

多機能ペプチド Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) の下垂体ゴナドトロピン産生細胞調節機能

金崎 春彦¹⁾、折出 亜希²⁾、京 哲³⁾

1) 島根大学医学部 産科婦人科 准教授

2) 島根大学医学部 産科婦人科 講師

3) 島根大学医学部 産科婦人科 教授

はじめに

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP: 下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド) は 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単離・同定された視床下部ペプチドである¹⁾。PACAP の発現は脳視床下部、下垂体の他、副腎や卵巣など幅広い末梢組織に認められ、その受容体も広範囲に存在している。中枢神経系においては神経細胞の分化や維持、シナプス可塑性に関与し、末梢においてはインスリンやカテコラミンなどホルモン分泌促進作用をもつ多機能ペプチドとして様々な生理的作用を有すると考えられている²⁾。

女性の生殖機能は視床下部-下垂体-性腺軸 (Hypothalamic pituitary Gonadal axis :HPG axis) による制御を基軸とし、視床下部キスペプチン及び Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) を頂点とする内分泌支配を受けている。視床下部キスペプチンニューロンが GnRH ニューロンから GnRH の分泌を制御し、GnRH が下垂体前葉からゴナドトロピンである Follicle-stimulating hormone (FSH) と Luteinizing-hormone (LH) の分泌を促進する。そして、FSH と LH は協調して卵胞発育及び性ステロイド生合成を制御している。

本稿では多機能ペプチドである PACAP が HPG axis の中心である下垂体ゴナドトロピン産生細胞における LH、FSH の産生に対してどのような影響を与えているのか、私たちの研究から得られた知見を基に概説する。

Key words : PACAP、HPG axis、GnRH、ゴナドトロピン

1. PACAP と PACAP 受容体

PACAP には PACAP38 と PACAP27 の 2 つのフォームがあり、それぞれ 38 と 27 のアミノ酸からなる。PACAP は Vasoactive intestinal polypeptide (VIP)

/グルカゴン/セクレチンファミリーに属し、互いのアミノ酸配列に高い相同性を有する。PACAP 受容体は G 蛋白共役型の受容体であり、PACAP タイプ I 受容体 (PAC1 受容体) の他、VPAC1、VPAC2 受容体があるが、そのうち PAC1 受容体が最も PACAP 選択的な受容体である。PAC1 受容体は Gs 蛋白及び Gq 蛋白と共役しており、アデニル酸シクラーゼ及びフォスホリパーゼ C を活性化し、細胞内 cAMP の増加、細胞内カルシウムの上昇あるいはプロテインキナーゼ C 及び MAP キナーゼ経路を活性化させる³⁾。PAC1 受容体は脳全体の神経細胞に広く発現しており、特に視床下部室傍核、視索上核、弓状核など、GnRH ニューロンの存在部位オーバーラップする部位に存在する他⁴⁾、下垂体前葉及び後葉にもその発現を認めている⁵⁾。

2. PACAP によるゴナドトロピン調節

下垂体からのゴナドトロピン合成・分泌を主として制御するのは視床下部 GnRH であるが、PACAP もゴナドトロピン調節に関与する。ラットに PACAP の静脈内投与を行うと血中 LH、FSH の濃度は増加する⁶⁾。また PACAP は GnRH によるゴナドトロピン分泌作用を増強させる⁷⁾。PACAP 欠損マウスあるいは PAC1 受容体欠損マウスの繁殖能力は大幅に減少するとされ^{8,9)}、PACAP が性機能制御に重要な役割を果たしていることが窺える。

視床下部で合成された PACAP は下垂体門脈を経由して下垂体前葉に作用する。一方で下垂体前葉にも PACAP が存在し、性周期でその発現量が増加することから¹⁰⁾、PACAP は下垂体の局所因子としての役割があるものと推測される。

