

令和元年9月3日現在

機関番号：32666

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07145

研究課題名(和文) 加齢による生殖機能不全メカニズムの解明

研究課題名(英文) Effect of long-term E2 exposure to hypothalamic kisspeptin neuron and luteinizing hormone surge generation

研究代表者

國村 有弓 (Kunimura, Yuyu)

日本医科大学・大学院医学研究科・ポストドクター

研究者番号：60801488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：長期エストロゲン(E2)暴露が、加齢に伴う生殖機能低下に与える影響について検討した。老齢動物では排卵に必要な黄体形成ホルモン分泌(LHサージ)は誘起されなかったが、若齢時に卵巣除去し生理的なE2暴露の影響をなくしたモデルでは老齢時にLHサージが誘起されたことから、生理的濃度のE2に長期暴露されることがLHサージ分泌制御に影響を与える可能性が示された。この可能性を検証するために、LHサージを制御する視床下部のキスペプチンと、エストロゲン受容体 遺伝子の発現を可視化する二重蛍光in situ hybridizationの最適条件を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴う不妊のメカニズムは古くより研究されているものの、未だ解明されていない。現在の不妊治療は生殖機能が低下した状態での対処治療だが、本研究成果は生殖機能低下メカニズムの根本的な解明に焦点を当てていることから、本研究成果を応用しE2暴露量や暴露期間の調整を成功させれば、予防医療などの臨床的応用も可能となる。また、本研究成果は、不妊や更年期障害などの治療法開発や、高齢出産の問題解決の新たな切り口となる、社会的にも意義のある研究であると期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to examine the effects of estrogen(E2) exposure to age-related reproductive decline. Although no luteinizing hormone (LH) surge was detected in aged female rats, aged rats which ovariectomized at 5-months of age showed E2-induced LH surge, which is necessary for ovulation. This result suggests that long-term physiological E2 exposure might alter LH surge generation. To examine the effect of E2 on LH surge generating mechanism, double fluorescent in situ hybridization against estrogen receptor and kisspeptin was established.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：キスペプチン 視床下部 老化 黄体形成ホルモン 脳 生殖 エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の排卵は、卵胞から分泌されるエストロゲンを視床下部が受容することで性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)が分泌され、下垂体から黄体形成ホルモン(LH)が一過性に大量放出(LHサージ)することで引き起こされることが知られている。げっ歯類では加齢に伴いこのLHサージと排卵リズムに乱れが起こり、生殖機能が著しく低下し最終的に不妊になる。

先行研究より、卵巣由来のエストロゲンが、視床下部のエストロゲン感受性を低下させることでLHサージの制御機構が障害されることが若齢動物に卵巣除去を施す実験より明らかとなっている(Finch et al., 1984)。また、エストロゲンは、脳内のエストロゲン受容体 α の発現を低下させることも先行研究より明らかにされている(Funabashi et al., 2000)。このことから、加齢に伴う生殖機能の低下は、長期にわたり卵胞発育と排卵を繰り返し性周期を経験すること、すなわち自身の卵巣由来のエストロゲンに長期暴露されることで、視床下部のエストロゲン受容体 α の発現およびエストロゲンの感受性が低下し引き起こされる可能性が極めて高いと考えられる。このような研究は不妊のメカニズム解明に直結するため非常に重要だが、この後進んでいない。なぜなら、視床下部に存在し卵巣からエストロゲンのフィードバックを受けることでLHサージを生み出す「ジェネレーター」の実態が特定されていなかったためである。2003年に、このジェネレーターは視床下部前腹側室周囲核に存在しエストロゲン受容体 α を発現するキスペプチンニューロンであることが明らかとなった。このことから、加齢に伴う生殖機能の低下は、キスペプチンニューロンにおけるエストロゲン感受性の低下がきっかけで引き起こされる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

前述のエビデンスより、加齢による生殖機能低下のきっかけは、長期エストロゲン暴露が前腹側室周囲核のキスペプチンニューロンのエストロゲン受容体 α の発現を抑制し、エストロゲン感受性を低下させることにより、LHサージの産生が障害されることによる可能性が考えられた。よって、本研究では長期エストロゲン暴露が、前腹側室周囲核のキスペプチンニューロンのエストロゲン感受性に与える影響を明らかにすることを目的とする。これにより、老化による生殖機能不全の直接的な原因がエストロゲン暴露であることを示すことができる。

