

オレキシンの生殖機能抑制作用に関する作用機序についての検討

尾形 理江¹⁾, 松崎 利也¹⁾, 清川麻知子²⁾, 岩佐 武¹⁾, 清水 扶美¹⁾, 田中 尚子¹⁾, 苛原 稔¹⁾

1) 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部発生発達医学講座女性医学分野

2) 徳島市民病院

背景

ダイエットによる体重減少で無月経が起きるように、摂食行動と生殖機構は密接に関連しているが、両者を結びつける機構は明らかではなかった。近年、分子生物学、分子遺伝学的手法を用いた研究により摂食行動を調節する物質が発見され、それらが性機能に影響を及ぼすことが報告されるようになってきた。

1998年に未知のG蛋白質共役受容体に対するリガンドとして同定されたオレキシンは摂食促進作用をもっており [1], 絶食により摂食中枢として知られる視床下部外側野 (LHA) とその周辺に発現する。強力な摂食促進物質であるNeuropeptide Y (NPY) が存在する視床下部の弓状核 (ARC) や室傍核 (PVN) 周辺へオレキシンの神経投射がみられ [2], NPYのY1受容体拮抗薬によってオレキシンの摂食促進作用が低下することから、オレキシンの摂食促進作用の一部はNPYを介することが明らかになっている [3]。オレキシンの生殖機能への影響に関して、われわれは卵巣摘出後ラットを用いてオレキシンが視床下部レベルでGnRHの pulsatile 分泌を抑制することを報告した [4]。オレキシンのGnRH分泌抑制作用に関しては、オレキシンが齧歯類ではGnRH産生細胞が存在する視索前野 (POA), 中隔核群 (septal nuclei) に神経投射していることから、GnRHニューロンへの直接作用が考えられ、また、ARCやPVNにも神経投射し、GnRH分泌を抑制する作用をもつNPYニューロンやβエンドルフィンの前駆体であるproopiomelanocortin (POMC) を神経支配している [5-7] ことから、これらの神経ペプチドを介して間接的に作用している可能性も考えられる。

今回われわれは、NPYおよびβエンドルフィンが、オレキシンのGnRH分泌抑制作用に関与しているかを明

らかにするために卵巣摘出ラットを用いて検討した。

方法

1) 実験動物

実験動物は、ウイスター系成熟雌ラットを用いた。8週齢時に、ペントバルビタール (40mg/kg) の腹腔内投与による麻酔下に、両側卵巣を摘出した。10週齢時、ペントバルビタール (50mg/kg) 腹腔内投与による麻酔下に、定位固定装置を用いて第3脳室内への投与針を留置した。11週齢時、ケタミンおよびキシラジン (20:5 mg/kg) の腹腔内投与による麻酔下に、外頸静脈より右心房内ヘシリコンチューブを留置し、翌日下記の実験を行った。

2) NPYの関与の有無に関する実験

①摂食実験：暗期にオレキシンA3nmolまたは生理食塩水5μlを第3脳室内へ投与し、投与後2時間の摂食量を測定した。

②生殖実験：明期に、オレキシンA投与の10分前にNPY抗体5μlまたは生理食塩水5μlを前処置として脳室内投与した後、オレキシンA3nmolまたは生理食塩水5μlの脳室内投与を行った。2時間にわたり、6分毎に右心房内カテーテルより採血を行い、採血と同時に生理食塩水を静脈内投与した。

検討群は、Group C (n=9)：生理食塩水脳室内投与前処置および生理食塩水脳室内投与、Group O (n=8)：生理食塩水脳室内投与前処置およびオレキシンA脳室内投与、Group ON (n=8)：NPY抗体脳室内投与前処置およびオレキシンA脳室内投与の3群とした。

3) βエンドルフィンの関与の有無に関する実験

オレキシンA3nmol, オレキシンB3nmolまたは生理食塩水5μlを第3脳室内へ投与し、投与後2時間にわたり、6分毎に右心房内カテーテルより採血を行った。採血と同時に、ナロキソン (0.5mg/kg/h) または生理食塩水を静脈内投与した。

