

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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590230

研究課題名（和文） 思春期発動の性機能神経制御と摂食、ストレス、神経制御の三次元機能形態相関の解析

研究課題名（英文） Study on the dynamic morphofunctional relationships between the neuronal regulation of reproduction, energy control, and stress response in the onset of puberty

研究代表者

小澤 一史 (OZAWA HITOSHI)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：60169290

研究成果の概要（和文）：生殖機能を制御する視床下部—下垂体—性腺軸（HPG 軸）の上位に位置し、生殖情報のみならずエネルギー代謝調節、ストレス応答の情報も集約して統合制御の役割を果たす、視床下部に存在する新規生理活性ペプチド Kisspeptin とその含有神経細胞の機能形態学的役割について、組織化学的、分子生物学的な解析を行い、思春期発動機における kisspeptin の重要性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have histochemically and molecular biologically studied on the morphofunctional role of kisspeptin and kisspeptin neurons in the hypothalamus which integrate the information about the reproduction, energy balance and stress response in the brain and rely to the HPG axis, and revealed an important role of kisspeptin neurons in the onset of puberty.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,500,000

研究分野：神経解剖学、神経内分泌学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：キスペプチン (kisspeptin)、HPG 軸、GnRH、視床下部、ストレス、エネルギー代謝、レプチン、グルココルチコイド受容体

1. 研究開始当初の背景

生殖機能調節は、下垂体前葉から分泌される性腺刺激ホルモン (gonadotropin) が重要な働きを果たしているが、この分泌調節には上位の間脳視床下部におけるゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 分泌ニューロンによって制御される。この仕組みが性腺に働きかける、いわゆる視床下部—下垂体—性腺軸 (HPG 軸) が形成される。性腺からの性ステ

ロイドホルモンは中枢にフィードバックし、環状制御機構が構築される。この環状制御機構に様々な内的および外的環境因子が影響を与え、HPG 軸はその影響を受けて性機能発現の表現系に変化を示す。例えば、大きな精神的ショックを受けると性機能に影響が現れたり、食欲に影響が出たりするし、低栄養状態に陥ると生殖機能障害が引き続き誘導される。また、摂食障害の一つである

anorexia nervosa においては、摂食障害に加えて、生殖機能障害、高次脳機能障害などが合併して生じやすい。これらは、生殖機能、摂食調節機能、ストレス応答機能といった本来それぞれにおいて独立した神経制御機構の間に何らかの相互作用関係が存在し、影響し合っていることを強く示唆するが、その詳細な仕組みについては明らかになっていない状況であった。この状況の中で、それらの統合と統御を行う可能性のある神経ペプチドである、キスペプチン(kisspeptin)が発見され、その役割に注目が集まっていた。

2. 研究の目的

本研究では、キスペプチンニューロンの情報統合ニューロンとしての機能を中心に、生殖機能調節に関わる神経系、摂食調節に関わる神経系、そしてストレス応答に関わる神経系の相互連関の仕組みを解明し、「思春期」前後に生じる神経回路網の柔軟な構築の実態、これらの相互作用が高次脳機能に与える影響について、分子細胞形態科学の立場から組織細胞化学的手法、多重標識免疫染色法、共焦点レーザー顕微鏡法、電子顕微鏡法、超高压電子顕微鏡法などの形態科学研究技法に加え、PR-PCR 方や Chip assay などの分子生物学的手法、行動解析、また我々が開発を進めている生きて動物で無麻酔下化に神経細胞機能を測定する光ファイバーを介した蛍光測光による脳内深部遺伝子発現のリアルタイムモニタリングなどを組み合わせて多角的かつ詳細な検索を進めることを計画した。

