

令和 6 年 9 月 25 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18711

研究課題名（和文）卵巣キスペプチンの周排卵期における機能形態学的解析 ～臨床応用への分子基盤確立～

研究課題名（英文）Function morphologic analysis in the ovulation period of ovarian kisspeptin
-Molecular base establishment to clinical application-

研究代表者

村川 裕子（Murakawa, Hiroko）

日本医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80465286

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：外因性キスペプチン投与による卵巣の内因性キスペプチンの発現変化を解析するため、まずは卵巣の染色方法の確立することとした。脳サンプルでは既に染色方法が確立されており、ラット卵巣でキスペプチンを免疫染色した報告もあるため滞りなく進むと考えていた。しかし様々な条件を検討したが、本研究では卵巣の内因性キスペプチンは染色できなかった。また、ニューロキニンB（NKB）やダイノルフィン（Dyn）も脳サンプルでは染まるが卵巣では染まらなかった。一方で性ホルモン合成にかかわるStARは発現が一致する細胞に陽性反応がみられたため、キスペプチンやNKB、Dynは脳と比べて卵巣での発現が非常に低い可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キスペプチンは卵胞発育や排卵に関与するホルモンであり、今後臨床での応用が期待される。特に多嚢胞性卵巣症候群（PCOS: polycystic ovary syndrome）患者に排卵のトリガーとして用いることで、重篤な合併症である卵巣過剰刺激症候群（OHSS: ovarian hyperstimulation syndrome）の予防も期待されている。外因性キスペプチン投与による卵巣内因性キスペプチンへの影響を明らかにすることは、安全な医療の提供に貢献できると考えられる。本研究では免疫染色で卵巣でのキスペプチン発現が確認できなかったが、今後も染色法など工夫して検討していく。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to analyze the expression of endogenous kisspeptin in the rat ovary after exogenous kisspeptin administration. Although kisspeptin immunoreactivity was detected in the brain, it was not detected in the ovary. In addition, the immunoreactive cells of neurokinin B (NKB) and dynorphin A (Dyn) were also detected in the brain, but they were not immunostained in the ovary. On the other hand, StAR, a cholesterol transport protein, was immunostained in the ovary. Therefore, the expression of kisspeptin, NKB, and Dyn in the ovary may be too low to be detected by immunohistochemistry compared with the brain.

研究分野：産婦人科

キーワード：キスペプチン 卵巣 ラット

1. 研究開始当初の背景

キスペプチン(kisspeptin)は視床下部キスペプチンニューロンから分泌される神経ペプチドで、GnRH/LH 分泌を介し、雌では卵胞発育や排卵に、雄では精子形成に関与する。ヒトでもキスペプチンの末梢投与が LH サージを引き起こすため、hCG 製剤や GnRHa 製剤と同様に、今後、新しいトリガーとして生殖医療の臨床現場で用いられる可能性が高まっている。特にヒトでキスペプチン投与により卵胞内ステロイドホルモンの関連遺伝子や卵巣過剰刺激症候群(OHSS: ovarian hyperstimulation syndrome)関連遺伝子が上昇しないことが報告されていることから、多嚢胞性卵巣症候群(PCOS: polycystic ovary syndrome)患者に対してhCGを投与したときに起こりうる重篤な合併症であるOHSSの予防についても期待されている。

卵巣でもキスペプチンやキスペプチン受容体が発現していることが明らかになっており、ラット卵巣におけるキスペプチン発現は性周期やhCG投与で変動すると報告されている。ヒトでもキスペプチンとキスペプチン受容体の顆粒層細胞での発現を認め、ヒト血中キスペプチン値は排卵前に増加が見られることから、視床下部/下垂体からの制御に加えて、卵巣キスペプチンの周期的発現が周排卵期の分子メカニズムに関与していると推測される。今後、臨床現場での活用が期待されているキスペプチンだが、末梢投与したキスペプチンが視床下部に働きかけてGnRH/LH サージを引き起こす一方で、末梢循環中のキスペプチンが卵巣に対してどのような影響を及ぼすかはほとんど明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、周排卵期の卵巣におけるキスペプチンおよびキスペプチン受容体の発現変化と、LH サージ誘導目的でキスペプチンを末梢より投与された場合の卵巣における局所作用の詳細を組織細胞化学的、分子生物学的に解析し、臨床導入を目指すための重要なステップとしてキスペプチン製剤の特性を検証する分子基盤を確立する。方法を確立した後、キスペプチンの臨床応用に際して好適応と考えられるPCOSのモデルラットを用いて黄体化を中心とした変化を同様の手法で解析する。

以上の結果を統合し、周排卵期におけるキスペプチン キスペプチン受容体シグナルの卵巣局在における役割を明らかにし、臨床応用の適応や至適プロトコルの確立に向けた分子基盤とする。

