

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592473

研究課題名(和文) 中枢神経ペプチドを利用した新しい排卵誘発法の基礎検討

研究課題名(英文) Basic study for new ovulation induction using hypothalamic neuropeptide

研究代表者

松崎 利也 (MATSUZAKI, Toshiya)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：70294692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：多胎発生の少ない新たな排卵誘発法の開発を目的として、排卵障害モデルラットを作成してその機序を検討し、中枢神経ペプチドNKBの作動薬であるsenktideの効果を検討した。成熟雌ラットの背部皮下にletrozole放出型ペレット(0.4 mg/日)を埋め込み、排卵障害モデルラットを作成した。このラットで、PMSG-hCG刺激により排卵が起きることを確認した。また、視床下部後方ブロックにおけるキスペプチンmRNAの発現亢進等がみられた。このモデルラットにsenktide(0.2 mg/日)を浸透圧ミニポンプで連日皮下投与し膣スメアを連日評価したが、性周期の回復は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：We studied the effect of chronic treatment of senktide for recovery of estrous cycle in rat ovulatory disorder model in order to develop new ovulation induction method that has low incidence of multiple pregnancy. We induced rat ovulatory disorder model using letrozol. Letrozol releasing pellets (0.4 mg/day) were placed subcutaneously on the back of 3-week-old female Wistar rats. The estrous cycle was estimated daily by vaginal smear after vaginal opening. These rats did not show estrous cycle and had no corpus lutein and possessed more follicles, showed higher leptin, lower estradiol, higher LH serum levels, higher expression of Kisspeptin mRNA in the posterior hypothalamic area than rats of control group. We placed osmotic minipump that released senktide (0.2 mg/day) for 3 weeks subcutaneously on the back of 8-week-old female rat ovulatory disorder model. Based on assessment of daily vaginal smear, senktide did not recover estrous cycle in the rat ovulatory disorder model.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ペプチド 排卵誘発 排卵障害 ギナドトロピン GnRH 多嚢胞性卵巣症候群 レトロゾール

#### 1. 研究開始当初の背景

排卵障害は不妊原因の30%を占め、その治療として排卵誘発が行われる。排卵誘発の副作用として多胎妊娠の発生が問題となっているが、1900年代に比較すると減少しているものの、最近では減少傾向が無く、新しい排卵誘発法の開発が求められている。排卵誘発による多胎妊娠は多発排卵によるものであり、血中ゴナドトロピン濃度が過剰になるために起きる。これを防ぐには、ゴナドトロピン分泌を調節している GnRH の分泌を適正化することが必要である。

近年、視床下部で GnRH 分泌を調節する新規ペプチドが発見されている。これまでに我々は kisspeptin は GnRH 分泌を促進的に調節する重要な因子であり( )、特に弓状核の kisspeptin は GnRH 分泌と性機能維持に不可欠であることを解明してきた( )。弓状核の kisspeptin ニューロン(KNDy ニューロン)は、ゴナドトロピン分泌に対するネガティブフィードバック作用の主体であり、適正な GnRH 分泌と自然な卵胞発育に重要な役割を担っていると思われる。KNDy ニューロンは Neurokinin B(NKB)、Dynorphin を同時に産生しており、KNDy ニューロンの活動を NKB は促進し、Dyn はそれを抑制する。NKB を雌ラットに脳室内投与すると、KNDy ニューロンのパルス状神経活動、GnRH のパルス状分泌が促進される。また、幼弱ラットに NKB 作動薬である senktide を慢性的に腹腔内投与すると、腔開口が早まる。これらの成績は、NKB/senktide が内因性の GnRH パルス状分泌を促進し、ゴナドトロピン分泌を刺激することを意味している。また、その際に KNDy ニューロンが本来備えているエストロゲンによるネガティブフィードバック機構が保たれていると推測される。以上より、排卵障害患者に対する自然に近い排卵誘発法として NKB 作動薬の senktide を応用できる可能性に着目した。

#### 2. 研究の目的

多胎発生の少ない新たな排卵誘発法の実現に資することを目的として、排卵障害モデルラットを作成してその機序を検討した上で、senktide を慢性的に投与して排卵の回復について検討した。

