

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10673

研究課題名(和文) 視床下部機能低下時の新規中枢神経ペプチドアナログによる新しい排卵誘発法の基礎検討

研究課題名(英文) Basic study for ovulation induction using novel hypothalamic peptide analogues in suppressed hypothalamic GnRH secretion

研究代表者

松崎 利也 (MATSUZAKI, Toshiya)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・准教授

研究者番号：70294692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ダイエットなどの各種ストレスにより女性では視床下部のGnRH分泌が抑制され、無月経・不妊となる。今回我々は、絶食ラットおよびマウスにNeurokinin B 作動薬SenktideおよびDynorphin拮抗薬nor-BNIを投与し、性機能回復効果を検討した。急性絶食により血中LH値は抑制されたが、Senktideは雄マウスにおいてLH値を有意に上昇させ、nor-BNIは雄ラットにおいてLH値を有意に回復させた。これらの神経ペプチドによるkisspeptin分泌回復作用が、各種ストレス下の性機能障害の治療に応用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We aimed to determine whether stimulation of neurokinin B (NKB)/neurokinin 3 receptor (NK3R) signaling and inhibition of dynorphin (Dyn)/kappa-opioid receptor (KOR) signaling recover LH secretion that is suppressed by acute fasting in male rats and male mice. Mature male rats were injected saline and senktide (20g/kg), a NK3R agonist, or nor-BNI (800g/kg), a KOR antagonist ip after 72h fasting. Mature male mice were injected multiple doses of senktide after 48h fasting. All three studies showed significantly lower LH concentration in fasted groups. Senktide recovered LH level suppressed by acute fasting in male mice, and nor-BNI also recovered LH level in male rats. These results suggest that stimulation of NKB/NK3R signaling and attenuation of Dyn/KOR signaling could recover suppressed LH secretion under acute fasting condition in male rodents.

研究分野：産科婦人科学、生殖内分泌学

キーワード：GnRH キスペプチン KNDyニューロン NKB ダイノルフィン センクタイド nor-BNI

1. 研究開始当初の背景

ダイエットなどの各種ストレスにより女性では視床下部の GnRH 分泌が抑制され、無月経・不妊となる。不妊治療として排卵誘発が行われるが、副作用の多胎妊娠の発生が問題となっている。ゴナドトロピンの基礎分泌は、GnRH のパルス状分泌で促進的に制御されている。また、GnRH のパルス状分泌は、視床下部弓状核の KNDy ニューロンからパルス状に放出される Kisspeptin により形成される。絶食下の性腺機能低下は、KNDy ニューロンの機能低下によることがわかっている。KNDy ニューロンの機能は Neurokinin B (NKB) により促進され、Dynorphin (Dyn) により抑制される。これらの因子のアナログを用いて KNDy ニューロンの機能を活性化させることで、GnRH/ゴナドトロピン分泌を正常化し、自然に近い排卵の回復が期待される。

2. 研究の目的

GnRH 分泌を調節している種々の視床下部ペプチドの作用を修飾することで、視床下部性排卵障害におけるゴナドトロピン分泌の抑制を解除できる可能性を検討するために、排卵障害モデル動物に NKB 作動薬 Senktide および Dyn 拮抗薬 nor-BNI を用い、性機能の回復について検討した。

(1) NKB agonist の Senktide を用いて、急性絶食下の LH 分泌および視床下部因子発現の抑制の回復作用を検討した。

(2) Dyn 受容体 KOR の antagonist である norBNI を用いて、急性絶食下の LH 分泌および視床下部因子発現の抑制の回復作用を検討した。

(3) 絶食下に見られる性周期抑制の Senktide による回復効果、慢性的な摂食制限で見られる性機能抑制に対する Senktide 慢性投与の性周期回復効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) 成熟雄マウスに自由摂食および 48 時間絶食を加え、Senktide または生食 ip 後 90 分血中 LH を以下の 6 群で検討した。Fed 群 (自由摂食、n=21)、Fast 群 (絶食、n=21)、Senk 1 群 (絶食 + Senktide 5ng、n=21)、Senk 2 群 (絶食 + Senktide 50ng、n=21)、Senk 3 群 (絶食 + Senktide 0.5 μg、n=21)、Senk 4 群 (絶食 + Senktide 5 μg、n=21)。

