

## 論文内容の要旨

### 論文題目

**Regulation of colony-formation and cell migration by GnRH  
and consideration of its evolutionary significance  
(GnRH によるコロニー形成及び細胞移動の制御の解明とその進化的意義の考察)**

氏名 榎本 匡宏

### 序論

GnRH (生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン) は、1971 年に脳下垂体からの生殖腺刺激ホルモンの合成・放出を促すホルモンとして同定された視床下部ペプチドである。その後、近年の分子生物学の発展に伴い、GnRH 及びその受容体が様々な種で同定され、脊椎動物全般でリガンド、受容体ともに複数存在し、その発現分布は広範に渡っていることが報告されている。このような GnRH 及びその受容体の複数性と広範な発現分布は、GnRH が生殖腺刺激ホルモンの放出以外の生理機能を担っていることを強く示唆しており、これまでに、神経修飾、免疫系修飾、卵巣における卵胞の発育制御などの生理機能をもつことが報告されている。しかしながら、これらの GnRH 作用についてはその詳細なメカニズムはいまだ解明されていない。

GnRH の発見以来、第 2 のブレイクスルーとなったのが GnRH ニューロンの発生源に関する研究である。GnRH ニューロンが嗅板で発生し脳内に移動するという 1982 年の発見は、それまでの神経発生の常識を覆すものであった。GnRH ニューロンはこの移動の際にも GnRH を産生していることが示されているが、その生理機能についても明らかになっていない。

このような GnRH の多様な生理機能を考える上で興味深い知見として、GnRH による細胞種に依存した正負の増殖制御がある。最近では、細胞接着、移動、細胞骨格の再構築に対する GnRH の制御も明らかになり、細胞増殖をはじめとする基本的な細胞機能に対する GnRH の作用機序とその生理的意義が注目されている。

本研究では、過去の研究において発見したコロニー形成に対する GnRH の正負の制御に

注目し、その詳細な特性と作用機序について 4 種類の細胞株 (TSU-Pr1, Jurkat, DU145, HHUA) を実験モデルとして解析を行った。さらに、その過程において明らかになった GnRH による細胞移動の制御及びアクチン骨格の再構築についても研究を行い、多様な生理機能の背後にある GnRH 情報伝達系の共通性と特異性、そしてその進化的意義について考察した。

### 第 1 章 GnRH による正負のコロニー形成制御の特性

まず、4 種類のヒト細胞株 TSU-Pr1 (前立腺がん由来), Jurkat (T 細胞白血病由来), DU145 (前立腺がん由来), HHUA (子宮がん由来) を用いて、GnRH のコロニー形成率に及ぼす影響を調べた。その結果、TSU-Pr1, Jurkat では GnRH 投与によりコロニー形成率が増加し、逆に DU145, HHUA では減少した。次に、この相反する作用の特性を解析するために、ヒトに存在する 2 つの天然リガンド (GnRH-I, II) と合成アンタゴニスト、Cetrorelix を用いて、正負の作用のリガンド選択性を調べた。その結果、2 つの相反する作用は異なるリガンド選択性を示すことがわかった。このことは、2 つの作用が異なる GnRH 受容体を介していることを強く示唆している。

### 第 2 章 GnRH によるコロニー形成制御における各 GnRH 受容体サブタイプの機能

第 1 章の結果を受けて、まず、ゲノム上は 2 種類存在することが知られているヒト  $\text{GnRH-R1}$  型、 $\text{GnRH-R2}$  型 GnRH 受容体に関して RT-PCR により発現解析を行ったところ、GnRH 刺激に対して正に反応する細胞株 (TSU-Pr1, Jurkat) と負に反応する細胞株 (DU145, HHUA) の発現パターンに明確な差異は見られなかった。次に、RNA 干渉法を用いて各 GnRH 受容体サブタイプの発現を抑制し GnRH に対する反応を調べたところ、以下のような興味深い結果が得られた。 $\text{GnRH-R1}$  型受容体は、正負どちらの作用においても 3 種すべての GnRH の作用に関して必須であった。また、 $\text{GnRH-R2}$  型受容体は、正負どちらの作用においても GnRH-II と Cetrorelix の作用に必要であった。さらに、 $\text{GnRH-R2}$  型受容体 splice variant は GnRH に対する正の反応に必要であり、反応の方向性の決定に関与することが示唆された。ヒト  $\text{GnRH-R1}$  型受容体は、その遺伝子配列の欠陥から偽遺伝子であると考えられてきたが、本研究の結果は、 $\text{GnRH-R1}$  型受容体が機能的であることを示している。