連絡先：尾形理江, 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部発生発達医学講座女性医学分野,
〒770-8503 徳島市蔵本町2-3-5
TEL: 088-633-7177
FAX: 088-631-2630
E-mail: oga@clin.med.tokushima-u.ac.jp

検討群は、Group 1 (n=7)：生理食塩水脳室内投与および生理食塩水静脈内投与、Group 2 (n=8)：生理食塩水脳室内投与およびナロキソン静脈内投与、Group 3 (n=7)：オレキシシンA脳室内投与および生理食塩水静脈内投与、Group 4 (n=7)：オレキシシンA脳室内投与およびナロキソン静脈内投与、Group 5 (n=8)：オレキシシンB脳室内投与および生理食塩水静脈内投与、Group 6 (n=8)：オレキシシンA脳室内投与およびナロキソン静脈内投与の6群とした。

4) 血中LH濃度の測定と統計処理

検体は、ただちに血清を分離し-40℃で冷凍保存した。後日、血清LH値をRIAにて測定し、LHパルス状分泌の平均値、頻度、振幅につき検討した。LHパルスの判定基準は、平均LH値付近での測定内変動係数の2倍以上の上昇とした。血清LH濃度は、ラジオイムノアッセイキット (Amersham Bioscience社製) を用いて測定した。統計解析は、ANOVAを用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

成績

1) NPYの関与の有無

暗期における脳室内投与後2時間の摂食量は、コントロールであるGroup Cの $0.81 \pm 1.01g$ (mean \pm SD)に比べ、オレキシシンAを投与したGroup Oでは有意に ($p < 0.05$) 多かった (図1)。NPY抗体を前処置した後、オレキシシンAを投与したGroup ONの摂食量はGroup Oよりも有意に少なく ($p < 0.05$)、オレキシシンAによる摂食促進効果が完全に解除されていた。

LHパルス状分泌の頻度と振幅を解析結果したところ、オレキシシンAを脳質内投与したGroup Oでは、Group Cに比べてパルス状分泌の頻度が有意に少なく ($p <$

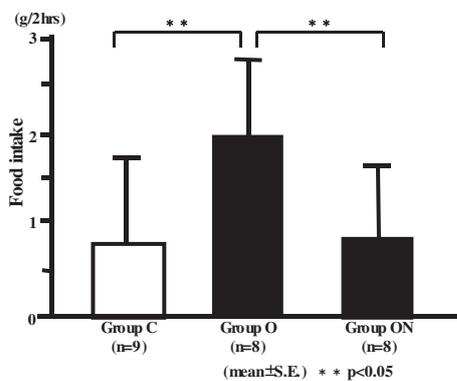


図1 脳室内投与後2時間の摂食量

0.01), NPY抗体を前投与した後にオレキシシンAを投与したGroup ONでは、Group Oと比べてパルス状分泌の頻度が有意に ($p < 0.05$) 多かった (図2)。しかし、Group ONのLHパルス状分泌の頻度は、Group Cと比べると有意に ($p < 0.05$) 少なく、オレキシシンAのLHパルス状分泌抑制効果はNPY抗体により解除されるが、完全ではないと考えられた。パルス状分泌の振幅は各群で有意差を認めなかった。脳室内投与後の血中LH濃度の推移を脳室内投与前のLHの値を100%として解析した (図3)。オレキシシンAを投与したGroup Oでは、30分後

