

第 61 回日本産科婦人科学会・学術講演会

シンポジウム 2 「中枢神経関連生理活性物質の生殖機能へのかかわり」

(2) 中枢神経系に存在する生理活性物質 Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) によるゴナドトロピン産生調節

島根大学産科婦人科

講師 金崎 春彦

Regulation of Gonadotropin Subunit Gene Expression by Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)

Haruhiko KANASAKI

Department of Obstetrics and Gynecology, Shimane University School of Medicine, Shimane

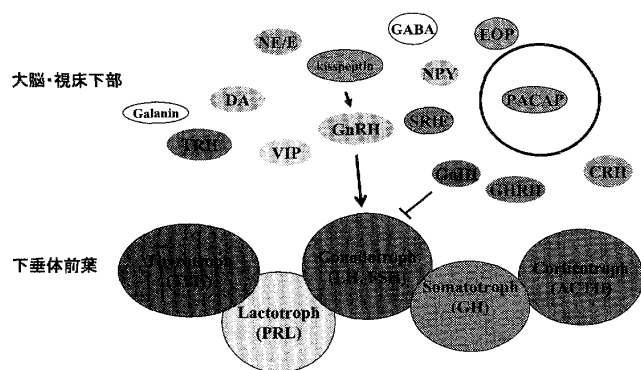
はじめに

下垂体ゴナドトロピンである LH (Luteinizing hormone) および FSH (Follicle stimulating hormone) は主として視床下部 Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) により制御されていると考えられてきた。視床下部から分泌された GnRH はその分泌パターンを変化させることで LH および FSH を特異的に下垂体ゴナドトロピン産生細胞より合成・分泌させる。つまり、卵胞期初期には 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、卵胞を発育させ、エストロゲン合成を促進する。その後排卵近くなると GnRH 分泌は高頻度パルス状に変化して LH を優位に増加させる。そしてエストロゲン上昇に伴うポジティブフィードバック機構が LH サージをもたらす。排卵を誘発する。その後十分な性ステロイドが分泌されると、ネガティブフィードバック機構により GnRH 分泌あるいはゴナドトロピン分泌が制御される。このように GnRH を中心とした視床下部—下垂体前

葉—性腺系が、女性の月経周期を極めて精巧に制御している。一方最近では、視床下部 GnRH 自体の分泌を制御する新規ペプチドであるキスペプチンが発見され、GnRH のパルス分泌あるいはサージ分泌を制御する機構が解明されつつある。また、GnRH がゴナドトロピン放出ホルモンであるのに対し、Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) と名づけられた新たなゴナドトロピン制御因子が注目されている。GnRH を中心としたゴナドトロピン制御機構が存在するのは間違いない。しかし、大脳視床下部には GnRH 以外に数多くの生理活性物質が存在する (図 1)。また、アクチビン—フォリスタチンによる FSH 制御は下垂体局所におけるオートクライン・パラクラインによるゴナドトロピン産生調節機構としてよく知られているが、下垂体局所においてもアクチビン、フォリスタチンの他にも数々の液性因子が存在し、それらの相互作用によりゴナドトロピン調整が行われている可能性がある (図 2)。

1989 年に下垂体細胞のアデニル酸シクラーゼを活性化する物質として視床下部より単離・同定

Key Words: PACAP, GnRH, LH, FSH, Gonadotroph



【図1】 大脳・視床下部因子によるホルモン産生調節

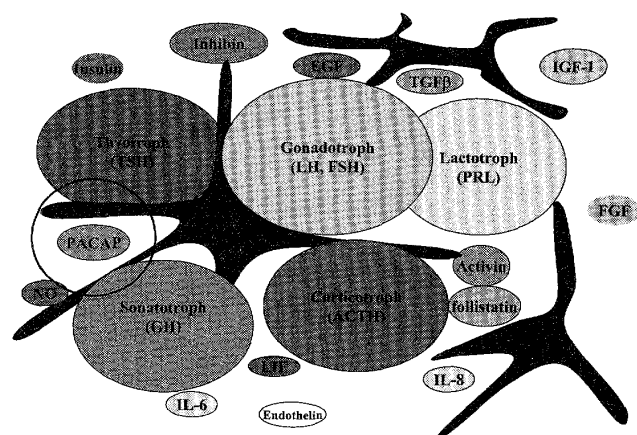
された Pituitary Adenylate Cyclase-Activation Polypeptide (PACAP) は、脳視床下部のみならず、脳下垂体前葉、卵巣組織を含む広い範囲の末梢組織に存在する生理活性物質である¹⁾。PACAP は vasoactive intestinal polypeptide (VIP)/グルカゴンファミリーに属し、中枢においては神経細胞の分化・生存維持や神経分泌系の活性化などに関与していることが知られているが、近年、成長ホルモンやプロラクチン分泌調節や排卵における役割など、生殖機能を含む多様な生理的役割が報告されるようになり、その解明が進んでいる。

