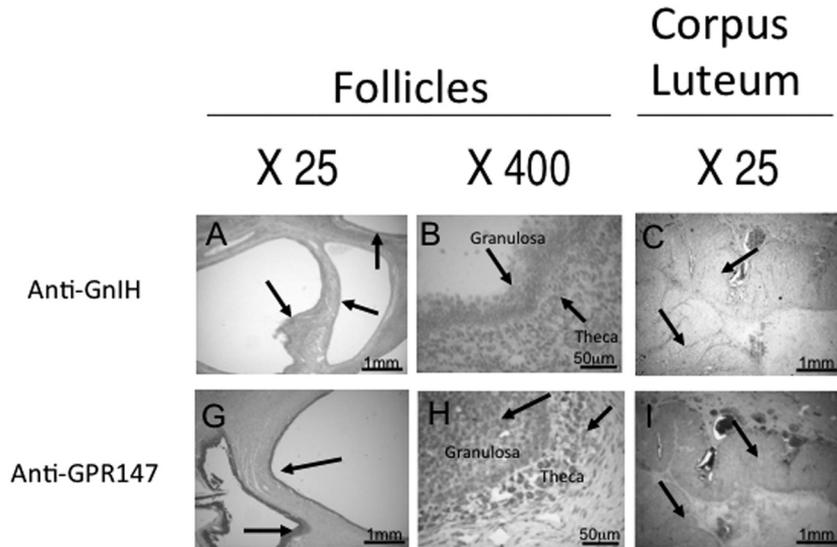


図3 生殖年齢女性の卵巣を用いた RFRP-3 および GPR147 の免疫染色

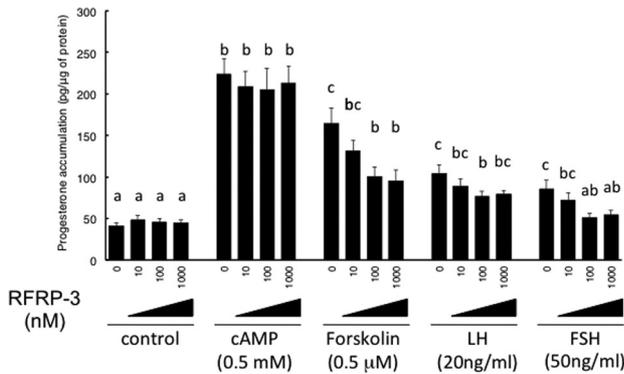


図4 RFRP-3によるヒト黄体化顆粒膜細胞でのプロゲステロン生成の抑制 (n = 5)
異なるアルファベットは p < 0.05 を示す. (Tukey test)

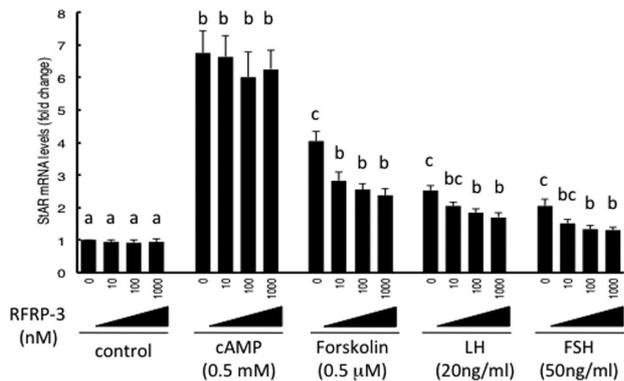


図5 RFRP-3によるヒト黄体化顆粒膜細胞での StAR mRNA の抑制 (n = 5)

ることを明らかにした. RFRP-3は GPR147に特異的に結合し, G 蛋白 α_i サブユニットを活性化させアデニルサイクラーゼを抑制することにより, ゴナドトロピン刺激で上昇した cAMP 濃度と StAR 発現を減少させ, プロゲステロン生成を抑制するものと考えられる.