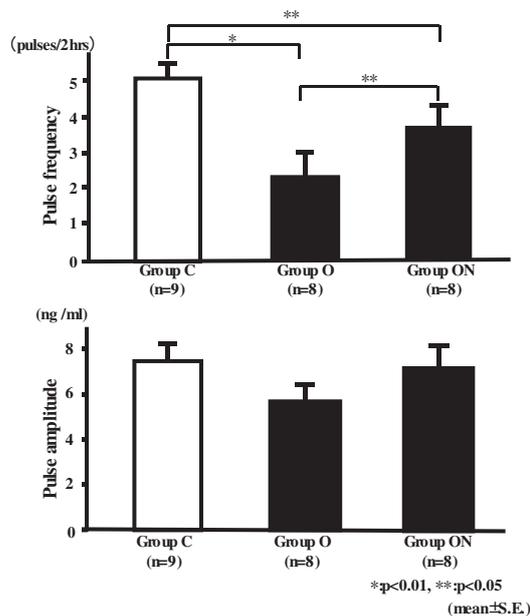


図2 脳室内投与後のLHのパルス状分泌の頻度と振幅

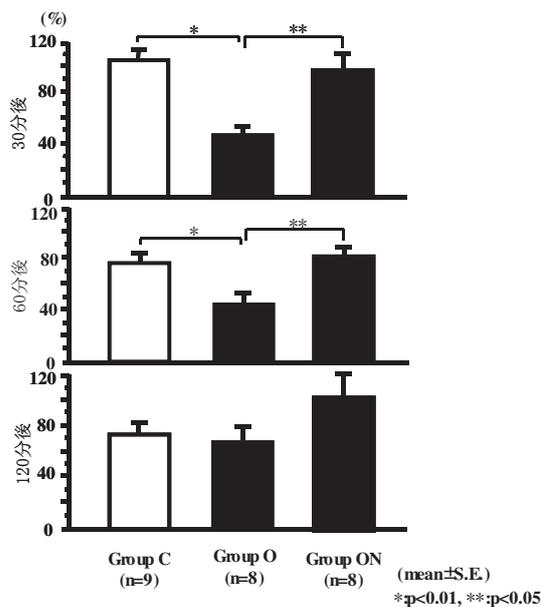


図3 脳室内投与後の血中LH濃度の推移 (投与前の値を100%とした)

および60分後の血中LH濃度はGroup Cに比べて有意に ($p < 0.01$) 低かった. NPY抗体を前投与したGroup ONでは, 30分後および60分後で, 血中LH濃度がO群に比べて有意に ($p < 0.05$) 高かった. 120分後のLH濃度は各群に有意差を認めず, 今回の単回投与量では, 効果の持続が一時間程度と考えられた.

2) β エンドルフィンの関与の有無

LHパルス状分泌の解析結果を図4および図5に示した. 間欠的にナロキソンを静脈内投与したGroup 2は, 平均LH値, LHのパルス頻度にコントロール(Group 1)と差異はなかった. オレキシンAを投与したGroup 3では, コントロールに比べて平均LH値が有意 ($p < 0.01$) に低く, LHのパルス状分泌の頻度も有意 ($p < 0.01$) に少なかった. オレキシンAとナロキソンを同時に投与したGroup 4では, オレキシンAのみを投与したGroup 3に比べて平均LH値が有意 ($p < 0.01$) に高く, LHのパルス状分泌の頻度も有意 ($p < 0.01$) に多かった. しかし, LHのパルス状分泌の頻度はコントロールに比べると有意 ($p < 0.01$) に少ない頻度であった. オレキシンBのみを投与したgroup 5でも, 平均LH値が有意 ($p < 0.05$) に低く, LHのパルス状分泌の頻度も有意 ($p < 0.05$) に少なかった. オレキシンBとナロキソンを同時に投与したgroup 6は, group 5と差異を認めなかった. LHパルス状分泌の振幅には差異を認めなかった.

考 察

オレキシンの前駆体であるprepro-orexin mRNAの発現は, 48時間絶食後のラットで絶食前に比べ約2.5倍に上昇し, 産生されたオレキシンは視床下部弓状核の

NPYを介して摂食促進作用を発揮する [1]. その他, 自発運動量の亢進や覚醒レベルの増加など, オレキシンは多彩な生理作用を有するが, 本研究では性機能抑制作用とその経路について検討を行った.