3. 下垂体ゴナドトロピン産生細胞における PACAP の役割

私たちはゴナドトロピン産生細胞における PACAP の役割を検討するためにマウス下垂体腫瘍由来のゴナドトロピン産生細胞株である L β T2 細胞を実験に用いた。L β T2 細胞はゴナドトロピンサブユニット α 、LH β 、FSH β 及び GnRH 受容体を持ち、GnRH に反応して全てのゴナドトロピンサブユニットを発現させる。PACAP を L β T2 細胞の培養ディッシュに直接添加すると全てのゴナドトロピンサブユニットの転写活性が増加することから PACAP も GnRH と同様、ゴナドトロピン促進因子であることが分かる¹¹⁾。また PACAP は GnRH 受容体及び自身の PAC1 受容体発現も増加させる¹²⁾。

4. GnRH と PACAP の相互作用

GnRH がゴナドトロピン合成・分泌の強力な促進因子であることは間違いないが、PACAP もゴナドトロピン促進因子である。この 2 つのペプチドは

ゴナドトロピン産生細胞でどのような相互作用をもつのかを検討した。まず、GnRH はゴナドトロピン産生細胞において自身の GnRH 受容体発現を促進する¹³⁾。また、PACAP も GnRH 受容体発現を増加させる¹²⁾。一方で GnRH は PAC1 受容体発現を増加させ¹⁴⁾、上述したように PACAP もまた自身の受容体を増加させる。興味深いことに PAC1 受容体発現量の増加は、GnRH によるゴナドトロピン発現効率を上昇させる¹⁵⁾。これらの結果から GnRH と PACAP はそれぞれの受容体発現を制御することで互いに影響しあっているものと考えられる (図1)。

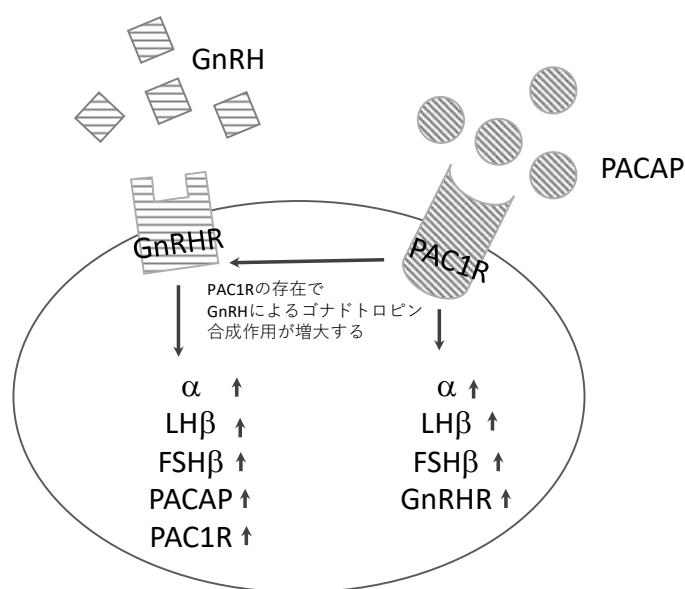


図1 下垂体ゴナドトロピン産生細胞においてGnRHとPACAPは協調してゴナドトロピン合成に働く
GnRHR(GnRH受容体), PAC1R (PAC1受容体)

GnRH 受容体はその数が多ければ多いほど、LHβ産生促進へ向かい、反対に過剰な GnRH 受容体存在下では FSHβ産生は抑制される傾向にあることが分かっている^{13,16)}。一方、同一濃度の PACAP によるゴナドトロピン合成刺激効果は PAC1 受容体発現が多ければ多いほど LHβ, FSHβともに上昇する¹⁷⁾。これらの結果は GnRH は自身の刺激で PAC1 受容体を増加させ、PACAP による LHβ, FSHβサブユニット発現効果を増大させている一方、PACAP も GnRH 受容体数を増加させることで、GnRH による LHβ、FSHβサブユニット合成を微妙に調節している可能性がある。GnRH と PACAP は共に単独でゴナドトロピン発現を促進するが、GnRH と PACAP の同時刺激では LHβ、FSHβ

はそれぞれの単独刺激よりもさらに増強する¹⁷⁾。PACAPは下垂体前葉局所にも発現を認める。L β T2細胞にもPACAP発現があることから、ゴナドトロピン産生細胞がPACAPを発現している可能性がある。L β T2細胞においてもGnRHがPACAP発現を促進することが分かっている¹⁴⁾。

