

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月24日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592100

研究課題名（和文） 新規脳内ペプチドによるゴナドトロピン分泌調節機構と各種ストレスによる影響の検討

研究課題名（英文） regulation of gonadotropin secretion by novel brain peptides and stresses

研究代表者 松崎 利也（MATSUZAKI TOSHIYA）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：70294692

研究成果の概要（和文）：性成熟に伴い、性機能を調節する新規脳内ホルモン RFRP の発現は上昇する。また、絶食により、性機能を促進するホルモンのキスペプチンの発現が低下する反応性は、生後早期に成立する。この反応性は重要で、性成熟後には、この作用により絶食で性周期が抑制される。出生前、出生後早期にストレスを受けると、その後の性機能に長期的な悪影響を及ぼすので、妊娠中の良好な栄養状態や新生児期にストレスを避けることは重要である。

研究成果の概要（英文）：Expression of novel hypothalamic peptide RFRP increases during development. Suppression of kisspeptin expression by starvation was acquired in neonatal period, and plays an important role for suppression of gonadal function. Stresses during perinatal and neonatal period result in long-lasting influences on sexual function, therefore, it should be better to avoid stresses in these periods.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学、ゴナドトロピン分泌、視床下部、神経ペプチド、プログラミング、ストレス、キスペプチン、RFRP

1. 研究開始当初の背景

女性の性機能は、視床下部-下垂体によるゴナドトロピン分泌と、卵巣局所での卵胞発育により調節されている。とりわけ、視床下部-下垂体系によるゴナドトロピンの分泌は、生理的な卵巣ホルモンのフィードバック作用に加え、飢餓などの各種ストレスからも影響を受ける。ダイエットと心理的ストレスなどの各種ストレスは女性の性機能が抑制される原

因の大半を占めており、この抑制機序の解明は重要である。

これまでに我々は、摂食・ストレスを司るペプチドがゴナドトロピン分泌に影響を与えることを雌ラットを用いた動物実験で明らかにしてきた。近年、ゴナドトロピン分泌を調節する新規ペプチドとして、キスペプチンと性腺刺激ホルモン放出抑制ホルモン（GnIH）が発見され注目されている。最近我々は、キスペプチンの発現低下が感染ストレスによるGnRH

分泌抑制作用に関与すること、哺乳類におけるGnIH のホモログRFRP-3 が下垂体レベルで黄体形成ホルモン(LH)の分泌を抑制することを動物実験で明らかにした。そこで本研究では、GnIH/RFRP によるゴナドトロピン分泌の調節機構をさらに解明し、次いでキスペプチン、GnIHとストレス時に発現するペプチドとの関係を検討した。さらに、幼弱期に受けたストレスは、身体のストレス反応に長期的な影響を及ぼし、健康状態に悪影響を及ぼす。同様のプログラミング作用が性腺系に起きるか否かは明らかでは無かった。各種ストレスが性機能に及ぼす長期的影響について検討した。

2. 研究の目的

(1) 幼弱期、胎生期のストレスが、成熟後の同じストレスによる性機能と摂食調節機構反応に与える長期的影響(プログラミング)を検討した。

①幼弱期の感染ストレス ②胎生期の低栄養

(2) GnIH ホモログ RFRP のゴナドトロピン分泌抑制作用とその機構について検討した

①性成熟過程におけるラット視床下部RFRPとその受容体 (RFRP-R) の発現の推移 ②RFRPの思春期発来における意義

(3) 絶食ストレスによるキスペプチンの発現について検討した。

①kisspeptin 関連遺伝子発現の発達過程における感受性の獲得時期

②性成熟期の視床下部におけるキスペプチンとNKBの発現変動

3. 研究の方法

(1) ①新生仔期(日齢10)に感染ストレス(LPS)を与え、成熟後に感染ストレス(LPS)を負荷して、摂食と性機能に対するプログラミング下記の1-3を検討した。

1. 雌ラット、性機能、摂食機能 2. 雄ラット、性機能 3. 雄ラット、摂食機能

②妊娠ラットに自由摂食または自由摂食の2分の1の摂食制限を行い、出生仔の雌を更に生後の通常栄養、過栄養に分けて、合計4群で性成熟を検討した。

(2) ①幼弱期から性成熟期のSD系雌雄ラットを用いて、RFRPとRFRP受容体(RFRPr)の発現の推移と性ステロイドの影響について検討した。RFRP-RmRNA、RFRP蛋白の発現の推移を検討し、さらに、性腺摘出と性ステロイドホルモン補充を行い、RFRPとその受容体mRNAの発現を検討した。