近年、青少年の健やかな身体と精神の発達が問題となることが多々ある。これらは脳内の様々な高次脳機能が成熟し全体の構築が完成されていく「思春期」がどのように発動され、その過程が脳の神経機能発達にどのように影響を与えるのか、精神神経医学、小児思春期医学、婦人科生殖医学などの臨床医学とも密接に関わる。思春期前後の正常な「性」、「摂食」、「心」の安定を導く神経回路構築とその構築に影響を与える因子の作用機序を解き明かすことは基礎的、神経科学的にも重要な課題であり、健やかな身体と精神の発達が脳のレベルで制御される仕組みを知る基礎となり、社会への還元性を持つ意義深い研究として展開することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規生理活性神経ペプチド「kisspeptin」の生殖機能調節に及ぼす影響の解析: Kisspeptin ニューロンの発現には明らかな性差が存在し、この性差の発現が、雄における生殖システム、雌における生殖システムの特異性を生み出す可能性があるが、現在のところ、この Kisspeptin 発現の性差と機能発

現の性差の直接的な違いが結びつく研究はあまり行われていない。この本質的な問題解決に向けて、性ホルモンによる制御、新生児期から老年期にかけての Kisspeptin と HPG 軸の連動性、相関性の解析、行動様式への影響を総括的に詳細に検索する。また、発症原因のはっきりしていない多膿疱性卵巣症候群 (PCOS) の発症に、Kisspeptin-HPG 軸の異常が関わる可能性を想定し、PCOS 誘導動物を用いて Kisspeptin-HPG 軸の変化を考察、臨床治療応用への礎を築く。

(2) ストレス応答神経系と生殖制御神経系の相互作用の解析: ごく最近の我々の研究成果より、Kisspeptin ニューロンには CRH 受容体およびグルココルチコイド受容体が発現していることがわかりつつある。このことは、キスペプチンニューロンを介してストレス応答系である HPA 軸と生殖機能制御系である HPG 軸が接点を有することを意味する。加えて、Kisspeptin ニューロンには脂肪より分泌される摂食制御ホルモンである leptin の受容体が発現していることがわかっている。これらのことから Kisspeptin ニューロンが生殖制御系と、摂食、ストレス制御系との交差点になり、これらの統括、制御、伝達の役割をなす可能性が強く示唆される。この点について、ストレス負荷実験による Kisspeptin-HPG 軸の挙動、妊娠中ストレスによる子の生殖中枢の発達障害の検索、ストレス負荷による HPG 軸の変動とその影響による (海馬、扁桃体を中心とした) 情動系神経細胞の機能形態学的変化、行動変化の解析を行い、高次脳機能への影響を評価する。

(3) 光ファイバーを応用した蛍光測光による脳内遺伝子発現のリアルタイムモニタリング: GFP-transgenic rats を用いて、in vivo, real time での遺伝子発現の定量測定システムを完成させる。光ファイバーを用いて脳内の GFP 発現ターゲットニューロンの情報を、非拘束下・無麻酔のラットから行動・生理状態と関連した領域特異的の遺伝子発現を解析するシステムを構築し、Kisspeptin ニューロン、GnRH ニューロン、CRH ニューロンなどの関連ニューロンの挙動を解析するシステムを完成させる。

4. 研究成果

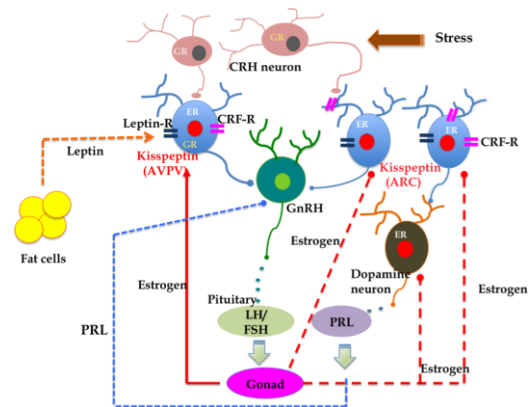
これまでに、我々の研究グループは、新規生理活性物質である kisspeptin に対する特異抗体を開発することに成功し、脳の視床下部における kisspeptin ニューロンの免疫組織化学による発現、また in situ hybridization による mRNA の発現を恒常的に観察、解析出来る体制が出来た。さらに、様々なホルモン処理や病態による kisspeptin ニューロンの反応性や HPG 軸に対する制御機能を明らかにしてきた。Kisspeptin ニューロンは、ラット

