

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09671

研究課題名(和文) 女性内分泌の中枢制御機構の解明

研究課題名(英文) Study for the central regulation of female reproductive endocrinology

研究代表者

金崎 春彦 (Kanasaki, Haruhiko)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授

研究者番号：10325053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：1) 脳内にもアクチビン/インヒビン/フォリスタチンの発現があり、これらはE2の影響を受ける。脳内Kiss-1発現もアクチビン/インヒビン/フォリスタチンの影響を受ける。2) 高テストステロン状態は視床下部KNDyニューロンにおいてKiss-1、NKB発現を増加させ、Dyn A発現を減少させる結果、視床下部-下垂体-性腺軸の不調を来す可能性がある。3) AMHはGnRH発現を増加させて視床下部-下垂体-性腺軸に影響を与える他、GnRHパルス中枢であるKNDyニューロンにおいてキスペプチン発現に対し抑制的に作用する可能性がある。4) キスペプチンとGnRHには自己調節作用及び相互作用がある可能性がある

研究成果の学術的意義や社会的意義  
キスペプチンニューロンの制御機構の一端を解明できた。

研究成果の概要(英文)：1) Activin, inhibin, and follistatin expressed in the brain participate in the E2-induced feedback control of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. 2) Hyperandrogenemia affects KNDy neurons and changes their neuronal characteristics by increasing kisspeptin and NKB levels and decreasing DynA levels. These changes might cause dysfunction of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. 3) AMH participates in hypothalamic-pituitary-gonadal axis control by stimulating GnRH expression. In addition, AMH might be a potent repressor of Kiss-1 gene expression induced by KP10. 4) Kisspeptin and GnRH affected Kiss-1- and GnRH-expressing hypothalamic cells and modulated Kiss-1 and/or GnRH gene expression with a concomitant increase in c-Fos protein expression. A mutual- or self-regulatory system might be present in Kiss-1 and/or GnRH neurons in the hypothalamus.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：視床下部 キスペプチン GnRH インヒビン アクチビン フォリスタチン

## 1. 研究開始当初の背景

2003年に低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の患者から GPR54 (後のキスペプチン受容体)の遺伝子変異が見つかり、このリガンドである「キスペプチン」が GnRH ニューロンから GnRH を分泌させて HPG axis を刺激する重要なホルモンであることが明らかとなった(PNAS 100:10972-10976, 2013, NEJM 349:1614-1627, 2013)。その後キスペプチン発現ニューロンが視床下部に存在すること、このニューロンがエストラジオール(E2)によるフィードバック機構に関与していることが分かってきた。キスペプチンニューロンは視床下部内の2つの異なった領域に局在する。げっ歯類において弓状核(ARC)に局在するキスペプチンニューロンでは卵巣摘出によりキスペプチンをコードする Kiss1 遺伝子発現が増加する。同部位の Kiss1 発現の上昇は E2 を補充することで抑制されることから、ARC 領域のキスペプチンニューロンは E2 によるネガティブフィードバックに関与すると考えられる。一方、前腹側室周囲核(AVPV)領域に局在するキスペプチンニューロンにおいては卵巣摘出で Kiss1 発現は減少し、E2 投与で増加する。このことから AVPV 領域のキスペプチンニューロンは E2 増加に伴い GnRH/サージを促す中枢であると考えられる。E2 によるネガティブフィードバック中枢である ARC 領域のキスペプチンニューロンは GnRH の基礎パルス状分泌を制御し、ネガティブフィードバックのターゲットとなるが、同部位のキスペプチンニューロンにはニューロキニン B (NKB) とダイノルフィン A (Dyn A) が発現しそれぞれの頭文字を取って KNDy ニューロンとも呼ばれている。NKB、DynA が自身の神経活動をそれぞれ促進的、抑制的に制御することでキスペプチン分泌を調節し、GnRH パルスを誘導していると考えられる。一方ポジティブフィードバック中枢である AVPV 領域のキスペプチンニューロンは KNDy ニューロンではないことが分かっている。

## 2. 研究の目的

E2 によるフィードバック中枢と考えられるキスペプチンニューロンであるが、2つの異なる領域のニューロンが何故 E2 に対して異なった反応を示すのか不明である。そもそもキスペプチンニューロンが E2 の情報を一元的に自身で感受するのか、他の因子の介在があるのかも不明である。E2 による Kiss1 発現の増減は直接作用によるものか間接的なものなのか、あるいは男性ホルモンがキスペプチンニューロンにどのような影響を与えるのかも不明である。キスペプチンニューロンに影響する因子は数々報告されている。キスペプチンニューロンに影響を与え、またキスペプチンが影響を受ける因子を解明し、HPG axis の複雑な仕組みを明らかにすることを本研究の目的とし、脳内アクチビン、インヒビンのキスペプチンニューロンに対する作用、男性ホルモンの KNDy ニューロンへの影響、Anti-Müllerian hormone (AMH)、GnRH によるキスペプチンニューロンの作用に焦点をあて研究を行った。