### 第 3 章 GnRH による細胞移動の制御とアクチン骨格の再構築

第 1、2 章では GnRH によるコロニー形成の制御について、各 GnRH 受容体サブタイプの機能に焦点をあてて解析を行ったが、その過程において GnRH が細胞移動にも関わっていることが示唆される現象が観察された。それは、GnRH により TSU-Pr1 の培養ディッシュ上での局在が不均一になるというものである。この現象は、コロニー形成を制御することの生理的意義や GnRH 情報伝達系の共通性と特異性を理解する上で重要な手がかりになると考え、その作用機序も含めて詳細な研究を行った。

まず、GnRH による培養ディッシュ上の細胞の局在の変化は細胞移動を反映していると予想し、定量的な解析を行うために、走化性や細胞移動の研究にしばしば用いられる modified Boyden chamber assay (Fig. 1) を行った。この方法は、細胞の大きさに対して適切な pore size (本研究では 8  $\mu\text{m}$ ) の chamber の上側に細胞をまき、数時間後に chamber の下

側に移動した細胞数を測定するという実験法である。同じ前立腺由来の細胞株であるが、コロニー形成に関しては TSU-Pr1 とは反対の GnRH 作用が見られた DU145 についても同様の解析を行った。まず、chamber の下側に GnRH を与えた条件では、TSU-Pr1, DU145 とともに細胞の移動に有意な差は見られなかった。この結果は、細胞が GnRH に走化性を示して移動するのではないことを示唆している。次に、細胞が自己分泌物質に対して走化性を示す例が報告されていたため、chamber の下側に conditioned medium を与えたところ、TSU-Pr1, DU145 とともに細胞移動が増強された。この条件下で、chamber の上側に細胞とともに GnRH を与えると、増加した細胞移動が TSU-Pr1 では促進され、DU145 では抑制された。以上の結果から、GnRH により細胞の運動性が変化し、その結果細胞移動に影響したと予想した。

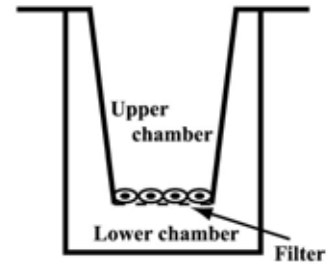


Fig. 1. modified Boyden chamber

そこで次に、phalloidin 染色を行ってアクチン骨格に対する GnRH の制御を調べたところ、GnRH により TSU-Pr1 では filopodia を形成している細胞の割合が有意に増加し、逆に DU145 では stress fiber を形成している細胞の割合が有意に増加した。この結果は、細胞内の GnRH 情報伝達系が Rho ファミリー-G タンパク質 (Rac1, Cdc42, RhoA など) を経由していることを強く示唆するものである。この可能性を検証するため、Rac1, Cdc42, RhoA の dominant-negative mutant (順に Rac1 T17N, Cdc42 T17N, RhoA T19N) を発現させたときの GnRH の細胞移動に対する影響を調べたところ、TSU-Pr1 では Rac1 T17N, Cdc42 T17N の発現により GnRH 作用が観察されなくなった。一方、DU145 では RhoA T19N の発現により GnRH 作用が見られなくなった。さらに、第 2 章と同様に RNA 干渉法により GnRH 受容体の発現を抑制した細胞を用いて細胞移動やアクチン骨格の再構築に対する GnRH の影響を調べたところ、正負のコロニー形成の場合と同様に、正負の細胞移動の制御、アクチン骨格の再構築にもヒト型 GnRH 受容体は必須であることが示された。

また、Rac1, Cdc42, RhoA の活性化は、正負の細胞移動の制御のみならず、正負のコロニー形成の制御にも関与していることが、dominant-negative mutant を用いた実験で明らかになった。この結果は、Rho ファミリー-G タンパク質が GnRH の細胞内情報伝達において重要な役割を果たしていることを示唆している。

## 考察

以上の結果から、GnRH 情報伝達系の共通性と特異性に関しては以下のような統合的解釈が考えられる。まず、「共通性」については、本研究により GnRH によるコロニー形成及び細胞移動の制御の両方に共通して、Rho ファミリー-G タンパク質が関わっていることが明らかになった。Rho ファミリー-G タンパク質は、その下流において多様な細胞機能を制御することが報告されており、GnRH 受容体は Rho ファミリー-G タンパク質の活性制御を共通の機構とし、多様な現象を制御する可能性が示唆された。また、「特異性」については、第 2 章の各 GnRH 受容体サブタイプの機能解析の結果から、ヒト型 GnRH 受容体 splice variant が GnRH 作用の特異性、特に正負の方向性の決定に寄与することが強く示唆された。その作用機構としては、受容体サブタイプ同士の二量体形成、各受容体サブタイプの情報

