

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460323

研究課題名(和文)新規生殖制御系への環境情報入力と三次元的相互作用、生活環に関する機能形態学的研究

研究課題名(英文) Morphofunctional study on inputs of the environmental information, three dimensional interaction and life cycle, of a new system for reproductive regulation.

研究代表者

小澤 一史 (Hitoshi, Ozawa)

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

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-性腺系(HPG軸)の上位中枢として様々な環境情報を集約する働きを示す新規生理活性ペプチドであるKisspeptinニューロンについて、1) 弓状核に存在するKYNDyニューロンにおけるkisspeptin, NKB, dynorphinの3種類の神経ペプチドの細胞内局在を超微細形態学的に明らかにし、2) 老化に伴うkisspeptinニューロンの発現変化と生殖機能変化の相関を明らかにし、3) kisspeptin受容体の脳内発現を詳細に観察し、また4) PCOSや甲状腺機能低下状態と連動する生理動態におけるkisspeptin発現の変化を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated about the kisspeptin neurons, which is known as the center of reproductive regulation and integrate the several information in the brain to relay to the HPG axis. Actually, we clearly investigated 1) the subcellular localization of kisspepin, NKB, and dynorphin in the KNDy neuronos, which are coexpressed kisspepin, NKB, and dynorphin in the arcute nucleus by immunoelectron microscopy; 2) the interrelationship between the change of kisspetpin neurons and athe change of reproductive function with aging, 3) the mapping of kisspeptin receptor expression in the rat brain, and 4) the change of expression of kisspepin of certain kind of model animals suc as PCOS an/or hypothyroidism.

研究分野：神経解剖学、神経内分泌学

キーワード：Kisspeptin NKB dynorphin kisspeptin receptor immunohistochemistry menopause suckling stimuli PCOS

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに、思春期 (puberty) が誘発される神経機能メカニズムの解明をテーマとして研究を重ねてきた。思春期は子供から大人へのゲートであり、これを通り抜けることは身体的にも精神的にも成熟し、大人としての社会活動、行動に適応する身体と精神の仕組みが構築されると考えられる。神経内分泌学的に、思春期の誘発には視床下部—下垂体—性腺軸 (HPG 軸) の活性化が必修な現象である。これまで、この HPG 軸の思春期における活性化を誘導するトリガーが不明で、思春期誘発機構の全景が不透明であったが、近年、オーファン受容体 GPR54 のリガンドとして Kisspeptin が同定され、Kisspeptin による HPG 軸の中核ニューロンである GnRH ニューロンの活性誘導に関する分子機構、細胞間連絡機構などが明らかとなりつつあり、我々もこれらの解明に関し科学的貢献をしてきた。また、我々はこの Kisspeptin ニューロンと dopamine ニューロンを介した下垂体ホルモン分泌制御機構、エネルギー代謝調節機構と Kisspeptin ニューロン活性化の相関、kisspeptin ニューロンにおけるストレス応答神経メカニズムの受容と伝達機構を明らかにし、従来の HPG 軸の上位に Kisspeptin ニューロンが位置し、様々な内的、外的環境因子 (情報) を中継、統合して、それを HPG 軸に伝達し、生殖機能を制御することを見出しつつあり、新しい生殖制御系としての Kisspeptin-HPG 軸の構築を解析している。この統合中枢を介して、(1) HPG 軸の制御、活性化が誘導されること、(2) さらに高次の脳、精神活動にも影響を与え、複雑で精巧な三次元的神経機能システムを構築すること、(3) 生殖機能の制御機構とエネルギー代謝調節、ストレス応答制御、概日周期とホルモン分泌の連関が連動し、生体機能の総括的な制御が行われている機構が見出されつつある。

これらの基盤をもとに、Kisspeptin を中枢とする新しい概念における生殖制御機構の再確認、再調査が盛んに行われるようになり、さらに詳細な機能形態学的な研究が展開され始めている背景が本研究の置かれた状況である。