やマウスといった齧歯類動物では、視床下部の前腹側室周囲核(AVPV)と弓状核(Arc)の2カ所に分離して存在することが知られている。これらの部位における kisspeptin ニューロンの生後発生の違いを明らかにし、また、末梢の性ホルモン、特に女性ホルモンであるエストロゲンに対する反応性の相違について、免疫組織化学や in situ hybridization 法を用いて明らかにした。生直後の性ホルモンによる刺激の変化によって、雌雄の kisspeptin ニューロンの発現パターンが逆転することも明らかになり、生後のホルモン処理によって生じる生殖機能の変化に、kisspeptin ニューロンが重要な役割を果たしていることを明らかにした。

基本的に、kisspeptin ニューロンは、同じ視床下部に存在する GnRH ニューロンに投射し、GnRH ニューロンの機能制御に関わっている。GnRH ニューロンには HPG 軸のフィードバックとして関わる性ステロイドホルモンの受容体が発現していないので、このフィードバック機構の直接の標的が明らかになっていなかったが、kisspeptin ニューロンに性ステロイドホルモンの受容体が存在することが明らかとなり、我々もその発現を明らかにした。従って、kisspeptin ニューロンはこれまでに不明であった HPG 軸の負のフィードバックの直接的な標的となり、それを受けて、HPG 軸に制御をかける仕組みが構築されていることが明らかとなった。加えて、kisspeptin ニューロンが背側弓状核に存在するドーパミンニューロン (TIDA) ニューロンに投射し、シナプスを形成して、TIDA ニューロンを制御する可能性を明らかにした。TIDA ニューロンは視床下部正中隆起に投射し下垂体前葉からのプロラクチン(PRL)分泌を抑制することが知られている。この仕組みの上流に kisspeptin ニューロンが関わることが初めて明らかとなった。下垂体に PRL 腺腫が発生し、血清 PRL 値の高い女性において、GnRH 分泌が抑制され、無月経や不妊が生じることが知られているが、この臨床的機構に上流で kisspeptin が関わっている可能性が高くなり、創薬を含めた臨床的課題へと繋がる結果が得られており、さらに詳細な解析を続けている。

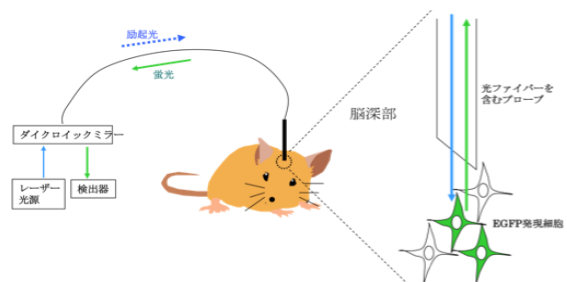
何らかのストレスが加わると食欲不振や生殖機能障害が発生することは、よく知られているが、その神経解剖学的、神経科学的メカニズムについてはまだ不明な点が多い。我々は、HPG 軸の上流に位置する kisspeptin ニューロンにストレス応答の重要な反応因子である副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) を含有する神経線維が kisspeptin ニューロンの近傍に投射していることも明らかにし、さらに kisspeptin ニューロンには CRH 受容体やグルココルチコイド受容体

(GR) が発現していることを明らかにした。このことは、様々なストレス刺激が HPG 軸に影響する過程として、HPG 軸の常習に存在する kisspeptin ニューロンによって受容され、その情報が統合された情報として HPG 軸に伝達される可能性が高いことを明らかにした。これらの Kisspeptin ニューロンを統合中枢とした HPG 軸への脳内三次元的神経回路構築から、下に示すような生殖系とエネルギー代謝調節系、ストレス応答制御系のそれぞれの神経ネットワークが kisspeptin ニューロンを中枢として連絡し合う可能性を明らかにしつつある。現在、さらにこれらの分子基盤も含めた解析を精力的に展開している。



