





## 論文審査の要旨および担当者

学位申請者	Doungrut Tungmahasuk (DV14005 獣医生理学)
学位論文題目	Relationship and function of gonadotropin-releasing hormone and related bioactive peptides in rat granulosa cells ラットの顆粒層細胞におけるゴナドトロピン放出ホルモンと関連生理活性ペプチドの機能と相関
担当者	<div>主査 北里大学教授 折野 宏一 </div> <div>副査 北里大学教授 佐々田 比呂志 </div> <div>副査 北里大学教授 中村 和市 </div> <div>副査 東京大学大学院教授 西原 真杉 </div>

## 論文審査の要旨

哺乳動物の卵巣における周期的排卵と黄体形成機序の解明は、繁殖生理学の基本的課題の一つである。ラットは、規則正しい4日の発情周期（排卵）を繰返し、妊娠をしない限り、排卵後の黄体は退行する。排卵および黄体化は発情前期の午後に出現する黄体形成ホルモン大量放出（LHサージ）によって引き起こされる。排卵後の卵胞では、顆粒層細胞と卵胞膜細胞の増殖が起こり、黄体が形成される。顆粒層細胞は、黄体ホルモンを合成できる黄体細胞に分化する。LHに加え、卵巣においても種々のホルモンが局所的に合成され、排卵と黄体形成に関与している。黄体化は、組織リモデリング、ホルモン合成能の変化、細胞周期のシフ

ト、下垂体ホルモンに対する応答の変化などを伴う劇的な変化である。近年、視床下部から放出される性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）が、同じく視床下部で GnRH 分泌に関わることの知られている神経ペプチド（キスペプチン、ニューロキニン、ダイノルフィン）と共に顆粒層細胞に発現していることが示されている。更に、GnRH によって合成の促進されるアネキシン A5（ANXA5）が黄体に発現していることが明らかにされている。しかしながら、これらのホルモンおよびタンパク質の卵巣における生理的役割は未解明である。本研究では顆粒層細胞から黄体細胞への分化の過程で、GnRH が中心的な役割を果たしていることを明らかにすると共に、神経ペプチド間の機能的な相関を解明することを目的とした。さらに ANXA5 の顆粒層細胞における役割を検討した。

#### （1）hCG による顆粒層細胞の黄体化における GnRH の関与

本研究では、幼若ラットモデルを用いた解析が行われた。未成熟ラット（25 日齢）に妊馬血清性性腺刺激ホルモン（PMSG）を投与して卵胞を発育させた。2 日後に（hCG：ヒト絨毛性刺激ホルモン）を投与して黄体化を促進した。hCG を投与したラットでは、血漿プロジェステロン濃度が明らかに上昇し、6 時間後にピークを示し、hCG によってステロイド合成能の促進される事が確かめられた。hCG の投与によって黄体に ANXA5 が発現したことから、hCG 投与後早期に卵巣で GnRH の作用したことが疑われた。実際、hCG 投与後 3 時間に卵巣の GnRHmRNA 発現が有意に増加した。PMSG を投与したラットからは、27 日齢に卵巣を摘出して、初代培養顆粒層細胞を得た。顆粒層細胞は、免疫細胞化学染色によって 3- $\beta$  ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ（3 $\beta$ HSD）が示されステロイド産生細胞であることが確かめられた。更に hCG がプロジェ

ステロン合成を濃度依存性に亢進させること、GnRH および GnRH アゴニストがプロジェステロン合成を抑制することを確認めた。hCG と GnRH は LH 受容体発現を増大させ、FSH 受容体発現を有意に低下させ、両者の作用は相加的だった。さらに黄体化に関与する遺伝子 (p21、p27、FOXO1、プロラクチン受容体) の発現に対しても相加的に作用した。これらの結果は、hCG による顆粒層細胞から黄体細胞への分化を促進する多くの過程に GnRH が介在することを示している。