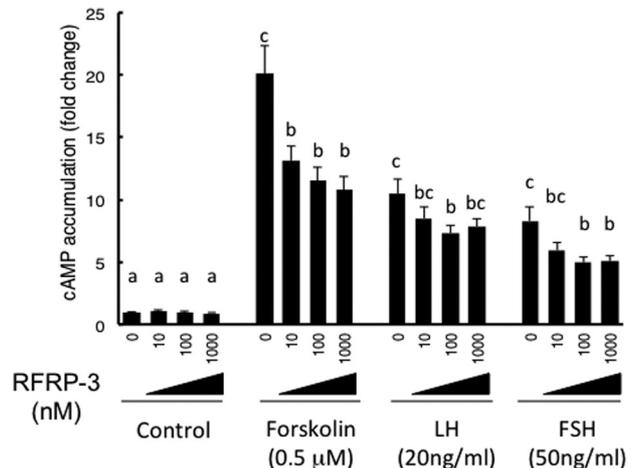


図6 RFRP-3によるヒト黄体化顆粒膜細胞での細胞内 cAMP 濃度の抑制 (n = 5)

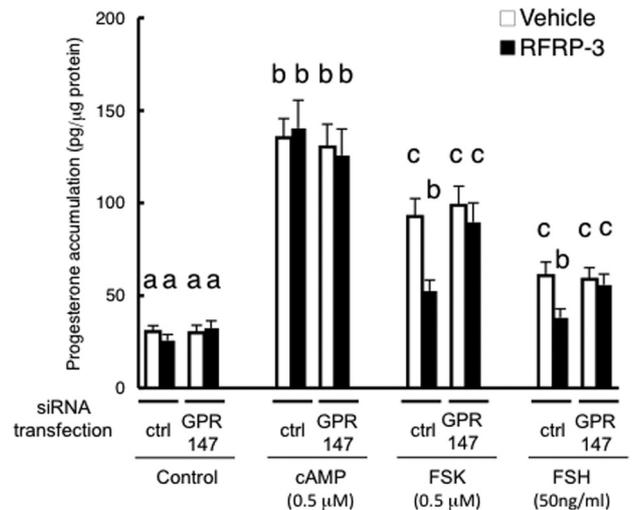


図7 GPR147ノックダウンによる RFRP-3 のプロゲステロン生成抑制作用の解除 (n = 5)

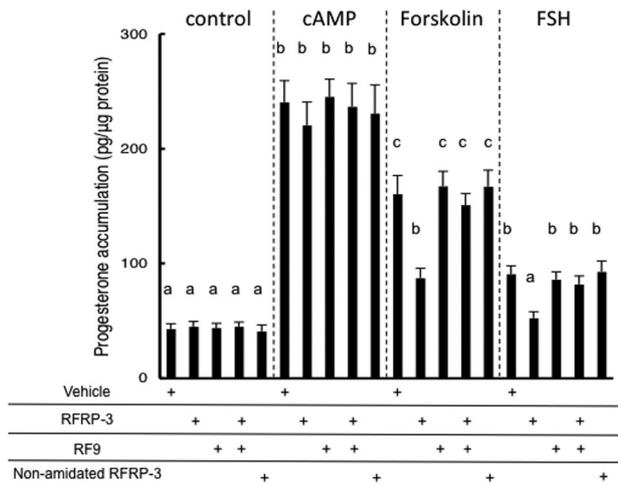


図8 RFRP-3アンタゴニストRF9投与によるRFRP-3のプロゲステロン生成抑制作用の解除 (n=5)
非アミド化RFRP-3投与ではRFRP-3でみられる抑制効果を認めない。

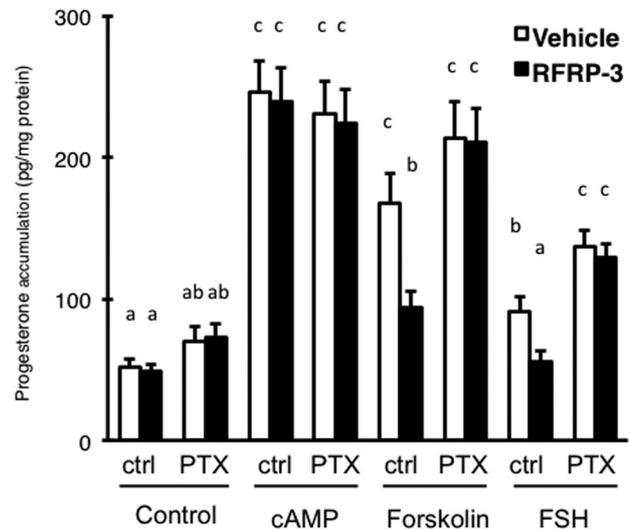


図9 G蛋白質iサブユニットの阻害剤である百日咳毒素での前処理による、RFRP-3のプロゲステロン生成抑制作用の解除 (n=5)