2. 研究の目的

神経内分泌学的に、思春期の誘発には視床下部—下垂体—性腺軸 (HPG 軸) の活性化が必修な現象である。これまで、この HPG 軸の思春期における活性化を誘導するトリガーが不明で、思春期誘発機構の全景が不透明であったが、近年、オーファン受容体 GPR54 のリガンドとして Kisspeptin が同定され、Kisspeptin による HPG 軸の中核ニューロンである GnRH ニューロンの活性誘導に関する分子機構、細胞間連絡機構などが明らかとなりつつあり、我々もこれらの解明に関し科学的貢献をしてきた。また、我々はこの Kisspeptin ニューロンと dopamine ニューロンを介した下垂体ホルモン分泌制御機構、エネルギー代謝調節機構と Kisspeptin ニューロン活性化の相関、kisspeptin ニューロンにおけるストレス応答神経メカニズムの受容と伝達機構を明らかにし、従来の HPG 軸の上位に Kisspeptin ニューロンが位置し、様々な内的、外的環境因子 (情報) を中継、統合して、それを HPG 軸に伝達し、生殖機能を制御することを見出しつつあり、新しい生殖制御系としての Kisspeptin-HPG 軸の構築を解析している。この統合中枢を介して、(1) HPG 軸の制御、活性化が誘導されること、(2) さらに高次の脳、精神活動にも影響を与え、複雑で精巧な三次元的神経機能システムを構築すること、(3) 生殖機能の制御機構とエネルギー代謝調節、ストレス応答制御、概日周期とホルモン分泌の連関が連動し、生体機能の総括的な制御が行われている機構が見出されつつある。

上記の現状を背景に、本研究では、Kisspeptin ニューロンの中継、統合・統御中枢としての機能形態学的な意義とその制御機能について、分子生物学的手法、種々のバイオイメージング法を組み合わせ解析し、恒常性の維持に重要な調節機構と生殖制御機構の神経学的、神経内分泌学的相関を1つのユニットとして明らかにすることを目的とする。また、生殖機能の出発点である puberty onset と対極にある menopause (閉経期) におけるこれらの脳内分子・神経制御機構の相関の変動を詳細に解析し、生涯を通じた生活環における変化の全容を明らかにし、生殖医科学への貢献を成し遂げることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 光ファイバーを介した脳内微量光測定システムを用いて非拘束・無麻酔下におけるラット Kisspeptin ニューロン、GnRH ニューロン活性の連続測定：26G の微小針に組み込んだ光ファイバーをラットやマウスの脳内に挿入・留置し、これらの動物の特異的な神経細胞に遺伝子導入した GFP や luciferase などの発光タンパクについて、光ファイバーを介した励起として蛍光検出が可能なシステムの開発に成功しつつある。このシステムを eGFP-GnRH transgenic rat (Kato et al. *Endocrinology* 2003) に応用し、非拘束・無麻酔下のラットにおける、性周期に沿った視索前野の GnRH 発現の連続解析、Kisspeptin の脳室内投与による GnRH 発現の経時的持続観察、嗅覚刺激（発情雌ラットとの同居など）に伴う GnRH 活性の変化を連続計測する。

(2) 弓状核 kisspeptin ニューロンにおける Neurokinin B、dynorphin の共局在に関する微細構造学的解析と、Kisspeptin 分泌への関与に関する解析を行う。弓状核の Kisspeptin ニューロンには Neurokinin B (NKB)、dynorphin の共存が明らかとなっており、これを反映して KNDY ニューロンと称されるようになっている。多重標識免疫電子顕微鏡法を用いて、3つの神経ペプチドの微細構造的細胞内局在様式を明らかにすると共に、これらの神経ペプチドの分泌様式について微細機能形態学的に解明する。

(3) Kisspeptin-HPG 軸におけるストレスへの反応機序の解析：Kisspeptin-HPG 軸へのストレス情報の入力、Kisspeptin ニューロンに投射する CRH ニューロンがその受容体を介して直接的にストレス反応を伝達する可能性が高く、またグルココルチコイド受容体(GR)の発現も認められ、末梢からのフィードバックも受けて統括的にストレスに対する統御がなされることが強く示唆された。そこで、実際に動物に拘束ストレス等のストレスを与えた場合の分子メカニズムの反応性、母胎にストレスを与えた場合（胎生期ストレス）に出生児の Kisspeptin-HPG 軸の制御機構に与える影響について Kisspeptin 発現動態、性差機構への影響、性ステロイドへの反応性、性周期や繁殖能への