6 週齢思春期雌雄ラットで非絶食群、72 時間絶食群、72 時間絶食 + Senktide ip 群の血中 LH 等を検討した。

(2) 8 週齢の SD 系雄ラットを 3 群 (対照群、絶食群、絶食 norBNI 群) に分けた。絶食群と絶食 norBNI 群の絶食条件は 72 時間絶食とした。対照群、絶食群には実験開始時に生理食塩水を腹腔内投与 (ip) し、絶食 norBNI 群には norBNI 200 μg/body を ip した。72 時間後に血中 LH、視床下部に発現するゴナドトロピン分泌に関与する因子 (Kisspeptin、KOR、NKB、NK3R) の mRNA 発現を検討した。

(3) 成熟雌ラットを用いて、72 時間絶食群 (n=8)、72 時間絶食 + Senktide ip 群 (0.2mg/day、7 日間) (n=8) で、性周期を連日の膣スミアにて検討した。また、成熟雌ラットを用い、慢性的摂食制限として -75% の摂食制限 13 日間で無排卵を誘導し、続いて -63% の摂食制限の下で浸透圧ミニポンプを用いて生食群 (n=8)、センクタイド ip 群 (0.2mg/day、14 日間) (n=6) で 14 日の連日膣スミアで性周期を検討した。

4. 研究成果

(1) 成熟雄マウスの血中 LH は絶食で抑制され、センクタイド投与の 4 濃度中、高濃度の 2 濃度で改善効果が見られた (図 1)。思春期雄ラットの血中 LH は 72 時間絶食生食 ip 群と 72 時間絶食 + Senktide ip 群は非絶食群よりも有意に低かったが、Senktide ip による LH 分泌改善効果は見られなかった (図 2)。なお、雌ラットで同様の検討を行ったが血中 LH に差を見られなかった。

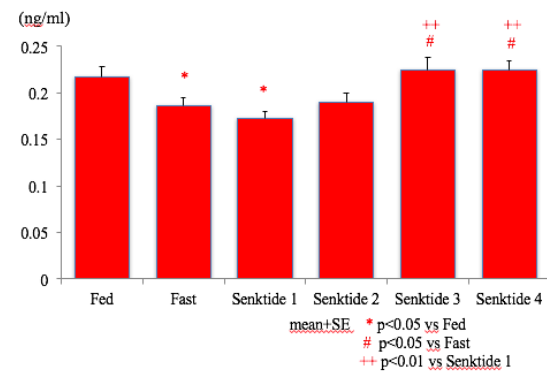


図 1 絶食により低下した血中 LH 濃度に対する Senktide の影響 (雄マウス)

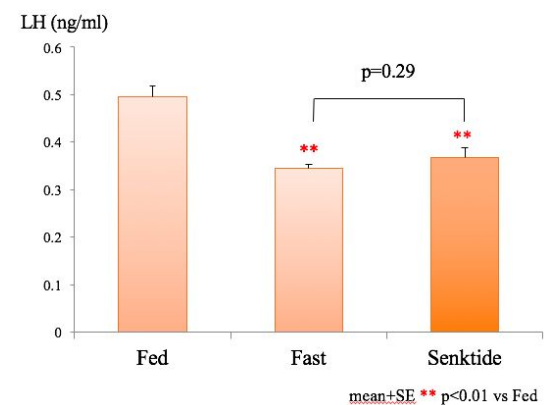


図 2 絶食により低下した血中 LH 濃度に対する Senktide の影響 (雄ラット)

(2) 絶食群と絶食 norBNI 群の血中 LH は対照群に比べ有意に低値であったが、絶食 norBNI 群では絶食群よりも有意に高値であった (図 3)。一方、血中 T 濃度および視床下部の

kisspeptin など生殖関連因子の mRNA 発現には有意差は見られなかった。

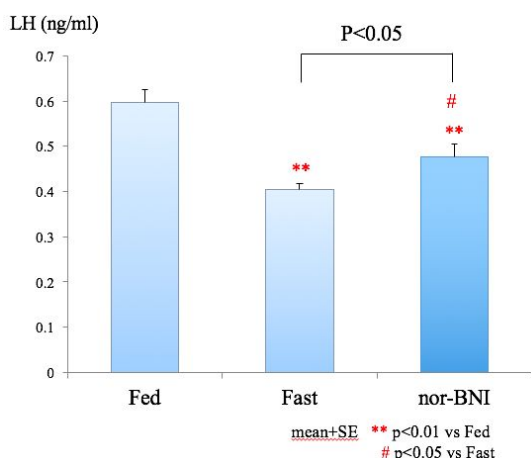


図3 絶食により低下した血中LH濃度に対するnor-BNIの影響(雄ラット)