本研究で卵巣摘出後ラットの脳室内にオレキシンを投与したところ, 摂食量を増加させる作用が確認され, 同時にLHのパルス状分泌は強く抑制された. オレキシンのLH分泌に対する抑制作用は, 脳室内投与後ただちに現れ, 約1時間にわたって持続していた. パルス状分泌の頻度が低下していることから, オレキシンは視床下部のGnRH分泌を抑制していると考えられた. NPY抗体の前処置により, オレキシンAの摂食促進作用は完全に解除され, 一方, LHのパルス状分泌抑制作用は部分的に解除された. このことから, オレキシンAの摂食促進作用はほぼ完全にNPYを介し, GnRHパルス状分泌抑制作用は, 部分的にNPYを介することが示唆された.

摂食およびエネルギー調節に重要な役割を果たしているARCのNPYニューロンは, GnRHニューロンの存在するPOAへ神経投射していることが形態学的に証明されており, medial basal hypothalamus (MBH)にも直接的に神経投射し, GnRHの産生および放出を調節していることが推察されている [9]. 一方, GnRHの株細胞であるGT-1細胞にはNPY Y1受容体が存在し [10], NPY受容体のサブタイプのうち, Y1とY4がLHの放出を促進することが報告されている [11]. In vivoにおいては, NPYを卵巣摘出ラットへ脳室内投与するとLHのパルス状分泌を抑制するが, E2を前処置した場合, NPYはLH分泌を促進することも報告されている [7]. このように, NPYのゴナドトロピン分泌系に対する作用はエストロゲンの有無で異なると考えられる. オレキシンのゴナドトロピン分泌に対する作用も同様であり, 卵巣摘出ラットに脳室内投与するとLH値 [12] およびLHパルス状分泌が抑制され [4], 卵巣摘出後にE2を補充したラットに脳室内投与するとLH値が上昇し [12], 発情前期のラットから摘出した脳にオレキシンを投与するとGnRH分泌が促進される [13]. 以上のように, NPYとORXはともにエストロゲンの存在によって性腺系への影響が変化する点でも共通性があり, オレキシンのGnRHへの作用がNPYを介していることを支持している.

NPYは強力な摂食促進物質であり, オレキシン以外にもレプチンや, 迷走神経由来の延髄からの神経投射などの多様な情報を統合することで体内のエネルギー状態を認識し, 食欲を調節する重要な役割を担っている. 個体生命の維持と種の保存にとって, 生殖機能は, エネル

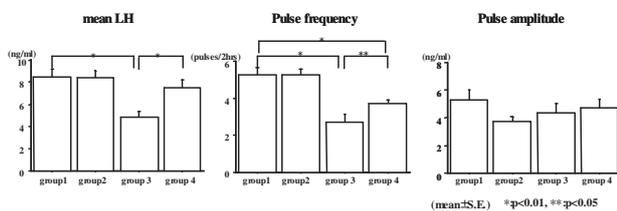


図4 脳室内投与後の平均LH, LHのパルス状分泌の頻度と振幅(オレキシンA)

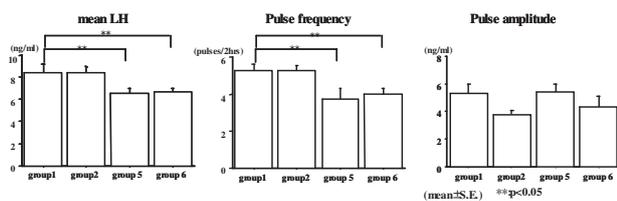


図5 脳室内投与後の平均LH, LHのパルス状分泌の頻度と振幅(オレキシンB)

ギー状態が良好な時に活性化され、不良の場合には抑制されることが好ましく、事実、絶食状態の雌動物では、性周期が抑制され [14]、性行動も抑制される [15]。したがって、NPYのように栄養状態の情報を統合するニューロンからの情報は性機能の調節に重要な意味をもつと考えられ、今回のわれわれのデータもそのことを支持している。