影響を中心に機能形態を解析する。

(4) 老化動物を用いた Kisspeptin を統合中枢とする HPG 軸と生体環境情報との連関に関する機能形態学的変動の生活環の解析を行う。具体的には KNDY ニューロンの3種の神経ペプチドの発現と相互作用、ストレス応答系における Kisspeptin-HPG 軸の機能形態学的変動、エネルギー代謝調節系の変化および概日リズム調節系との連関について、老化ラットを用いて幼若期、思春期、成熟期のデータに加え、経時的に aging による変化を精査し、特に閉経期（更年期）における Kisspeptin-HPG 軸の役割と変動を詳細に解析し、いわゆる更年期障害に対する治療や創薬の基礎になる神経内分泌学的背景を明らかにする。

4. 研究成果

当研究室では2007年頃より Kisspeptin ニューロンの研究に着手し、Kisspeptin に対する polyclonal 抗体の作成を始めた。抗体の交差性などの問題から難儀な時間も経過したが、最終的にこの polyclonal 抗体が特異性を持った抗体として確立することが出来、2011年にこの抗体を用いて脳内の Kisspeptin ニューロン分布について免疫組織化学的に報告することが出来た（*Journal of Molecular Neuroscience* 43:146-154）。さらに、様々な性ホルモンの処理を行うことにより、Kisspeptin ニューロンの発現が変化することも判り、またこのニューロンが明かな性的二型核の特徴を有することも明らかにした（*Journal of Molecular Neuroscience* 43:138-145 (2011)）。その後、Kisspeptin ニューロンは主たる標的神経細胞である GnRH ニューロンに加えて、視床下部背側の Dopamine ニューロン(TODA ニューロン)にも投射しており、シナプスを介してこの TIDA ニューロンに入力していることを明らかにし、Dopamine ニューロンを介して下垂体からの PRL 分泌に関与する可能性を見出した（*Neurosci Res* 74:10-16 (2012)、*Neuroscience Research* 84:10-18 (2014)）。この研究は、最近、授乳期の吸引刺激が GnRH、LH 分泌を止める機構解明に繋がり、吸引刺激が脊髄、中脳を経由して弓状核の Kisspeptin ニューロンに投射し、Kisspeptin ニューロンの mRNA 発現に直接

関与していることを解明し、この Kisspeptin の発現変動が、下位に存在する GnRH ニューロン、LH 細胞の機能調節に関与する仕組みを見出した (Journal of Endocrinology 227:105-15 (2015))。

一方、Kisspeptin ニューロンに CRH ニューロンの軸索が投射し、また、Kisspeptin ニューロンには CRH 受容体、グルココルチコイド受容体が発現していることも見出し、Kisspeptin ニューロンがストレス応答の神経回路と直接連絡していることを報告し、ストレス応答と生殖機能制御のクロストーク、情報伝達・統御と関連する可能性を報告した (Neuroscience Letters. 531:40-45 (2012))。

Kisspeptin ニューロンには leptin 受容体が発現していることが報告されており、このことからエネルギー代謝調節系との情報連絡があることが示唆されている。そこで、妊娠時に母親ラットの摂取栄養を変化させた場合に出生したラットのその後の成熟過程と生殖機能制御系の発達変化を観察し、母親に高カロリー食を与えて出生したラットでは、Kisspeptin ニューロンの成熟が早まり、その結果、思春期が前倒しに早く発現するように誘導されることが見出された (Neuroscience Research 100:21-28 (2015))。Kisspeptin ニューロンは前腹側室周囲核 (AVPV) と弓状核 (ARC) の2ヶ所に分散して存在し、AVPV の Kisspeptin ニューロンは GnRH、下垂体からの LH のサージ分泌を制御し、ARC の Kisspeptin ニューロンは GnRH のパルス状分泌を制御する役割が想定されつつある。ARC の Kisspeptin ニューロンは Kisspeptin ニューロンには Kisspeptin に加えて、NKB、dynorphin も発現しているが、これらの神経ペプチドは別々の神経小胞にソーティングされて制御されていることを免疫電子顕微鏡法によって明らかにした (Neuroscience Letters 612:161-166 (2016))。

これらの研究を通し、Kisspeptin ニューロンはこれまでの教科書的な視床下部の GnRH ニューロン、下垂体の LH/FSH、性腺の性ホルモンの繋がりの上に位置し、ストレス応答やエネルギー代謝調節機構などの内外の情報を統合し、旧来の生殖神経制御機構にその情報を連絡する上位ニューロンである可能性が明らかとな