5. PACAP及びPAC1受容体のGnRHパルス頻度依存性ゴナドトロピン発現への関与

視床下部から放出されるGnRHはパルス状に分泌されておりGnRHパルスの頻度と振幅は性周期により変動し、GnRHパルス分泌の頻度がLH、FSHの特異的な合成分泌に関与している。卵胞期初期にはGnRHは下垂体門脈へ比較的低頻度パルス状に分泌されており、この時期下垂体からはLHよりもFSHが優位に分泌される。一方、卵胞期後期に近づくにつれFSHよりもLHが優位に分泌されてくるが、この時期のGnRHの分泌は高頻度パルス状分泌に変化している¹⁸⁾。このようにGnRHは自らの分泌頻度を変化させることでFSH、LHの合成分泌を特異的に制御していると考えられる。実際L β T2に対しGnRHパルス状刺激を行うと高頻度GnRH刺激ではLH β サブユニットが優位に合成され、低頻度GnRH刺激ではLH β よりもFSH β サブユニットが優位に合成される。興味深いことにL β T2細胞におけるPACAP及びPAC1受容体の発現は高頻度GnRHパルス刺激よりも低頻度GnRHパルス刺激においてより増強する¹⁴⁾。一方GnRH受容体発現は低頻度GnRH刺激よりも高頻度GnRH刺激で優位に増加する¹³⁾ (図2)。

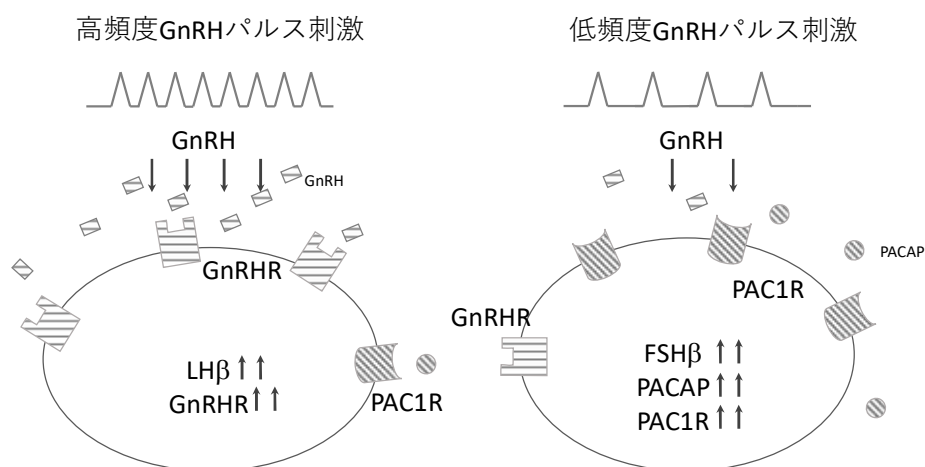


図2 GnRHパルス頻度依存性ゴナドトロピン発現機構におけるPACAP及びPAC1受容体の関与
高頻度GnRH刺激においてはLH β が優位に発現する。この時GnRH受容体数は増加する。
低頻度GnRHパルス刺激下でPACAP、PAC1受容体発現は増加。この状態ではFSH β 産生が優位となる。

上述したように FSH β サブユニットは細胞内の GnRH 受容体発現量が多ければその発現が抑制される傾向にあることから、高頻度 GnRH パルス刺激状態では GnRH 受容体数が増加し、LH β 合成優位になる環境になる。低頻度 GnRH パルス刺激により PACAP 及び PAC1 受容体数がゴナドトロピン産生細胞内に増加した状態では FSH β 合成が優位な状態になっている。PACAP あるいは PAC1 受容体と FSH β の関係は更に検討する必要があるが、GnRH による FSH 合成が PACAP 受容体の阻害剤下で抑制されることは分かっている¹⁴⁾。

6. PACAP のパルス状刺激でもゴナドトロピン特異的産生が生じる

GnRH は視床下部からパルス状に分泌され、下垂体ゴナドトロピンサブユニットを特異的に制御している。PACAP が視床下部から GnRH と同様にパルス状に分泌されているかどうかは不明であるが、実験的に PACAP のパルス状刺激を行った場合、高頻度 PACAP 刺激では L β T2 細胞内の GnRH 受容体発現が著明に増加した。一方、低頻度 PACAP 刺激では PAC1 受容体発現が高頻度刺激においてよりも優位に増加する¹²⁾。GnRH 受容体あるいは PAC1 受容体発現が LH β 、FSH β サブユニットの特異的発現に関与している可能性がある。

