

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31日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590253

研究課題名（和文）オキシトシンレセプター発現調節とエストロゲン作用調節に関する研究

研究課題名（英文）Regulations of oxytocin receptor expression and estrogen action

研究代表者

村田 拓也（MURATA TAKUYA）

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：70281186

研究成果の概要（和文）：

オキシトシン受容体の調節には、卵巣から分泌される女性ホルモン、エストロゲンが働いている。エストロゲン作用を持つ数種類の異なる薬物を投与することにより、オキシトシン受容体の調節におけるエストロゲンの作用について調べた。その結果、オキシトシン受容体の調節には、2つのエストロゲン受容体（ER）であるER α とER β を介する反応に加えて、数種類のERを介する反応が存在することが明らかになった。さらに、エストロゲンの摂食を抑制する作用に関係する脳の部位を、幼弱ラットを用いて示した。

研究成果の概要（英文）：

The oxytocin receptor is regulated by estrogen secreted from the ovary. Using several types of estrogenic compound, the effects of estrogen on the oxytocin receptor were demonstrated to be mediated by several types of estrogen receptor, including classical estrogen receptors α and β , and the membrane-associated receptor. In addition, the brain site where estrogen shows an inhibitory effect on food intake was demonstrated in developing female rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養医学）

キーワード：オキシトシン、オキシトシンレセプター、エストロゲン、エストロゲンレセプター、ラット

1. 研究開始当初の背景

オキシトシンの中枢作用と生殖機能、特に行動との関連については今後の大きな課題である。エストロゲン濃度と細胞のエストロゲン感受性は、オキシトシン作用の調節に最も重要なファクターである。我々が研究し

てきた子宮および視床下部腹内側核（VMH）のオキシトシンレセプター（OTR）は、エストロゲンの誘導作用を受けている遺伝子である。

エストロゲンレセプター（ER）は、ER α とER β の二つのタイプが同定されており、リ

ガンドが結合するとダイマーを形成して転写因子として働く。最近では、この核内レセプターによる転写調節に加え、細胞膜に存在するERによって引き起こされる反応、あるいは細胞内にあるが核外で蛋白リン酸化のカスケードに加わっていくER反応が想定されている。これらのERが、細胞のエストロジェン感受性を決め、それぞれの経路の総和がその細胞へのエストロジェン作用となっていると考えられる。

バルプロ酸は、抗てんかん薬として30年以上広く使われ、最近では気分安定薬あるいは抗躁うつ薬としても使われている短鎖脂肪酸である。当研究室でラットの不安行動について検討している過程で、バルプロ酸が子宮およびVMHのOTR mRNA量を増加させることがわかった。このことは、バルプロ酸の作用が、オキシトシン作用を調節することにより発現している可能性を示唆するとともに、新たなOTR調節メカニズムの存在をも推測させる。

2. 研究の目的

(1) OTRおよびERの発現調節

エストロジェンがどのような経路でOTRおよびERの発現を調節しているのかについて検討する。

(2) オキシトシンおよびバルプロ酸の行動に及ぼす効果について検討する。

(3) エストロジェンの行動に及ぼす効果について検討する。

3. 研究の方法

(1) 卵巣摘出ラットに、各種ERアゴニストあるいはアンタゴニストを投与し、それぞれの薬物がOTRおよびER mRNA量に及ぼす影響を調べた。各mRNA量の測定には、リアルタイムPCR法を用い、 β -actinにより標準化を行った。

さらに、膜ERの1つと考えられているG-protein coupled receptor 30 (GPR30)のmRNA量について、妊娠、分娩および性周期中の変化を調べ、さらに各種ERアゴニストあるいはアンタゴニストの影響について調べた。

(2) ラットは、4日周期の性周期を回帰する。その4日間で、内分泌環境、特に血中エストロジェン濃度は大きく変動する。ラットの各性周期(4日周期)に、オキシトシンアンタゴニストおよびバルプロ酸を投与し、それぞれの自発運動量および摂食量に対する影響に調べ、内分泌環境の変化と関連があるのかについて検討した。自発運動量は、赤外線センサーを用いた測定装置により1時間毎に集計し行動量を測定した。摂食量については、薬物を暗期開始30分前に投与し、投与後1、3、24時間後の摂食量を測定した。

