

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09460

研究課題名（和文）キスペプチン発現解析によるメラトニンの思春期抑制機構の解明

研究課題名（英文）Inhibitory effects of melatonin on the onset of puberty examined by kisspeptin expression analysis

研究代表者

託見 健（Takumi, Ken）

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：40553269

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,700,000円

研究成果の概要（和文）：夜間に分泌量が増えるホルモン、メラトニンが哺乳類の性成熟に必須の神経ペプチドであるキスペプチン発現を介して思春期開始に抑制的な働きを持つ可能性を検討した。メラトニン投与は、思春期開始時期のメスラットの成長速度、卵巣重量、卵胞発育にほとんど影響せず、黄体形成ホルモン量、キスペプチン発現もコントロール群との間に有意な差がみとめられなかったことから、メラトニンが思春期におけるキスペプチン発現の強力な抑制因子である可能性は低いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メラトニンは外界の明暗環境の情報伝達に関わるホルモンであるため、本研究によって思春期発来に必要なキスペプチン発現への影響を明らかにすることで、ヒトを含む哺乳類における照明環境と性成熟の関係性についての知見が得られることが期待された。投与経路などによる制限はあるものの、メラトニンが思春期の開始に与える影響は報告されてきたように強固でない可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the possibility that melatonin, a hormone which increases during night, has an inhibitory effect on the onset of puberty through the expression of kisspeptin, a neuropeptide essential for sexual maturation in mammals. Since melatonin administration no effect on body growth rate or ovarian weight, and no significant difference was observed in luteinizing hormone levels or kisspeptin expression in the hypothalamus of female rats at the onset of puberty, it is suggested that melatonin is not a strong inhibitor of kisspeptin expression during the pubertal development.

研究分野：生殖生理学

キーワード：キスペプチン メラトニン 思春期

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メラトニンは松果体で合成され、その分泌は夜間に増加、光刺激により減少することから外界の明暗環境の情報伝達に重要なホルモンである。メラトニンは生殖腺抑制効果を持ち、思春期の開始に影響することが古くより報告されてきた。しかしながら、このようなメラトニンによる思春期の開始に対する抑制がどのようなメカニズムを通して実現されているのかは明らかでない。

キスペプチンニューロンは哺乳類の思春期と生殖機能の制御に重要な働きをもつ神経細胞であり、個体内外の様々な情報はキスペプチンニューロンに集約され、思春期の開始のタイミングを制御していると考えられている。しかしながら、個体発達においてキスペプチンニューロンを制御し、思春期の開始に関わる因子についての情報は未だ不足している。

季節繁殖動物を用いた研究では日長の変化や松果体除去によるメラトニンの欠乏がキスペプチン発現に影響することが報告されている。周年繁殖動物においてもメラトニンがキスペプチンニューロンの制御因子として働いている可能性がある(図1)。

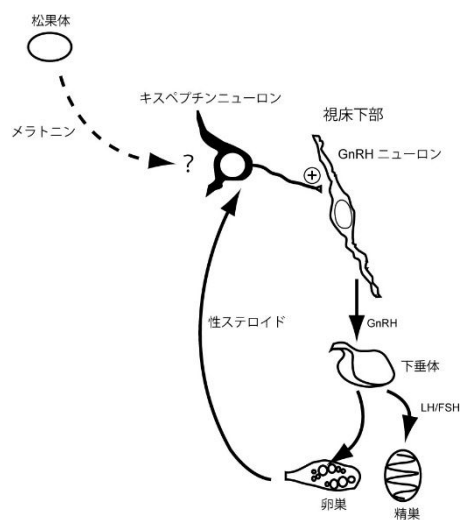


図1. メラトニンによるキスペプチン制御

2. 研究の目的

思春期の開始期にはキスペプチン発現の増加によって、視床下部 下垂体 性腺系が活性化されると考えられている。本研究では、メラトニンがキスペプチン発現を抑制することで思春期の開始のタイミングに関与している可能性を検討するため、幼若期のラットにおいてメラトニンを投与することにより、メラトニンが思春期開始時に起こるキスペプチン発現増加に与える影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

