

令和元年6月21日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07987

研究課題名(和文) 交尾排卵動物スルクスを用いた排卵制御神経メカニズムの解明

研究課題名(英文) Neural mechanism regulating ovulation in mammals

研究代表者

井上 直子 (Inoue, Naoko)

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：90377789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、哺乳類の排卵中枢である視索前野/前腹側室周囲核キスペプチンニューロンに上位から入力する神経経路を同定し、視索前野/前腹側室周囲核キスペプチンニューロンを活性化させるメカニズムを明らかにすることにより、排卵制御の新たな神経機構を解明することを目的とした。本研究により、脳内で神経伝達物質として働くATPが前腹側室周囲核キスペプチンニューロンのプリン受容体に直接作用して性腺刺激ホルモン放出ホルモン/黄体形成ホルモンのサージ状分泌を誘起することが明らかとなり、哺乳類において排卵中枢制御を仲介する新たなシグナルとして、ATP-プリン受容体の重要性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、脳内で神経伝達物質として働くATPが、視床下部前方に存在する排卵中枢キスペプチンニューロンのプリン受容体に直接作用して性腺刺激ホルモン放出ホルモン/黄体形成ホルモンのサージ状分泌を誘起し排卵を誘起することが明らかとなった。キスペプチンニューロンは、種を越えて性腺刺激ホルモン放出ホルモン分泌を促進し排卵を制御する生殖中枢であることから、本研究結果は、家畜における排卵障害やヒトの生殖障害のメカニズムの解明、新規な治療法の開発に資するものである。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to investigate the neural mechanism controlling kisspeptin neurons in the preoptic area (POA)/anteroventral periventricular nucleus (AVPV) in mammals. The present study revealed that purinergic signaling involves in gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge generation via POA/AVPV kisspeptin neurons.

研究分野：動物生殖生理学

キーワード：キスペプチン ATP プリン受容体

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Kiss1 遺伝子にコードされるキスペプチンは、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 分泌を直接制御し、哺乳類の生殖機能を最上位から制御する因子として注目される神経ペプチドである。視床下部の視索前野/前腹側室周囲核に存在するキスペプチンニューロンは、排卵直前の成熟卵胞から放出されるエストロジェンのポジティブフィードバックを仲介し、GnRH/黄体形成ホルモン (LH) サージ分泌を促進する排卵中枢であると考えられている。

Kiss1 遺伝子は、排卵直前の高濃度エストロジェンによって視索前野/前腹側室周囲核において発現が上昇することが齧歯類、霊長類、反芻類を含む様々な動物で明らかとなっている。しかしながら、視索前野/前腹側室周囲核キスペプチンニューロンが活性化されるメカニズムは未だ不明なままである。そこで、排卵中枢である視索前野/前腹側室周囲核キスペプチンニューロンの神経活動を制御するメカニズムが明らかになれば、哺乳類における排卵調節機構の解明につながると思われ本研究を計画するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、哺乳類の排卵中枢である視索前野/前腹側室周囲核キスペプチンニューロンに上位から入力する神経経路を同定し、視索前野/前腹側室周囲核キスペプチンニューロンを活性化させるメカニズムを明らかにすることにより、排卵制御の新たな神経機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では当初、排卵のタイミングを人為的に制御できる交尾排卵動物のunksを主として用いる予定であった。しかしながら、研究代表者の研究室において自家繁殖により維持しているunksの繁殖率が非常に悪く、実験に使用できる個体の確保が困難となったため、ラットを用いて研究を遂行することにした。交尾排卵動物であってもラットやマウスなどの周期的に排卵が起きる自然排卵動物であっても、視索前野/前腹側室周囲核キスペプチンニューロンが排卵中枢として機能しており、視索前野/前腹側室周囲核キスペプチンニューロンの活性化により GnRH/LH サージが誘起され排卵が生じることから、哺乳類に共通する視索前野/前腹側室周囲核キスペプチンニューロンを上位から制御する神経メカニズムが存在すると思われた。

研究代表者の所属研究室で保有しているラット前腹側室周囲核キスペプチンニューロンにおけるトランスクリプトーム解析結果において、神経の興奮に関与する受容体を検索したところ、ATP をリガンドとする非選択的陽イオンチャネルであるプリン受容体 (P2X2 受容体) が特異的に発現していることを見出した。そこで、ラットを用い、前腹側室周囲核キスペプチンニューロンにおける ATP-プリン受容体シグナリングの役割を生理学および組織学的に検討した。

### 4. 研究成果

本研究課題の遂行により、ATP はプリン受容体 (P2X2 受容体) を介して前腹側室周囲核キスペプチンニューロンに直接作用してキスペプチン分泌を促し、ひいては GnRH/LH サージを誘起することが明らかとなり、哺乳類において排卵中枢制御を仲介する新たなシグナルとして、ATP-プリン受容体の重要性が示された (図 1)。

