

令和元年6月6日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20218

研究課題名(和文) 視床下部性生殖機能抑制：Toll様受容体4を介したGnRH神経活動抑制機序の解明

研究課題名(英文) Hypothalamic hypogonadism: Elucidation of the mechanisms controlling GnRH neural activity via Toll-like receptor 4

研究代表者

藤岡 仁美 (Fujioka, Hitomi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：50410064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ストレスによりLH分泌が抑制されることが知られる。私達は先行研究で、LPS感染ストレスによるLHサージ状分泌抑制は終板器官MのIL-1発現を介する可能性を示唆した。本研究では、IL-1を介したGnRHニューロン興奮抑制機構について検討し、IL-1受容体の発現は血管の一部に見られ、GnRHニューロンでは見られないこと、および、感染ストレスにより前腹側室周囲核kiss-1ニューロン活動が低下し、M活性化阻害薬で回復することを発見した。これらの結果より、IL-1は血管内皮細胞・kiss-1ニューロンを介して間接的にGnRHニューロン興奮を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能的な視床下部性腺機能低下はストレスと関連があることが知られている。本研究は、感染ストレスをモデルとして、脳内の免疫担当細胞を介したLHサージ状分泌抑制メカニズムの解明を目指し、その一端を明らかにした。近年、ストレスにより、脳内の免疫担当細胞の活性化が示されていることから、今回の研究の結果は、感染ストレスモデルを超えて、ストレスによる機能的な視床下部性腺機能低下にも、共通するメカニズムである可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory/immune challenge is known to suppress LH secretion. We previously discovered that the pretreatment with minocycline (Mino), a potent inhibitor of microglia activation, significantly alleviate the suppression of ovarian steroid-induced LH surge by lipopolysaccharide (LPS) in ovariectomized rats. We also found that Mino suppressed LPS induced interleukin 1 (IL-1) expression in macrophage in the OVLT. In the present study, we examined distribution of IL-1 receptor in the preoptic area/OVLT, and found IL-1 receptor mRNA located in some vascular structure but not GnRH neurons. Next, we examined whether kiss1 neurons were involved in suppression of LH surge by LPS. We found LPS treatment decreased c-Fos expression in both the kiss1 and GnRH neurons at the peak time of LH surge, that was ameliorated by Mino pretreatment. These results suggest IL-1 induced by LPS suppress GnRH neural activity indirectly through depression of activity in the kiss-1 neurons.

研究分野：神経内分泌

キーワード：GnRH macrophage LPS LH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

機能的視床下部性無月経は、代謝的・物理的・心理的なストレスと関連があると考えられている。ストレスによる黄体形成ホルモン(LH)分泌抑制の少なくとも一部は、視床下部に存在する性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)ニューロンの神経活動が抑制されることによると考えられている。

一方、ストレス負荷は脳の免疫担当細胞である脳組織マクロファージ(MΦ)系細胞の活性化と、炎症性サイトカインの脳内での発現上昇が報告されている。動物実験では、Interleukin-1β (IL-1β)などの炎症性サイトカインの脳室内投与により LH 分泌が抑制されることから、ストレスによる脳内炎症反応が LH 分泌抑制に関与している可能性がある。

近年、ストレスによる脳内炎症反応への Toll-like 受容体 4 (TLR4)シグナルの関与が報告された。従来 TLR4 は、グラム陰性細菌の外膜成分であるリポ多糖 (lipopolysaccharide (LPS))を認識する受容体で、外来微生物に対する生体防御に関わるとともに、酸化リン脂質や飽和脂肪酸など内因性リガンドにも応答することから、自己免疫疾患や動脈硬化・肥満など非感染性炎症反応への関与も示唆されている。

我々は、GnRH ニューロンの周りに脳組織 MΦ 系細胞が存在し、MΦ 活性化阻害剤の前投与により LPS による LH サージ状分泌抑制が回復すること、LPS 投与により終板脈絡器官 MΦ 系細胞の一部で IL-1β の発現が上昇すること、MΦ 活性化阻害剤の前投与によりこれが減弱することを見出し、終板脈絡器官の MΦ 系細胞が TLR4 を介して直接 LPS に応答し、IL-1β の分泌を介して GnRH ニューロン活動を抑制している可能性がある。

2. 研究の目的

上記の背景より、本研究では、ストレス刺激により TLR4 を介して直接活性化した終板脈絡器官 MΦ 系細胞が、IL-1β を介して GnRH ニューロン興奮を抑制し、結果 LH サージ状分泌が抑制されるのかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 終板脈絡器官の LPS 誘導性 IL-1β 発現細胞と血管の組織学的関係の検討

