

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：34438

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592492

研究課題名(和文) アンドロゲン誘導マウス多嚢胞性卵巣における卵母細胞成熟の基礎的研究

研究課題名(英文) Immunohistochemical localization of serotonin in the ovaries of mice with experimental polycystic ovary syndrome (PCOS)

研究代表者

畑村 育次 (HATAMURA, IKUJI)

関西医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：80336883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの多嚢胞性卵巣症(Polycystic Ovary Syndrome, PCOS)は、無月経に伴う生理の不規則性、不妊症などを伴い、思春期頃から発症する一種の排卵障害であり、ホルモン異常であると見なされているが、その成因は解明されていない。本研究においてはアンドロゲンをマウスに投与しPCOを作製し、その卵巣内環境ホルモンの異常がどのように卵母細胞成熟に関与するのかをセロトニンを中心に組織学および分子生物学的に検討を行った。セロトニンの発現は二次卵胞、グラーフ卵胞と卵胞が成熟するにつれて強く発現していることが確認され、セロトニンの発現が卵胞成熟に関連することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Polycystic ovary syndrome(PCOS) is the most common etiology of menstrual disorders and hyperandrogenism. At present, the understanding of PCOS has advanced significantly. PCO was induced by a single intraperitoneal injection of Testosterone propionate(TP)(0.1mg, dissolved in sesame oil) in 4-5 days female mice. The mice for 5 weeks after TP administration exhibited constantly either Estrus or Diestrus and resulted in anovulatory polycystic ovaries. These ovaries contain multiple large follicles and no corpus luteum. Its morphology and ovulatory failure are similar to PCOS of human. These ovaries contain multiple large follicles and no corpus luteum. Its morphology and ovulatory failure are similar to PCOS of human. It was subjected to immunohistochemistry of serotonin in those PCO. Expression of serotonin was strongly expressed in the later secondary follicles. It was suggested that excessive serotonin expression in ovarian caused abnormally enhance follicle maturation

研究分野：分子生物学

キーワード：多嚢胞性卵巣(PCO) セロトニン

1. 研究開始当初の背景

多嚢胞性卵巣症 (PCOS) について

ヒトの PCOS は、無月経に伴う生理の不規則性、不妊症、多毛症、胸の発達の遅れと病的肥満などを伴い、思春期頃から発症する一種の排卵障害となることが明らかにされた。本疾患の生化学的特徴は性ステロイドホルモン、アンドロゲンの産生が過剰であり、下垂体ホルモンの分泌は FSH に比べ、LH が優位となる。このような体内環境ホルモン異常、特に卵巣内の環境ホルモンの調整異常が PCO の誘因となるが、その成因や治療についての研究は今日まで続けられているが、未だに解決するに至っていない。そこで多嚢胞性卵巣 (PCO) における体内環境ホルモンの異常で生じる卵母細胞成熟過程への影響を検討することが治療に繋がると考えられる。

モデル疾患動物作製とヒト PCO の基礎的研究の背景

PCO モデル動物の作製には、その多くはラットを用いて Estradiol Valerate の投与 (Brawer et al., 1986)、黄体形成ホルモン放出ホルモンの抗体 (LHRH) の投与 (Faser and Baker, 1978, Popkin et al., 1983)、Dehydroepiandrosterone (DHEA) の投与 (Singh, 1969, Anderson et al., 1997, Parker and Mahesh, 1976) や、視床下部前部の進入絡遮断 (Helasz, 1969) 及び甲状腺低下症ラットにヒト生殖腺刺激ホルモンの投与 (Copmann and Adams 1981) によるものなどの方法が報告されている。

今回我々はマウスにステロイドホルモンの一種である Testosterone propionate (TP) を投与することによって、PCO モデルマウスを作製することに成功した (業績 No. 4)。その PCO 組織において、二次卵胞に含まれる卵母細胞には正常卵巣では認められない第一減数分裂中期のものや、第一極体を放出し、第二減数分裂中期を示すもの認めた。これらは体内環境ホルモンの異常が卵巣内のホルモ