(1) アロマターゼ阻害剤の letrozol を用い、排卵障害モデルラットを作成し、卵巣障害について検討した。

(2) 排卵障害モデルラットの内分泌的検討を行った。

(3) 排卵障害モデル雌ラットに対する senktide の性周期回復効果の有無を検討した。

#### 3. 研究の方法

(1) Wistar 系成熟雌ラット(6週齢)を、コントロール群(n=3)、Letrozole 投与群(n=3)に群分けした。

コントロール群には letrozole を含まないペ

レットを、letrozole 投与群のラットには letrozole 放出型ペレット(0.4 mg/日)を背部皮下に埋め込み、連日の腔スミアで性周期を評価した。16週齢で PMSG-hCG 刺激を行った。PMSG300 IU(2~4回、投与間隔48~72時間、発情前期になるまで)を投与し、48時間後または発情前期に近い像が見られた時点で hCG150 IU を投与し、3~15時間後に排卵を確認した。排卵の確認は、卵巣の出血点及び輸卵管内の卵の存在を指標とした。

(2) Wistar 系成熟雌ラットを用い、3週齢にレトロゾール除放ペレット(0.4mg/日で溶出)(L群、n=9)、またはコントロールペレット(C群、n=10)を背部皮下に留置した。連日の腔スミア、体重推移を検討し、12週齢で卵巣および子宮重量、卵巣組織、血中ホルモン、視床下部 Kiss1 mRNA 発現を検討した。

(3) 3週齢の Wistar 系成熟雌ラット35匹に2週間(約3周期)の腔スミアを連日実施し、性周期が整である個体を選択し、1.対照群(n=10)、2.letrozol 群(n=10)、3.letrozol+senktide 群(n=10)に分けた。排卵障害モデル作成のための letrozol の投与期間および senktide の作用期間を8週齢からの3週間に調整した。8週齢からの3週間、letrozol(0.4 mg/日)またはコントロール用ペレットを背部皮下に留置し、生理食塩水または senktide(0.2 mg/日)を浸透圧ミニポンプで連日皮下投与した。ポンプ装着中の腔スミアを連日実施し、性周期を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 発情周期は、コントロール群のラットは実験期間を通して4~5日の周期的な発情周期を示した。一方、Letrozol 投与群では、Letrozol 投与から2週間後以降には発情周期が完全に消失した。PMSG-hCG の投与により、コントロール群、Letrozol 投与群ともに、全個体で PMSG-hCG による排卵が見られた。この排卵誘発モデルラットを用い、排卵誘発法の効果を評価できると考えられた。

(2) 発情周期: C群は4~5週齢で最初の発情期が見られ、6~7週齢以降は4~5日の規則的な発情周期を示した。L群は、発情が休止を維持していた。体重:L群は、6週齢以降体重が有意に重かった。卵巣および子宮重量:L群の卵巣は有意に重く、子宮は有意に軽かった。卵巣形態:L群では多数の嚢胞性の卵胞が見られ、顆粒膜層は薄く、黄体は見られなかった。血中ホルモン:L群ではT、レプチンが有意に高く、Eは有意に低かった。また、LHが有意に高く、FSHはC群と有意差がなかった。視床下部 Kiss1 mRNA 発現:前方ブロックではC群と差がなく、後方ブロックでは有意に高かった。

これらの結果から、letrozol 誘発 PCOS モデルラットでは、LH 過剰分泌に弓状核 KNDy ニューロンにおけるキスペプチンの発現亢進が関与していることが示唆された。

(3) 8週齢から11週齢までの腔スミア、12週

齡の卵巣所見で、letrozol 群、letrozol+senktide 群は同様に排卵周期が障害されており、卵巣所見も同様であった。senktide 投与は、letrozol 誘発排卵障害モデルの卵巣機能を回復させることができなかった。

以上のように、letrozol による排卵障害モデルを作成し、中枢神経ペプチド NKB の作動薬である senktide を投与して検討したが、性周期の回復作用はみられなかった。今後の検討の可能性として、排卵障害モデルの変更、senktide の投与量を増量、senktide 以外の中枢神経ペプチドアナログの使用などにより検討を行う余地があると思われる。

<引用文献>

Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Shimizu F, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Decreased expression of kisspeptin mediates acute immune/inflammatory stress-induced suppression of gonadotropin secretion in female rat. *J Endocrinol Invest.* 2008 Jul;31(7):656-659.