## 3. 研究の方法

研究1)ラット胎児脳神経初代培養細胞に発現するアクチビン、インヒビン及びフォリスタチンの役割について検討した。妊娠 16-18 日目の妊娠ラットから胎児を取り出し、全胎児脳を初代培養して実験に用いた。脳初代培養細胞に発現する Kiss-1 遺伝子に対するアクチン/インヒビン/フォリスタチン刺激効果及び、これらの遺伝子発現に対するエストラジオール(E2)の影響について検討した。

研究2)マウスの KNDy ニューロン細胞株 mHypoA-55 細胞を用いて、同細胞に対するテストステロンの影響について検討した。mHypoA-55 細胞をテストステロンで刺激し、Kiss-1、NKB、Dyn A の発現量をリアルタイム PCR 及びウェスタンブロッティング法にて検討した。

研究3)ラット視床下部前腹側室周囲核(AVPV)領域由来の mHypoA-50 細胞と視床下部弓状核(ARC)由来の KNDy ニューロンである mHypoA-55 細胞を用いた。両細胞を AMH で刺激し Kiss-1 及び GnRH 発現について検討した。

研究4)AVPV 由来の mHypoA-50 細胞と ARC 由来の Kiss-1 発現細胞である mHypoA-55 細胞を用い、両細胞をキスペプチン(KP10)及び GnRH で刺激し、キスペプチン及び GnRH 発現について検討した。

#### 4 . 研究成果

結果 1) ラット胎児脳には Kiss-1 発現の他、アクチビン、インヒビン、フォリスタチン発現がある事を PCR 及びウェスタンブロットングで確認した。脳内のインヒビン、inhibin  $\beta$ A、 $\beta$ B サブユニット及びフォリスタチン発現は E2 の存在で増加した。脳初代培養細胞をアクチビンで刺激すると Kiss-1 発現は増加、インヒビン A 及びフォリスタチン刺激では Kiss-1 発現は減少した。これらの結果は脳内にもアクチビン/インヒビン/フォリスタチンの発現があり、これらは E2 の影響を受ける。脳内 Kiss-1 発現もアクチビン/インヒビン/フォリスタチンの影響を受けることから、脳内のアクチビン/インヒビン/フォリスタチンは E2 によるフィードバック機構に関与している可能性がある事を示している。

結果 2) mHypoA-55 細胞をテストステロンで刺激すると、細胞内の Kiss-1 遺伝子及びキスペプチン蛋白量が増加した。テストステロンは NKB 遺伝子及び蛋白発現も増加させた。テストステロン刺激で Dyn A 遺伝子発現に有意な変化はなかったが、Dyn A 蛋白発現は有意に減少した。ジヒドロテストステロンによる刺激でも、キスペプチン、NKB は増加し、Dyn A は減少した。一方プロラクチン刺激ではキスペプチン、NKB、Dyn A 発現量に変化は認めなかった。高テストステロン状態は視床下部 KNDy ニューロンにおいて Kiss-1、NKB 発現を増加させ、Dyn A 発現を減少させる結果、視床下部-下垂体-性腺軸の不調を来している可能性があると考えられた。

結果 3) mHypoA-50 細胞及び mHypoA-55 細胞には AMH 受容体が発現していた。両細胞において AMH 刺激は Kiss-1 発現を変化させなかったが、GnRH 発現が有意に増加した。mHypoA-55 細胞(ARC 由来)においてはキスペプチン(KP10)刺激で Kiss-1 発現が有意に増加したが、KP10 による Kiss-1 の増加は AMH 存在下で完全に抑制された。KNDy ニューロンである mHypoA-55 細胞におけるキスペプチン受容体、Neurokinin B、Dynorphin A 発現は AMH 刺激で変化しなかった。AMH は GnRH 発現を増加させて視床下部-下垂体-性腺軸に影響を与える他、GnRH パルス中枢である KNDy ニューロンにおいてキスペプチン発現に対し抑制的に作用する可能性が示唆された。