(3) 急性投与実験で、絶食雌ラットの性周期は絶食群と絶食+Senktide群の間で有意な改善はなかった(絶食群5.1日、Senktide群4.3日)。また、慢性投与実験では投与中14日間の性周期は回復しなかった。

以上のように、NKB agonistであるSenktide、Dyn antagonistであるnorBNIは、急性絶食によるLH分泌の抑制を回復させる効果があることを明らかにした。この作用を用いて性周期を改善させるには、投与量の検討を含め今後の検討が必要であるが、将来的にはこれらの神経ペプチドまたは同様の機序を用いたkisspeptin分泌の回復が、各種ストレス下の性機能障害の治療に応用されることが期待される。

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 29件)

Iwasa T, Matsuzaki T, Yano K, Mayila Y, Irahara M. Effects of dihydrotestosterone administration on the expression of reproductive and body weight regulatory factors in ovariectomized and estradiol-treated female rats. *Gynecol Endocrinol.* 2018 Jan;34(1):73-77. 査読有、DOI : 10.1080/09513590.2017.1337096.

Iwasa T, Matsuzaki T, Yiliyasi M, Yano K, Irahara M. The effects of chronic testosterone administration on body weight, food intake, and fat weight were age-dependent. *Steroids.* 2017 Nov;127:18-23. 査読有、DOI : 10.1016/j.steroids.2017.08.014.

Matsuzaki T, Munkhzaya M, Tungalagsuvd A, Mayila Y, Iwasa T, Yano K, Yanagihara R, Tokui T, Kato T, Kuwahara A, Matsui S, Irahara M. Prenatal undernutrition disrupted the sexual maturation, but not the sexual behavior, in male rats. *Reprod Med Biol.* 2017 Sep 16;16(4):325-329. 査読有、DOI : 10.1002/rmb2.12045.

Iwasa T, Matsuzaki T, Yano K, Yanagihara R, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Mayila Y, Kuwahara A, Irahara M. The effects of chronic testosterone administration on body weight, food intake, and adipose tissue are changed by estrogen treatment in female rats. *Horm Behav.* 2017 Jul;93:53-61. 査読有、DOI : 10.1016/j.yhbeh.2017.05.008.

Matsuzaki T, Douchi T, Oki T, Ishihara O, Okagaki R, Kajihara T, Tamura M, Kotsuji F, Tajima K, Kawano M, Ishizuka B, Irahara M. Weight reduction using a formula diet recovers menstruation in obese patients with an ovulatory disorder. *Reprod Med Biol.* 2017 Jul 7;16(3):268-275. 査読有、DOI : 10.1002/rmb2.12034.

Matsuzaki T, Munkhzaya M, Iwasa T, Tungalagsuvd A, Yano K, Mayila Y, Yanagihara R, Tokui T, Kato T, Kuwahara A, Matsui S, Irahara M. Relationship between serum anti-Mullerian hormone and clinical parameters in polycystic ovary syndrome. *Endocr J.* 2017 May 30;64(5):531-541. 査読有、DOI : 10.1507/endocrj.EJ16-0501.

Iwasa T, Matsuzaki T, Yano K, Irahara M. Gonadotropin-Inhibitory Hormone Plays Roles in Stress-Induced Reproductive Dysfunction. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017 Apr 5;8:62. 査読有、DOI : 10.3389/fendo.2017.00062.

Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Iwasa T, Munkhzaya M, Yano K, Mayila Y, Tokui T, Yanagihara R, Matsui S, Kato T, Kuwahara A, Irahara M. Clinical outcome of various metformin treatments for women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Med Biol.* 2017 Apr 4;16(2):179-187. 査読有、DOI : 10.1002/rmb2.12026.