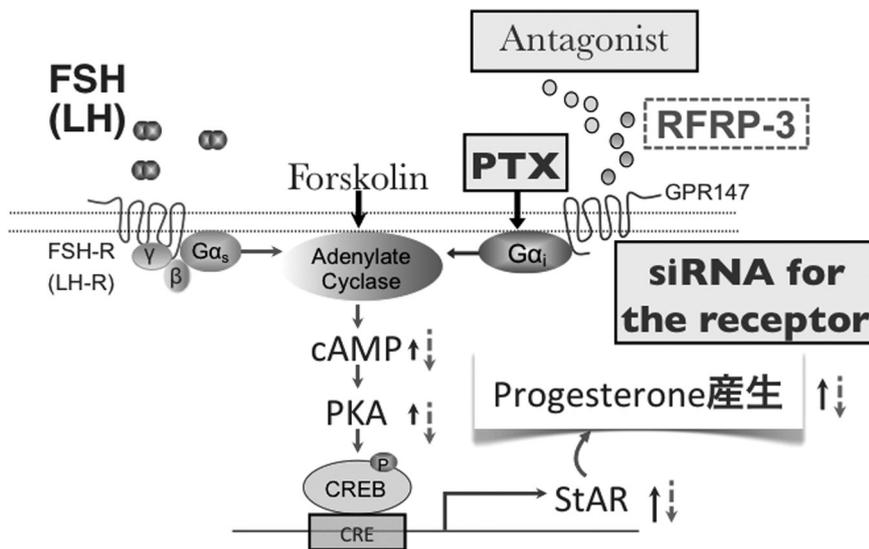


図10 ゴナドトロピンのシグナル伝達系とRFRP-3/GPR147の作用点

ヒト顆粒膜細胞でのステロイド合成の制御にRFRP-3が関与している可能性が示唆された。今後ヒトRFRP-3が生体内で卵胞発育や性ステロイド合成に対してどのような生理的作用をもつのかを明らかにする必要がある。

当研究は研究施設での研究倫理審査により承認されたうえで施行されている。

謝 辞

本稿は2011年度に日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞した研究内容をまとめたものである。本稿の執筆の機会を与えてくださいました日本生殖内分泌学会理事長 苛原 稔先生、第16回学術集會会長 宮本 薫先生、ならびに広報理事 筒井和義先生に感謝いたします。

引用文献

1. Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, et al (2000) A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 275, 661-667.
2. Hinuma S, Shintani Y, Fukusumi S, et al (2000) New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat Cell Biol* 2, 703-708.
3. Yoshida, H, Habata H, Hosoya M, et al (2003) Molecular properties of endogenous RFamide-related peptide-3 and its interaction with receptors. *Biochim Biophys Acta* 1593, 151-157.
4. Smith JT, Clarke IJ (2010) Gonadotropin inhibitory hormone function in mammals. *Trends Endocrinol Metab*

- 21 : 255-260.
5. Ubuka T, Ukena K, Sharp PJ, et al (2006) Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits gonadal development and maintenance by decreasing gonadotropin synthesis and release in male quail. *Endocrinology* 147, 1187-1194.
 6. Bentley GE, Ubuka T, McGuire NL, et al (2008) Gonadotropin-inhibitory hormone and its receptor in the avian reproductive system. *Gen Comp Endocrinol* 156, 34-43.
 7. Maddineni SR, Ocón-Grove OM, Krzysik-Walker SM, et al (2008) Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) receptor gene is expressed in the chicken ovary: potential role of GnIH in follicular maturation. *Reproduction* 135, 267-274.
 8. Shimizu M, Bedecarrats, GY (2010) Activation of the chicken gonadotropin-inhibitory hormone receptor reduces gonadotropin releasing hormone receptor signaling. *Gen Comp Endocrinol* 167, 331-337.
 9. McGuire NL, Kangas K and Bentley GE (2011) Effects of melatonin on peripheral reproductive function: regulation of testicular GnIH and testosterone. *Endocrinology* 152, 3461-3470.
 10. Singh P, Krishna A, Tsutsui K (2010) Effects of gonadotropin-inhibitory hormone on folliculogenesis and steroidogenesis of cyclic mice. *Fertil Steril* 95, 1397-1404.
 11. Ubuka T, Morgan K, Pawson AJ, et al (2009) Identification of human GnIH homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the cognate receptor, GPR147 in the human hypothalamic pituitary axis. *PLoS One* 4, e8400.
 12. Ubuka T, Lai H, Kitani M, et al (2009) Gonadotropin-inhibitory hormone identification, cDNA cloning, and distribution in rhesus macaque brain. *J Comp Neurol* 517, 841-855.