3. 研究の方法

長期エストロゲン暴露が、前腹側室周囲核のキスペプチンニューロンのエストロゲン感受性に与える影響を明らかにするために、ラットを用いて(1)長期卵巣除去により、前腹側室周囲核キスペプチンニューロンのエストロゲン感受性は若齢レベルを維持するか、(2)エストロゲン感受性の低下はエストロゲン受容体 α 遺伝子(*Esr1*)の発現変化によるものか、(3)エストロゲン暴露による若齢動物のLHサージ低下はキスペプチンニューロンの*Esr1*の発現低下によるものか、の3点について検証した。

(1) 長期エストロゲン暴露が、前腹側室周囲核のキスペプチンニューロンのエストロゲン感受性に与える影響を明らかにするために、長期卵巣除去モデルを作製し、前腹側室周囲核のキスペプチンニューロンのエストロゲン感受性が若齢レベルを維持するか検討した。正常な性周期を示す雌のWistarラットを生後5ヶ月で卵巣除去し、飼育を続けることで長期卵巣除去モデルを作製した。卵巣除去していないコントロール群で性周期を確認し続け、正常な性周期を示さなくなった20ヶ月齢以降に、両群を実験に使用した。LHサージを検証するために、LHサージおよび排卵を誘起する高濃度エストロゲン含有チューブを皮下に留置し、2日後に12:00から22:00まで1時間ごとに、頸動脈より右心室に留置したカテーテルより無麻酔・無拘束下で採血を行い、ラジ

オイムノアッセイによって血中LH濃度を測定した。4%の parahormonaldehyde で灌流後、脳を取り出し、*in situ hybridization*によってキスペプチンニューロンの発現を可視化する。

(2) 長期エストロゲン暴露による視床下部のエストロゲン感受性の低下が、エストロゲン受容体 α 遺伝子(*Esr1*)の発現変化によるものかについて検討するため、作製した長期卵巣除去モデルを4%の parahormonaldehyde で灌流後、脳を取り出し、前腹側室周囲核のキスペプチンニューロンに発現するエストロゲン受容体 α のmRNAの発現を二重蛍光*in situ hybridization*によって可視化する。

(3) 本研究室のこれまでの知見で、若齢動物の皮下に高濃度エストロゲン含有チューブを留置すると、4日程度は毎日午後の決まった時間にLHサージが誘起されるが、それ以降は誘起されなくなることが分かっている。このことから、若齢動物でもエストロゲン暴露によって前腹側室周囲核キスペプチンニューロンのエストロゲン感受性が低下することが考えられる。よって、(1)で卵巣除去した動物が老齢期まで成長するのを待つ間、若齢動物に高濃度エストロゲンを暴露したときの視床下部のエストロゲン反応性と、前腹側室周囲核キスペプチンニューロンのエストロゲン受容体 α 発現を検証する。これにより、加齢に伴うエストロゲン暴露が生殖機能低下に与える影響だけでなく、視床下部の一般的な性質として、成熟後のエストロゲン暴露による生殖機能がどのように変化するかが明らかとなる。

正常な性周期を示すWistarラットの雌を卵巣除去し、高濃度エストロゲン含有チューブを皮下に留置した2日後と14日後に実験に使用した。LHサージについて検討するため、10:00から21:00まで1時間ごとに、頸動脈より右心室に留置したカテーテルより無麻酔・無拘束下で採血を行い、血中LH濃度をラジオイムノアッセイ法により測定した。前腹側室周囲核のキスペプチンニューロンの発現を*in situ hybridization*にて、また前腹側室周囲核における*Esr1*を発現するキスペプチンニューロンを二重蛍光*in situ hybridization*にて、キスペプチンニューロンの下流に存在するGnRHニューロンを免疫染色にて観察し、それぞれ細胞数を計測した。

4. 研究成果

(1) 長期卵巣除去モデルのLH分泌を検討した結果、若齢時に卵巣除去していないコントロール群では、エストロゲンによるLH分泌の上昇はみられなかったが、長期卵巣除去モデルではLHサージ分泌がみられた。このことにより、長期卵巣除去によって加齢に伴うLHサージの低下はレスキューされることが確認された。