Kisspeptin ニューロンを中心とした生殖系調節、エネルギー代謝調節、ストレス応答制御の神経間ネットワーク

上記の神経システムを解析する上で、神経細胞の機能と形態を、形態学的手法で観察するためには、細胞を可視化するために、生の中断、すなわち切片化が必要になるが、これを dynamic な動的イメージングで観察する仕組みを開発してきた。すなわち無拘束無麻酔の動物の脳内神経細胞の機能と形態を光ファイバーを用いてライブイメージングする仕組みである。ターゲットとする神経細胞に GFP などの蛍光物質を遺伝子導入し、その発現様式を捉えようというものである。おおよその概略図を下に示す。



ほぼシステム開発が完了し、具体的な検証に取り掛かりつつある。

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 15 件)

Anzai M, Iijima N., Higo S, Takumi K, Matsuo I, Mori K, Ohe Y, Kadota K, Akimoto T, Sakamoto A, Ozawa H. : Direct and specific effect of sevoflurane anesthesia on rat *Per2* expression in the suprachiasmatic nucleus. *PLOS ONE* 8 : 1~9 (2013) (査読あり)

Takumi K, Iijima N., Higo S., Ozawa H. : Immunohistochemical analysis of the colocalization of corticotropin-releasing hormone receptor and glucocorticoid receptor in kisspeptin neurons in the hypothalamus of female rats. *Neurosci Lett.* 531:40-45 (2012) (査読あり)

Kadota K., Iijima N., Ohe-Hayashi Y., Takui K., Higo S., Sakamoto A., Ozawa H. : Time-dependent repression of *mPer2* expression in the suprachiasmatic nucleus by inhalation anesthesia with sevoflurane. *Neurosci Lett.* 528:153-158 (2012) (査読あり)

Takumi K., Iijima N., Iwata K., Higo S., Ozawa H. : The effects of gonadal steroid manipulation on the expression of *Kiss1* mRNA in rat arcuate nucleus during postnatal development. *J. Physiol Sci.* 62:453-460 (2012) (査読あり)

Ozawa H., Sawai N., Iwata K., Takumi K., Iijima N. : Regulation of tuberoinfundibular dopamine (TIDA) neurons by kisspeptin neurons. *J Nippon Med Sch.* 79 :168-9 (2012) Ozawa H., Sawai N., Iwata K., Takumi K., Iijima N. : Regulation of tuberoinfundibular dopamine (TIDA) neurons by kisspeptin neurons. *J Nippon Med Sch.* 79 :168-9 (2012) (査読あり)

Sawai N., Iijima N., Takumi K., Matsuzaki T., Ozawa H. : Immunofluorescent histochemical and ultrastructural studies on the innervation of kisspeptin/ neurokinin B neurons to tuberoinfundibular dopaminergic neurons in the arcuate nucleus. *Neurosci Res* 74 : 10-16 (2012) (査読あり)

Yang C-Y., Matsuzaki T., Iijima N., Kajimura N., Ozawa H. : Morpho-

functional Changes of the Astrocyte in Rat Hippocampus Under Different Corticosteroid Conditions. *Med Mol Morphol* 45:206-213 (2012)

Matsuzaki T., Inahata Y., Sawai N., Yang C-Y., Kobayashi M., Takata K., Ozawa H. : Immunohistochemical localization of water channels, AQP4 and AQP5 in the rat pituitary gland. *Acta Histochem Cytochem* 44 : 259~266 (2011) (査読あり)

Tobari Y., Iijima N., Tsunekawa K., Osugi T., Haraguchi S., Ubuka T., Ukena K., Okanoya K., Tsutsui K., Ozawa H. : Identification, Localisation and Functional Implication of 26RFa Orthologue Peptide in the Brain of Zebra Finch (*Taeniopygia guttata*). *J. Neuroendocrinology* 23:791-803(2011) (査読あり)