(3) エストロジェンは、脳に作用して摂食を抑制する作用がある。この作用は、生後性成熟までに獲得されると考えられている。幼弱雌ラットにエストロジェンを投与し、いつこのエストロジェンの摂食抑制作用が発現するのかを調べ、さらに投与後脳各部位発現するc-Fosを基に、摂食抑制作用と発現時期と脳各部位のエストロジェン感受性の変化とを比較検討した。

4. 研究成果

(1) 卵巣摘出ラットに17 β -estradiol (12.5 or 2.5 μ g)を投与したところ、24時間後にOTR mRNA量は有意に増加したが、0.5 μ g投与群では有意な増加は見られなかった。次に、17 β -estradiol (12.5 or 0.5 μ g)を日に1回、3日間投与すると、最後の投与から24時間後に、ともに有意な増加が観察され、12.5 μ g投与群では、さらに増加が見られた。

ER α mRNA量においては、17 β -estradiol (12.5, 2.5 or 0.5 μ g)投与24時間後には、有意な変化は見られず、さらに3日間投与においても、減少傾向は見られたが、有意な変化は観察されなかった。

ER β mRNA量においては、17 β -estradiol (12.5, 2.5 or 0.5 μ g)投与24時間後には、有意な減少が観察された。一方、3日間投与においては、有意な減少は見られたが、その減少は1回投与と比べて小さくなっていた。

17 β -estradiol (12.5 μ g)を投与し、1時間毎に9時間までの変化を調べたところ、OTR mRNA量は2時間後に有意に増加し、ER α およびER β mRNA量は2時間後に有意に減少した。

ER α アゴニストであるPPTおよびER β アゴニストであるDPNを投与し、3時間および6時間後の変化を調べた。その結果、PPT投与により、3時間および6時間後に、OTR mRNA量は有意に増加し、ER α およびER β mRNA量は有意に減少した。DPN投与においては、ER α およびER β mRNA量は、PPT投与と同様に3時間後および6時間後に有意に減少したが、OTR mRNA量は3時間後に有意に増加したものの6時間後には対照群と同じレベルに減少した。

膜ERに感受性が高いと考えられているestrenの効果について、投与1時間、3時間および6時間後のOTRおよびER mRNA量変化を調べた。OTR mRNA量は、1時間後に増加し、3時間後にピークを示すように増加した後、投与6時間後には減少した。ER α およびER β mRNA量は、ともに3時間後に有意に減少し、6時間後までその減少は維持された。

これらの3時間後の変化に対するERアンタゴニストとしての作用があるtamoxifen (Tam)およびICI182,780 (ICI)の効果調べ

た結果、OTR mRNA 量の増加は、Tam および ICI 投与によって抑制された。しかし、ER α および ER β mRNA 量の減少に対して、Tam 投与はさらに減少させ、アゴニストとしての作用を示し、一方 ICI 投与では、作用を示さなかった。また、estren は、アンドロゲンレセプターに対する作用も報告されているが、testosterone の投与により、OTR, ER α および ER β mRNA 量に変化は見られなかった。このことから、estren によるこれらの反応は、アンドロゲンレセプターを介した反応ではないと考えられる。

ラット性周期中の発情前期において、OTR mRNA 量が、他の日に比べて有意に増加し、ER α および ER β mRNA 量が有意に減少する。この変化に対する Tam および ICI の作用について調べた。発情前期の OTR mRNA 量の増加は、前日の Tam および ICI の投与により、抑制された。発情前期の ER α mRNA 量の減少は、ICI の投与により抑制されたが、Tam の投与では抑制されなかった。一方 ER β mRNA 量の減少においては、逆に、Tam の投与により抑制されたが、ICI の投与では抑制されなかった。

GPR30 mRNA 量は、妊娠および分娩中に変化は見られなかった。性周期中においては、発情前期に有意に低下した。この変化は、ER α と ER β の変化と類似しており、かつ ER アンタゴニストにより阻止されたことから、発情前期に上昇する血中エストロゲンによるものと考えられた。