過去の文献より、当初は加齢に伴う性周期の異常がみられるようになるまで約13ヶ月と予想していたが、予想に反して約20ヶ月かかった。ラットのストレインによって加齢に伴う性周期の変化が大きくことなることが原因と考えられる。性周期は、膣上皮の細胞を採取し、採取された細胞の割合によって判断する。図1のグラフは14ヶ月~20ヶ月の性周期の代表例である。縦軸が膣上皮細胞種、横軸は動物の月齢(M)を示している。Cは角化細胞、Nは有核細胞、Lは白血球を示す。一般的に、ラットの性周期は4~5日で、有核細胞が多くみられる発情前期、角化細胞が多く見られる発情期、白血球と有核細胞がみられる発情後期、発情休止期の順で繰り返される。14ヶ月齢からすでに性周期は乱れ始めているが、角化細胞(C)が多く観察される発情期がみられ、排卵していることが分かる。上のグラフが示す動物は、19ヶ月齢以降も発情前期および発情期様の性周期を示しており、下のグラフが示す動物では排卵が見られなくなる連続発情休止期は生後19ヶ月以降であることが分かる。このように、個体によって性周期の乱れや停止の時期に大きな差があったことから、モデルを作製し、数が揃うまでに想定より大幅に時間を要した。よって、*in situ hybridization*によるキスペプチンニューロンの可視化については、今後検証する予定である。

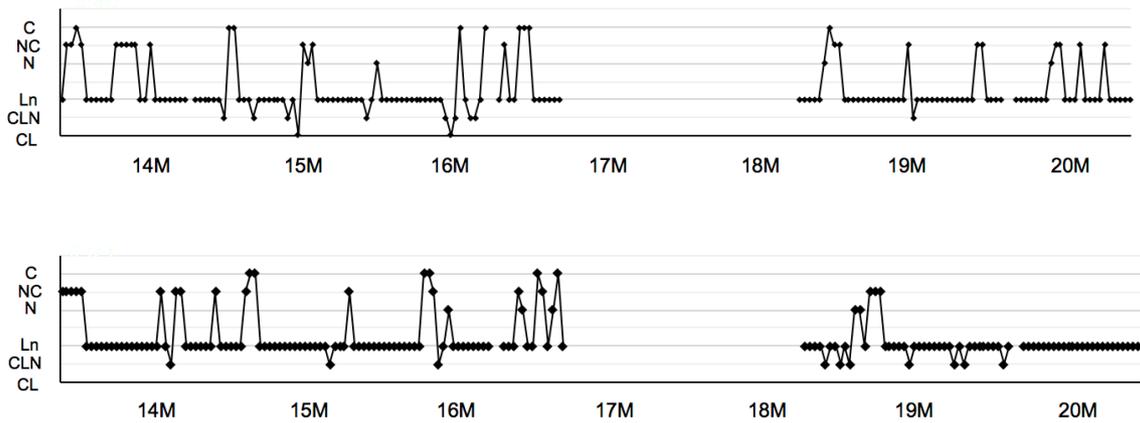


図 1. 加齢に伴う性周期変化の代表例

(2) 長期エストロゲン暴露による視床下部のエストロゲン感受性の低下が、エストロゲン受容体 α 遺伝子 (*Esr1*) の発現変化によるものかについて検討するため、長期卵巣除去モデルの作製を待つ間、*Esr1* と *Kiss1* の二重蛍光 *in situ* hybridization の手技を確立させた。*Esr1* は受容体のため、キスペプチンなどのペプチドより発現が低く、検出が難しい。より検出感度を高くするためのプローブ設計やシグナルの増感について条件検討し、*Kiss1* との二重蛍光 *in situ* hybridization を可能とする手技を確立させた。今後、この方法を用いて *Esr1* を発現する *Kiss1* ニューロン数について検討する。