視床下部 PACAP の下垂体門脈系を介する分泌パターン、あるいは局所における産生メカニズム、作用機序に関しては依然不明な点が多い。今回我々は PACAP が GnRH 以外のゴナドトロピン制御因子として機能しうるのでどうか、ゴナドトロピンサブユニット発現に関する作用および PACAP の細胞内情報伝達経路について検討した。

方 法

1. ゴナドトロフ

下垂体前葉にはゴナドトロピン産生細胞(ゴナドトロフ)の他、ACTH 産生細胞、成長ホルモン産生細胞、プロラクチン産生細胞など、少なくとも5つのホルモン産生細胞が混在しており、ゴナドトロフの単離は困難である。単一ゴナドトロフ内での現象を明らかにする為、本研究においてはゴナドトロフモデル細胞である LβT2 細胞を用いた。この細胞は3つのゴナドトロピンサブユニット(α , LH β , FSH β)を発現し、GnRH



【図2】 下垂体前葉局所におけるホルモン産生調節

に反応するなど、正常のゴナドトロフと共通した多くの機能をもつ細胞として知られている。

2. 細胞刺激方法

静止刺激の場合、LβT2 細胞培養ディッシュに PACAP に直接添加し、最終濃度 100nM 刺激とした。パルス刺激においては培養 chamber に LβT2 細胞を接着させた後、Perifusion system を設置し、メディウムを還流させた。5 分間の PACAP パルスを 30 分間隔で投与する高頻度パルスと 120 分間隔で投与する低頻度パルス刺激を行った。

3. プロモーターアッセイ

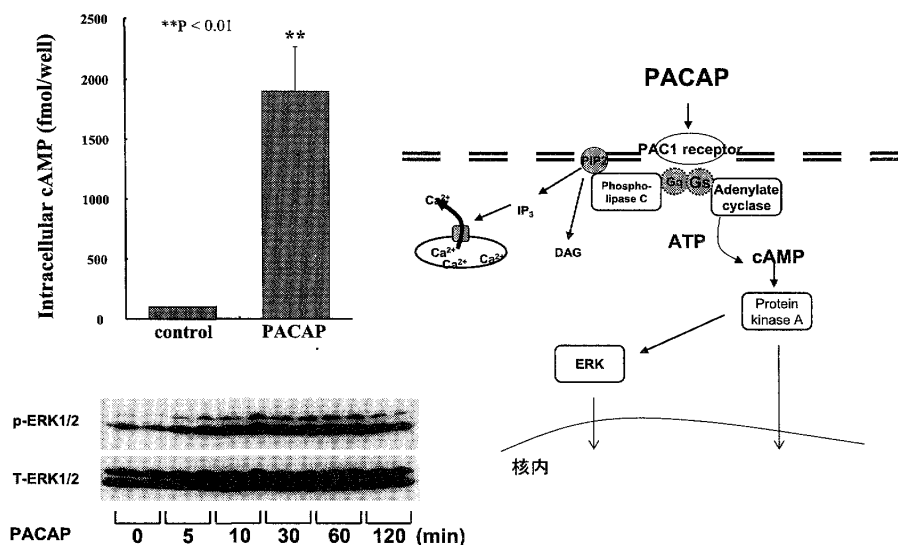
ルシフェラーゼベクターに、 α (-846/0), LH β (-797/+5), FSH β (-2000/+698) 各々のプロモーター領域を挿入し、転写活性をルシフェラーゼアッセイにて測定した。

4. mRNA 定量

ゴナドトロピンサブユニット(α , LH β , FSH β), GnRH 受容体, PACAP 受容体(PAC1)及びフォリスタチン発現を real-time RT-PCR 法を用いて測定した。

5. 統計処理

全ての実験は duplicate あるいは triplicate サンプルで行い、少なくとも3回は繰り返した。結果は mean $\pm$ SE を用いて示し、one-way ANOVA 法にて解析した。