次に、卵巣摘出ラットに、17 β -estradiol (12.5 μ g) を投与した。1 回投与した場合、24 h 後に GPR30 mRNA 量には有意な変化は見られなかったが、3 日間投与した場合、最後の投与から 24 h 後に有意な減少が観察された。一方、1 回投与後のタイムコースを調べたところ、2 時間後に有意な減少が観察された。このことは、17 β -estradiol による GPR30 発現への抑制作用は、早い段階で発現するが 24 h 後には、消失していることを示している。この変化は、ER α の変化と類似している。

PPT と DPN をそれぞれ投与したところ、PPT 投与の場合、3 時間および 6 時間後ともに GPR30 mRNA 量に有意な減少がみられたが、DPN 投与の場合 3 時間後のみ有意に減少し、6 時間後には対照群と差は見られなかった。

以上の結果より、PPT, DPN および estren に対する OTR, ER α および ER β mRNA 量の調節において、数種類の反応があることがわかった。1 つは、6 時間以内に起こる非常に短い反応である。今回観察された反応が、共通のメカニズムかどうかはわからないが、今後の研究の重要なターゲットになるであろうと考えられる。もう 1 つは、これら数種

類の ER 作動薬に対する反応の違いから、おそらく膜 ER を含む数種類の未だ同定されていない ER の関与が考えられる。未だ、膜 ER の本体および作用機序については、その全貌は明らかにされていないが、本研究は解明の重要な手掛かりになるとともに、有用な実験モデルとなるであろうと考えられる。

(2) 4 日周期の性周期の各日、発情前期、発情期、発情後期、非発情期の暗期開始 30 分前に、バルプロ酸を投与し、摂食量および行動量を計測した。その結果、発情前期と後期において、摂食量と行動量の抑制が観察された。摂食量において、発情前期においてより強い抑制が見られた (図 1)。行動量においては、性周期間に差は見られなかった。オキシトシンアンタゴニストの投与により、発情前期の摂食量に有意な減少が観察された (図 1)。これらの作用機序には、エストロジェンの影響を受ける経路、たとえば GABA 受容体の変化などが想定される。さらには、今回観察されたオキシトシン作用が、中枢性か末梢性であるのかも今後の重要なポイントになると考えられる。

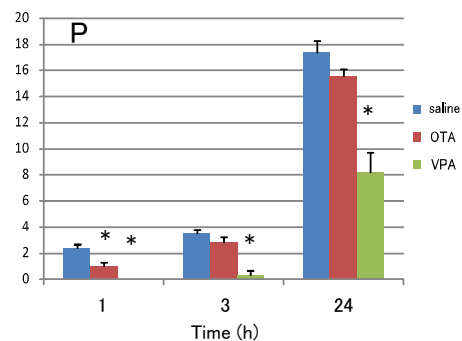


図 1 オキシトシンアンタゴニスト (OTA) およびバルプロ酸 (VPA) の摂食量に及ぼす効果。縦軸は摂食量 (g)、横軸は投与後の時間を示す。

(3) 多くの種において、卵巣ステロイドホルモンであるエストロゲンが摂食量を抑制することが報告されている。しかし、その作用に関与する脳部位の詳細については未だ明らかにされていない。我々は、脳の発達期にある未成熟ラットにおいて、エストロゲンの摂食抑制作用がいつ有効となるのかを調べ、さらに、同時期においてエストロゲンに反応する脳部位を c-Fos 発現を基に検討した。4 つの発育段階 (12、20、25、29 日齢) のラットに安息香酸エストラジオール (EB, 20 μ g/kg/day) を 3 日間投与し、摂食量および体重の変化を測定した。その結果、12 日および 20 日齢ラットにおいては有意な変化は見られなかったが、25 日および 29 日齢のラットにおいては、投与 2 日お

