

主論文の要旨

Kisspeptin in the Hypothalamus of 2 Rat Models of Polycystic Ovary Syndrome

〔 2種類之多嚢胞性卵巣症候群モデルラットにおける
表現型の相違と視床下部キスペプチンとの関連 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

大須賀 智子

【緒言】

キスペプチンは 1996 年にその遺伝子が同定されたペプチドであり、当初はがん転移の抑制遺伝子として注目されていた。その後、キスペプチンレセプターである GPR54 を欠損した家系では性成熟発来が認められないことや、キスペプチンが GnRH 分泌を直接刺激すること、キスペプチンニューロンが性ステロイドレセプターを発現していることなどが示され、現在では GnRH 分泌の上位調節機構として、性成熟や生殖機能の維持に関与しているとされる。げっ歯類の視床下部では、キスペプチンニューロンは視床下部の弓状核 (ARC: arcuate nucleus) と前腹側室周囲核 (AVPV: anteroventral periventricular nucleus) に局在することが示されている。これらキスペプチンニューロンは、性ステロイドレセプターを発現し、卵巣からのフィードバック制御を中継するとされる。とくに、AVPV がポジティブフィードバックを、ARC がネガティブフィードバックを中継する。さらに、ARC のキスペプチンニューロンは、キスペプチンの他に、ニューロキニン B (NKB) とダイノルフィンを共発現し、KNDy ニューロンと呼ばれる。NKB はキスペプチンを正に制御し、ダイノルフィンは負に制御するとされている。

多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS: polycystic ovary syndrome) は、性成熟期女性の 5-10% に認められる疾患である。多嚢胞性卵巣、排卵障害による不妊、高アンドロゲン血症、高 LH 血症の他、インスリン抵抗性や肥満といった代謝異常も呈する。PCOS の病態はこのように複雑であるため、その病因の詳細は不明であり、現在の治療法は対症療法のみで根本的な治療法は確立されていない。この複雑な PCOS の病態を解明するため、様々な動物モデルの作製が試みられてきた。高アンドロゲン血症に着目したモデルでは、性成熟期前や胎生期に DHT (dihydrotestosterone) などのアンドロゲンを投与するモデルがある。これらのモデルの中には卵巣の形態異常や性周期の異常、高 LH 血症など、PCOS 様の表現型を示すものも報告されている。一方で、GnRH/ LH パルスジェネレーターである ARC のキスペプチンや、それを制御する NKB についての評価をしたものは少ない。

この論文では、胎生期、または出生後に DHT を投与することにより PCOS モデル動物を作成し、その表現型とキスペプチンとそれに関連する因子の発現変化の関連を明らかにすることを目的とした検討を行った。

【方法】

ウィスター系ラットを用い、生後 21 日目に DHT ペレット (50 μ g/body/日、90 日間リリース) の皮下埋没投与を行った出生後投与モデル、および、妊娠 16-19 日の母獣に対し DHT 3mg/日、4 日間の皮下注射投与を行い、出生仔を解析する胎生期投与モデルを作成した。それぞれプラセボペレットまたは vehicle の投与によりコントロールを作成した。各モデルとも体重の変化や性成熟期に腔スミアによる性周期の評価を行った後、14-16 週齢の発情休止期に屠殺し、血清ホルモン値、卵巣の形態評価、ARC、AVPV におけるキスペプチンとその関連因子の発現解析を行った。

【結果】

性周期の評価では、両モデル共に、排卵障害を示す性周期の異常を呈した。卵巢の形態学的評価では、出生後投与モデルにおいて、いずれの発育段階の卵胞もコントロールに比して低下傾向を示した。一方で、胎生期投与モデルでは、正常発育を示す胞状卵胞数と黄体数が減少し、異常形態を示す胞状卵胞が増加するという多嚢胞性卵巢様の所見が得られた (Figure 1.)。血清ホルモン値については、コントロールに比して、出生後投与モデルでプロゲステロン値が有意に低値であったが、ヒトの PCOS で認められる LH 値の上昇は示さなかった。一方、胎生期投与モデルでは、LH 値がコントロールに比して有意に高値であった (Figure 2.)。さらに、ARC における免疫染色によるキスペプチン発現の解析では、出生後投与モデルでは有意な変化は認められなかったが、胎生期投与モデルでは、とくに吻側～中央の ARC においてキスペプチン陽性細胞の増加が認められた。ARC のキスペプチンは卵巢から分泌される性ステロイドホルモンのフィードバック制御をうけることから、エストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプターの免疫染色による評価を行ったが、いずれのモデルでもこれら性ステロイドレセプターの陽性細胞数に変化は見られなかった。そこでさらに、ARC のキスペプチンニューロンにおいてキスペプチンと共発現し、その発現を正に制御するとされるニューロキニン B (NKB) についても免疫染色による評価を行ったところ、胎生期投与モデルでは ARC 中央部において NKB 陽性細胞の増加が認められた (Figure 3.)。

【考察】

本研究では、出生後と胎生期の DHT 投与による PCOS モデルについて表現型と視床下部弓状核におけるキスペプチンとその関連因子の発現についての比較・評価を行った。アンドロゲンである DHT の直接的な影響を反映する出生後投与モデルでは、体重の増加や発育卵胞数の減少、黄体数の減少を示したが、ヒト PCOS にみられる高 LH 血症は再現できなかった。他方、出生前投与モデルでは、異常形態卵胞数の増加、黄体の減少、性周期の異常から排卵障害が示唆され、さらに血清 LH 値の上昇も示し、よりヒト PCOS に近い表現型が得られた。また、このモデルでは体重増加は示されなかった。PCOS は多様な症状を示す病態であり、肥満も主徴のひとつであるが、実際の出現率は 50%程度であるとされる。今回のモデル動物の表現型の比較から、肥満を呈する PCOS では高アンドロゲン血症とインスリン抵抗性が病態において重要な役割を担っており、肥満を呈しない PCOS では、高 LH 血症が病態の主要な要因となっている可能性が示唆される。

また、視床下部の評価では、出生前投与モデルにおいて、ネガティブフィードバック中枢である弓状核におけるキスペプチン陽性細胞の増加を認め、血清 LH 値の増加と矛盾しない結果となった。一方で、出生後投与モデルでは、キスペプチン陽性細胞数の有意な変化は認めなかった。さらに出生前投与モデルでは、キスペプチンを正に制御する NKB の陽性細胞数の増加を認めた。これら視床下部における変化が、とく

に非肥満型の PCOS 様の表現型に寄与している可能性がある。

近年、モデル動物またはヒト PCOS における卵巣組織や末梢血細胞の解析から、DNA のエピジェネティックな変化と PCOS の関連が指摘する報告が散見される。一方で、胎生期環境と成人期における疾患の関わりがエピジェネティック機構により示されつつある。これらから、胎生期 DHT 投与モデルにおけるキスペプチンや NKB の変化に、エピジェネティック機構が関連する可能性も考えられるが、これを明らかにするにはさらなる検討が必要である。

【結語】

出生後または胎生期に DHT を投与することにより作成した PCOS ラットモデルの比較では、後者の方が多嚢胞性卵巣様の所見や血清 LH 値上昇など、よりヒトの PCOS に近い表現型を示した。胎生期 DHT 投与モデルにおいて、免疫染色により、ARC におけるキスペプチン発現の増加が示され、PCOS 様の表現型と関連する可能性が示唆された。