【図3】 PACAP 刺激による細胞内情報伝達機構

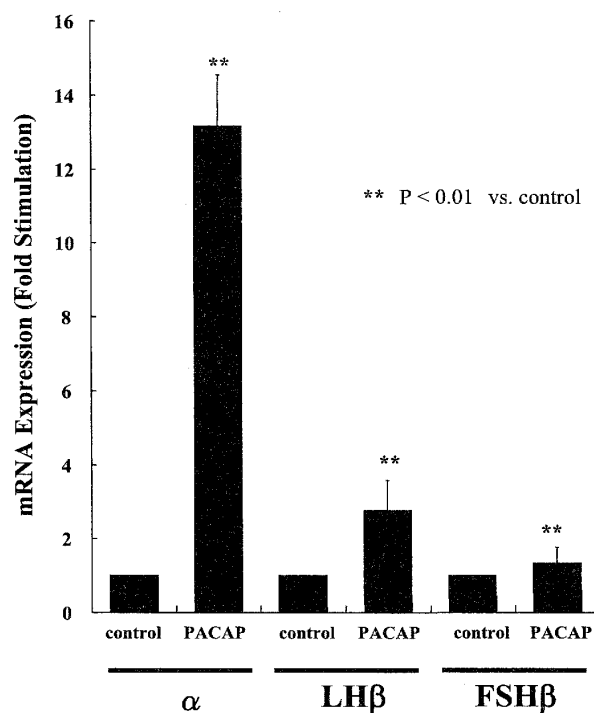
結 果

1. PACAP による細胞内情報伝達経路

PACAP はその名前の通り, adenylate cyclase を活性化し, 細胞内の cAMP 濃度を上昇させることでその作用を発揮するといわれている. 実際に我々の検討でも LβT2 細胞において PACAP 刺激により細胞内 cAMP 濃度が著明に増加した. また, MAP キナーゼファミリーの一つである Extracellular signal-regulated kinase (ERK) はゴナドトロピン発現に重要な役割を果たしていると言われているが, PACAP は ERK 活性も強く促進することが分かった. 特異的阻害剤を用いた実験から, ERK 活性化は PACAP による cAMP 上昇および Protein kinase A (PKA) に依存することを我々は報告している²⁾(図 3).

2. PACAP によるゴナドトロピンサブユニット発現

PACAP 静止刺激におけるゴナドトロピン発現について検討した. 血清除去メディアウムに LβT2 細胞を培養し, 最終濃度 100nM となるように PACAP を直接添加した. 24 時間後に mRNA を抽出し, real-time RT-PCR 法にて各サブユニット発現をコントロールと比較した. α サブユニット mRNA 発現は PACAP 刺激により約 13 倍に増加し, LHβ, FSHβ サブユニットはそれぞれ約 3 倍,

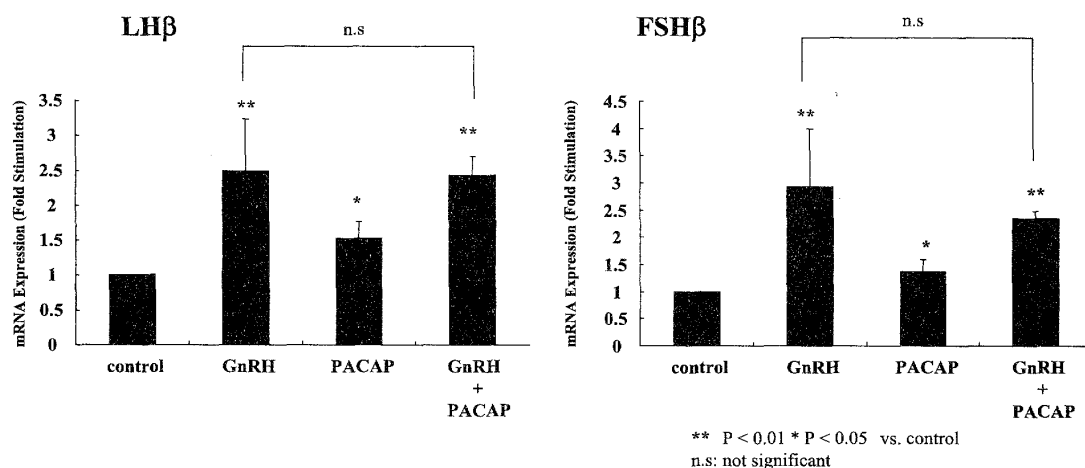


【図4】 PACAP によるゴナドトロピンサブユニット発現

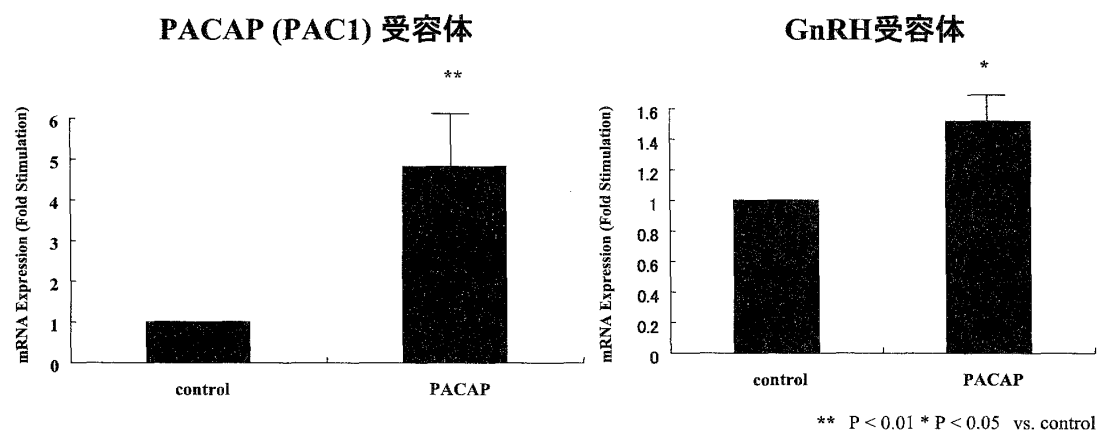
1.3 倍程度増加した(図 4). このことから, 視床下部ペプチドである PACAP は, GnRH と同様ゴナドトロピンサブユニット発現能を有することが明らかとなった.