3. 研究の方法

(1) 卵巣のキスペプチンの免疫組織染色法を確立

各性周期の成熟した雌ラットをパラホルムアルデヒド(PFA、固定液A)溶液またはグリコキサル溶液(固定液B)で灌流固定し、卵巣を採取した。パラフィン包埋した切片と凍結切片を作成した。キスペプチンの染色には3種類の抗体について検討した。市販の抗体(抗体1)と脳切片で染色が確認されている抗体(抗体2、抗体3)を使用した。1次抗体については、反応時間(0.5日~7日間) 反応温度(4度または室温)および抗体の濃度(50倍~2000倍)について検討した。抗原の賦活化を行うため、市販の賦活化剤およびpH 6、7、8、9の賦活化剤を用いて検討した。1次抗体の特異性は1次抗体の反応を除いた切片を作成し検討した。

(2) キスペプチン染色の信憑性の確認

卵巣のキスペプチンの発現は過排卵処理により増加することが明らかとなっているため、生後24日齢の雌ラットにPMSGとhCGを投与し、PFAで固定した過排卵処理した卵巣を用いて免疫染色を行った。

(3) キスペプチン以外の抗体による染色の検討

卵巣で発現が確認されている neurokinin B(NKB) dynorphin(Dyn) vascular endothelial growth factor(VEGF) steroidogenic acute regulatory protein(StAR)についての免疫染色を成熟した雌ラットの卵巣切片を用いて検討した。

(4) in situ hybridization 法による卵巣の染色の検討

卵巣を固定後にパラフィン包埋した切片、固定後に凍結し作成した切片、未固定で凍結し切片を作成後に固定した切片の3種類を用いて Kiss1(キスペプチンをコードする遺伝子)と Pdyn(Dynをコードする遺伝子)の染色について検討した。Kiss1の染色は脳切片で染色が確認されている2種類のプローブを用いて検討した。Pdynのプローブも脳切片で染色が確認されているものを使用した。

4. 研究成果

(1) 材料の状態によっては2次抗体の非特異反応が検出されたため、最適な賦活化剤について検討したところ、pH 7, 8, 9の賦活化剤では2次抗体の非特異反応が強く検出された(図1)。また、市販の賦活化剤も陽性反応が検出されたが、その反応はpH 7, 8, 9の賦活化剤と比べて弱い反応を示した。この結果から賦活化剤はpH 6の賦活化剤を使用することにした。

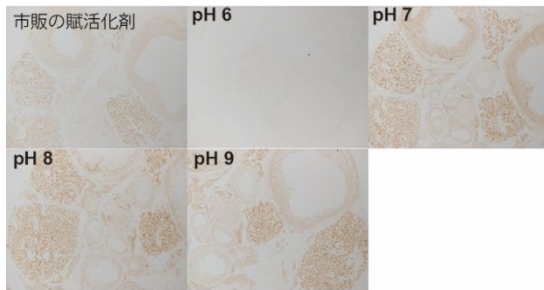


図1. 賦活化剤の違いによる2次抗体の非特異的反応

3種類の抗キスペプチン抗体については、免疫反応が検出されたが、免疫陽性細胞に一貫性がみられなかった(図2)。抗体1と抗体2は黄体と顆粒層細胞に非常に弱い免疫陽性反応を示した。抗体3では顆粒層細胞、黄体、間質の細胞に陽性反応がみられた。固定液の違い、1次抗体の濃度、反応時間、反応温度を変更しても染色像に明らかな違いは見られなかった。

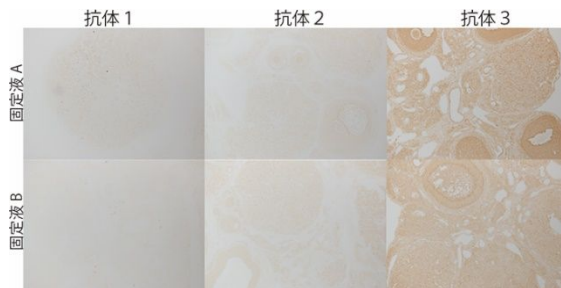


図2. 抗キスペプチン抗体による卵巣の免疫染色

これまでの報告から卵巣の kisspeptin の mRNA の発現に関して、ラットでは発情前期の午後に顆粒層細胞で発現が増加することが明らかとなっているが、本実験では発情前期の午後に採取した卵巣とその他の性周期の卵巣の染色性の違いはみられなかった。