一方、内因性オピオイドの β エンドルフィン β はGnRHの抑制系として働いている。 β エンドルフィンの拮抗薬であるナロキソン (NAL) は、 β エンドルフィンが活性化されている状況下でGnRHの抑制を解除する効果をもつが、本研究でオレキシンAとNALの同時投与で平均LH濃度はほぼコントロールと同等にまで回復し、パルス状分泌の頻度も若干は回復した。この結果より、オレキシンAのLHパルス状分泌抑制作用は一部 β エンドルフィンを介していることが示唆された。一方、オレキシンBのLHパルス状分泌抑制作用はNALの同時投与により解除できず、オレキシンBによるGnRH分泌抑制作用には、 β エンドルフィンは関与していないと考えられる。GnRH分泌を調整する重要な因子としては、 β エンドルフィン、NPYの他、CRHがあり、オレキシンにはCRHを介した作用経路が存在する可能性や、直接的にGnRH分泌を抑制する可能性も考えられ、今後さらなる検討が必要と考えられる。

結 論

摂食調節物質オレキシンは、体内のエネルギー状態の欠乏をNPYに伝える因子のひとつであり、オレキシンの摂食促進作用とGnRH抑制作用はともにNPYを介していることが明らかになった。また、GnRH抑制作用には β エンドルフィンを介する経路も存在していた。オレキシンを含めた摂食調節系から性機能調節系へのクロストークシグナルは、生体の生殖機能が適した時期に行われるために重要であると考えられる。

文 献

1. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998) Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92, 573-585.
2. Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M (1999) Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 748-753.
3. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1999) Orexins and orexin receptors: A family of orexin receptors: Implication in feeding behavior. *Regul Pept* 85, 25-30.
4. Tamura T, Irahara M, Tezuka M, Kiyokawa M, Aono T (1999) Orexins, orexigenic hypothalamic neuropeptides, suppress the pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized female rats. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 759-762.
5. Horvath TL, Diano S, van den Pol AN (1999) Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: A novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci* 19, 1072-1087.
6. Dyer RG, Mansfield H, Corbet H, Dean ADP (1984) Fasting impairs LH secretion in female rats by activating an inhibitory opioid pathway. *J Endocrinol* 105, 91-97.
7. McDonald JK, Lumpkin MD, DePaolo LV (1989) Neuropeptide-Y suppresses pulsatile secretion luteinizing hormone in ovariectomized rat: possible site of action. *Endocrinol* 125, 186-191.
8. Gindoff PR, Ferin M (1987) Endogenous opioid peptides modulate the effect of corticotropin-releasing factor on gonadotropin release in the primate. *Endocrinol* 121, 837-842.
9. Li C, Chen P, Smith MS (1999) Morphological evidence for direct interaction between arcuate nucleus neuropeptide Y (NPY) neurons and gonadotropin-releasing hormone neurons and the possible involvement of NPY Y1 receptors. *Endocrinol* 140, 5382-5390.
10. Besecke LM, Wolfe AM, Pierce ME, Takahashi JS, Levine JE (1994) Neuropeptide Y stimulates luteinizing hormone-releasing hormone release from superfused hypothalamic GT1-7 cells. *Endocrinol* 135, 1621-1627.
11. Jain MR, Pu S, Kalra PS, Kalra SP (1999) Evidence that stimulation of two modalities of pituitary luteinizing hormone release in ovarian steroid-primed ovariectomized rats may involve neuropeptide Y Y1 and Y4 receptors. *Endocrinol* 140, 5171-5177.
12. Pu S, Jain MR, Kalra PS, Kalra SP (1998) Orexins, a novel family of hypothalamic neuropeptides, modulate pituitary luteinizing hormone secretion in an ovarian steroid-dependent manner. *Regul Pept* 78, 133-136.
13. Russel SH, Small CJ, Kennedy AR, Stanley SA, Seth A, Murphy KG, Taheri S, Ghatei MA, Bloom SR (2001) Orexin A interaction in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrinol* 142, 5294-5302.
14. Tropp J, Markus EJ (2001) Effects of mild food deprivation on the estrous cycle of rats. *Physiol Behav* 73, 553-559.
15. Temple JL, Millar RP, Rissman EF (2003) An evolutionarily conserved form of gonadotropin-releasing hormone coordinates energy and reproductive behavior. *Endocrinol* 144, 13-19.