生後 15 日齢のメスラットをメラトニン投与群とコントロール群にランダムに割り当て、毎日 15 時から 15 時 30 分の間にメラトニン投与群にはメラトニン(0.1mg)、コントロール群には 10% エタノール生理食塩水を皮下投与した。生後 29 日、生後 35 日の時点で深麻酔下で採血、4% パラホルムアルデヒドを含む固定液を灌流、固定した。

(1) 血中黄体形成ホルモン(LH)測定

血液サンプルの遠心分離により血清を得、市販の ELISA キット(レビス LH - ラット(Sタイプ)、富士フィルムワコーシバヤギ)を用いて、血清中の LH 濃度を測定した。

(2) 卵巣組織観察

生後 35 日齢の個体を固定後採取した卵巣については重量を測定後、パラフィンに包埋し、薄切、定法に従ってヘマトキシリンエオジン(HE)染色をした後、光学顕微鏡で観察した。

(3) 視床下部におけるキスペプチン発現解析

採取した脳から厚さ 40 μ m の連続凍結切片を作製し、*in situ* hybridization 法によりキスペプチン遺伝子(Kiss1)mRNA 発現細胞を可視化した。前腹側室周囲核(AVPV)と弓状核(ARC)をデジタルカメラで撮影し、PC画面上で Kiss1 mRNA 発現細胞を計数した。

4. 研究成果

発達にともなう体重変化にメラトニン投与群とコントロール群の間で違いはみとめられなかったことから、メラトニン投与は全身の成長速度にはほとんど影響しなかったと考えられた。

(1) 血中 LH 濃度測定

生後 29 日齢では血中 LH 濃度は両群ともに低く、差はみとめられなかった。生後 35 日齢でも平均値に有意な差はみとめられなかったが、コントロール群においてのみ血中 LH の上昇した個体がみとめられた(図2)。メラトニン投与により LH 分泌、も

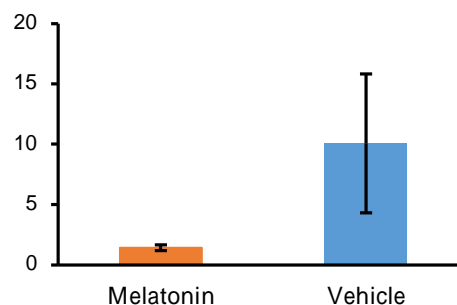


図2. 生後 35 日の LH 濃度

しくは LH 分泌を促進する性腺刺激ホルモン放出ホルモンの分泌が抑制された可能性が考えられたが、単に思春期開始の個体差を反映している可能性も排除できない。

(2) 卵巣組織

生後 35 日齢の卵巣重量に群間差はみとめられなかった。また、両群とも卵巣内には成熟卵胞がみとめられた (図 3)。これらの結果は、先行研究にしたがって設定した本研究のメラトニン投与条件ではメラトニンによる性腺抑制作用が十分ではなかった可能性を示唆している。