3. PACAP の GnRH 作用に対する効果

次に GnRH による LHβ, FSHβ サブユニット発現作用に対する PACAP の効果について検討



【図5】 PACAP の GnRH に対する効果



【図6】 PACAP による受容体発現

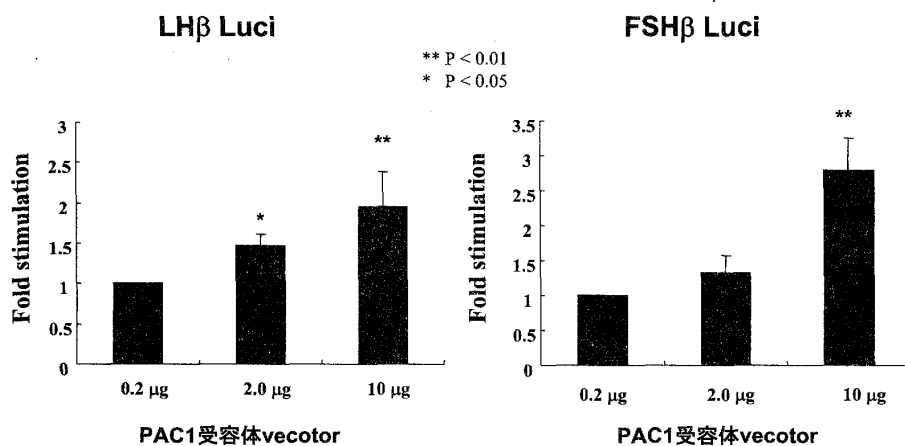
した. GnRH および PACAP を最終濃度 100nM となるように培養ディッシュに添加し, 24 時間培養した. GnRH, PACAP 共に LHβ, FSHβ 発現を有意に増加させたが, ギナドトロピン発現能は PACAP に比べて GnRH の方が強かった. GnRH のギナドトロピン発現効果は PACAP の存在で影響を受けなかった(図5).

4. PACAP による PAC1 受容体および GnRH 受容体発現

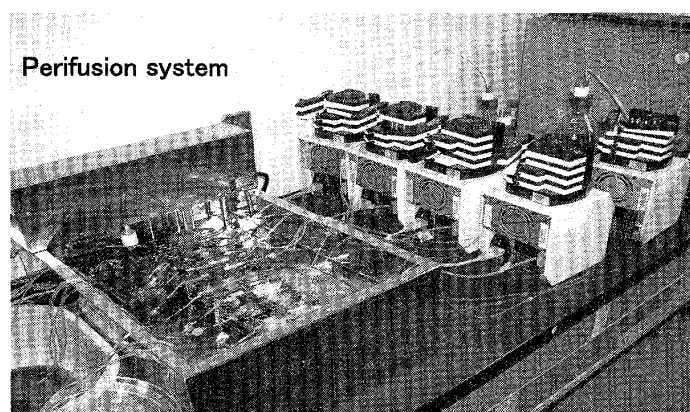
GnRH は自身の GnRH 受容体発現を促進することが分かっているが³⁾, PACAP による PACAP 自身の受容体である PAC1 受容体に対する効果および GnRH 受容体発現について検討した. PACAP による静止刺激で, PAC1 受容体 mRNA 発現は有意に増加した. また, GnRH 受容体発現も PACAP により制御されることが明らかとなった(図6).

5. PAC1 受容対数の変化によるギナドトロピン発現

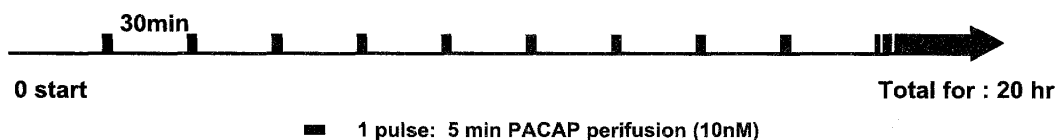
ギナドトロフにおいて PACAP はギナドトロピンサブユニット発現のみでなく, 自身の受容体及び GnRH 受容体を制御することが分かった. PACAP は自身の受容体である PAC 受容体数を増加させることで, どのような変化が生じるのか. PAC 受容体発現ベクターを LβT2 細胞へそれぞれ 0.2μg, 2.0μg, 10μg とベクター量を増加させて細胞内へ導入し, 同濃度(100nM)の PACAP 刺激による LHβ 及び FSHβ プロモーター活性をルシフェラーゼベクターを用いて測定した. その結果 LHβ 及び FSHβ ともに, PAC1 受容体発現数が多いほど, 同濃度の PACAP 刺激に対して発現が促進されることが明らかとなった(図7).