②Wistar系幼弱雌ラットを用い、RFRP-3、GnIH中和抗体、RFRP拮抗薬のRF9または生理食塩水を、浸透圧ミニポンプにて14日間

慢性脳室内投与し、各群の膣開口日を検討した。

(3) ①絶食ストレスに対するkisspeptin関連遺伝子発現の感受性の発達過程における変化とレプチンの関与について検討した。

②8週齢Wistar系成熟雌ラットを用い、72時間絶食、自由摂食の2群で、性周期、血中LH、キスペプチンmRNA発現を検討した。

4. 研究成果

(1) ①1. 新生仔期にストレスを受けた雌ラットでは、成熟後のストレスに対する性機能抑制反応が増強し、摂食抑制作用は軽減するプログラミングが見られた。また、幼弱期ストレス群は、成熟後の視床下部のUCN2およびCRHR2の発現が高く、このプログラミングに関与していることが示唆された。

2. 新生仔期に感染ストレス(LPS)を与えた雄ラットでは、成熟後の感染ストレス(LPS)に対する血中LH値の低下を認めなかった。中枢の感受性(IL-1 β , TNF- α mRNA産生)が減弱し、性腺(精巣)の感受性は変化しない。以上から、雄では性機能抑制が減弱するプログラミングが視床下部で起き、感染ストレスに対する視床下部サイトカイン産生亢進の減弱がこのプログラミングに関与していることが示唆された。

3. 幼弱期に感染ストレス(LPS)を受けた雄ラットでは、成熟期の同ストレスに対し摂食抑制が減弱した。その際、レプチン上昇がみられず、視床下部IL-1 β , TNF- α mRNA, NPYmRNAの発現上昇は幼弱期生食投与群よりも軽度であり、プログラミングに関与していることが示唆された。

②胎生期低栄養群は、16日齢から33日齢までのいずれの時期においてもKiss-1mRNAの発現が低く、膣開口が遅延したが、kisspeptinの脳室内慢性投与により膣開口遅延は解除された。胎生期の低栄養が視床下部におけるkisspeptinの発現を低下させ、出生後の性成熟および思春期発来を遅らせることが判明した。また、妊娠中の摂食制限により遅延した膣開口は、生後の栄養状態により影響を受けず、胎生期に低栄養ストレスを受けたラットの性機能抑制が生後の十分な栄養によっても改善できないことを明らかにした。

(2) ①性成熟にともないRFRPとRFRPrのmRNAの発現は上昇した。また、RFRP蛋白も同様の変動がみられた。性腺摘出でRFRPとRFRPrの発現は変化しなかった。RFRPmRNAは、雌ラットにおいてエストラジオールの投与により上昇した。RFRPの発現は幼弱期の発育に伴い上昇し、既にエストロゲンに反応することがわかった。

②各群の膣開口日に有意差は見られなかった。幼弱期には、RFRPの性機能抑制作用はまだ未

発達であり、思春期発来機構に関与していないことが示唆された。

(3) ①低栄養に対し、Kiss1r発現の低下反応は日齢15から25にかけて発達し、Kiss1rの低下反応は日齢5ですでに確立されていた。日齢25では血中レプチンとKiss1r発現に有意な正の相関を認め、また、絶食中にレプチンを投与すると、Kiss1r発現の抑制が解除されたことから、幼弱期の低栄養時にはレプチンの低下によりKiss1r発現が低下に関わると考えられた。

②絶食により、性周期は延長し、血中 LH は低下した。また、キスペプチン mRNA 発現は、後方(弓状核)では低下し、視床下部前方(AVPV)では不変であった。一方、NKB とその受容体 mRNA も不変であった。絶食による性機能抑制には、弓状核の方のキスペプチンの発現低下が関与していることを明らかにした

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32件)

1. Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Kinouchi R, Gereltsetseg G, Nakazawa H, Yamamoto S, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Effects of lipopolysaccharide exposure at different postnatal time points on the response of LH to homotypic stress in adulthood.