ン環境を乱し、卵母細胞の成熟に影響を与えた可能性がある。これらの卵母細胞の成熟過程を検索するために、卵母細胞はもちろんそれを取り巻く顆粒膜細胞、卵丘細胞等を組織学的、分子生物学的に検討を行い、PCO の成因の解明に繋げる。また我々は正常卵巣に於いて卵胞成熟には卵胞組織内セロトニン量が重要であり、卵胞組織で卵胞が正常に成熟する為にはセロトニンが必要であり、一定量のセロトニン濃度が必要である可能性を示したが、卵巣の環境ホルモン異常でできた PCO における卵母細胞の異常な成熟とセロトニンの関係を検討することが重要となってくると考えられる

2. 研究の目的

多嚢胞性卵巣症は、月経異常、多嚢胞性卵巣、血中男性ホルモン高値または LH 基礎値高値かつ FSH 基礎値正常を満たす疾患で体内環境ホルモンの異常で生じるが原因の解明はされていない。女性生殖機能はステロイドホルモンを中心とした内分泌系により調整を受けている。その中心である卵巣は、下垂体から分泌される FSH、LH の作用を受けて卵胞の発育、排卵、黄体の形成・退行と周期的に変化する。この体内環境ホルモンの調整悪化が卵巣機能不全を引き起こし、生殖機能に影響を与え、種々の疾患を引き起こす。PCO はストレスや内分泌攪乱物質等の環境ホルモンや体内環境ホルモンの乱れなど多因子の影響で、下垂体、卵巣機能の障害を来たしステロイドホルモンの産生異常が病因となっていることが予想されるが、その原因や病態生理は複雑でいまだ明らかにされていない。そこで我々はステロイドホルモンの一種であるアンドロゲンをマウスに投与し PCO を作製し、その卵巣内環境ホルモンの異常がどのように卵母細胞成熟に関与するのかをセロトニンを中心に組織学的および分子生物学的に検討する。

3. 研究の方法

1. PCO モデルマウスの作製

4-5 日齢の雌マウスに、アンドロゲン的一种である Testosterone propionate (TP) をゴマ油とエタノール (9 : 1 v/v) に溶解した溶液 (0.5~1.0mg) を腹腔に 1 回注射をおこない、対照として TP を除いたゴマ油とエタノール (9 : 1 v/v) に溶解した溶液 (0.5~1.0mg) を腹腔内に投与した。

(2) 5 週齢に達した時点から膺スミアで発情周期を調べ、膺スミアで常に角化細胞と少量の小型有核細胞が見られる発情前期 (Proestrus)、または角化細胞のみが見られる発情期 (Estrus) を示し、その後周期の変動が見られなくなった個体を PCO になったと判定した。

2. 作製したモデルマウスの卵巣の解析

(1) 1 で作製したモデルマウスより卵巣組織をとり 4%パラホルムアルデヒド固定し、H.E 染色をおこない多嚢胞性卵巣の組織学的検索をおこなった。

(2) 卵巣組織の免疫組織学的解析

セロトニンはもちろんそのほかにセロトニン合成経路が存在する可能性を検討するため、セロトニン合成の律速段階酵素である TPH-1 (Tryptophan-5-hydroxylase) とセロトニン最終合成酵素として知られる DDC (Dopa decarboxylase) の卵巣内組織の発現様式を検索するためにそれぞれの免疫染色をおこない、卵母細胞の PCO における蛋白発現様式を解析した。次にセロトニンのレセプター 5-HT_{2A}、5-HT_{2B}、5-HT_{2C}、5-HT₇ を中心に各種のセロトニンレセプターの免疫染色もおこなった、またそれぞれの RT-PCR も行い発現様式の相違も検討した。

本実験はすべて関西医療大学動物実験委員会の承認を受け、国際動物実験指針に従って行った。

4. 研究成果

5 週齢に達した対照群のマウス卵巣の組織切片は、発達中のさまざまな大きさの卵胞と黄体などが多数混在していた。それら卵母細胞はみな大きな卵核胞 (GV) をもち、その周りに一層の濾胞細胞 (顆粒膜細胞) で取り囲まれている一次卵胞と、二層から数層の顆粒膜細胞が卵母細胞を取り巻く二次卵胞、更に卵丘細胞に取り囲まれた卵母細胞が卵胞腔に突き出た成熟卵胞を認めた。これに対して、TP 処理の 5 週齢の卵巣では、発達中の卵胞が見られるが、一変して大きく膨らんだ卵胞が多数見られ、黄体は少なく、卵巣全体が凹凸を形成し、膨張しており、大きく膨らんだ卵胞は卵巣の表層に配列するようになり、卵胞腔の顆粒膜細胞層は薄く、卵胞を取り巻く莢膜細胞層が厚くなっているのが観察された (図 1)