(2) キスペプチンは過排卵処理により卵巣で mRNA の発現が増加することが報告されている。しかし、hCG 投与により過排卵処理したラットの卵巣と生理食塩水を投与した control の卵巣の間で染色像に違いはみられなかった(図3)。また、3種類の抗体全てにおいて、hCG 投与による変化を検出できなかった(図3)。

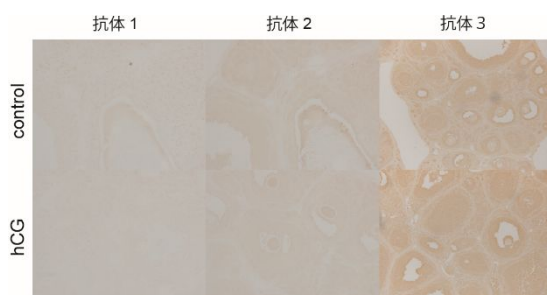


図3. hCG を投与した卵巣の抗キスペプチン抗体による免疫染色像

(3) 卵巣で mRNA の発現が確認されており、脳サンプルで染色法が確立されている NKB と Dyn を免疫染色したが、明らかな陽性反応は検出できなかった。VEGF は間質の一部を除いた細胞で陽性反応がみられたが、特異的な反応であるかは更なる検討が必要であった(図4)。StAR は発現が報告されている黄体細胞と内卵胞膜細胞に強い陽性反応がみられた(図4)。また2次抗体による非特異反応も検出されなかった。

StAR の染色で陽性反応が検出されたため、hCG 投与したサンプルを用いて検討したところ、一部の顆粒層細胞で陽性反応が検出されたが、control と比較して明らかな差は見られなかった(図5)。

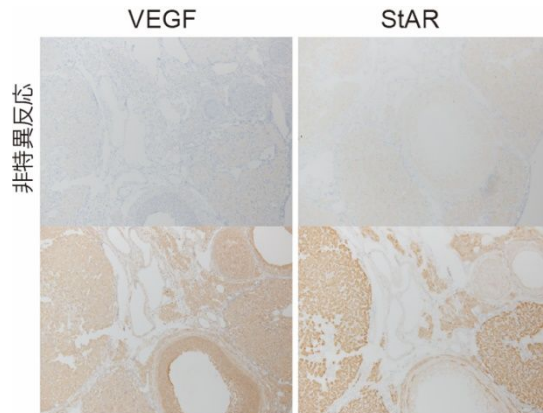


図 4. VEGF と StAR の免疫染色

非特異反応は 1 次抗体の反応を除いた染色像

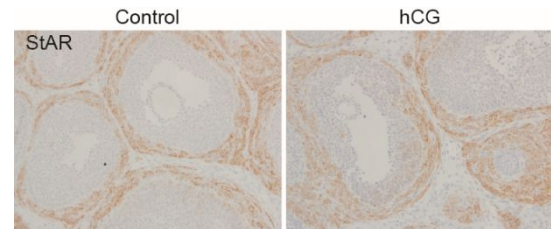


図 5. 抗 StAR 抗体による免疫染色

(4) キスペプチンの免疫染色が滞っていたため、mRNA の発現を in situ hybridization 法にて検討した。Kiss1 プローブ 2 種類とも卵巣で陽性反応はみられたが、その陽性反応は弱く、また Kiss1 プローブを除いても非特異的の反応が検出された。パラフィン包埋の切片と凍結切片で明らかな染色像の違いは見られなかった。また、未固定のまま凍結し、切片作成後に固定をしても染色像に違いは見られなかった。

Pdyn の mRNA の検出については、陽性反応が検出される個所もあったが、Pdyn プローブを除いても非特異反応が検出されており、Kiss1 と共に明らかな染色像は得られなかった。

考察

キスペプチン投与による卵巣のキスペプチンの発現変化を解析するため、染色方法の確立を試みた。脳サンプルでは染色方法を確立しており、またラット卵巣でキスペプチンを免疫染色した結果も報告されていることから、卵巣の染色も滞りなくできると考えていた。しかし、様々な条件を検討したが、卵巣で信憑性のあるキスペプチンの染色像は得られなかった。また、NKB や Dyn も脳サンプルでは染まるが、卵巣では明らかな染色像は得られなかった。一方で StAR は発現が一致する細胞に陽性反応が検出されたため、キスペプチンや NKB、Dyn は、脳と比べて卵巣での発現が非常に低い可能性が考えられた。染色による mRNA の検出も滞ったため、現在リアルタイム PCR を立ち上げている。今後、検出方法が確立次第、キスペプチンによる過排卵処理した動物で卵巣のキスペプチン発現を解析する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	岩田 衣世 (Iwata Kinuyo) (00582991)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	
	松本 恵介 (Matsumoto Keisuke)	日本医科大学・医学部・テクニカルスタッフ (32666)	

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------