J Reprod Immunol. 査読有 2012 Jun;94(2):155-160. Epub 2012 Apr 15. doi:10.1016/j.jri.2012.02.003

2. Matsui S, Yasui T, Tani A, Kunimi K, Uemura H, Yamamoto S, Kuwahara A, Matsuzaki T, Tsuchiya N, Yuzurihara M, Kase Y, Irahara M. Changes in insulin sensitivity during GnRH agonist treatment in premenopausal women with leiomyoma. Clin Chim Acta. 査読有 2012 Jun 14;413(11-12):960-965. Epub 2012 Feb 16. doi:10.1016/j.cca.2012.01.040

3. Moride N, Kuwahara A, Sutoh A, Tanaka Y, Mukai Y, Yamashita M, Matsuzaki T, Yasui T, Irahara M. Okadaic acid-sensitive phosphatase is related to MII/G1 transition in mouse oocytes. Zygote. 査読有 2012 May;20(2):193-198. Epub 2011 Feb 10.

doi:10.1017/S0967199411000013

4. Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M,

Kinouchi R, Osugi T, Gereltsetseg G, Yoshida S, Irahara M, Tsutsui K. Developmental changes in the mammalian gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) ortholog RFamide-related peptide (RFRP) and its cognate receptor GPR147 in the rat hypothalamus.

Int J Dev Neurosci. 査読有 2012 Feb;30(1):31-37. Epub 2011 Oct 28. doi:10.1016/j.ijdevneu.2011.10.003

5. Matsuzaki T, Iwasa T, Kinouchi R, Yoshida S, Murakami M, Gereltsetseg G, Yamamoto S, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Fasting reduces the kiss1 mRNA levels in the caudal hypothalamus of gonadally intact adult female rats.

Endocr J. 査読有 2011;58(11):1003-1012. Epub 2011 Oct 6. doi:10.1507/endocrj.K11E-131

6. Iwasa T, Matsuzaki T, Kinouchi R, Gereltsetseg G, Murakami M, Nakazawa H, Fujisawa S, Yamamoto S, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Effect of immune stress on body weight regulation is altered by ovariectomy in female rats.

J Reprod Immunol. 査読有 2011 Sep;91(1-2):41-47. Epub 2011 Aug 19. doi:10.1016/j.jri.2011.05.010

7. Yoshida K, Furumoto H, Abe A, Kato T, Nishimura M, Kuwahara A, Maeda K, Matsuzaki T, Irahara M. The possibility of vertical transmission of human papillomavirus through maternal milk.

J Obstet Gynaecol. 査読有 2011 Aug;31(6):503-506. doi:10.3109/01443615.2011.570814

8. Matsui S, Yasui T, Uemura H, Yamamoto S, Matsuzaki T, Tsuchiya N, Yuzurihara M, Kase Y, Irahara M. Induction of circulating monocyte chemoattractant protein-1 in women with gonadotropin-releasing hormone agonist. J Reprod Immunol. 査読有 2011 Aug;90(2):227-234. Epub 2011 Jul 2. doi:10.3109/01443615.2011.570814

9. Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Kinouchi R, Gereltsetseg G, Nakazawa H, Yamamoto S, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Changes in responsiveness of appetite, leptin and hypothalamic IL-1 β and TNF- α to lipopolysaccharide in developing rats. J Neuroimmunol. 査読有 2011

Jul;236(1-2):10-16. Epub 2011 May 31.
doi:10.1016/j.jneuroim.2011.04.004

10. Iwasa T, Matsuzaki T, Kinouchi R, Gereltsetseg G, Murakami M, Nakazawa H, Yasui T, Irahara M. Changes in the responsiveness of serum leptin and hypothalamic neuropeptide Y mRNA levels to food deprivation in developing rats. *Int J Dev Neurosci*. 査読有 2011 Jun;29(4):377-380. Epub 2011 Mar 29.
doi:10.1016/j.ijdevneu.2011.03.006

11. Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Kinouchi R, Gereltsetseg G, Yamamoto S, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Delayed puberty in prenatally glucocorticoid administered female rats occurs independently of the hypothalamic Kiss1-Kiss1r-GnRH system. *Int J Dev Neurosci*. 査読有 2011 Apr;29(2):183-188. Epub 2010 Nov 11.
doi:10.1016/j.ijdevneu.2010.11.001