Matsuzaki T, Iwasa T, Kinouchi R, Yoshida S, Murakami M, Gereltsetseg G, Yamamoto S, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Fasting reduces the kiss1 mRNA levels in the caudal hypothalamus of gonadally intact adult female rats. *Endocr J.* 2011;58(11):1003-1012

#### 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 20 件)

1. Iwasa T, Matsuzaki T, Munkhzaya M, Tungalagsuvd A, Yamasaki M, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. The effects of prenatal undernutrition and postnatal high-fat diet on hypothalamic Kiss1 mRNA and serum leptin levels. *Int J Dev Neurosci.* 査読有, 2015 May;42:76-79.
2. Matsuzaki T, Iwasa T, Munkhzaya M, Tungalagsuvd A, Kawami T, Murakami M, Yamasaki M, Yamamoto Y, Kato T, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Developmental changes in hypothalamic oxytocin and oxytocin receptor mRNA expression and their sensitivity to fasting in male and female rats. *Int J Dev Neurosci.* 査読有, 2015 Apr;41:105-109.
3. 松崎利也、松井寿美佳、岩佐 武、苛原 稔 月経不順と女性医療 特集 女性医療について フジメディカル出版 査読無、Vol.1/No.1/2014, 25-31 平成 26 年 11 月 10 日発行
4. 松崎利也、岩佐 武、苛原 稔 アディポサイトカインとゴナドトロピン

分泌 HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY 査読無、VOL.21 NO.3 2014.9,31-37

5. Iwasa T, Matsuzaki T, Munkhzaya M, Tungalagsuvd A, Kawami T, Murakami M, Yamasaki M, Kato T, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Prenatal exposure to glucocorticoids affects body weight, serum leptin levels, and hypothalamic neuropeptide-Y expression in pre-pubertal female rat offspring. *Int J Dev Neurosci.* 査読有, 2014 Aug;36:1-4.
6. 松崎利也 PCOS におけるメトホルミン療法 産科と婦人科 査読無、2014 年 7 月号 第 81 巻 7 号 851-857
7. Matsuzaki T, Iwasa T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Kawami T, Yamasaki M, Murakami M, Kato T, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. The responses of hypothalamic NPY and OBRb mRNA expression to food deprivation develop during the neonatal-prepubertal period and exhibit gender differences in rats. *Int J Dev Neurosci.* 査読有, 2015 Apr;41:63-67.
8. Iwasa T, Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Kawami T, Niki H, Kato T, Kuwahara A, Uemura H, Yasui T, Irahara M. Hypothalamic Kiss1 and RFRP gene expressions are changed by a high dose of lipopolysaccharide in female rats. *Horm Behav.* 査読有, 2014 Jul;66(2):309-316.
9. Iwasa T, Matsuzaki T, Munkhzaya M, Tungalagsuvd A, Kawami T, Murakami M, Yamasaki M, Kato T, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Pre-pubertal serum leptin levels and sensitivity to central leptin injection of prenatally undernourished female rats. *Int J Dev Neurosci.* 査読有, 2014 Jun;35:52-54.
10. Niki H, Matsuzaki T, Kinouchi R, Iwasa T, Kawami T, Kato T, Kuwahara A, Irahara M. Improvement in diagnostic performance of the revised total testosterone measuring system in Japanese women with polycystic ovary syndrome. *J Med Invest.* 査読有, 2014;61(1-2):65-71.
11. Iwasa T, Matsuzaki T, Munkhzaya M, Tungalagsuvd A, Kawami T, Murakami M, Yamasaki M, Kato T, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Changes in the responsiveness of hypothalamic