び3日後に摂食量と体重増加量に有意な減少が見られた(図2)。

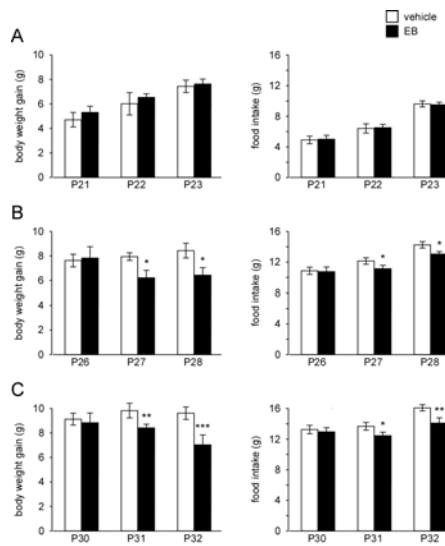


図2 EB投与による幼弱ラットの体重と摂食量の変化
縦軸は体重あるいは摂食量、横軸は生後の日数を示す

さらに、25日および29日齢のラットでは、視床下部室傍核小細胞領域(pPVN)においてのみ、2日間および3日間のEB投与後にc-Fos発現の増加が観察された。この変化は20日齢のラットでは見られなかった。このことは、pPVNがエストロゲンに対する反応性を獲得する時期が、エストロゲンの食欲抑制作用の発現し始める時期と一致することを示している。さらに、卵巣摘出した成熟雌ラットでは、3日間のEB投与により延髄弧束核、扁桃体中心核および視床下部腹内側核でもc-Fos発現の増加が観察されたが、これに対し未成熟ラット(20~29日齢)では、これらのpPVN以外の神経核では顕著なc-Fos発現の増減は見られなかった。また成熟ラットの視床下部室傍核におけるc-Fos発現の増加はpPVNの腹内側部に局限して見られ、その一部はコルチコトロピン放出ホルモン産生ニューロンであることが確認された。

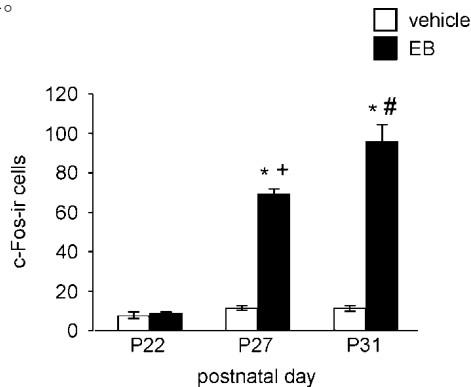


図3 EB投与による幼弱ラットのpPVNにおけるc-Fos発現
縦軸はc-Fosを発現している細胞数、横軸は生後の日数を示す

以上、エストロゲンの摂食抑制効果は生後30日までに現れ、その発現時期はpPVNがエストロゲンに反応し始める時期と並行すること、さらに、摂食調節に関与すると考えられている他の神経核が、この時点では未だエストロゲンに対する感受性を持たないことが明らかとなった。これらの結果は、pPVNはエストロゲンの食欲抑制作用を制御する脳の重要な部位の1つであり、pPVNの機能の発達がエストロゲンの摂食抑制効果発現の律速になっている可能性を示唆している。

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1件)

Chi JH, Narita K, Ichimaru T, Murata T. Estrogen increases c-Fos expression in the paraventricular nucleus along with its anorexic effect in developing rats. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有、Vol. 57, No. 3, 2011, 365-372, https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/57/3/57_10-189E/_pdf

[学会発表] (計2件)

村田 拓也
ラット子宮オキシトシンおよびエストロゲンレセプターの調節
中部生理学会
平成23年1月1日
福井県県民ホール(福井市)

村田拓也
Regulation of oxytocin receptor by estrogen in rat uterus.
国際内分泌学会
平成23年3月28日
京都国際会館(京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 拓也 (MURATA TAKUYA)
福井大学・医学部・准教授
研究者番号: 70281186

(2) 研究分担者

成田 和己 (NARITA KAZUMI)
福井大学・医学部・助教
研究者番号: 80270958
市丸 徹 (ICHIMARU TORU)
福井大学・医学部・助教
研究者番号: 30452121