12. Dorjpurev U, Kuwahara A, Yano Y, Taniguchi T, Yamamoto Y, Suto A, Tanaka Y, Matsuzaki T, Yasui T, Irahara M. Effect of semen characteristics on pregnancy rate following intrauterine insemination. *J Med Invest*. 査読有 2011 Feb;58(1-2):127-133.
doi:10.2152/jmi.58.127

13. Kasai Y, Maegawa M, Yamamoto S, Kamada M, Yasui T, Uemura H, Kobayashi A, Kaneyama M, Tani A, Matsui S, Kuwahara A, Matsuzaki T, Furumoto H, Irahara M. Effects of raloxifene on the production of cytokines in stimulated whole blood in ex vivo and in vitro studies. *J Med Invest*. 査読有 2011 Feb;58(1-2):110-117.
doi:10.2152/jmi.58.110

14. Moride N, Kuwahara A, Yamashita M, Tanaka Y, Matsuzaki T, Yasui T, Irahara M. Does the bromocriptine-rebound method improve embryo quality? *J Med Invest*. 査読有 2011 Feb;58(1-2):63-66.
doi:10.2152/jmi.58.63

15. Kiyokawa M, Matsuzaki T, Iwasa T, Ogata R, Murakami M, Kinouchi R, Yoshida S, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Neuropeptide Y mediates orexin A-mediated suppression of pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in ovariectomized rats. *J Med Invest*. 査

読有 2011 Feb;58(1-2):11-18.
doi:10.2152/jmi.58.11

16. Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Kinouchi R, Gereltsetseg G, Fujisawa S, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Sensitivities of mRNA expression levels of Kiss1 and its receptor, Kiss1r, to nutritional status are changed during the developmental period in female rats. *J Endocrinol*. 査読有 2010 Nov;207(2):195-202. Epub 2010 Aug 31.
doi:10.1677/JOE-10-0129

17. Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Fujisawa S, Kinouchi R, Gereltsetseg G, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Effects of intrauterine undernutrition on hypothalamic Kiss1 expression and the timing of puberty in female rats. *J Physiol*. 査読有 2010 Mar 1;588(Pt 5):821-829. Epub 2010 Jan 18.
doi:10.1113/jphysiol.2009.183558

18. Yasui T, Matsui S, Saijo A, Kaji T, Yamamoto S, Uemura H, Matsuzaki T, Irahara M. Association of N-terminal pro B-type natriuretic peptide and sex hormone-binding globulin in non-obese peri- and postmenopausal women. *Clin Chim Acta*. 査読有 2010 Feb;411(3-4):280-284. Epub 2009 Nov 27.
doi:10.1016/j.cca.2009.11.025

19. Iwasa T, Matsuzaki T, Kinouchi R, Fujisawa S, Murakami M, Kiyokawa M, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Neonatal LPS injection alters the body weight regulation systems of rats under non-stress and immune stress conditions. *Int J Dev Neurosci*. 査読有 2010 Feb;28(1):119-124. Epub 2009 Sep 4.
doi:10.1016/j.ijdevneu.2009.08.015

20. Ogata R, Matsuzaki T, Iwasa T, Kiyokawa M, Tanaka N, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Hypothalamic Ghrelin suppresses pulsatile secretion of luteinizing hormone via beta-endorphin in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*. 査読有 2009;90(4):364-370. Epub 2009 Nov 6.
doi:10.1159/000257421

21. Yasui T, Saijo A, Uemura H, Matsuzaki T, Tsuchiya N, Yuzurihara M, Kase Y, Irahara M. Effects of oral and transdermal

estrogen therapies on circulating cytokines and chemokines in postmenopausal women with hysterectomy. *Eur J Endocrinol*. 査読有 2009 Aug;161(2):267-273. Epub 2009 May 18. doi:10.1530/EJE-09-0063

22. Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Shimizu F, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Reproducibility of luteinizing hormone hypersecretion in different phases of the menstrual cycle in polycystic ovary syndrome.