7. おわりに

本稿では多機能 PACAP の下垂体ゴナドトロピン産生細胞における機能について概説した。PACAP やその受容体は GnRH の影響下にあり LH あるいは FSH 合成の特異性決定に影響を与えている可能性がある。PACAP は同じ視床下部ペプチドである GnRH ニューロンにも影響を与えていることは間違いなく、実際 GnRH 産生細胞株において PACAP は GnRH 受容体数を変動させる¹⁹⁾。また HPG axis の最上位に位置し、GnRH ニューロンからの GnRH 分泌を支配しているという視床下部キスペプチンニューロンに対しての作用も有すると考えられる。HPG axis における PACAP の存在意義について更に検討を進めたいと考えている。

【参考文献】

- 1) Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, et al. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;164(1):567-74.
- 2) Hashimoto H. Physiological significance of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the nervous system. *Yakugaku Zasshi*. 2002;122(12):1109-21.
- 3) Rawlings SR, Hezareh M. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and PACAP/vasoactive intestinal polypeptide receptors: actions on the anterior pituitary gland. *Endocrine Reviews*. 1996;17(1):4-29.
- 4) Masuo Y, Suzuki N, Matsumoto H, Tokito F, Matsumoto Y, Tsuda M, et al. Regional distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat central nervous system as determined by sandwich-enzyme immunoassay. *Brain Research*. 1993;602(1):57-63.
- 5) Hashimoto H, Nogi H, Mori K, Ohishi H, Shigemoto R, Yamamoto K, et al. Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in the rat brain: an in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology*. 1996;371(4):567-77.
- 6) Hart GR, Gowing H, Burrin JM. Effects of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, on pituitary hormone release in rats. *The Journal of Endocrinology*. 1992;134(1):33-41.
- 7) Culler MD, Paschall CS. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) potentiates the gonadotropin-releasing activity of luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology*. 1991;129(4):2260-2.
- 8) Shintani N, Mori W, Hashimoto H, Imai M, Tanaka K, Tomimoto S, et al. Defects in reproductive functions in PACAP-deficient female mice. *Regulatory Peptides*. 2002;109(1-3):45-8.
- 9) Jamen F, Rodriguez-Henche N, Pralong F, Jegou B, Gaillard R, Bockaert J, et al. PAC1 null females display decreased fertility. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;921:400-4.
- 10) Heinzlmann A, Kirilly E, Meltzer K, Szabo E, Baba A, Hashimoto H, et al. PACAP is transiently expressed in anterior pituitary gland of rats: in situ hybridization and cell immunoblot assay studies. *Peptides*. 2008;29(4):571-7.

- 11) 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(4):707-16.
- 12) Kanasaki H, Mutiara S, Oride A, Purwana IN, Miyazaki K. Pulse frequency-dependent gonadotropin gene expression by adenylate cyclase-activating polypeptide 1 in perfused mouse pituitary gonadotroph LbetaT2 cells. *Biol Reprod.* 2009;81(3):465-72.
- 13) 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(5):1802-11.
- 14) Kanasaki H, Purwana IN, Mijiddorj T, Oride A, Miyazaki K. Possible involvement of PACAP and PACAP type 1 receptor in GnRH-induced FSH beta-subunit gene expression. *Regul Pept.* 2011;167(2-3):227-32.
- 15) 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. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;410(2):295-300.
- 16) 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1995;92(26):12280-4.
- 17) Purwana IN, Kanasaki H, Oride A, Mijiddorj T, Shintani N, Hashimoto H, et al. GnRH-induced PACAP and PAC1 receptor expression in pituitary gonadotrophs: a possible role in the regulation of gonadotropin subunit gene expression. *Peptides.* 2010;31(9):1748-55.
- 18) Crowley WF, Jr., Filicori M, Spratt DI, Santoro NF. The physiology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in men and women. *Recent Prog Horm Res.* 1985;41:473-531.
- 19) 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.* 2013;193:95-102.