Iijima N., Takumi K., Sawai N., Ozawa H. : An immunohistochemical study on the expressional dynamics of kisspeptin neurons relevant to GnRH neurons using a newly developed anti-kisspeptin antibody. *J. Mol Neurosciences* 43:146-154(2011) (査読あり)

Takumi K., Iijima N., Ozawa H. : Developmental changes in the expression of kisspeptin mRNA in rat hypothalamus. *J. Mol Neurosciences* 43:138-145 (2011) (査読あり)

Ohe Y., Iijima N., Kadota K., Sakamoto A., Ozawa H. : The general anesthetic sevoflurane affects the expression of clock gene *mPer2* accompanying the change of NAD⁺ level in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Neuroscience Lett.* 490:231-236 (2011) (査読あり)

Tobari Y., Iijima N., Tsunekawa K., Osugi T., Okanoya K., Tsutsui K., Ozawa H. : Identification of gonadotropin-inhibitory hormone in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*) : Peptide isolation, cDNA cloning and brain distribution. *Peptides.* 31:816-826 (2010) (査読あり)

Akimoto T., Terada M., Shimizu A., Sawai N., Ozawa H. : The influence of dietary restriction on the development of diabetes and pancreatitis in female WBN/Kob-fatty rats. *Experimental Animals* 59:623-630 (2010) (査読あり)

Sawai N., Ueta Y., Nakazato M., Ozawa H.: Developmental and aging change of orexin-A and -B immunoreactive neurons in the male rat hypothalamus. *Neurosci Lett.* 468:51-55 (2010) (査読あり)

[学会発表] (計 65 件)

飯島典生、松本恵介、上田陽一、小澤一史： GFP 蛍光を用いた脳深部での遺伝子発現モニタリングシステムの開発：非拘束・無麻酔の AVP-eGFP TG ラットを用いた試み：第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2013.3 (高松)

Iijima N., Sawai N., Iwata K., Matsumoto K., Ozawa H.: Regulation of the Tuberoinfundibular Dopamine Neuron by Kisspeptin in the Rat Hypothalamus: 2nd World Conference of Kisspeptin Signaling in the Brain 2012.11 (Tokyo)

Takumi K., Iijima N., Ozawa H.: Corticotropin-Releasing Factor Receptor and Glucocorticoid Receptor Immunoreactivities in Kisspeptin Neurons in Female Rat Hypothalamus: 2nd World Conference of Kisspeptin Signaling in the Brain 2012.11 (Tokyo)

Iwata K., Ikehara M., Iwatate H., Suga M., Kobayashi A., Shirai S., Aikawa S., Matsumoto K., Iijima N., Ozawa H.: Kisspeptin Inputs to Hypothalamic Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons from Neonate to Puberty in Female Rats by Immunohistochemical Analysis: 2nd World Conference of Kisspeptin Signaling in the Brain 2012.11 (Tokyo)

Ozawa H., Takumi K., Higo S., Iwata K., Iijima N.: The Interaction of the Reproductive Regulation, Energy Metabolic Regulation, and Stress

Response through Kisspeptin Signaling System: 2nd World Conference of Kisspeptin Signaling in the Brain 2012.11 (Tokyo)

飯島典生、松本恵介、小澤一史：光ファイバーを用いた脳深部での遺伝子発現のリアルタイムモニタリング：AVP-eGFP ラットを用いた試み：第 39 回日本神経内分泌学会学術集会 2012.9 (北九州)

Iijima N., Takumi K., Matsumoto K., Ozawa H.: Kisspeptin regulates tuberoinfundibular dopamine neurons in the hypothalamus: 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry 2012.8 (Kyoto)

Takumi K., Iijima N., Higo S., Ozawa H.: Immunohistochemical study of corticotropin-releasing factor receptor and glucocorticoid receptor in kisspeptin neurons in rat hypothalamus: 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry 2012.8 (Kyoto)