ってきた。Kisspeptin ニューロンの発現、成熟は思春期発現の大きなポイントとなり、また体脂肪率と生殖機能変化の生理学的な機能関連を神経内分泌学的に明らかにしてきた。思春期の対極にある閉経期、更年期の起こる過程にも Kisspeptin ニューロンは関与すると考え、老化動物における Kisspeptin ニューロンの経時的変化を観察し、弓状核の Kisspeptin、NKB、dynorphin の発現バランスの変化、変調が、閉経期、更年期の生じるきっかけになる可能性を最近発表した (Neurology of Aging. 50:30-38 (2017))。

最近では Kisspeptin そのものの動態に加え、Kisspeptin 受容体の脳内発現変化について詳細な検討を進めており、Kisspeptin ニューロンの生殖機能への関わり以外の機能探索も展開している (Journal of Neuroendocrinology 28 (e-journal) (2016)、Journal of Neuroendocrinology. 29 (e-journal) (2017))。

このように、Kisspeptin ニューロンを上位中枢とする新しい生殖機能制御機構の機能形態学的研究を多角的に展開し、多くの土台となる基礎科学的研究データを発表し、その基盤と確立してきた。

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 20 件)

1. Iwata K, Kunimura Y, Matsumoto K, **Ozawa H.** : Effect of androgen on Kiss1 expression and luteinizing hormone release in female rats. *Journal of Endocrinology* In press
2. Iijima N, Miyamoto S, Matsumoto K, Takumi K, Ueta Y, **Ozawa H.** Development of an image system for in vivo real-time monitoring of neuronal activity in deep brain of free-moving rats. *Histochemistry and Cell Biology* In press
3. Ishii H., Hattori Y., Munetomo A., Watanabe H. Sakuma Y., **Ozawa H.** Characterization of rodent constitutively active estrogen receptor α variants and their constitutive transactivation

- mechanisms. *Gen Comp Endocrinol.* 248 : 16-26 (2017)
4. Tomori Y, Takumi K, Iijima N, Takai S, Ozawa H. Kisspeptin expression is decreased in the arcuate nucleus of hypothyroid female rats with irregular estrus cycles. *Neuroscience Research.* 117 : 35-41 (2017)
 5. Kumimura Y., Iwata K., Ishigami A., Ozawa H. Age-related alterations in hypothalamic kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin neurons and in pulsatile LH release in female and male rats. *Neurology of Aging.* 50 : 30-38 (2017)
 6. Higo S., Iijima N., Ozawa H. : Characterization of Kiss1r (Gpr54)-expressing neurons in the arcuate nucleus of the female rat hypothalamus. *Journal of Neuro- endocrinology.* 29 (e-journal) (2017)
 7. Iwata K., Ikehara M., Kunimura Y., Ozawa H. : Interactions between kisspeptin neurons and hypothalamic tuberoinfundibular dopaminergic neurons in aged female rats. *Act Histochem Cytochem.* 49 : 191-196 (2016)
 8. Higo S., Honda S., Iijima N., Ozawa H. : Mapping of kisspeptin receptor mRNA in the whole rat brain and its co-localisation with oxytocin in the paraventricular nucleus. *Journal of Neuro- endocrinology* 28 (e-journal) (2016)
 9. Li S., Takumi K., Iijima N., Ozawa H. : The increase in the number of spines on the gonadotropin-releasing hormone neuron across pubertal development in rats. *Cell Tissue Research* 364 : 405-414 (2016)
 10. Murakawa H., Iwata K., Takeshita T., Ozawa H. : Kisspeptin, neurokinin B and dynorphin A in KNDY neurons in the arcuate nucleus of the female rat. *Neuroscience Letters* 612 : 161-166 (2016)
 11. Higo, S., Aikawa, S., Iijima, N., Ozawa, H. Rapid modulation of hypothalamic Kiss1 levels by the suckling stimulus in the lactating rat. *Journal of Endocrinology* 227 : 105-115. (2015)
 12. Nagamoto, S., Iijima, N., Ishii, H., Takumi, K., Higo, S., Aikawa, S., Anzai, M., Matsuo, I., Nakagawa, S., Takashima, N., Shigeyoshi, Y., Sakamoto, A., Ozawa, H. Establishment of an in vitro cell line experimental system for the study of inhalational anesthetic mechanisms. *Neuroscience Letters* 620 : 163-168. (2016)
 13. Murakawa, H., Iwata, K., Takeshita, T., Ozawa, H. Immunoelectron microscopic observation of the subcellular localization of kisspeptin, neurokinin B and dynorphin A in KNDy neurons in the arcuate nucleus of the female rat *Neuroscience Letters* 612 : 161-166 (2016)
 14. Matsuo, I., Iijima, N., Takumi, K., Higo, S., Aikawa, S., Anzai, M., Ishii, H., Sakamoto, A., Ozawa, H. Characterization of sevoflurane effects on Per2 expression using ex vivo bioluminescence imaging of the suprachiasmatic nucleus in transgenic rats", *Neuroscience Research* 107 : 30-37. (2016)
 15. Takumi, K., Shimada, K., Iijima, N., Ozawa, H. Maternal high-fat diet during lactation increases Kiss1 mRNA expression in the arcuate nucleus at weaning and advances puberty onset in female rats. *Neuroscience Research* 100 : 21-28. (2015)
 16. Kunimura, Y., Iwata, K., Iijima, N., Kobayashi, M., Ozawa, H. Effect of sex steroid hormones on the number of serotonergic neurons in rat dorsal raphe nucleus", *Neuroscience Letters* 594 : 127-132. (2015)
 17. Higo, S., Aikawa, S., Iijima, N., Ozawa, H. Rapid modulation of hypothalamic Kiss1 levels by the suckling stimulus in the lactating rat. *Journal of*