結果 4) mHypoA-50 細胞と mHypoA-55 細胞はキスペプチンを発現するが、GnRH も発現していた。また両細胞にキスペプチン受容体及び GnRH 受容体の発現を認めた。mHypoA-50 AVPV 細胞における Kiss-1 発現は KP10 及び GnRH 刺激で増加した。GnRH 発現は KP10 及び GnRH 刺激で増加しなかった。一方 mHypoA-55 ARC 細胞においても Kiss-1 発現は KP10 及び GnRH 刺激で増加した。mHypoA-55 ARC 細胞においては GnRH 発現も KP10 及び GnRH 刺激で増加した。両細胞とも KP10 及び GnRH 刺激で c-fos 蛋白の発現は増加した。キスペプチンと GnRH には自己調節作用及び相互作用がある可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Oride A, Kanasaki H, Okada H, Kyo S.	4. 巻 47
2. 論文標題 Reproductive prognosis of patients with hypogonadotropic hypogonadism: Retrospective review of 16 cases with amenorrhe	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Obstet Gynecol Res	6. 最初と最後の頁 3895-3902
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.15006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kanasaki H, Tumurbaatar T, Tumurgan Z, Oride A, Okada H, Kyo S.	4. 巻 28
2. 論文標題 Mutual Interactions Between GnRH and Kisspeptin in GnRH- and Kiss-1-Expressing Immortalized Hypothalamic Cell Models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reprod Sci	6. 最初と最後の頁 3380-3389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s43032-021-00695-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oride A, Kanasaki H, Tumurbaatar T, Tumurgan Z, Okada H, Kyo S.	4. 巻 37
2. 論文標題 Effect of anti-mullerian hormone in hypothalamic Kiss-1- and GnRH-producing cell models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gynecol Endocrinol	6. 最初と最後の頁 841-847
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09513590.2021.1950134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tumurbaatar T, Kanasaki H, Tumurgan Z, Oride A, Okada H, Kyo S	4. 巻 68
2. 論文標題 Effect of anti-mullerian hormone on the regulation of pituitary gonadotropin subunit expression: roles of kisspeptin and its receptors in gonadotroph L T2 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocr J	6. 最初と最後の頁 1091-1100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ21-0085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Oride A, Kanasaki H, Okada H, Kyo S	4. 巻 30
2. 論文標題 Detection of pure Leydig cell ovarian tumor not visible on imaging by selective venous blood sampling in a woman with secondary amenorrhea and hirsutism: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ase Rep Womens Health	6. 最初と最後の頁 e00298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crwh.2021.e00298	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 .Oride A, Kanasaki H, Tumurbaatar T, Tumurgan Z, Okada H, Tomomi H, Kyo S	4. 巻 27
2. 論文標題 Effects of the fertility drugs clomiphene citrate and letrozole on Kiss-1 expression in hypothalamic Kiss-1 expressing cell models.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reprod Sci	6. 最初と最後の頁 806-814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s43032-020-00154-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tumurgan Z, Kanasaki H, Tumurbaatar T, Oride A, Okada H and Kyo S	4. 巻 23
2. 論文標題 Roles of Intracerebral Activin, Inhibin, and Follistatin in the Regulation of Kiss-1 Gene Expression: Studies Using Primary Cultures of Fetal Rat Neuronal Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100785	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okada H, Kanasaki H, Tumurgan Z, Tumurbaatar T, Oride A and Kyo S	4. 巻 91
2. 論文標題 Hyperandrogenism induces proportional changes in the expression of Kiss-1, Tac2, and DynA in hypothalamic KNDy neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Breprod Biol Endocrinol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12958-022-00963-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tumurgan Zolzaya、金崎春彦、Tumurbaatar Tuvshintugs、折出亜希、原 友美、岡田裕枝、京 哲
2. 発表標題 ラット胎児脳初代培養細胞を用いた脳内アクチビン、インヒピン、フォリスタチン制御に関する検討
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 折出亜希、金崎春彦、Tuvshintugs Tumurbaatar、Zolzaya Tumurgan、岡田裕枝、京 哲
2. 発表標題 クロミフェンクエン酸塩とアロマトマーゼ阻害剤レトロゾールの視床下部キスペプチンニューロンに対する直接作用について
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 折出亜希、金崎春彦、Tumurbaatar Tuvshintugs、umurgan Zolzaya、原 友美、岡田裕枝、京 哲
2. 発表標題 抗ミューラー管ホルモンの下垂体ゴナドトロピン産生細胞に対する作用について
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	折出 亜希  (Oride Aki)  (00423278)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・講師    (15201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------