飯島典生、澤井信彦、岩田衣世、松本恵介、小澤一史：視床下部 Tuberoinfundibular dopamine neurons による神経ペプチド kisspeptin 含有神経線維からの入力・応答：第 38 回日本神経内分泌学会学術集会 2011.11 (東京)

岩田衣世、小澤一史：ラット脳室周囲の上皮細胞に対するグルココルチコイド受容体の組織化学的解析：第 38 回日本神経内分泌学会学術集会 2011.11 (東京)

飯島典生、澤井信彦、岩田衣世、中根亮、松本恵介、小澤一史：神経ペプチド kisspeptin 含有神経線維の視床下部 Tuberoinfundibular dopamine neurons への入力：第 52 回日本組織細胞化学会総

会・学術集会 2011.9 (金沢)
託見健、飯島典生、小澤一史：新生仔期の性ステロイドがラット弓状核 kisspeptin の発現に及ぼす効果：第 52 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2011.9 (金沢)
小澤一史、岩田衣世、中根亮、託見健、飯島典生：エネルギー代謝神経調節系と kisspeptin-GuRH 神経系の相関について：第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会 2011.3 (横浜)
小澤一史：思春期はいかにして現れるのか～脳の性機能調節神経系による思春期発現の制御機構～：第 30 回日本思春期学会総会・学術集会 2011.8(福岡)
澤井信彦、飯島典生、小澤一史：雌ラット視床下部における TH 陽性細胞へのキスペプチン線維投射の分布と超微形態学的解析：第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会 2011.3 (横浜)
託見健、飯島典生、小澤一史：性ステロイドがラット新生仔の弓状核における kisspeptin 発現に及ぼす効果：第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会 2011.3 (横浜)
楊 春英、託見健、小澤一史：性成熟過程におけるラット視床下部の弓状核及び正中隆起のグリア細胞の可塑性について：第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会 2011.3 (横浜)
託見健、飯島典生、小澤一史：ラット Kisspeptin ニューロンの生後発達と性ステロイドによる発現制御：第 37 回日本神経内分泌学会学術集会 2010.10 (京都)
澤井信彦、飯島典生、松本恵介、小澤一史：

雌ラット視床下部弓状核ドーパミン産生ニューロンへの kisspeptin 神経線維入力：第 37 回日本神経内分泌学会学術集会 2010.10 (京都)

飯島典生、澤井信彦、岩田衣世、松本恵介、小澤一史：弓状核ドーパミンニュートロンを介した神経ペプチド kisspeptin の新たな生理作用：第 33 回日本神経科学大会 2010.9 (神戸)

他 45 発表

〔図書〕(計 5 件)

小澤一史：カラーアトラス機能組織学 第 2 版(医歯薬出版)(河田光博、小路毅彦監修(分担：特殊感覚器の項) 2013

小澤一史：カラーイラストで学ぶ集中解剖学 (Medical View) (分担：神経系の項) 2012

小澤一史：インテグレートッドシリーズ「解剖学・発生学」(東京化学同人)(分担：頭部と頸部の項) 2011

小澤一史：トートラ 人体の構造と機能 第 3 版(丸善出版)(桑木共之、黒澤美枝子、高橋研一、細谷保彦 監訳)(分担：生殖器系の項) 2010

小澤一史：トートラ 解剖学 第 11 版(丸善出版)(小澤一史、千田隆夫、高田邦昭、依藤宏 監訳)(分担：内分泌系、生殖器系、自律神経系の項) 2010

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nms.ac.jp/nms/kaibou2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤一史 (OZAWA HITOSHI)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60169290

(2) 研究分担者

飯島典生 (IIJIMA NORIO)

日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00285248

澤井信彦 (SAWAI NOBUHIKO)

日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：70307916
(H22, 23)

楊 春英 (YO SHUNEI)

日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：70303435