- prokineticin 2 mRNA expression to food deprivation in developing female rats. *Int J Dev Neurosci*. 査読有, 2014 May;34:76-78.
12. Iwasa T, Matsuzaki T, Kinouchi R, Gereltsetseg G, Murakami M, Munkhzaya M, Altankhuu T, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Changes in central and peripheral inflammatory responses to lipopolysaccharide in ovariectomized female rats. *Cytokine*. 査読有, 2014 Jan;65(1):65-73.
  13. 松崎利也 インスリン抵抗性を持つ多嚢胞性卵巣症候群患者の診断とメトホルミン療法の適応の検討 *日本産科婦人学会雑誌* 第65巻 第12号、査読無、2698-2708 2013年12月
  14. 松崎利也、岩佐 武、苜原 稔 新たに開発されたアーキテクト・テストステロンIIの性能評価と多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)の診断における有用性の検討 *医学と薬学* 査読有、70巻20号・331-339、2013年8月
  15. Iwasa T, Matsuzaki T, Kinouchi R, Gereltsetseg G, Murakami M, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Developmental changes in the responsiveness of hypothalamic ER alpha mRNA levels to food deprivation. *Neuro Endocrinol Lett*. 査読有、2013;34(6):543-548.
  16. Kinouchi R, Matsuzaki T, Iwasa T, Gereltsetseg G, Nakazawa H, Kunimi K, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Prepubertal exposure to glucocorticoid delays puberty independent of the hypothalamic Kiss1-GnRH system in female rats. *Int J Dev Neurosci*. 査読有, 2012 Sep 11;30(7):596-601.
  17. Gereltsetseg G, Matsuzaki T, Iwasa T, Kinouchi R, Nakazawa H, Yamamoto S, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Delay in the onset of puberty of intrauterine growth retarded female rats cannot be rescued with hypernutrition after birth. *Endocr J*. 査読有, 2012 Nov 30;59(11):963-972.
  18. 木内理世、松崎利也、松井寿美佳、中澤浩志、苜原 稔 エクルーシス試薬エストラジオールの基礎的および臨床的有用性についての検討 *医学と薬学* 査読無、68巻2号・2012年8月、319-326
  19. 松崎利也、木内理世、中澤浩志、苜原 稔 OHSSを防ぐ排卵誘発 産科と婦人科 査読無、2012.7号(63号)、875-882
  20. Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Kinouchi R, Gereltsetseg G, Nakazawa H, Yamamoto S, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Effects of lipopolysaccharide exposure at different postnatal time points on the response of LH to homotypic stress in adulthood. *J Reprod Immunol*. 査読有, 2012 Jun;94(2):155-160.
- 〔学会発表〕(計 23 件)
1. 松崎利也 学会賞受賞講演 Fasting reduces the kiss1 mRNA levels in the caudal hypothalamus of gonadally intact adult female rats. 第67回中国四国産科婦人科学会総会ならびに学術講演会 2014年9月13-14日、ANAクラウンプラザホテル宇部(山口県、宇部市)
  2. 松崎利也 PCOSに対する排卵誘発産婦人科臨床懇話会セミナー -不妊治療2014- 2014年8月16-17日、新横浜プリンスホテル(神奈川県、横浜市)
  3. 松崎利也 -排卵誘発Update- 排卵誘発の現状と将来 第66回日本産科婦人科学会学術講演会 2014年4月18-20日、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)
  4. 松崎利也、岩佐 武、Ganbat Gereltsetseg、Munkhsaikhan Munkhzaya、Altankhuu Tungalagsuvd、苜原 稔 多嚢胞性卵巣症候群モデルラットにおけるLH分泌異常の中樞機構の検討 第18回日本生殖内分泌学会学術集会 2013年12月7日、シェーンバツハ・サボー(東京都・千代田区)
  5. 岩佐 武、松崎敏也、木内理世、松井寿美佳、加藤剛志、桑原 章、安井敏之、苜原 稔 生殖関連ホルモン測定系間における測定値の相関に関する検討 第58回日本生殖医学会学術講演会 2013年11月15-16日、神戸国際会議場、神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)
  6. 松崎利也、岩佐 武、Gereltsetseg Ganbat、Munkhzaya Munkhsaihan、Tungalagsuvd Altankhuu、苜原 稔 多嚢胞性卵巣症候群モデルラットにおけるLH分泌異常の機序の検討 第58回日本生殖医学会学術講演会 2013年11月15-16日、神戸国際会議場、神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)
  7. 松崎利也、岩佐 武、Ganbat Gereltsetseg、Munkhsaikhan Munkhzaya、Altankhuu

- Tungalagsuvd, 苛原 稔 多嚢胞性卵巣症候群モデルラットにおける LH 分泌異常の中樞機構の検討 第 66 回中国四国産科婦人科学会総会ならびに学術講演会 2013 年 9 月 21-22 日、ザ クラウンパレス新阪急高知(高知県・高知市)
8. 木内理世、松崎利也、松井寿美佳、中澤浩志、岩佐 武、苛原 稔 新しいエストラジオール測定キットの基礎的及び臨床的検討 第 65 回日本産科婦人科学会学術集会 2013 年 5 月 10-12 日、札幌プリンスホテル(北海道・札幌市)
  9. 中澤浩志、松崎利也、岩佐 武、木内理世、苛原 稔 雌ラット発情周期における視床下部 RFRP mRNA の発現の変動に関する検討 第 65 回日本産科婦人科学会学術集会 2013 年 5 月 10-12 日、札幌プリンスホテル(北海道・札幌市)
  10. 松崎利也 シンポジウム：多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)の病因・病態と管理 -インスリン抵抗性を持つ多嚢胞性卵巣症候群患者の診断とメトホルミン療法の適応の検討- 第 65 回日本産科婦人科学会学術集会 2013 年 5 月 10-12 日、札幌プリンスホテル(北海道・札幌市)
  11. 岩佐 武、松崎利也、苛原 稔 雌ラットにおける卵巣摘出後のストレス反応の変化についての検討 第 86 回日本内分泌学会学術集会 2013 年 4 月 25-27 日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)
  12. 松崎利也 シンポジウム：中樞と性腺の機能制御に関する最近の話題 -胎性期の低栄養が成長後の性機能と視床下部 kisspeptin に及ぼす影響- 第 57 回日本生殖医学会学術講演会 2012 年 11 月 8-9 日、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)
  13. 中澤浩志、松崎利也、岩佐 武、木内理世、Gereltsetseg Ganbat, 苛原 稔 成熟期の LPS に対する LH 抑制の反応性は、生後早期の LPS 投与により最終的な影響を受ける 第 57 回日本生殖医学会学術講演会 2012 年 11 月 8-9 日、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)
  14. Gereltsetseg Ganbat, Toshiya Matsuzaki, Takeshi Iwasa, Riyo Kinouchi, Hiroshi Nakazawa, Minoru Irahara. RFRP mRNA expression during estrous cycle in the rat hypothalamus. 第 57 回日本生殖医学会学術講演会 2012 年 11 月 8-9 日、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)
  15. 松崎利也 特別講演：多嚢胞性卵巣症候群の病態に基づく診断と治療 第 126 回近畿産科婦人科学会学術集会、2012 年 10 月 7 日、リーガロイヤルホテル(大阪府・大阪市)
  16. 中澤浩志、松崎利也、木内理世、ガンバット ゲレルチエチエグ、岩佐 武、苛原 稔 発達期の雌雄ラット視床下部における RFRP,RFRP 受容体の発現推移に関する検討 第 45 回四国産科婦人科学会学術講演会 2012 年 7 月 14 日、総合あんしんセンター(高知県・高知市)
  17. Toshiya Matsuzaki , Ganbat Gereltsetseg , Takeshi Iwasa , Riyo Kinouchi , Hiroshi Nakazawa , Minoru Irahara. Delay in the Onset of Puberty of Intrauterine Growth Retarded Female Rats Cannot Be Rescued with Hypernutrition after Birth. The Endocrine Society's 94<sup>th</sup> Annual Meeting & Expo Jun 23-26 , 2012 , George R, Brown Convention Center (Houston , Texas, USA)
  18. Hiroshi Nakazawa , Toshiya Matsuzaki , Takeshi Iwasa , Riyo Kinouchi , Ganbat Gereltsetseg , Minoru Irahara. Early Postnatal Lipopolysaccharide Exposure : Effects on Adult Male Rat LH Response to Homotypic Stress. The Endocrine Society's 94<sup>th</sup> Annual Meeting & Expo Jun 23-26 , 2012 , George R, Brown Convention Center (Houston , Texas, USA)
  19. 岩佐 武、松崎利也、苛原 稔 シンポジウム：GnIH、キスペプチン/メタスチンによる性腺機能調節 -胎性期の低栄養がキスペプチン/メタスチンに及ぼす影響- 第 85 回日本内分泌学会学術総会 2012 年 4 月 19-21 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
  20. 中澤浩志、松崎利也、岩佐 武、木内理世、苛原 稔、筒井和義 発達期の雌雄ラット視床下部における、RFRP 発現の変動と性ステロイドの影響に関する検討 第 85 回日本内分泌学会学術総会 2012 年 4 月 19-21 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
  21. 松崎利也 モーニングセミナー：よくわかる排卵誘発剤の使い方 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 2012 年 4 月 13-15 日、神戸国際会議場、神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)
  22. 中澤浩志、松崎利也、岩佐 武、木内理世、苛原 稔 発達期のラット視床下部における RFRP 発現の変動と性ステロイドの影響に関する検討 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会

2012年4月13-15日、神戸国際会議場、神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

研究者番号：20160070

23. Ganbat Gereltsetseg, Toshiya Matsuzaki, Takeshi Iwasa, Riyo Kinouchi, Hiroshi Nakazawa, Minoru Irahara The effect of neonatal nutritional condition on the timing of puberty in normal and IUGR female rats 第64回日本産科婦人科学会学術講演会 2012年4月13-15日、神戸国際会議場、神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計 1 件)

1. 岩佐 武、松崎利也、苛原 稔 「A 月経異常と関連疾患 6. 体重減少性月経および神経性食欲不振症の診断と治療」婦人科診療ハンドブック 中外医学社 査読無、2014年7月15日発行、29-34

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松崎 利也 (MATSUZAKI, Toshiya)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・准教授  
研究者番号：70294692

### (2) 研究分担者

苛原 稔 (IRAHAHA, Minoru)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授