- Endocrinology* 227 : 105-115. (2015)
18. Hattori, Y., Ishii, H., Morita, A., Sakuma, Y., Ozawa, H. Characterization of the fundamental properties of the N-terminal truncation (Delta exon 1) variant of estrogen receptor alpha in the rat. *Gene* 571 : 117-125. (2015)
19. Iwata K., Ozawa H Expression of glucocorticoid receptor and coactivators in ependymal Cells of male rats. *Acta Histochem. Cytochem* 47 : 165-174.(2014)
20. Sawai N., Iijima N., OzawaH., Matsuzaki T Neurokinin B—and kisspeptin—positive fibers as well as tuberoinfundibular dopaminergic neurons directly innervate periventricular hypophyseal dopaminergic neurons in rats and mice.: *Neuroscience Reseach* 84 : 10-18(2014)

[学会発表] (計 54 件)

1. 小澤一史 : 生殖神経制御系を基盤とした生殖行動と辺縁系の連関 : 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017.3 (長崎)
2. 飯島典生、託見健、石井寛高、岩田衣世、楊春英、肥後心平、小澤一史 : 日本医科大学における実習手順 ——全体のデザイン、モチベーション、評価—— : 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017.3 (長崎)
3. 國村有弓、岩田衣世、石神昭人、小澤一史 : 雌雄ラットのパルス状 LH 分泌と弓状核キスペプチン、ニューロキニン B、ダイノルフィンニューロン発現の加齢変化に関する研究 : 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017.3 (長崎)
4. 金谷萌子、岩田衣世、小澤一史 : エストロゲンの濃度変化における雌ラット弓状核 dynorphin の発現変動 : 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017.3 (長崎)
5. 肥後心平、飯島典生、小澤一史 : ラット弓状核における *Gpr54* 発現ニューロンの神経化学的特性の同定 : 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017.3 (長崎)

[図書] (計 4 件)

1. Big Picture 解剖学 (丸善出版) (2015) (監訳 分担執筆 頭部、頸部)
2. 臨床のための解剖学 (メディカルサイエンスインターナショナル) (2016) (分担執筆 頭部、頸部)
3. 集中講義 解剖学 (Medical View) (2016) (分担執筆 神経系)
4. ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ 求愛・性行動と脳の性分化 (裳華房) (2016) 序論、ヒトにおける求愛・性行動と脳の性

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www2.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 (IJIMA NORIO)

日本医科大学 医学部 准教授

研究者番号 : 00285248

石井寛高 (ISHII HIROTAKA)

日本医科大学 医学部 講師

研究者番号 : 20445810

託見 健 (TAKUMI KEN)

日本医科大学 医学部 講師

研究者番号 : 40553269

岩田衣世 (IWATA KINUYO)

日本医科大学 医学部 講師

研究者番号 : 00582991

肥後心平 (HIGO SHINPEI)

日本医科大学 医学部 助教

研究者番号 : 50623922