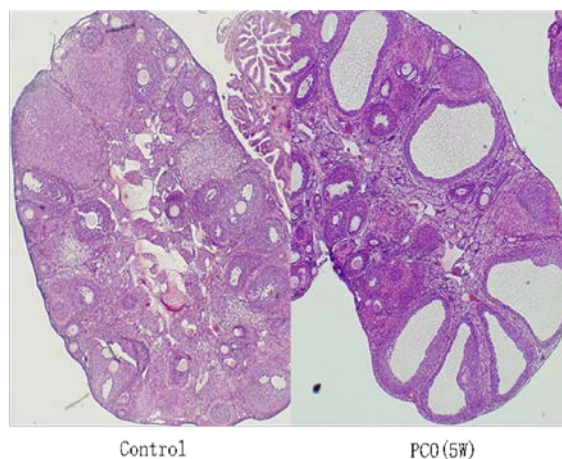


図 1

これらの組織から mRNA を抽出し cDNA を作製し、セロトニン合成の律速段階酵素である TPH-1 (Tryptophan-5-hydroxylase) とセロトニン最終合成酵素として知られる DDC (Dopa decarboxylase)、およびセロトニンのレセプター 5-HT_{2A}、5-HT_{2B}、5-HT_{2C}、5-HT₇ の RT-PCR を施行したところ、TPH-1、DDC、5-HT_{2C} の発現がコントロールと比し、PCO 組織で亢進していた (図 2)

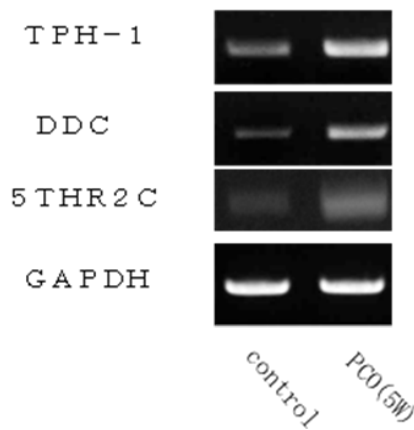
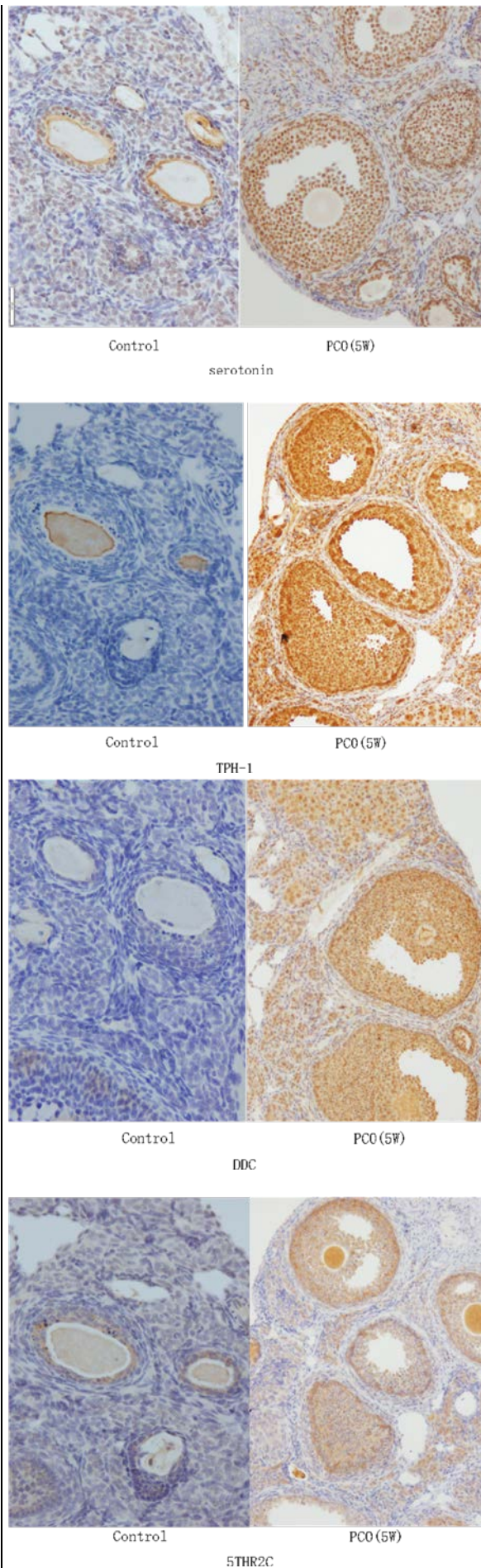