J Obstet Gynaecol Res. 査読有 2009 Jun;35(3):514-519.

doi:10.1111/j.1447-0756.2008.00998.x

23. Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Kinouchi R, Ogata R, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Neonatal lipopolysaccharide exposure attenuates the homotypic stress-induced suppression of LH secretion in adulthood in male rat. *Int J Dev Neurosci*. 査読有 2009 Jun;27(4):345-349. Epub 2009 Mar 14.

doi:10.1016/j.ijdevneu.2009.03.004

[学会発表] (計 53 件)

1. 松崎利也、木内理世、岩佐 武、苛原 稔 テストステロンに対する特異性を改善した新測定系による PCOS における高テストステロン血症検出率の向上 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会 平成 23 年 8 月 29-31 日、大阪国際会議場 (大阪)

2. Matsuzaki T, Iwasa T, Kinouchi R, Gereltsetseg G, Irahara M. Sensitivities of messenger ribonucleic acid expression levels of Kiss1 and its receptor, Kiss1r, to nutritional status are changed during the developmental period in female rats. The Endocrine Society's 93rd Annual Meeting, June 4-7, 2011, Boston Convention & Exhibition Center (Boston, USA)

3. 松崎利也、岩佐 武、苛原 稔 出生前後の栄養状態およびストレスが成長後の性機能に及ぼす影響 シンポジウム「生殖機能の中枢性調節：最近の知見」 第 84 回日本内分泌学会学術総会 平成 23 年 4 月 21-23 日、神戸国際会議場 (神戸)

4. 岩佐 武、松崎利也、木内理世、苛原 稔 母胎内の低栄養環境は出生後の kisspeptin の作用を低下させ思春期の発来を遅延させる 第 15 回日本生殖内分泌学会 平成 22 年 11 月 20 日~21 日、千里ライフサイエンスセンター (豊中市)

5. 松崎利也 シンポジウム「見過ごしてならない肥満合併症(婦人科、整形外科、呼吸器

科、循環器科)」 女性の肥満と月経異常 第 3 回日本肥満症治療学会学術集会 平成 22 年 9 月 10-11 日 学術総合センター (東京都千代田区)

6. Matsuzaki T, Iwasa T, Fujisawa S, Kinouchi R, Irahara M. Neonatal LPS Injection Alters the Body Weight Regulation Systems of Rats under Non-Stress and Immune Stress Conditions. The Endocrine Society's 92nd Annual Meeting, June 19-22, 2010, San Diego Convention Center

7. Matsuzaki T, Iwasa T, Kinouchi R, Gereltsetseg G, Irahara M. Neonatal lipopolysaccharide exposure attenuates the suppressive responses of LH secretion to homotypic immune challenge in adulthood in male rat. Poster Presentations; Reproduction and development 05. The 14th international Congress of Endocrinology March 26-30, 2010, 京都国際会議場 (Kyoto, JAPAN)

8. Matsuzaki T, Kinouchi R, Gereltsetseg G, Fujisawa S, Iwasa T, Irahara M. Assessment of serum LH level and LH/FSH ratio using electrochemistry luminescence immunoassay method for the diagnosis of polycystic ovarysyndrome, The International Ovarian Conference 2009 December 5, 2009, 大手町サンケイプラザ (Tokyo).

9. 岩佐 武、松崎利也、藤澤しのぶ、木内理世、苛原 稔 雄ラットにおいて新生仔期の感染ストレスは成熟後の感染ストレスに対する性機能の反応を減弱させる 第 14 回日本生殖内分泌学会 平成 21 年 11 月 28 日、シェーンバッハ・サボー (東京都)

10. 松崎利也 多嚢胞性卵巣症候群の診断とホルモン測定上の注意点 第 54 回日本生殖医学会・学術講演会 平成 21 年 11 月 22-23 日、石川県立音楽堂、ANA クラウンプラザホテル金沢 (金沢市)

11. Matsuzaki T, Iwasa T, Kinouchi R, Irahara M. Early life lipopolysaccharide expose attenuates the suppressive responses of LH secretion to homotypic immune challenge in adulthood in male rat, The Endocrine Society's 91st Annual Meeting, June 10-13, 2009, Washigton Convention Center (Washigton, DC)

12. 岩佐 武、松崎利也、木内理世、村上雅博、苛原 稔 新生期のストレスが成熟後のストレスに対する性機能および摂食調節機構の反応に及ぼす影響 第 82 回日本内分泌学会学術総会 平成 21 年 4 月 23-25 日、群馬県民会館、前橋商工会議所 (前橋市)

[図書] (計 3 件)

1. 松崎利也、他、月経異常・排卵障害、医学

書院、今日の診断指針第6版、2010、
pp423-425

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 利也 (MATSUZAKI TOSHIYA)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
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・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：20160070