

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09516

研究課題名（和文）キスペプチンを中心とする生殖機能制御機構の解明

研究課題名（英文）Study for reproductive regulatory mechanisms centered on kisspeptin

研究代表者

折出 亜希（ORIDE, AKI）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・講師

研究者番号：00423278

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：卵巣の顆粒膜細胞によって産生される抗ミュラー管ホルモン（AMH）は視床下部にも発現しており、GnRH発現を増加させた他、negative feedback中枢の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した。さらに、卵巣を摘出しnegative feedback機構が働いているラットに性ステロイドホルモン投与すると、下垂体では特徴的な変化を引き起こされた。またヒト卵胞の顆粒膜細胞を用いた実験では、卵胞のサイズによりE2濃度は有意に差を認めたと、Kiss-1及びKiss-1受容体遺伝子発現には差を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視床下部-下垂体-性腺軸におけるキスペプチンの作用とその制御機構の一端を解明することができた。

研究成果の概要（英文）：Anti-Mullerian duct hormone (AMH), which is produced by ovarian granulosa cells, is also expressed in the hypothalamus. AMH increased GnRH expression and had inhibitory effects on kisspeptin expression in the negative feedback center, KNDy neurons. Furthermore, administration of sex steroid hormones to rats whose ovaries had been removed and in which the negative feedback mechanism was active induced characteristic changes in the pituitary gland. In the experiment using granulosa cells of human follicles, E2 levels differed significantly depending on follicle size, but not on Kiss-1 or Kiss-1 receptor gene expression.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：キスペプチン 視床下部 下垂体 卵巣

1. 研究開始当初の背景

女性の生殖機能は視床下部-下垂体-性腺軸により制御される。視床下部で産生された性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) は下垂体門脈に放出され、下垂体前葉にあるゴナドトロピン産生細胞に作用しゴナドトロピンである Luteinizing hormone (LH) と Follicle-stimulating hormone (FSH) が分泌される。LH、FSH は卵巣における性ホルモン産生と卵胞発育、排卵を調節する。元来 GnRH が HPG axis の最上位に位置すると考えられてきたが、視床下部キスペプチンニューロンの発見により、キスペプチンが GnRH ニューロンの働きを支配していることが明らかになってきた。

視床下部から律動的に分泌された GnRH により下垂体前葉からゴナドトロピンが放出されると、卵巣では卵胞が発育し、性ステロイドであるエストラジオール (E_2) の合成が増加する。この増加した E_2 により positive feedback がおこると GnRH がサージ状に分泌され、これに伴う LH サージにより排卵が誘起される。この feedback 機構にもキスペプチンは重要な役割を果たしている。キスペプチンニューロン (Kiss-1 ニューロン) はげっ歯類では 2 つの異なる視床下部領域に局在する。弓状核 (ARC) にある Kiss-1 ニューロンはニューロキニン B、ダイノルフィン A を同時に発現し、KNDy ニューロンとして GnRH パルス分泌及び negative feedback を制御するといわれている。一方、前腹側室周囲核 (AVPV) にある Kiss-1 ニューロンは E_2 の positive feedback を仲介し、GnRH のサージ状分泌を誘起すると考えられている。またキスペプチン及びキスペプチン受容体 (Kiss-1 受容体) は下垂体にも存在し、ゴナドトロピンとプロラクチン発現に関与していることを私たちは報告している。キスペプチンとその受容体は卵巣においても発現がみられるが、その生理的役割については明らかではない。

2. 研究の目的

女性生殖機能制御の中心となるのは視床下部 Kiss-1 ニューロンとその下流にある GnRH ニューロン、その影響下にある下垂体ゴナドトロピンである。しかしその枢軸は様々な因子の作用を受けている。本研究では、視床下部キスペプチンニューロンが如何なる因子の影響下にあるのか、また HPG axis を構成する下垂体あるいは卵巣における末梢性のキスペプチンが何によって制御され、どの様な役割を果たしているのかを明らかにすることを目的とした。視床下部、下垂体、卵巣に発現していることが知られている抗ミュラー管ホルモン (AMH)、アクチビン、インヒビン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) とキスペプチンとの関連に焦点をあてて研究を行なった。HPG 軸の最終点は卵胞発育、性ステロイドホルモン産生である。そのためキスペプチンやキスペプチンに作用するとされている生理活性物質が E_2 発現にどのように影響するかについても合わせて検討を行なった。

3. 研究の方法

研究 1) AMH, GnRH についてマウス視床下部 AVPV 由来 Kiss-1 発現モデル細胞 (mHypoA50 細胞)、Kiss-1、ニューロキニン B、ダイノルフィン A を共発現している ARC 由来の KNDy ニューロンモデル細胞 (mHypoA55 細胞) を用いて実験を行なった。AMH, GnRH 発現についてリアルタイム PCR 法、ウエスタンブロットング法にて検討を行なった。

研究 2) 下垂体ゴナドトロピン α 、LH β 、FSH β サブユニット、GnRH 受容体、Kiss-1 受容体、インヒビン、アクチビンの発現が卵巣の有無でどのように変化するかは 7 週齢のメスラットの卵巣を摘出し検討した。さらに卵巣摘出ラットに性ステロイドホルモンを投与した際にこれらの発現がどのように変化するか検討した。