【図7】 PAC1 受容体数の変化によるゴナドトロピン発現



1 pulse/30 min stimulation 高頻度PACAP刺激



1 pulse/2 h stimulation 低頻度PACAP刺激

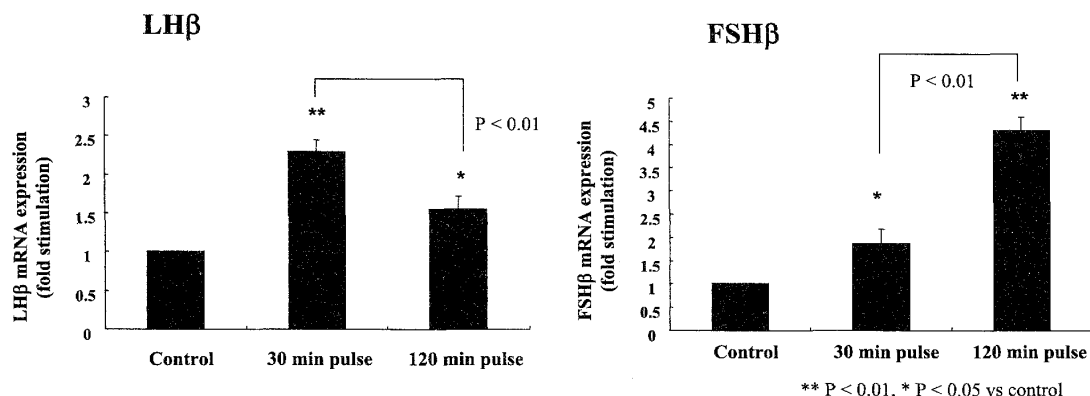


【図8】 Perifusion system を用いたパルス刺激

6. パルス状 PACAP 刺激によるゴナドトロピンサブユニット発現

GnRH は視床下部よりパルス状に分泌される。つまり GnRH の分泌頻度を変化させることで LH および FSH を特異的に制御している。下垂体培養細胞を用いた実験においても、高頻度 GnRH 刺激では LH が優位に産生され、低頻度 GnRH 刺激では FSH 優位となることが証明されている⁴⁾。現時点で PACAP の分泌動態は不明であるが、その存

在部位が室傍核、視索上核、弓状核などの GnRH ニューロン存在部位とオーバーラップする点を考えると、このペプチドが GnRH と同様にパルス状に分泌されている可能性がある。そこで、図8に示すような Perifusion system (還流装置) を作成し、メディウムを還流させながら5分間の PACAP 刺激を一定時間ごとに細胞に与える PACAP パルス刺激を行った。30 分間隔の PACAP 投与を高頻度 PACAP 刺激とし、120 分



【図9】 PACAP パルス頻度依存性ゴナドトロピンサブユニット発現

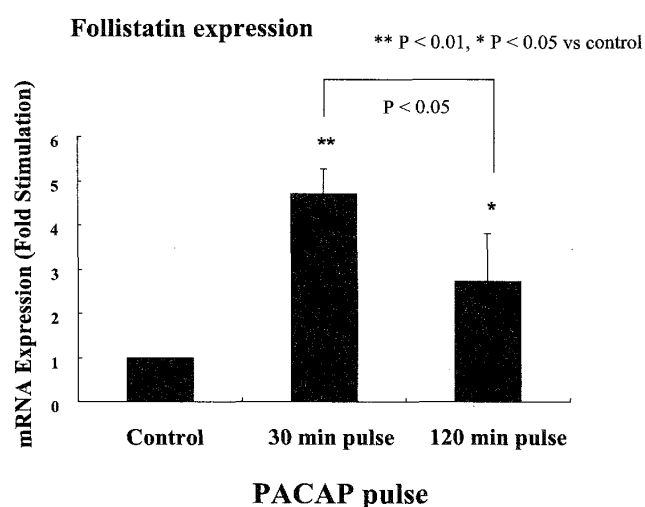
間隔の刺激を低頻度 PACAP 刺激としたが、この刺激頻度は LβT2 細胞において GnRH パルス刺激で最も LH および FSH 特異性発現が生じる頻度を選択した。PACAP パルス刺激 20 時間後のゴナドトロピン発現は、興味深いことに高頻度 PACAP 刺激では LHβ が FSHβ に比べて優位に増加し、低頻度 PACAP 刺激では FSHβ 発現が LHβ に比べて優位に増加した(図 9)。高頻度 PACAP 刺激で LHβ 優位、低頻度刺激で FSHβ 優位のゴナドトロピンサブユニット増加は、GnRH パルス刺激と全く同様の結果であった。