松崎利也 インスリン増感剤、不妊・不育診療指針、査読有、柴原浩章 編著、中外医学社、259-260、2016年11月10日発行

Iwasa T, Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Yiliyasi M, Kato T, Kuwahara A, Irahara M. Effects of chronic DHEA treatment on central and peripheral reproductive parameters, the onset of vaginal opening and the estrous cycle in female rats. *Gynecol Endocrinol.* 2016 Sep;32(9):752-755.、査読有、DOI : 10.3109/09513590.2016.1163672

Iwasa T, Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Yiliyasi M, Kato T, Kuwahara A, Irahara M. Developmental changes in the hypothalamic mRNA expression levels of PACAP and its receptor PAC1 and their sensitivity to fasting in male and female rats. *Int J Dev Neurosci.* 2016 Aug;52:33-37.、査読有、DOI : 10.1016/j.ijdevneu.2016.05.003.

Iwasa T, Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Yiliyasi M, Kato T, Kuwahara A, Irahara M. Effects of chronic testosterone administration on body weight and food intake differ among pre-pubertal, gonadal-intact, and ovariectomized female rats. *Behav Brain Res.* 2016 Aug 1;309:35-43.、査読有、DOI : 10.1016/j.bbr.2016.04.048.

Saito K, Matsuzaki T, Iwasa T, Miyado M, Saito H, Kubota T, Irahara M, Ogata T, Fukami M. Blood allopregnanolone levels in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2016 Jul;85(1):151-152.、査読有、DOI : 10.1111/cen.13080.

Iwasa T, Matsuzaki T, Matsui S, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Takiguchi E, Kawakita T, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. The sensitivity of adipose tissue visfatin mRNA expression to lipopolysaccharide-induced endotoxemia is increased by ovariectomy in female rats. *Int Immunopharmacol.* 2016 Jun;35:243-247.、査読有 DOI : 10.1016/j.intimp.2016.04.002.

Saito K, Matsuzaki T, Iwasa T, Miyado M, Saito H, Hasegawa T, Homma K, Inoue E, Miyashiro Y, Kubota T, Irahara M, Ogata T, Fukami M. Steroidogenic pathways involved in androgen biosynthesis in eumenorrhic women and patients with polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016 Apr;158:31-37.、査読有、DOI : 10.1016/j.jsbmb.2016.02.010.

Iwasa T, Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Yiliyasi M, Kuwahara A, Irahara M. Developmental changes in the hypothalamic mRNA levels of nucleobindin-2 (NUCB2) and their sensitivity to fasting in male and female rats. *Int J Dev Neurosci.* 2016 Apr;49:46-49.、査読有、DOI : 10.1016/j.ijdevneu.2016.01.003.

Tungalagsuvd A, Matsuzaki T, Iwasa T, Munkhzaya M, Yiliyasi M, Kawami T, Kato T, Kuwahara A, Irahara M. The expression of orexigenic and anorexigenic factors in middle-aged female rats that had been subjected to prenatal undernutrition. *Int J Dev Neurosci.* 2016 Apr;49:1-5.、査読有、DOI : 10.1016/j.ijdevneu.2015.12.002.

Iwasa T, Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Yiliyasi M, Kato T, Kuwahara A, Irahara M. Prenatal undernutrition results in greater lipopolysaccharide-induced changes in hypothalamic TNF- expression, but does not affect the equivalent changes in the serum levels of luteinizing hormone and testosterone, in adult male rats. *Int J Dev Neurosci.* 2016 Feb;48:80-83.、査読有、DOI : 10.1016/j.ijdevneu.2016.01.003.