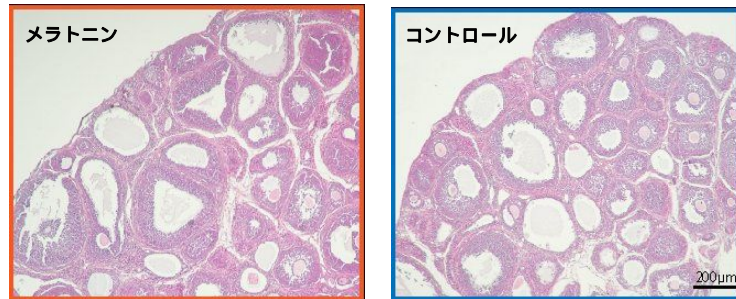


図 3. 生後 35 日の卵巣 HE 染色像

(3) 視床下部におけるキスペプチン発現解析

生後 29 日齢では AVPV、ARC のどちらの神経核においても、Kiss1 mRNA 発現細胞数にメラトニン投与群とコントロール群との間で有意な差はみとめられなかった。生後 35 日齢においても両神経核で Kiss1 mRNA 発現細胞に統計的に有意な差はみとめられなかったが、AVPV における Kiss1 mRNA 発現細胞数がコントロール群と比較してメラトニン投与群で少ない傾向があった (図 4)。これらの結果から、本研究で投与されたメラトニンによるキスペプチン抑制効果はみとめられなかった。AVPV のキスペプチンニューロンはエストロゲンによるポジティブ・フィードバック制御を受け、排卵時の LH サージ状分泌に働く集団であると考えられていることから、幼若期のメラトニン上昇が性成熟後の排卵の過程に影響する可能性が考えられた。

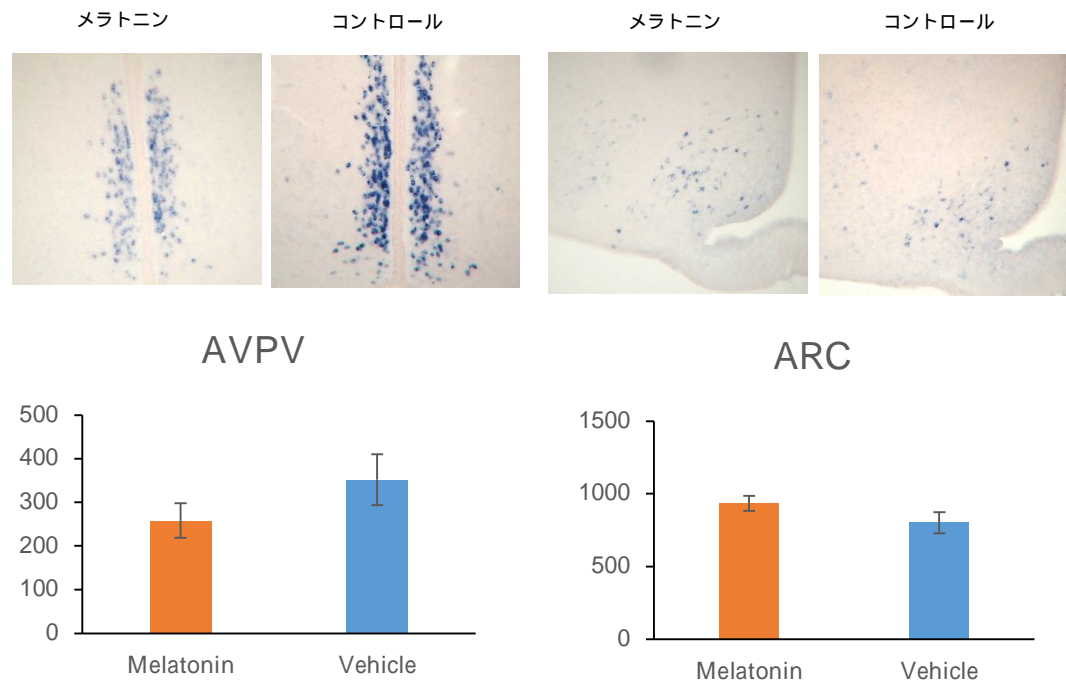


図 4. 生後 35 日における Kiss1 mRNA 発現細胞数

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 託見健
2. 発表標題 幼若期にメラトニンを投与されたラットのキスペプチンニューロン数の解析
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 託見健、岩田衣世、小澤一史	4. 発行年 2023年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 3
3. 書名 CLINICAL NEUROSCIENCE Vol.41 No.06	

1. 著者名 國村有弓、託見健	4. 発行年 2023年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 3
3. 書名 CLINICAL NEUROSCIENCE Vol.41 No.10	

〔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

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
---------	---------