(3) エストロゲン暴露による若齢動物の LH サージ低下が、キスペプチンニューロンの *Esr1* の発現低下によるものか検討するために、若齢動物に高濃度エストロゲンを 2 日間もしくは 14 日間暴露したときの視床下部のエストロゲン反応性と、前腹側室周囲核キスペプチンニューロンのエストロゲン受容体 α 発現を検証した。図 2 の左はエストロゲンを 2 日間暴露した動物の LH 分泌で、右は 14 日間暴露した動物の LH 分泌である。エストロゲンを 2 日間暴露した群では LH サージ分泌がみられたが、14 日間暴露した群ではサージはみられなかった。一方、*Kiss1* と *Esr1* の発現は両群で観察されたが (図 3)、*Esr1* を発現する *Kiss1* 陽性細胞数の割合に有意差はみられなかった。また、両群で *Kiss1* 発現細胞数を測定したが (図 4)、発現細胞数に有意差はみられなかった。キスペプチンニューロンの下流に位置する GnRH ニューロンについても検討したが、GnRH 免疫陽性細胞数にもエストロゲン暴露による影響はみられなかった。

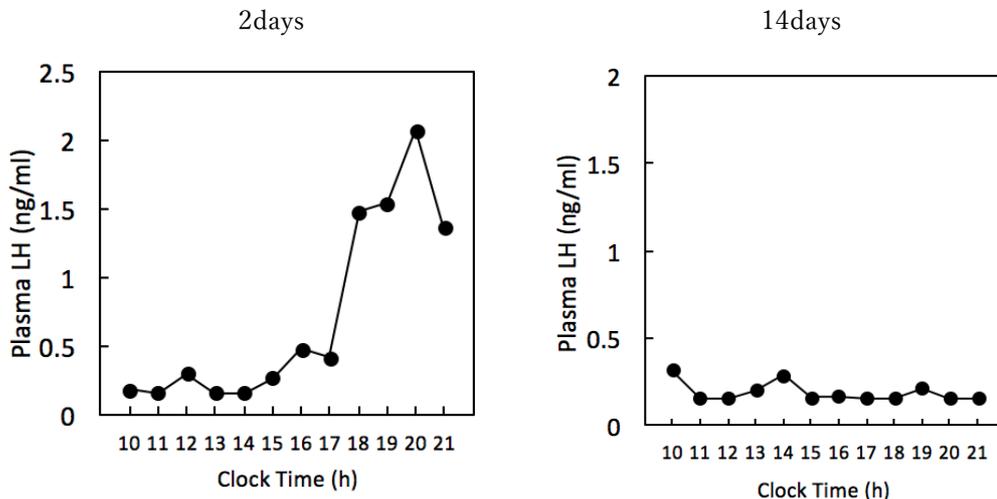


図 2. エストロゲン含有チューブを皮下に留置した雌ラットの LH 分泌の代表例

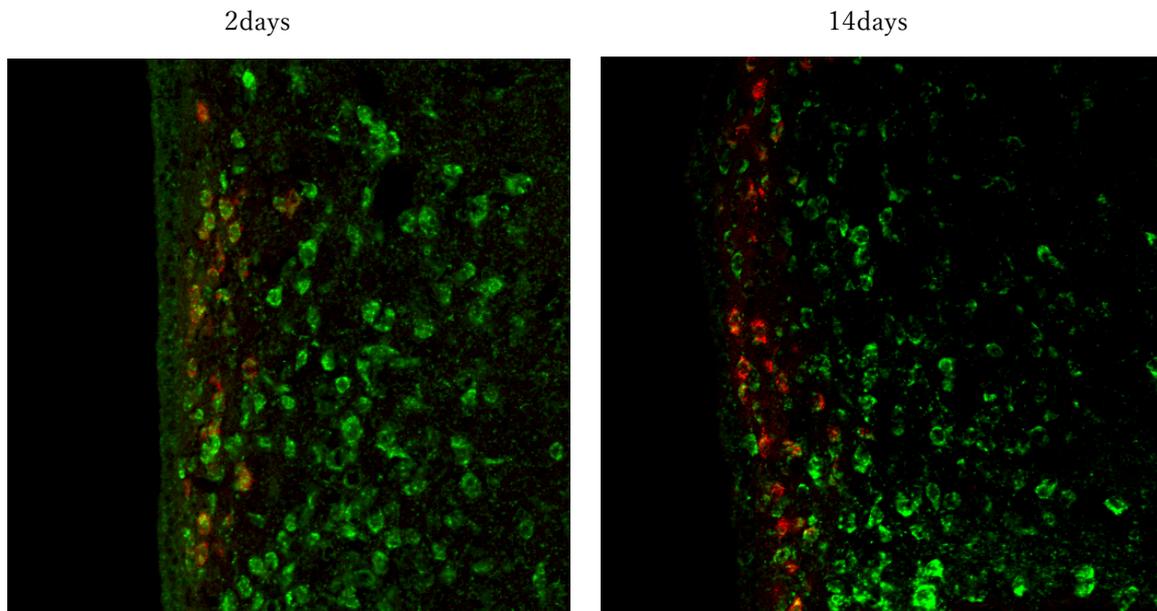


図 3. 前腹側室周囲核のキスペプチンニューロン(赤)におけるエストロゲン受容体 α (緑)の発現の代表例

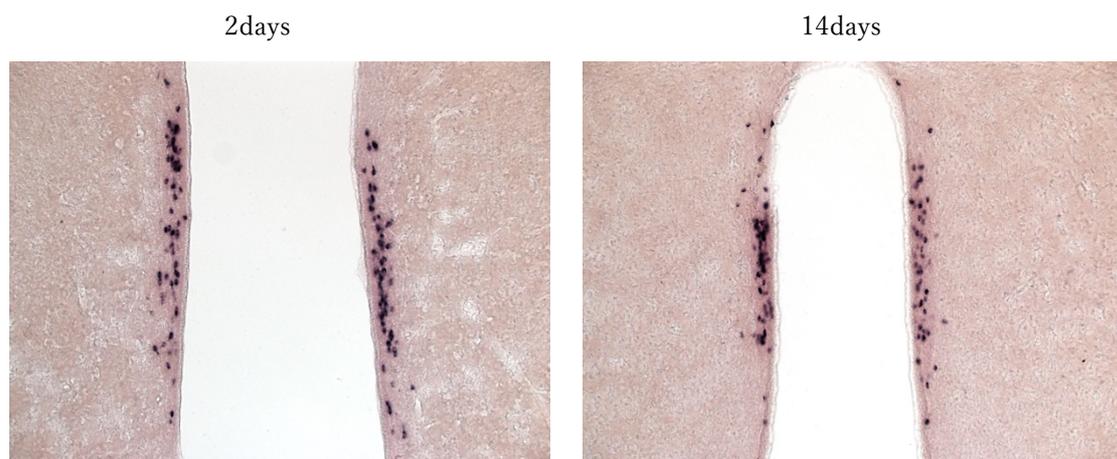


図 4. 前腹側室周囲核の *Kiss1* 発現細胞の代表例

以上の結果から、視床下部の一般的な性質として、成熟後の長期高濃度エストロゲン暴露によりLHサージの分泌は障害されるが、その原因は前腹側室周囲核キスペプチンニューロンにおけるエストロゲン受容体の発現低下によるものではない可能性が示唆された。