7. PACAP パルス刺激によるフォリスタチン発現

GnRH によるパルス頻度依存性ゴナドトロピン発現機構の詳細は依然不明である。しかし、ひとつの説としてフォリスタチンの役割が考えられている。アクチビンは FSHβ サブユニットの制御因子であるが、フォリスタチンはアクチビンと結合し、その生物活性を阻害するとされる。Burger et al.は下垂体前葉細胞を用いた実験で、高頻度 GnRH パルス刺激において特異的にフォリスタチン発現が増加することを報告している⁵⁾。では GnRH と同様にパルス頻度依存性 LHβ, FSHβ 発現能を持つ PACAP 刺激ではどうか？高頻度 PACAP パルス刺激で、フォリスタチンは約 4.5 倍に増加し、低頻度 PACAP 刺激に比べて優位にその発現が有意に増加した(図 10)。

8. PACAP パルス刺激による PAC1 受容体および GnRH 受容体発現

静止 PACAP 刺激にて、PACAP は自身の PAC1

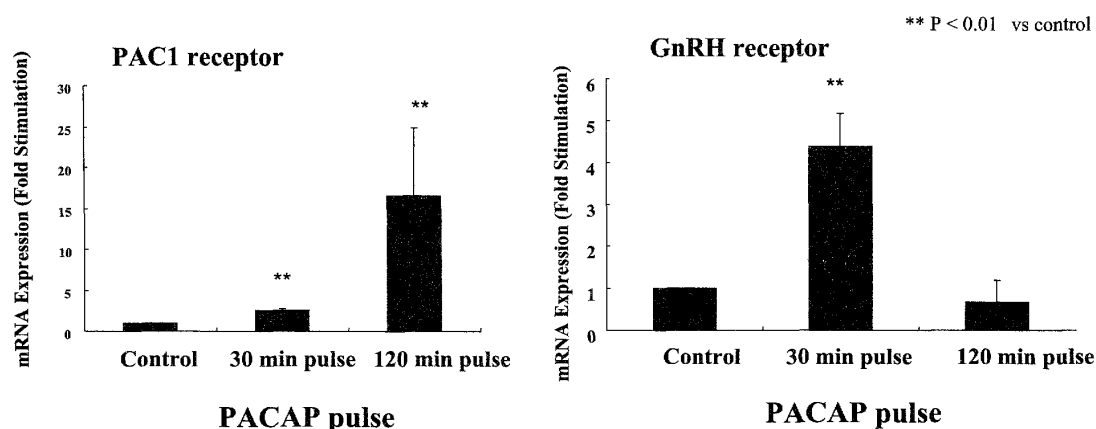


【図10】 PACAP パルス刺激によるフォリスタチン発現

受容体ならびに GnRH 受容体を増加させることが分かった(図 4)。それでは頻度依存的に LH, FSH 発現を制御するパルス状の PACAP 刺激ではこれらの受容体発現はどのように制御されるのか。次に高頻度および低頻度 PACAP 刺激後の受容体発現に関して検討した。両刺激頻度で 20 時間の PACAP パルス刺激を行った後、PAC1 受容体および GnRH 受容体 mRNA 発現を定量すると、PAC1 受容体は低頻度刺激で著明に増加した。一方 GnRH 受容体発現は高頻度刺激で著明に増加し、低頻度刺激では変化が無かった(図 11)。

考 察

女性の生殖内分泌が GnRH を中心とした視床下部—下垂体—卵巢系により制御されているのは間違いない。しかし、GnRH のみが下垂体 LH,



【図 11】 PACAP パルス刺激による受容体発現

FSH 分泌・合成に全責任を持ち、女性の性周期をコントロールしているのであろうか？というのが本研究を開始した動機である。また、我々はこれまで GnRH の刺激頻度による LH, FSH 特異的発現機序、つまり高頻度 GnRH 刺激では LH 優位、低頻度 GnRH 刺激では FSH が優位に増加するというメカニズムに関し、GnRH 以外の生理活性物質の関与も念頭において解明を進めてきた。その中で、GnRH とは異なる細胞内伝達様式をもつ PACAP に注目した。

PACAP は 1989 年にヒツジの脳下垂体から、下垂体前葉細胞のアデニル酸シクラーゼを活性化するペプチドホルモンとして分離同定された¹⁾。PACAP は多機能ペプチドとして数多くの作用が報告されているが、概日リズムの調節、情動行動の変化に対する作用、神経保護作用、知覚神経伝達に対する作用など、中神経系における役割のほか、末梢においてはインスリン分泌、アドレナリン分泌、卵巣からの性ステロイド分泌に関与するという報告がある⁶⁾。下垂体前葉細胞に PACAP が発現していることや、その受容体である PAC1 受容体が存在することは、このペプチドが下垂体ホルモン制御に何らかの役割を果たしている可能性を示している。実際 PACAP はゴナドトロピンに対する分泌促進作用を持つ⁷⁾、あるいは性周期でその発現が変動するといった報告がある⁸⁾。また PAC1 受容体欠損マウスあるいは PACAP ノックアウトマウスの生殖能力は大幅に低下するという事実は、生殖内分泌領域でのこのペプチドの重