松崎利也 多嚢胞性卵巣症候群 産婦人科処方実践マニュアル、査読有、産科と婦人科・第 83 巻・増刊号 243-247 2016 年 3 月 25 日発行

松崎利也、岩佐 武、徳井貴子、Yiliyasi Mayila、杉本 光、苛原 稔 電気化学発光免疫測定法 (ECLIA 法) を用いたプロゲステロン測定キット「エクルーシス 試薬プロゲステロン」の基本性能評価および基準範囲の検討 医学と薬学 査読無、自然科学社 73(3)、23-333、2016

21 Iwasa T, Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. The advancement of the onset of vaginal opening in female rats subjected to chronic testosterone treatment occurs independently of hypothalamic Kiss1 and RFRP expression. *Neuro Endocrinol Lett.* 2016 Jan 27;36(8):767-770.、査読有

22 松崎利也 差分解説：多嚢胞性卵巣症候群(PCOS) 治療の必要性 日本医事新報 No.4788 p59 2016年1月30日発行、査読有

23 Munkhzaya M, Matsuzaki T, Iwasa T, Tungalagsuvd A, Kawami T, Kato T, Kuwahara A, Irahara M. The

- suppressive effect of immune stress on LH secretion is absent in the early neonatal period in rats. *Int J Dev Neurosci*. 2015 Nov;46:38-43.、査読有、DOI : 10.1016/j.ijdevneu.2015.06.007.
- 24 Iwasa T, Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Prenatal undernutrition increases the febrile response to lipopolysaccharides in adulthood in male rats. *Int J Dev Neurosci*. 2015 Aug;44:1-5.、査読有、DOI : 10.1016/j.ijdevneu.2015.04.004.
- 25 Iwasa T, Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. LH and testosterone production are more sensitive to the suppressive effects of food deprivation in prenatally undernourished male rats. *Int J Dev Neurosci*. 2015 Jun;43:66-69.、査読有、DOI : 10.1016/j.ijdevneu.2015.04.001.
- 26 Matsuzaki T, Iwasa T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Kawami T, Yamasaki M, Murakami M, Kato T, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. The responses of hypothalamic NPY and OBRb mRNA expression to food deprivation develop during the neonatal-prepubertal period and exhibit gender differences in rats. *Int J Dev Neurosci*. 2015 Apr;41:63-67.、査読有、DOI : 10.1016/j.ijdevneu.2014.11.006.
- 27 Matsuzaki T, Iwasa T, Munkhzaya M, Tungalagsuvd A, Kawami T, Murakami M, Yamasaki M, Yamamoto Y, Kato T, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Developmental changes in hypothalamic oxytocin and oxytocin receptor mRNA expression and their sensitivity to fasting in male and female rats. *Int J Dev Neurosci*. 2015 Apr;41:105-109.、査読有、DOI : 10.1016/j.ijdevneu.2015.01.001.
- 28 松崎利也 多嚢胞性卵巣症候群 今日の診断指針第7版、査読有、総編集:金澤一郎、永井良三 P.P.1809-1812 医学書院 2015年3月31日発行

〔学会発表〕(計 18件)

松崎利也, Mayila Yiliyasi, 岩佐 武, 矢野清人, 柳原里江, 苛原 稔 出生後早期の感染ストレスが思春期発来と成熟後の性行動に及ぼす影響 第62回日本生殖医学会学術講演会 平成29年11月16-17日、下関
Toshiya Matsuzaki Symposium :

Manipulating hypothalamus using rat models of anovulation and optimizing ovulation induction in human -Control of HPG axis to improve the fertility in animals and humans- Fourth World Congress of Reproductive Biology ,Okinawa,Japan September 27-29,2017.

Yiliyasi Mayila, Toshiya Matsuzaki, Takeshi Iwasa, Kiyohito yano, Rie Yanagihara and Minoru Irahara The influence of neonatal infectious stress on the onset of puberty in male and female rats. 4th World Congress of Reproductive Biology 2017 (WCRB 2017) Okinawa,Japan 27-29 September,2017
Yiliyasi Mayila, Toshiya Matsuzaki, Takeshi Iwasa, Kiyohito Yano, Rie Yanagihara, Minoru Irahara The influence of early-live infectious stress on the onset of puberty in male and female rats. The 8th Congress of the International Society for Gender Medicine, Sendai,Japan September 14-16,2017

松崎利也, Yiliyasi Mayila, 岩佐 武, 矢野清人, 柳原里江, 苛原 稔 出生後早期の感染ストレスが雄ラットの性行動に及ぼす影響 第90回日本内分泌学会学術総会 平成29年4月20-22日、京都