先行研究により、エストロゲンは、視床下部の多くの領域でエストロゲン受容体 α の発現を低下させることが報告されていることから、本実験で高濃度エストロゲン処置をしたにも関わらず、エストロゲン受容体 α の遺伝子発現に変化がなかったことは非常に興味深い結果である。本結果より考えられる長期高濃度エストロゲン暴露によるLHサージ低下の原因には、キスペプチンニューロンやGnRHニューロンの活性の低下や、これらに受容体の発現変化、または下垂体のLH含有量の変化などが考えられる。

今回、長期卵巣除去モデルの作製に予測よりはるかに時間がかかったことから、予定していた実験を全て終わらせることができなかった。このモデル動物の脳切片を用いて今後行う予定である *Esr1* と *Kiss1* の二重蛍光 *in situ* hybridization の条件は若齢動物を用いて既に確立することができたため、これから長期卵巣除去モデルにも応用させ、今後長期卵巣除去モデルに適用し発現を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 2 件）

Kunimura Y., Iwata K., Ozawa H. Effect of long-term estradiol exposure on luteinizing hormone release and expression of estrogen receptor alpha in hypothalamic kisspeptin neurons in female rats. 10th International meeting, Steroids and Nervous System, Feb. 16-20. 2019, Torino (Italy)

國村有弓、岩田衣世、小澤一史. エストラジオール暴露が黄体形成ホルモン分泌と視床下部前腹側室周囲核キスペプチンニューロンのエストロゲン受容体 α の発現に与える影響, 第124回日本解剖学会総会・学術集会, 新潟, 2019年3月27-29日

6. 研究組織

※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。