伝達系のクロストークなどが想定される。また、細胞の自己分泌物質が GnRH による細胞増殖やコロニー形成の制御に影響するという結果を過去に得ており、GnRH 作用の特異性は、細胞の自己分泌物質の情報伝達系とのクロストークによっても決まる可能性がある。以上の考察を模式的に Fig. 2 に表した。

現在までに報告されている多くの動物種に共通して見られる GnRH 作用の多様性は、多様な細胞内情報伝達系を動かすことを可能にする本質的特徴を GnRH 情報伝達系がもち、それが進化的に保存されている可能性を示唆している。コロニー形成と細胞移動の制御における GnRH 情報伝達系の共通性と特異性に着目した本研究は、このような観点においても重要な知見を与えてくれると考えられる。

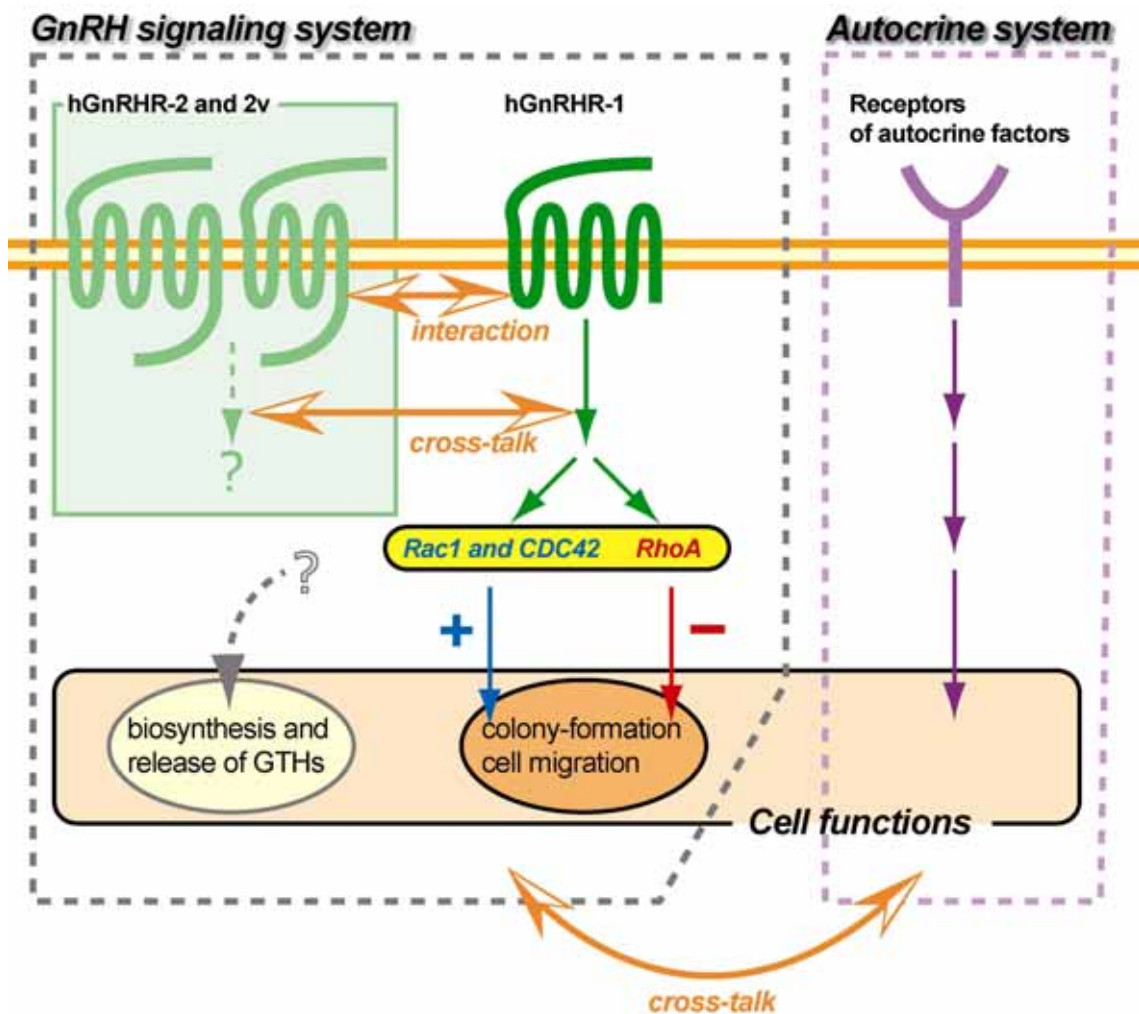


Fig.2. GnRH によるコロニー形成及び細胞移動の正負の制御の分子機構