卵巣摘出エストロゲン/プロゲステロンを処置した Wistar-Imamichi 系雌性ラットに、静脈内留置カニューレより LPS を投与した。2 時間後に 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定を行い、脳を摘出し、終板脈絡器官を含む領域の切片を作成した。抗 IL-1β 抗体と抗 rat endothelial cell antigen (RECA)-1 抗体を用いて二重免疫蛍光染色を行った。共焦点顕微鏡を用いて、z-stack 画像を取り込み、3 次元構築し、この領域における IL-1β 発現細胞と血管との組織学的関係を検討した。

(2) GnRH ニューロンにおける IL-1 受容体および関連シグナルタンパク質の発現の検討

Wistar-Imamichi 系メスラットを灌流固定を行い、脳サンプルを作成、終板脈絡器官を含む領域の切片を作成し、抗 IL1 receptor 1(IL1R1)抗体または抗 IL1 receptor accessory protein (IL1Rap) 抗体と抗 GnRH 抗体を用いて二重免疫蛍光染色を行い、GnRH ニューロンにおける IL-1 受容体や関連シグナルに関与するタンパク質の発現について検討した。

(3) 視床下部視索前野領域における IL-1 受容体 mRNA 発現の組織学的検討

卵巣摘出エストロゲン/プロゲステロンを処置した Wistar-Imamichi 系メスラットに、LPS または生理食塩水(Sal)を留置カニューレより静脈内に投与した。4.5-5.5 時間後にホルムアルデヒドで灌流固定を行い、脳サンプルを作成、終板脈絡器官および視床下部視索前野を含む領域の切片を作成した。DIG でラベルした rat IL1R1 プロブを用いて in situ hybridization を行い、アルカリフォスファターゼラベルされた抗 DIG 抗体と NBT/BCIP を用いてシグナルの検出を行い、視床下部視索前野領域における IL1R1 mRNA の発現を組織学的に検討した。

(4) ストレスによる LH サージ状分泌抑制への終板器官 MΦ 系細胞活性化の関与の検討

薬剤を終板脈絡器官にマイクロインジェクションするため、卵巣摘出 Wistar-Imamichi 系メスラットの終板脈絡器官に、脳定位固定装置を用いてガイドカニューレを留置した。ラットを、エストロゲン/プロゲステロンを処置したのち、MΦ 活性化阻害薬ミノサイクリン (5 μg/rat) または生理食塩水を終板脈絡器官に前投与し、LPS(0.5 μg/rat)または生理食塩水を留置カニューレより静脈内投与した。12:00 から 17:00 まで 1 時間毎に採血を行い、血清を回収した。radioimmunoassay を用いて血清中の LH 濃度を測定した。

(5) ストレスによる LH 分泌抑制への終板器官 TLR4 の関与の検討

薬剤を終板脈絡器官にマイクロインジェクションするため、卵巣摘出 Wistar-Imamichi 系メスラットの終板脈絡器官に、脳定位固定装置を用いてガイドカニューレを留置した。ラットを、エストロゲン/プロゲステロンを処置したのち、TLR4 阻害薬である TAK-242 (20 μg/rat) または vehicle は生理食塩水を終板脈絡器官に前投与し、LPS または生理食塩水を留置カニューレより静脈内投与した。12:00 から 17:00 まで 1 時間おきに採血を行い、血清を回収した。radioimmunoassay を用いて血清中の LH 濃度を測定した。

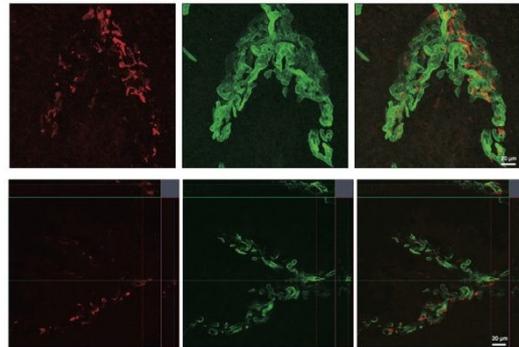
(6) ストレスによる LH サージ状分泌抑制への kiss-1 ニューロンの関与

卵巣摘出エストロゲン/プロゲステロンを処置した Wistar-Imamichi 系メスラットに、LPS または生理食塩水(Sal)を留置カニューレより静脈内に投与した。また一部のラットは、ミノサイクリン(25 mg/kg)または生理食塩水を 4 日間腹腔内前投与したのち、LPS を留置カニューレより静脈内に投与した。4.5-5.5 時間後にホルムアルデヒドで灌流固定を行い、脳サンプルを作成し、視床下部視索前野および前腹側室周囲核(AVPV)を含む領域の切片を作成した。DIG でラベルした rat kiss-1 プローブを用いて in situ hybridization と抗 c-Fos 抗体を用いた免疫蛍光染色による二重染色を行い、kiss-1 ニューロンでの c-Fos(神経細胞の興奮性マーカー)の発現を観察した。