図2 RT-PCR

RT-PCRで発現が亢進していた TPH-1、DDC、5-HT2C およびセロトニンの免疫組織染色で検討した。(右図)

セロトニンの発現は対照群の卵巢組織においては原始卵胞、および一次卵胞の顆粒膜細胞および、大きく成熟した二次卵胞の卵母細胞および卵丘細胞にまだらに発現していた。一方PCO組織では大きくふくらんだ二次、およびグラフ卵胞の卵母細胞に強く発現していた。同様に TPH-1、DDC、5-HT2C の発現もほぼセロトニンの発現と一致していた。卵胞成熟にはセロトニンの発現が大きく関わっていることが示された。そのセロトニンの供給は、セロトニン合成の律速段階酵素である TPH-1 とセロトニン最終合成酵素として知られる DDC が顆粒膜細胞、卵母細胞に発現して、卵母細胞がセロトニンを産生し、さらにセロトニン受容体の 5-HT2C の発現が同様に発現していたことから、卵胞形成と成熟に関与していることが示された。

セロトニンの働きは卵胞成熟に、卵胞自らセロトニンを産生し、オートクラインに作用し卵胞の成熟を促進するということが示された。今回TP誘導で卵母細胞においてセロトニン産生が促進され、異常に卵胞形成が亢進し大きくふくらんだPCOが形成されたと考えられる。PCOSの制御に、卵巢局所でセロトニンの産生を抑えることが必要であると考えられる。



今後PCOSの治療および予防には卵巣局所のセロトニン産生の抑制方法、そのセロトニン産生抑制薬の開発、受容体拮抗薬などの薬の開発が有効となると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Nishio N, Taniguchi W, Sugimura YK, Takiguchi N, Yamanaka M, Kiyoyuki Y, Yamada H, Miyazaki N, Yoshida M, Nakatsuka T

Reactive oxygen species enhance excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons by activating TRPA1 and TRPV1 channels.

Neuroscience. 2013 Sep 5;247:201-12

[学会発表] (計 2 件)

櫻井威織 畑村育次 平尾幸久 (関西医療大学) マウスの過剰排卵に刺鍼が及ぼす影響第61回 (社) 全日本鍼灸学会学術大会 (三重大会) 6月10日 (日) 2012年

三重

鍵弥 朋子 1, 伊藤 俊治 2, 畑島 紀昭 3, 櫻井 威織 2, 櫻井 悠加 2, 椎崎 和弘 4, 畑村 育次 3 (1 関西医療大・保健医療・臨床検査, 2 関西医療大・院保健医療・保健医療, 3 関西医療大・保健医療・ヘルスプロモーション整備, 4 自治医大・分子病態治療 研究センター・抗加齢医学研究部) 副甲状腺関連遺伝子 Psp は精子形成を支配する。

第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11月25日 (火) パシフィコ横濱

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑村 育次 (HATAMURA IKUJI)
関西医療大学・保健医療学部・教授
研究者番号 : 80336883

(2) 研究分担者

中塚 映政 (NAKATSUKA TERUMASA)
関西医療大学・保健医療学部・客員教授
(平成 24 年度)

研究者番号 : 30380752

櫻井 威織 (SAKURAI IORI)

関西医療大学・保健医療学部・その他
研究者番号 : 40624127
(平成 24 年度)

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :