

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790259

研究課題名(和文) 男性型不妊にかかわるバソプレッシン受容体異常の研究

研究課題名(英文) Adverse effects of vasopressin receptor deficiency on the male reproductive defect

研究代表者

土屋 裕義 (Tsuchiya, Hiroyoshi)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：80508755

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)：バソプレッシンV1a受容体欠損マウスを用いた分娩観察の結果、メスのV1a受容体が欠損している場合のみ産仔数減少や分娩の開始時間の遅延、総分娩時間の延長などの変化が観察され、オス親や胎仔の遺伝子型には依存しなかった。また、生殖組織を用いたin situ hybridization解析の結果からV1a受容体はオスの生殖組織では精巣上体を始め多くの組織の間質に強い発現が見られることが分かった。また、メスでは卵巣や子宮での発現が観察された。これらの結果はV1a受容体がオスメスの両方において生殖生理に関わっていることを示すものであり、病態解明への重要な知見を示すものである。

研究成果の概要(英文)：In vasopressin V1a receptor deficient mice, we observed the decrease of the number of birth, delay of the initiation of parturition, and the prolongation of the duration of labor. These changes were dependent on the maternal genetic background of mice, rather than paternal or fetal genetic background. We also revealed by in situ hybridization analyzes with male reproductive organs that there were intense V1a receptor expressions in bladder, testis, vas deference and epididymis, most of which were interstitial tissue. In female reproductive organs, V1a receptor was also observed in ovary and uterus. These results suggest that V1a receptor has important roles in male and female reproductive physiology and could provide important information in the elucidation of the pathophysiology associated with vasopressin.

研究分野：分子薬理学

キーワード：バソプレッシン V1a受容体 精巣上体 子宮 分娩

1. 研究開始当初の背景

これまでバソプレッシンやオキシトシンは雌性生殖器、すなわち子宮や卵巣への作用が注目され臨床薬物の開発も行われてきたが、雄性生殖器への作用については依然として不明な点が多い。そこで本研究では雄性生殖機能に注目してバソプレッシン受容体の機能解明を目的とする。バソプレッシンは9つのアミノ酸から構成されるペプチドホルモンで、脳下垂体後葉から血液中に分泌された後、末梢のさまざまな組織で作用を発揮する。その作用は特異的なG蛋白質共役7回膜貫通型受容体(GPCR)を介して発揮されるが、現在サブタイプとしてV1a、V1b、V2の3種類の受容体が知られている。これらの受容体は組織特異的に分布し、抗利尿作用のほか血管収縮作用や子宮収縮作用といった生理作用をそれぞれ制御していることがわかっている。またこれまでの研究の蓄積から、これらの受容体に作用するアゴニスト・アンタゴニストが開発され、実際にその一部は臨床的な薬物として使用されている。

バソプレッシンに類縁なホルモンとしてオキシトシンがあるが、オキシトシンもバソプレッシン同様9つのアミノ酸から構成されるペプチドホルモンで、脳下垂体後葉から血液中に分泌され作用を示す。オキシトシンの特異的な受容体にオキシトシン受容体(OTR)があり、この受容体を介してオキシトシンは子宮収縮作用や射乳作用を発揮することがわかっている。

これらのバソプレッシンとオキシトシンは構造的類似性に由来する受容体の交差反応が顕著に見られ、内因性リガンドだけでなく特異的なアゴニスト・アンタゴニストとして開発された薬物でさえ互いの受容体に及ぼす影響が少なくなく、これがリガンドとその受容体の個々の作用の解析を困難なものとしてきた(Akerlund et. al. 1999 Br. J. Obstet. Gynaecol. 106, 1047)。そこでより詳細な受容体固有の機能を解析するツールとしてV1a、V1b受容体遺伝子欠損マウスが作成されさまざまな生理機能の解析に用いられている。

2. 研究の目的

これまでバソプレッシンやオキシトシンの女性の生殖生理への作用に関する研究は盛んに行われ、分娩に深く関与することが示されている。妊娠末期のエストロゲン刺激が引き金となり子宮でのオキシトシン存在量とOxtr発現量が増大する。その結果、下流のシグナルを活性化させ直接的に、あるいはプロスタノイド産生を誘導して間接的にカルシウム流入を引き起こし、子宮を収縮させ分娩に至る。また、この子宮収縮にはV1a受容体も関与していることが示唆されている。こうした知見を応用することで、現在臨床ではオキシトシンは陣痛促進剤として利用され、バソプレッシンのアンタゴニストは早産治

療薬として用いられている。

しかしその一方で男性の生殖生理に対するバソプレッシンの解析はほとんど行われておらず、どのような作用を持つかに関する情報は極めて少ない。そんな中、Guptaらはラットやウサギを用いて、雄性生殖器側の精子分泌時にオキシトシンがV1a受容体を介して作用することを示唆するデータを報告した(Gupta et.al. 2008 Br. J. Pharm 155, 118)。実際に精巣においてV1a受容体は高発現していることが知られており、何らかの形で雄性生殖器に作用を及ぼすことは以前から知られていた(Howl et. al. 1995 Endocrinol. 136, 2206)。つまり精子の射出は生殖器官内の平滑筋組織の収縮により起こるため、子宮と同様の収縮制御機構が機能することで精子排出を制御している可能性が想定される。そこで申請者らはバソプレッシンやオキシトシンの雄性生殖生理に注目し、受容体欠損マウスを用いることでラットやウサギで得られた知見を更に詳細な解析へと深化させ、雄性生殖生理のメカニズムを明らかにしていく。

3. 研究の方法

申請ではこれまで解析が殆ど行われてこなかったバソプレッシン受容体の男性生殖生理に注目して総体的に解析を進めていく。はじめに、予備検討で観察された産仔数の減少についてより詳細な検討を行い、生殖生理におけるV1a受容体の役割について精査する。その上で、これまで明らかとなっていないV1a受容体の組織分布の解析を行い、異常の原因となる組織の同定を行う。

組織学的解析

まず精巣や胎盤においてバソプレッシンV1a受容体欠損マウスで顕著な組織異常がないかを精査する。また、精子そのものについても形態学的異常の有無を検出する。さらに、これらの組織におけるバソプレッシン受容体やオキシトシン受容体の発現に関する解析も進めていく。これまでの解析から精巣における遺伝子発現は知られているが、具体的にその中のどこに存在するかなどの詳細な検討は行われておらず、機能との連関が取れていない。より詳細な検討のためには特異的な抗体が不可欠であるが、バソプレッシンV1a受容体には特異的な抗体が存在せず、これまで組織内の受容体分布の解析を困難としてきた。そこで申請者らはまずバソプレッシンV1a受容体に特異的な抗体作成を速やかに進め、その抗体を用いて組織分布を明らかにしていく。また、特異的な抗体が生成困難な場合を想定し、in situ hybridizationでのmRNA発現分布の検討を並行して進める。

生理学的解析

予備検討で観察されたV1a受容体欠損マウスでの産仔数の減少をあらゆる観点か

ら精査し、原因の特定を目指す。また、バソプレッシン受容体 V1a 欠損マウスの解析から、バソプレッシンの作用が消失しても産仔数はゼロにならないことから、バソプレッシンが特定のシグナルの効果を減弱させる、あるいはバソプレッシン受容体が消失した場合の代償経路が存在することを示唆している。すなわち、受容体の機能不全の障害でもこの代償経路の刺激を行うことにより機能回復が図れることが予想される。そこで、バソプレッシン V1a 受容体発現細胞がどのような特性を持つ細胞なのかまたどのような因子が関わっているのか解析を行う。このとき組織内においてバソプレッシン V1a 受容体が発現する特定の細胞のみを選別して採取する必要があることから、解析にはシングルセル発現プロファイル解析の方法を応用し、特定の細胞のみを単離しアッセイを行う。こうして同定した候補に対して、バソプレッシン V1a 受容体欠損マウスにその因子の刺激薬などを投与することにより、産仔数の回復が図れるかどうか薬物開発を見据えて研究を行う。

4. 研究成果

組織学的解析

当初の計画通り、マウスの雄性生殖器におけるバソプレッシン受容体ならびにオキシトシン受容体の発現について解析を行った。これまでの報告には生殖生理にかかわる組織でのバソプレッシン受容体などの発現分布を詳細に比較解析したものは存在しない。そこでバソプレッシン受容体である V1a, V1b V2 の 3 種類、ならびにオキシトシン受容体 (Oxtr) のオス生殖器 (精巣、精巣上部、精囊、前立腺、膀胱、凝固腺、輸精管、陰茎) における発現を PCR で解析を行った。その結果、バソプレッシン V1a 受容体の発現は精巣、精囊、凝固腺、輸精管、陰茎で弱い発現が見られ、精巣上部と膀胱で強い発現が観察された。同様にしてオキシトシン Oxtr 受容体について発現解析をしたところ精巣、精巣上部、精囊、凝固腺、輸精管で発現が観察され、特に凝固腺で顕著な発現が認められた。また、バソプレッシン V1b 受容体は膀胱、凝固腺にわずかに発現が観察され、バソプレッシン V2 受容体は精囊、凝固腺、陰茎に比較的強い発現が観察された。このように、それぞれ類縁な受容体であるが固有の発現パターンを示し、受容体ごとに異なる生理機能に関与していることが考えられる。

次に発現が検出された組織において、より詳細な発現分布を *in situ hybridization* 法によって解析を行った。今回ターゲットとしている V1a 受容体やオキシトシン受容体は発現量が少なく、その少なさが故に *in situ hybridization* 法による検出を困難としていた。今回はその問題点を克服すべく高感度の Z 型オリゴプローブ法を用いた *in situ hybridization* を行い、組織での受容体発現分

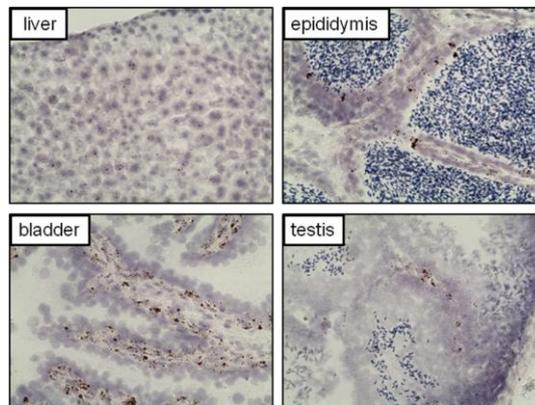


図 1、雄性生殖器における V1a 受容体の発現分布 (茶色)

布解析を可能にした。今回の解析の結果からは雌雄生殖器における特徴的な分布が明らかとなっている。まず雄性生殖器では、輸精管の筋層内と精囊にわずかな分布が確認された。一方で、精巣や精巣上部では間質に強い発現があることが分かった。特に精巣上部では initial segment の部分で強い発現が観察された。雌性生殖器では卵胞や卵管にわずかな分布が見られた。また、非妊娠時の子宮では子宮筋層と子宮筋に囲まれた動脈に発現が観察された。他にも生殖器ではないが、膀胱にも顕著な発現が観察され、これは既報で膀胱に強い発現が見られることとも一致する。これらの結果は組織の収縮に関与する細胞での発現が特徴的である。V1a 受容体のこれまでの解析から機能的に示唆されていた

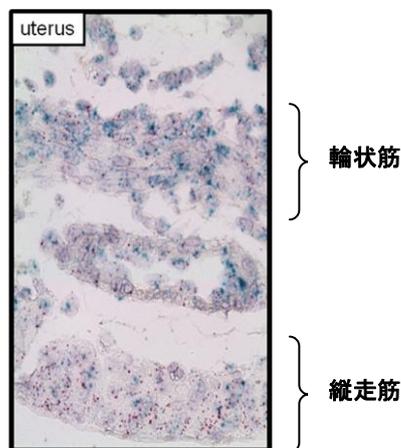


図 2、雌性生殖器における V1a 受容体 (赤) とオキシトシン受容体 (青) の発現分布

ように、血管に発現していることは血圧調節に V1a 受容体が関わることに一致するし、輸精管への発現は精子輸送に関与するという報告と一致する。また子宮筋の発現も *in vitro* での収縮能を示した報告と一致し、これまでオキシトシン受容体欠損マウスで観察されなかった分娩異常の理由が V1a 受容体による補償機構である可能性を示唆するものである。一方で、精巣や精巣上部、卵胞での発現はこれまで相当する報告が無く未知の機能の存在を示唆している。

これまでの報告から、V1a 受容体ならび

にオキシトシン受容体は、子宮収縮に重要な役割を持つことが示されている。実際にオキシトシン受容体は妊娠後期にかけて発現増加し、一方の V1a 受容体は発現変動はないと報告されている。そこでマウスにおける妊娠時期と発現変動を調べたところ、ヒトなどと同様にオキシトシン受容体は妊娠後期にかけて子宮での発現が増加する傾向が観察された。しかしながら一方で V1a 受容体は発現変動が見られないことが分かった。これはバソプレッシン受容体やオキシトシン受容体の発現変化が種を超えて保存されていることを意味している。

生理学的解析

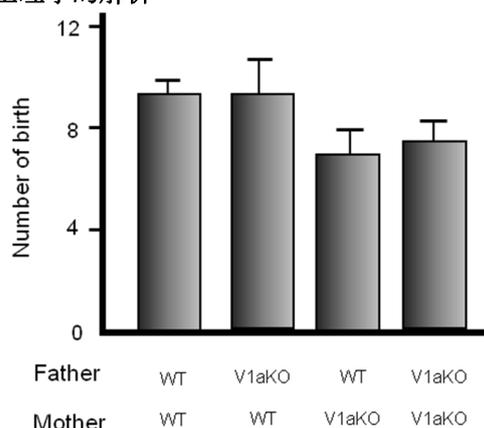


図 3、V1a 受容体欠損マウスでの産仔数減少

今回の研究に先だって行った解析から、バソプレッシン V1a 受容体欠損マウスで産仔数の減少が観察されていた。そこで、それがオスとメスのどちらに由来する障害なのか解析を進めた。また、それに不随して V1a 受容体欠損マウスの分娩能についても持続的な収録を通して詳細な解析を行った。野生型マウスと V1a 受容体欠損マウスのオスとメスについて、それぞれのホモとヘテロの 4 通りの組み合わせの交配を行い生殖機能の異常を観察したところ、野生型のメスを用いた群では産仔数の減少は観察されず、V1a 受容体欠損マウスを用いた群でのみオスの遺伝子型にかかわらず産仔数減少が見られた。また、分娩の開始時間や総分娩時間についてもメスが V1a 受容体欠損マウスを用いた群に限り、遅延や延長が観察された。このことは当初の予想とは異なり、V1a 受容体欠損マウスで観察された生殖異常はオスではなくメス側の因子に依存していることがわかる。また、胎仔が V1a 受容体遺伝子を持つ場合も母体の遺伝子型に依存して障害が見られることから、観察された異常は受精卵や胎仔に由来するものでもないことが示唆された。

これらの結果をまとめると、オスの生殖組織では精巣上体を始め多くの組織で V1a 受容体の発現が見られることが分かった。それらの多くは間質に発現していることが in situ hybridization の結果から明らかとなった

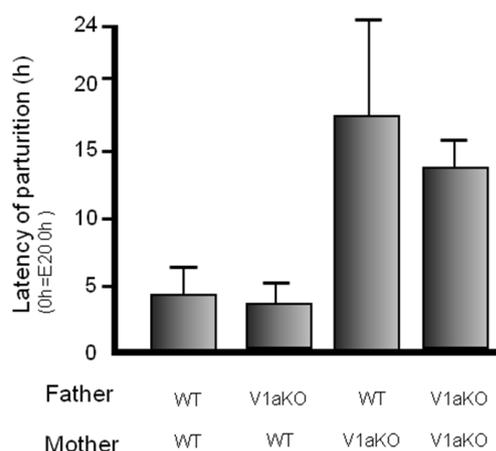


図 4、V1a 受容体欠損マウスでの分娩遅延

が、生理的解析の検討から単独欠損で生殖行動異常を誘導できるほど大きな役割を担っているとは言い難いことがわかった。ただし、高発現が見られていることから今回検討した尺度とは違った観点から解析を行うことで、その役割を解明することができのかもしれない。一方で、メスではこれまで議論のあった子宮での発現がしっかりと確認されている。妊娠期依存的な発現誘導はないものの、組み合わせ交配を用いた実験から、分娩中のメスで V1a 受容体が重要な役割を担うことが明らかとなっている。また In vitro での実験から特定のペプチドが V1 受容体を特徴的に制御しうることも明らかにした。これらのことは機序が十分に解明されていない臨床薬の作用にもつながる重要な知見であると考えている。今回の結果については、現在データをまとめて論文投稿をする準備をしている。

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)

Kazune Arai, Aki Kashiwazaki, Yoko Fujiwara, Hiro Yoshi Tsuchiya, Nobuya Sakai, Katsushi Shibata, Taka-aki Koshimizu; Pharmacological lineage analysis revealed the binding affinity of broad-spectrum substance P antagonists to receptors for gonadotropin-releasing peptide; European Journal of Pharmacology 2014, 749, 98-106 DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.01.001

査読有

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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

土屋 裕義 (TSUCHIYA HIROYOSHI)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：80508755

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：