4. 研究成果

(1) 終板脈絡器官の LPS 誘導性 IL-1 β 発現細胞と血管の組織学的関係の検討

終板脈絡器官は血液-脳関門が欠落した特殊な脳領域であり、この領域に存在する細胞は、末梢からのシグナルを直接受けとることができると考えられている。この領域では TLR4 の遺伝子発現が観察されることから、終板脈絡器官の M Φ 系細胞が TLR4 を介して直接 LPS に応答し、IL-1 β の分泌を介して GnRH ニューロン活動を抑制している可能性が示唆される。本実験では、LPS 投与モデルを用いて、血管内皮細胞のマーカーである rat endothelial cell antigen (RECA)-1 と IL-1 β との二重免疫蛍光染色を行い、終板脈絡器官の IL-1 β 発現細胞(ほとんどすべてが M Φ マーカー陽性であることは先行研究で確認済み)血管との組織学的関係を検討した。その結果、終板脈絡器官の中央付近に、蛇行した血管が密に存在する部位があり、IL-1 β 発現細胞は、この蛇行する血管の実質側の縁に局在することが示された(第 39 回日本神経科学大会にて発表)。この結果は、終板脈絡器官の血管に近接する M Φ 細胞が、末梢血中の情報を生殖中枢に伝えるインターフェースとしての役割を担っている可能性を示唆するものである。



血管との組織学的関係を検討した。その結果、終板脈絡器官の中央付近に、蛇行した血管が密に存在する部位があり、IL-1 β 発現細胞は、この蛇行する血管の実質側の縁に局在することが示された(第 39 回日本神経科学大会にて発表)。この結果は、終板脈絡器官の血管に近接する M Φ 細胞が、末梢血中の情報を生殖中枢に伝えるインターフェースとしての役割を担っている可能性を示唆するものである。

(2) GnRH ニューロンにおける IL-1 受容体および関連シグナルタンパク質の発現の検討

IL-1 β が GnRH ニューロンに直接作用するのかを検討するため、IL-1 β の受容体である IL1R1 および IL-1 の細胞内シグナルに關与する IL1RAP タンパク質が GnRH ニューロンで発現しているのかを二重免疫蛍光染色法を用いて組織学的に検討した。その結果、IL1R1 および IL1RAP 免疫陽性シグナルは、GnRH ニューロン細胞体の存在する視床下部視索前野 (POA) を含む領域で観察されたが、IL1R1 および IL1RAP 免疫陽性シグナルは GnRH 免疫陽性細胞では観察されなかった。この結果は、IL-1 β が GnRH ニューロンに直接ではなく、他の細胞を介して間接的に作用していることを示唆するものである。しかし、この結果、特に IL1R1 の分布については、既報の in situ hybridization の報告と異なっていることから、抗体の非特異反応の可能性を排除できなかった。また、Control 条件下では GnRH ニューロンでの IL1R1 の発現が低く検出できなかった可能性が考えられた。そこで、control および LPS 投与ラットのサンプルを用いて、in situ hybridization で IL1R1 mRNA の分布を検討し、免疫染色と同様の結果が得られるかを検討した。

(3) 視床下部視索前野領域における IL-1 受容体 mRNA 発現の組織学的検討

LPS 投与ラットおよび生理食塩水(Sal)投与ラットのサンプルを用いて、IL-1 receptor 1 (IL1R1) に対する in situ hybridization を行った結果、Sal 投与群視床下部視索前野では一部の血管で弱いシグナルが観察されたが実質ではシグナルは観察されなかった。これらの結果は、血管での発現を示した既報と一致していたが、前述の免疫染色の結果とは異なっていた。この理由としては、mRNA 発現量とタンパク質の発現量が異なる可能性、抗体の非特異反応の可能性などが考えられる。LPS 投与群の視床下部視索前野では、一部の血管で Sal 群より強いシグナルが観察されたが、脳実質ではシグナルは観察されなかった。これらの結果は、IL-1 β が GnRH ニューロンに直接ではなく、他の細胞を介して間接的に作用していることを示唆し、その経路の一部に血管内皮細胞が關与する可能性を示唆するものである。

(4) ストレスによる LH サージ状分泌抑制への終板器官 TLR4 の関与の検討

LPS の受容体である TLR4 の阻害薬 TAK-242 を終板脈絡器官に局所投与し、終板脈絡器官の M Φ 細胞による LPS の受容がによる LH サージ抑制に關与するのかを検討した。その結果、TAK-242 の局所投与は LPS による LH サージ抑制を回復することはできなかった。TAK-242 の単独投与は LH サージを抑制しないことから、この抑制は LPS によるものと考えられる。この結果の理由の一つとして、終板脈絡器官 M Φ 以外の因子(他の領域のミクログリア/M Φ 系細胞を含む) LPS による LH サージ抑制に關わっており、終板脈絡器官 M Φ の TLR4 阻害だけでは、