## (2) 顆粒層細胞における神経ペプチドの発現とその相互作用

卵巣におけるキスペプチンおよびダイノルフィンの発現は hCG 投与 3 時間後にピーク値を示し、その後減少した。一方、ニューロキニン (NKB) は 生理食塩水投与 (コントロール) でも hCG 投与と同様に暫時上昇傾向を示したが有意な差は無かった。これらニューロペプチドが、卵巣で LH サージに伴って変動すること、各受容体の存在も確認されたことから、顆粒層細胞でオートクリンとして独自の機能を担っていることが示唆された。そこで、各ニューロペプチド間の相互作用を調べると、顆粒層細胞における hCG 依存性ニューロペプチドの発現は GnRH アゴニスト共存在下で亢進された。一方、NKB は GnRH およびキスペプチンの発現を抑制した。即ち hCG 投与時には、GnRH 合成が促進され、更にキスペプチン、ダイノルフィン合成の促進されること、最後に NKB がこれらを抑制することで一連の反応を収束させているものと考えられた。一方、プロジェステロン合成に対する作用は、予想に反して大方で抑制的で、黄体機能が発揮されるためには、顆粒層細胞以外の卵巣コンポーネントの存在が必要である可能性も考えられた。以上の結果から、キス

ペプチン、ダイノルフィン、NKB の発現は顆粒層細胞の分化（黄体化）に関連することが初めて明らかになった。

### （3）顆粒層細胞における GnRH と ANXA5 の機能

GnRH が ANXA5 発現を促進することが、多くの組織で示されている。卵巣においても、黄体の退行時期に ANXA5 の発現が報告されている。本研究では、黄体化の過程で ANXA5 が顆粒層細胞／黄体細胞にどのような影響を与えるかを解析した。hCG は、顆粒層細胞において早期に ANXA5 mRNA 発現量を増大させた。この時 GnRH 発現も増加しており、ANXA5 が GnRH によって誘導されていると考えられた。ANXA5 は hCG 投与前の細胞のプロジェステロン合成に影響しなかったが、hCG に暴露されることで、ANXA5 はプロジェステロン合成を抑制するようになった。一方、hCG 感作前の顆粒層細胞は ANXA5 によってアポトーシスが誘導されたが、hCG 投与によってその作用は見られなくなった。これらの結果は、黄体化以前の顆粒層細胞が GnRH-ANXA5 によってアポトーシスに至ること、これが卵胞閉鎖に関連する減少であることが示唆された。更に ANXA5 抗体が細胞増殖を促進したことから、ANXA5 が細胞外で機能していることが示唆された。また、黄体化後には ANXA5 が、黄体細胞の機能を抑制するように作用すること、黄体退行に関連することが示唆され、GnRH-ANXA5 が顆粒層細胞の分化に深く関わっていることが明らかになった。

### 【論文審査の結果】

本研究では、まず LH サージ後の早い時期に顆粒層細胞で合成の促進される GnRH が、関連するニューロペプチドの発現を亢進させることが

明らかにされた。次いで NKB が GnRH を含めたニューロペプチドの発現を抑制することが示された。ANXA5 は卵胞閉鎖および黄体退行に関与すること、黄体化した後には、その退行に関与することが示唆された。ニューロペプチドの発現は KNDy ニューロンとは異なる機序で調節される事が示された。本研究では、GnRH-ANXA5 系が卵巣における顆粒層細胞および黄体細胞の調節に新規な役割を示している。これらの新知見は未解明な部分の多い顆粒層細胞から黄体細胞への短時間での変化の解明に一助となることが期待できる。

これら一連の研究により、顆粒層細胞から黄体細胞への変化に GnRH-ANXA5 系という新規の機構が関与することを提唱され、極めて高い価値を有するものと判断された。審査員一同は、本論文が新規の知見を多く含み医学や獣医学の発展に寄与するものとの認識で一致した。更に、著者が真摯な研究態度と豊かな人間性を持ち、将来研究成果を社会に還元できる能力を有するものであり、博士（獣医学）の学位の授与に値すると判断した。