要性を示している⁹⁾。

我々は単一のゴナドトロピン産生細胞における PACAP の作用について検討したが、PACAP は単独で全てのゴナドトロピンサブユニット発現能を持つことが分かった。このことは下垂体ゴナドトロピン産生調節が GnRH のみではなく、PACAP よりダイレクトに制御されることを示している。PACAP による LHβ, FSHβ 発現効果は GnRH よりも弱い、GnRH が GnRH 受容体自身を制御するのと同様に、PACAP は自身の受容体である PAC1 受容体を発現させ、GnRH 受容体をも制御することが分かった。PACAP と GnRH との同時刺激(刺激時間 12 時間)では、GnRH によるゴナドトロピン発現以上の効果は認められなかったが、PACAP は単独でのゴナドトロピン発現作用以外に、GnRH 受容体を制御することで GnRH 作用を高めている可能性はある。実際 Kaiser 博士らは同じ濃度の GnRH 刺激でも GnRH 受容体数が増加していればゴナドトロピンサブユニット発現能が増加することを実験的に証明している¹⁰⁾。一方 PACAP は PAC1 受容体を増加させることで、同一濃度の PACAP 刺激に対する反応性を高めていることが分かった。つまり、PACAP はゴナドトロピン発現に対する直接作用のみでなく、ゴナドトロフにおける GnRH 受容体および PAC1 受容体数を変化させることで、二次的に GnRH あるいは PACAP に対する反応性を高めているのではないかと考えている。

本研究において、PACAP のパルス刺激効果に

関しても検討を行った。視床下部 GnRH は月経周期によりその分泌頻度を変化させることで LH, FSH を特異的に合成・分泌させることが分かっている。つまり高頻度 GnRH パルス刺激では LH 優位, 低頻度 GnRH パルス刺激では FSH 優位に発現するという GnRH パルス頻度依存性ゴナドトロピンサブユニット発現機構が存在する。この現象は LβT2 細胞においても認められる¹¹⁾。一方 PACAP に関しては視床下部に存在することが分かっている以外, その分泌動態はまったく分かっていない。しかし, 下垂体門脈に伸びるニューロン軸索末端に高濃度の PACAP 発現が見られるという報告や¹²⁾, 下垂体門脈中の PACAP 濃度は末梢血中よりも高濃度であるという事実は¹³⁾, PACAP が GnRH と同様に下垂体門脈中に放出され, ゴナドトロフに作用している可能性を示している。では PACAP を GnRH と同様にパルス状にゴナドトロフへ作用させた場合, ゴナドトロピン合成はどのようになるのか? 興味深いことに, PACAP パルス刺激にてゴナドトロピンサブユニットは特異的に制御された。つまり, GnRH と同様に, 高頻度 PACAP 刺激においては LHβ サブユニット発現が優位, 低頻度 PACAP 刺激においては FSHβ 発現が優位に生じるというパルス頻度依存性ゴナドトロピン発現が生じたのである。また, 高頻度 PACAP パルスではフォリスタチンが低頻度刺激に比べて有意に増加しており, この現象も高頻度 GnRH 刺激と同様であった。一方 PACAP による受容体発現であるが, 高頻度 PACAP 刺激では GnRH 受容体が, 低頻度刺激では PAC1 受容体がほぼ特異的に増加していることが分かった。これらの結果は PACAP パルス刺激による特異的ゴナドトロピンサブユニット合成機構に, フォリスタチンのみならず, 視床下部ペプチイドに対する受容体発現の変化が関与している可能性を示している。

PACAP の生理的な分泌機構あるいは生殖内分泌領域における役割の詳細については依然不明な点が多い。しかし, 単一のゴナドトロピン産生細胞に対してゴナドトロピン発現能を有し, また自身の受容体及び GnRH 受容体数を制御しうる物

質であることは, この中枢性生理活性物質が GnRH 以外のゴナドトロピン制御因子であり, 生殖機能を調節する重要な物質である可能性がある。また, PACAP パルス刺激によるゴナドトロピン発現機構, 受容体発現を含む細胞応答の変化について解明することは, GnRH による LH, FSH 特異的制御機構の解明にもつながる重要な意味を持つものと考えている。