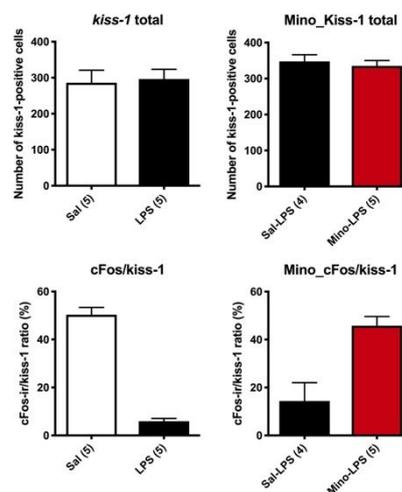
LH サージを回復するのに十分ではない可能性が考えられる。しかし、この結果については、文献で使用された最も濃い濃度の調整方法を用いて実験を行ったが、TAK-242 は難溶性のため局所投与の容量では、LPS による終板脈絡器官 MΦ の活性化を十分に抑制できなかった可能性も排除できず、さらなる検討が必要であると考えられる。

(5) ストレスによる LH サージ状分泌抑制への終板器官 MΦ 系細胞活性化の関与の検討

我々の先行研究では、MΦ 活性化阻害薬であるミノサイクリンの全身投与により、LPS による LH サージ状分泌抑制が回復することを観察した。本実験では、Mino を終板脈絡器官へ局所投与し、この部位の MΦ の活性化を抑制することで、LPS 末梢投与による LH サージ状分泌抑制が回復するかを検討した。しかし、今回用いた実験条件(5 μg/rat 単発投与)では LH サージ状分泌抑制の減弱は観察されなかった。先行研究では、ミノサイクリンを数日に渡り前投与しているのに対し、本実験では、LPS 投与前の単発投与であったため効果を得るに不十分だった可能性が考えられた。また、終板脈絡器官 MΦ 以外の因子(他領域のミクログリア/MΦ を含む)も、LPS による LH サージ抑制に関わっており、終板脈絡器官 MΦ の活性化阻害だけでは、LH サージを回復するのに不十分だった可能性が考えられる。

(6) ストレスによる LH サージ状分泌抑制への kiss-1 ニューロンの関与

上記組織学的実験より IL-1β は GnRH ニューロンに間接的に作用している可能性が示された。そこで、LH サージ状分泌時に GnRH ニューロンの興奮を制御していることが示唆されている、AVPV の kiss-1 ニューロンに着目し、このニューロンが LH サージ状分泌抑制の経路に関与するのかが検討した。kiss-1 mRNA の蛍光 in situ hybridization と c-Fos に対する免疫蛍光染色による二重染色の結果、kiss-1 ニューロンでの c-Fos 発現は LPS の投与により低下し、ミクログリア/MΦ 活性化阻害薬の前投与により回復することを、少数のサンプルではあるが確認した。AVPV の kiss-1 ニューロン数は全群で有意な差は見られなかった。この結果は、LPS による LH サージ状分泌抑制が、kiss-1 ニューロンの神経活動の低下と、それに引き続く GnRH ニューロンの神経活動の低下による可能性を示すものであり、IL-1β の作用点は kiss-1 ニューロンもしくはその上流に存在する可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Fujioka H, Funabashi T, Akema T.

Prostaglandin E2 modulates presynaptic regulation of GnRH neurons via EP4 receptors in accordance with estrogen milieu. *Neuroscience*, 2017, 360: 139-145. 査読あり
doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.07.025.

[学会発表](計3件)

藤岡仁美, 船橋利也, 明間立雄. LPS 急性ストレスによる GnRH サージ発生機構の活動抑制とミノサイクリン前投与による抑制解除への kiss1 ニューロンの関与、第 45 回日本神経内分泌学会学術集会、2018 年

藤岡仁美, 船橋利也, 明間立雄. 雌ラットにおけるプロスタグランジン E2 の GnRH ニューロン微小 EPSC への影響 (Effects of prostaglandin E2 on miniature EPSCs of gonadotropin-releasing hormone neurons in female rats.)、第 94 回日本生理学会大会、2017 年

藤岡仁美, 福島篤, 船橋利也, 明間立雄. リボポリサッカライドによる LH サージ状分泌抑制に関与する終板脈絡器官の IL-1β 産生細胞の特徴 (Characteristics of interleukin 1β producing cells involved in suppression of luteinizing hormone surge by LPS in the organum vasculosum of the lamina terminalis in ovarian steroid-primed ovariectomized rats)、第 39 回日本神経科学大会、2016 年

[図書](計0件)

[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://www.marianna-u.ac.jp/physiology/index.html>

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：明間 立雄

ローマ字氏名：(AKEMA, Tatsuo)

研究協力者氏名：船橋 利也

ローマ字氏名：(FUNABASHI, Toshiya)

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。