キスペプチンニューロンは、種を越えて性腺刺激ホルモン放出ホルモン分泌を促進し、排卵を制御する生殖中枢であることから、本研究成果は、家畜における排卵障害やヒトの生殖障害のメカニズムの解明、新規な治療法の開発に資するものである。

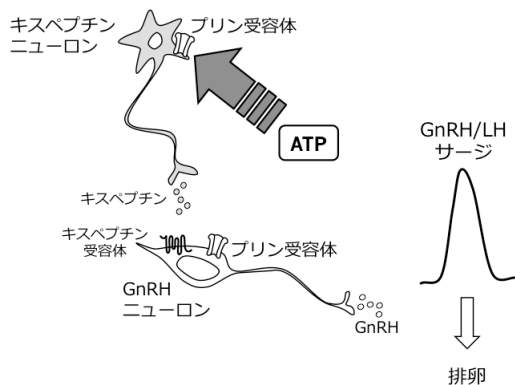


図 1. ATP-プリン受容体シグナリングを介した排卵中枢制御の概略図

本研究の成果の概要は以下の通りである。

(1) 発情前期モデル (卵巣除去+高濃度エストロジェン代償投与) 野生型ラットを用い、通常内因性の GnRH/LH サージが誘起されない午前 10 時に前腹側室周囲核近傍へ ATP を投与したとこ

ろ、投与直後に一過性の有意な血中 LH 濃度の上昇がみられた。一方、発情前期モデル Kiss1 遺伝子欠損ラットに同様に ATP を投与したところ、わずかな LH 濃度上昇にとどまった。これらの結果から、ATP はキスペプチンニューロンを介して LH 分泌を促進することが示唆された。また、発情前期モデル野生型ラットの腹側室周囲核近傍に、P2X 受容体拮抗剤を投与したところ、内因性の LH サージが消失したことから、ATP-プリン受容体シグナリングが、内因性 LH サージの誘起を仲介することが示唆された。

(2) 腹側室周囲核キスペプチンニューロンに、P2X2 受容体が共発現することを免疫組織化学的に明らかにした。また、腹側室周囲核キスペプチンニューロンにおける P2X2 受容体共発現は、エストロゲンによって促進することを見いだした。さらに、ATP を分泌するプリン作動性神経軸索が腹側室周囲核キスペプチンニューロン近傍に投射することを免疫組織化学的に明らかにした。バリコシティ様のプリン作動性神経終末が接する腹側室周囲核キスペプチンニューロン数および腹側室周囲核キスペプチンニューロンにおけるプリン作動性神経軸索のコンタクト数は、いずれもエストロゲンによって増加した。これらの結果から、排卵直前の成熟卵胞から分泌される高濃度エストロゲンによって、腹側室周囲核キスペプチンニューロンへのプリン作動性神経の投射の増加、ならびに腹側室周囲核キスペプチンニューロンにおける P2X2 受容体発現の増加により、ATP の放出と受容が促進され、GnRH/LH サージ分泌ひいては排卵が誘起される可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Minabe S, Sato M, Inoue N, Watanabe Y, Magata F, Matsuda F, Uenoyama Y, Ozawa H, Tsukamura H. Neonatal estrogen causes irreversible male infertility via specific suppressive action on hypothalamic Kiss1 neurons. *Endocrinology*. 2019 Mar 28. pii: en.2018-00732. doi: 10.1210/en.2018-00732. PMID:30920587 査読有
2. Deura C, Minabe S, Ikegami K, Inoue N, Uenoyama Y, Maeda KI, Tsukamura H. Morphological analysis for neuronal pathway from the hindbrain ependymocytes to the hypothalamic kisspeptin neurons. *J Reprod Dev*. 2019 Apr 12;65(2):129-137. doi: 10.1262/jrd.2018-122. Epub 2019 Jan 19. PMID:30662010 査読有
3. Sugimoto A, Tsuchida H, Ieda N, Ikegami K, Inoue N, Uenoyama Y, Tsukamura H. Somatostatin-somatostatin receptor 2 signaling mediates LH pulse suppression in lactating rats. *Endocrinology*. 2019 Feb 1;160(2):473-483. doi: 10.1210/en.2018-00882. PMID:30544226 査読有
4. Uenoyama Y, Inoue N, Maeda KI, Tsukamura H. The roles of kisspeptin in the mechanism underlying reproductive functions in mammals. *J Reprod Dev*. 2018 Dec 14;64(6):469-476. doi: 10.1262/jrd.2018-110. Epub 2018 Oct 8. PMID:30298825 査読有
5. Watanabe Y, Ikegami K, Ishigaki R, Ieda N, Uenoyama Y, Maeda KI, Tsukamura H, Inoue N. Enhancement of the LH surge by male olfactory signals is associated with AVPV Kiss1 cell activation in female rats. *J Neuroendocrinol*. 2017 Aug;29(8) e12505~e12505. doi: 10.1111/jne.12505. 査読有
6. Ikegami K, Minabe S, Ieda N, Goto T, Sugimoto A, Nakamura S, Inoue N, Oishi S, Maturana AD, Sanbo M, Hirabayashi M, Maeda KI, Tsukamura H, Uenoyama Y Evidence of involvement of neurone-glia/neurone-neurone communications via gap junctions in synchronised activity of KNDy neurones. *J Neuroendocrinol*. 2017 Jun;29(6). doi: 10.1111/jne.12480 査読有
7. Minabe S, Ieda N, Watanabe Y, Inoue N, Uenoyama Y, Maeda K-I, Tsukamura H. Long-term neonatal estrogen exposure causes irreversible inhibition of LH pulses by suppressing arcuate kisspeptin expression via estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in female rodents. *Endocrinology*, 2017 Sep;158(9):2918-2929. doi:10.1210/en.2016-1144 査読有
8. 井上直子, 東村博子, 上野山賀久. 視床下部による排卵制御～卵胞発育を理解する一知っておくべき基礎知識【卵胞発育の生理】. *臨床婦人科産科*, 2016 年 第 70 巻第 12 号, 1094-1097. 査読無