謝 辞

本シンポジウムで発表の機会を与えて下さいました嘉村敏治学術集会長, ならびに座長の労をお取下さいました倉智博久教授, 峯岸 敬教授に厚く御礼を申し上げます。また, 本研究をご指導頂きました恩師 宮崎康二教授, 島根大学医学部産科婦人科学教室 折出亜希助教, サンドラムティアラ院生, インドリプルワナ院生に深く感謝します。

文 献

- 1) Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164: 567—574
- 2) Harada T, Kanasaki H, Mutiara S, Oride A, Miyazaki K. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate/protein kinase A and mitogen-activated protein kinase 3/1 pathways are involved in adenylate cyclase-activating polypeptide 1-induced common alpha-glycoprotein subunit gene (Cga) expression in mouse pituitary gonadotroph LbetaT2 cells. *Biol Reprod* 2007; 77: 707—716
- 3) Bedecarrats GY, Kaiser UB. Differential regulation of gonadotropin subunit gene promoter activity by pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in perfused L beta T2 cells: role of GnRH receptor concentration. *Endocrinology* 2003; 144: 1802—1811
- 4) Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A, Chin WW. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro. *Endocri-*

- nology 1997; 138: 1224—1231
- 5) Burger LL, Dalkin AC, Aylor KW, Haisenleder DJ, Marshall JC. GnRH pulse frequency modulation of gonadotropin subunit gene transcription in normal gonadotropes—assessment by primary transcript assay provides evidence for roles of GnRH and follistatin. *Endocrinology* 2002; 143: 3243—3249
 - 6) Hashimoto H. [Physiological significance of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the nervous system]. *Yakugaku Zasshi* 2002; 122: 1109—1121
 - 7) Hart GR, Gowing H, Burrin JM. Effects of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, on pituitary hormone release in rats. *J Endocrinol* 1992; 134: 33—41
 - 8) Moore JP Jr, Burger LL, Dalkin AC, Winters SJ. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide messenger RNA in the paraventricular nucleus and anterior pituitary during the rat estrous cycle. *Biol Reprod* 2005; 73: 491—499
 - 9) Shintani N, Mori W, Hashimoto H, Imai M, Tanaka K, Tomimoto S, Hirose M, Kawaguchi C, Baba A. Defects in reproductive functions in PACAP-deficient female mice. *Regul Pept* 2002; 109: 45—48
 - 10) Kaiser UB, Sabbagh E, Katzenellenbogen RA, Conn PM, Chin WW. A mechanism for the differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by gonadotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 12280—12284
 - 11) Kanasaki H, Bedecarrats GY, Kam KY, Xu S, Kaiser UB. Gonadotropin-releasing hormone pulse frequency-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase pathways in perifused LbetaT2 cells. *Endocrinology* 2005; 146: 5503—5513
 - 12) Arimura A, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. *Front Neuroendocrinol* 1995; 16: 53—88
 - 13) Dow RC, Bennie J, Fink G. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide-38 (PACAP)-38 is released into hypophysial portal blood in the normal male and female rat. *J Endocrinol* 1994; 142: R1—4

Synopsis

We examined how pulsatile stimulation with Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) affected gonadotrophs. In static culture, GnRH stimulated transcription of all of the gonadotropin subunits. In contrast, PACAP increased α -subunit promoter activity, but failed to increase LH β and FSH β promoters. Messenger RNAs for LH β and FSH β were slightly but significantly increased by PACAP stimulation. Co-treatment of the cells with GnRH and PACAP was not different to the effects of GnRH alone on LH β and FSH β transcriptional activities as well as mRNA expressions. To determine the effect of pulsatile PACAP stimulation on gonadotropin subunit gene expression, perifused L β T2 cells were stimulated at either high frequency (5 min PACAP pulse every 30 min) or low frequency (5 min PACAP pulse every 120 min). High frequency PACAP pulses preferentially increased LH β gene expression up to 2.29 ± 0.15 -fold, and low frequency pulses resulted in a 1.55 ± 0.16 -fold increase. FSH β gene expression was increased 1.87 ± 0.3 -fold by high frequency PACAP pulses and 4.3 ± 0.29 -fold by low frequency pulses. These results were similar to the frequency specific effects of pulsatile GnRH. Follistatin expression was specifically increased by high frequency GnRH pulses. High frequency PACAP pulses further increased follistatin up to 4.7 ± 0.57 -fold than low frequency pulse (2.72 ± 1.09 -fold). PAC1 expression increased significantly following pulsatile GnRH regardless of pulse frequency. Low frequency PACAP pulses, however, increased PAC1 expression (16.49 ± 8.41) to a larger extent than did high frequency pulses. Additionally, high frequency PACAP pulses specifically increased GnRH receptor expression by 4.38 ± 0.81 -fold; however, low frequency pulses did not result in an increase. These studies suggest PACAP, like GnRH, specifically regulates LH β and FSH β subunit gene in a pulse-frequency specific manner. This regulation may involve alteration in numbers of GnRH and PACAP receptors as well as follistatin expression.