松崎利也 ランチョンセミナー:一般不妊治療の多胎を防ぐ 第69回日本産科婦人科学会学術講演会 平成29年4月14-16日、広島市

松崎利也 生涯研修プログラム:多嚢胞性卵巣症候群患者の代謝異常と長期的な管理 -多嚢胞性卵巣症候群(polycystic ovary syndrome : PCOS) ~基礎から臨床まで~ 第69回日本産科婦人科学会学術講演会 平成29年4月14-16日、広島市

松崎利也, Mayila Yiliyasi, 岩佐 武, Munkhzaya Munkhsaikhan, Tungalagsuvd Altankhuu, 矢野清人, 苛原 稔 出生後早期の感染ストレスが成長後の性行動に及ぼす影響に関する検討 第61回日本生殖医学会学術集会 平成28年11月3-4日、横浜

松崎利也, Munkhzaya Munkhsaikhan, 岩佐 武, Tungalagsuvd Altankhuu, Mayila Yiliyasi, 矢野清人, 苛原 稔 The effect of maternal undernutrition on sexual behavior of female offsprings in rat. 第61回日本生殖医学会学術集会 平成28年11月3-4日、横浜

松崎利也, Tungalagsuvd Altankhuu, 岩佐 武, Munkhzaya Munkhsaikhan, Mayila Yiliyasi, 矢野清人, 苛原 稔.

Neurokinin B agonist and Dynorphin antagonist influenced LH secretion in fasted male rodents. 第 61 回日本生殖医学会学術集会 平成 28 年 11 月 3-4 日、横浜

Munkhsaikhan Munkhzaya、松崎利也、岩佐武、Altankhuu Tungalagsuvd、Yiliyasi Mayila、矢野清人、苛原稔
The effect of prenatal undernutrition on sexual behavior in female rat 第 69 回中国四国産科婦人科学会総会ならびに学術講演会 平成 28 年 9 月 24-25 日、高松市

Altankhuu Tungalagsuvd、松崎利也、岩佐武、Munkhsaikhan Munkhzaya、Yiliyasi Mayila、矢野清人、苛原稔
Senktide and nor-BNI influenced LH secretion in fasted male rodents 第 69 回中国四国産科婦人科学会総会ならびに学術講演会 平成 28 年 9 月 24-25 日、高松市

松崎利也、岩佐武、馬依拉伊利垂斯、Altankhuu Tungalagsuvd、Munkhsaikhan Munkhzaya、苛原稔 多嚢胞性卵巣症候群における血中 AMH 測定の意義の検討 第 68 回日本産科婦人科学術講演会 平成 28 年 4 月 21-24 日、東京

Toshiya Matsuzaki Symposium : Exploring pathophysiology and future treatment for human anovulation using rat models.-What are the challenges and likely outcomes of drug development in the field?- The 3rd World Conference on Kisspeptin Orlando, Florida, USA March 30-31,2017.

Toshiya Matsuzaki Topics Session : Metformin treatment in women with polycystic ovary syndrome. IFFS/JSRM International Meeting,2015 26-29, April, 2015, Yokohama

Mukhsaikhan MUNKHZAYA, Toshiya MATSUZAKI, Takeshi IWASA, Altankhuu TUNGALAGSUVD, Takako KAWAMI, Minoru IRAHARA. Suppressive effect of immune stress on LH secretion is absent in early neonatal period in rats. IFFS/JSRM International Meeting, 2015 26-29, April, 2015, Yokohama

Altankhuu TUNGALAGSUVD, Toshiya MATSUZAKI, Takeshi IWASA, Munkhsaikhan MUNKHZAYA, Takako KAWAKITA, Minoru IRAHARA. Senktide does not recover suppression of HPG axis induced by acute fasting in male rats. IFFS/JSRM International Meeting 2015, 26-29, April, 2015, Yokohama

松崎利也 専攻医教育プログラム : 続

発性無月経 第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会 平成 27 年 4 月 9-12 日、横浜

〔図書〕(計 1 件)

松崎利也 インスリン増感剤、不妊・不育診療指針、柴原浩章 編著、中外医学社、259-260、2016 年 11 月 10 日発行

〔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

松崎 利也 (MATSUZAKI, Toshiya)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号 : 70294692

(2) 研究分担者

苛原 稔 (IRAHARA, Minoru)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号 : 20160070

岩佐 武 (IWASA, Takeshi)
徳島大学・病院・特任准教授
研究者番号 : 00707903