研究 3) 体外受精の採卵時に採取した顆粒膜細胞におけるキスペプチン、アロマトラーゼ、GnRH、PACAP とその受容体発現をリアルタイム PCR にて検討した。また卵胞液中の E_2 、 P_4 、 E_2 代謝産物 2-メトキシエストラジオール (2-ME) 値及び卵子の有無との関係について検討した。

4. 研究成果

研究 1) AVPV 由来の mHypoA-50 細胞と ARC 由来の mHypoA-55 細胞を AMH で刺激し Kiss-1 及び GnRH 発現について検討した。両細胞を AMH で刺激すると Kiss-1 発現は変化しなかったが、GnRH 発現が有意に増加した。ARC 由来の mHypoA-55 細胞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。mHypoA-55 細胞におけるキスペプチン受容体、ニューロキニン B、ダイノルフィン 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。

研究 2) 卵巣摘出(OVX)ラットでは下垂体内の α 、LH β 、FSH β サブユニットの mRNA 発現が対照(偽手術)ラットと比較して有意に増加したが、これは E₂ 補充によって完全に抑制された。また、男性ホルモンであるジヒドロテストステロンを投与すると、OVX ラットでは α 、LH β 、FSH β サブユニット発現の増加が抑制された。下垂体内の GnRH 受容体の発現は OVX ラットで有意に増加し、この増加は E₂ 補充により完全に抑制された。Kiss-1 受容体の発現は卵巣摘出によって変化しなかった。下垂体内のインヒピン、 β A、 β B サブユニット発現は卵巣摘出により変化しなかったが、フォリスタチン遺伝子発現は卵巣摘出により増加し、この増加は卵巣摘出後の E₂ 補充により完全に抑制された。下垂体ゴナドトロピン産生モデル細胞(L β T2 細胞)を用いた実験では、フォリスタチン自体は LH β 、FSH β サブユニット発現を調節せず、GnRH によるこれらの遺伝子の発現上昇はフォリスタチン存在下で阻害された。

研究 3) 体外受精の採卵時の卵胞直径 12mm 未満を小卵胞、12mm 以上を大卵胞とし卵胞液を回収した。患者 3 名計 29 個の卵胞から卵胞液を回収した。卵子が存在したものは大卵胞 60%、小卵胞 55.6%であった。顆粒膜細胞における Kiss-1、GnRH、Kiss-1 受容体、GnRH 受容体、PACAP 遺伝子発現は卵胞の大小で有意差はなかった。アロマターゼ及び PACAP 受容体遺伝子発現は小卵胞に比べて大卵胞で有意に低かった。卵胞液中の E₂ 値は小卵胞に比べ大卵胞で有意に高かった。卵子の有無で E₂ 値に差を認めなかった。卵胞液中の P₄、2-ME 値も大卵胞で有意に高く、卵子の有無で差を認めなかった。2-ME は卵巣での血管新生や性ホルモン合成、顆粒膜細胞の増殖分化に関与している。今回の研究では E₂、P₄、2-ME 値は小卵胞に比べ大卵胞で高値であったが全て卵子の有無には関係しなかった。またアロマターゼ、PACAP 受容体遺伝子発現は卵胞サイズで相違がみられ、卵胞発育への関与が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kanasaki Haruhiko, Tumurbaatar Tuvshintugs, Cairang Zhouma, Tumurgan Zolzaya, Oride Aki, Okada Hiroe, Kyo Satoru	4. 巻 2022
2. 論文標題 Impact of One-Week Administration of Dihydrotestosterone in Rat Anterior Pituitary Gland	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2022/9525227	査読の有無 無
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 Hiroe, Kanasaki Haruhiko, Tumurbaatar Tuvshintugs, Tumurgan Zolzaya, Oride Aki, Kyo Satoru	4. 巻 20
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 Reproductive Biology and Endocrinology	6. 最初と最後の頁 91
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 無
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 Kanasaki Haruhiko, Tumurbaatar Tuvshintugs, Tumurgan Zolzaya, Oride Aki, Okada Hiroe, Kyo Satoru	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 Reproductive Sciences	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 Aki, Kanasaki Haruhiko, Tumurbaatar Tuvshintugs, Tumurgan Zolzaya, Okada Hiroe, Kyo Satoru	4. 巻 37
2. 論文標題 Effect of anti-M μ llerian hormone in hypothalamic Kiss-1- and GnRH-producing cell models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gynecological Endocrinology	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 Tuvshintugs、Kanasaki Haruhiko、Tumurgan Zolzaya、Oride Aki、Okada Hiroe、Kyo Satoru	4. 巻 68
2. 論文標題 Effect of anti-Müllerian 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 Endocrine Journal	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

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 HPG axis中枢におけるAMHの作用について
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022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 Kiss-1及びGnRH発現視床下部モデル細胞におけるAMHの作用について
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022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 マウス視床下部Kiss-1ニューロンモデル細胞におけるGnRHとキスペプチンの相互作用について
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 折出亜希、金崎春彦、Tumurgan Zolzaya、Tumurbaatar Tuvshintugs、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94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021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	金崎 春彦 (KANASAKI HARUHIKO) (10325053)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授 (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
---------	---------