[学会発表] (計 11 件)

1. 井上直子: ATP-プリン受容体シグナリングによる排卵中枢制御. 第 5 回「脳と生殖」研究会, 2018 年 11 月 29 日, 東京大学
2. 高橋あい, 石垣蓮, 出浦慎哉, 上野山賀久, 東村博子, 井上直子: プリン作動性ニューロンの作用部位としての AVPV キスペプチンニューロンの役割. 第 111 回日本繁殖生物学会大会, 2018 年 9 月 12-16 日, 信州大学

3. 井上直子、石垣蓮、高橋あい、上野山賀久、東村博子：プリン作動性シグナルによるキスペプチンニューロンを介した排卵制御。第36回内分泌代謝学サマーセミナー、2018年8月2-4日、Active Resorts 宮城蔵王（宮城県）
4. 石垣蓮、家田菜穂子、上野山賀久、東村博子、井上直子：脳内 ATP-プリン受容体を介した排卵中枢制御メカニズム。平成29年度 東海畜産学会大会、2017年12月16日、名古屋大学
5. Ren Ishigaki, Nahoko Ieda, Yoshihisa Uenoyama, Hiroko Tsukamura Naoko Inoue :The effect of administration of ATP into the anteroventral periventricular nucleus on LH secretion in female rats. 4th World Congress of Reproductive Biology, 2017, September 27-29, Okinawa Convention Center (Okinawa, Japan)
6. 井上直子：Purinergetic ニューロンが Kisspeptin ニューロンの活動を修飾する可能性。第4回「脳と生殖」研究会、2017年7月24日、東京大学
7. 渡辺雄貴、池上花奈、石垣蓮、家田菜穂子、上野山賀久、前多敬一郎、東村博子、井上直子：雌由来臭覚刺激は雌ラット前腹側室周囲核キスペプチンニューロンを活性化し LH 分泌を増強する。第35回内分泌代謝学サマーセミナー、2017年7月13-15日、水上館（群馬県）
8. 井上直子、家田菜穂子、上野山賀久、東村博子：哺乳類における HPG 軸と生殖機能制御。第35回内分泌代謝学サマーセミナー、2017年7月13-15日、水上館（群馬県）
9. Youki Watanabe, Ren Ishigaki, Kana Ikegami, Nahoko Ieda, Yoshihisa Uenoyama, Kei-ichiro Maeda, Hiroko Tsukamura, Naoko Inoue :Augmentation of the LH surge by male olfactory signals is associated with AVPV Kiss1 cell activation in female rats. 3rd World Conference of Kisspeptin-Brain and Beyond, 2017, March, Orland, USA
10. 石垣蓮、家田菜穂子、上野山賀久、東村博子、井上直子：前腹側室周囲核への ATP の投与が LH 分泌に及ぼす影響。畜産学会第122回大会、2017年3月27-30日、神戸大学
11. 渡辺雄貴、井上直子、池上花奈、上野山賀久、東村博子：オスラット由来の嗅覚刺激によるメスラット前腹側室周囲核（AVPV）キスペプチンニューロンの活性化および LH 分泌の増強作用。第109回日本繁殖生物学会大会、2016年9月11-15日、麻布大学

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。