

# ストレス条件下での生殖機能制御におけるグルココルチコイドの役割

松脇 貴志, 山内 啓太郎, 西原 真杉

東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学教室

## はじめに

哺乳類の生殖機能は視床下部・下垂体・性腺軸 (HPG axis) によって制御されているが, ストレス条件下にある個体では, このHPG axisが抑制され, 生殖機能の低下へと繋がる. ストレス刺激により, 視床下部でのGnRHパルスジェネレーター活性 [1, 2] や下垂体からのLHのパルス状・サージ状分泌が抑制されることが報告されている [3-6]. 一方で, ストレス時には視床下部・下垂体・副腎軸 (HPA axis) が活性化され, 副腎からグルココルチコイドが多量に分泌される. これまで, ストレスに誘起されて血中に増加するグルココルチコイドは, 生殖機能に対しては抑制的に働くと考えられてきた [7-10]. しかしながら, 筆者らは過去の研究から, 炎症性サイトカインの一種である腫瘍壊死因子 (TNF)  $\alpha$  によるLHのパルス状・サージ状分泌の抑制が, グルココルチコイドにより逆に緩和されることを見出した [11, 12]. TNF  $\alpha$  の血中濃度は感染初期相において増加する [13, 14]. 感染ストレス条件下では, 免疫系細胞から放出されたサイトカインの情報が脳内ではプロスタグランジン (PGs) によって仲介されることが知られている. われわれの過去の研究から, TNF  $\alpha$  によるGnRHパルスジェネレーターの抑制も, PGsによって仲介されることも明らかになっている [15].

われわれは最近, 各種のストレス条件下でグルココルチコイドのHPG axisに対する影響についてさらに検討を行い, グルココルチコイドは脳内のPGsの合成を抑制することによりLHパルスを維持するという新しい知見を得た. 本稿では, このストレス条件下におけるグルココルチコイドの生殖機能保護作用を明らかにするに至った一連の研究について紹介したい.

連絡先: 松脇貴志, 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学教室

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

TEL: 03-5841-5388

FAX: 03-5841-8017

E-mail: aa37166@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

## LH分泌を抑制するストレス刺激

実験的に感染ストレス条件を誘起する方法としては, リポ多糖 (LPS) が頻用される. LPSはグラム陰性菌の膜構成成分であり, TNF  $\alpha$  血中サイトカインの増加などを促し, 投与された個体に感染の初期相に類似した症状を引き起こす [16]. 一方, 飢餓ストレスの実験モデルとしては, 動物を実際に絶食させる方法の他に, インスリンや, グルコースの競合利用阻害剤である2-デオキシグルコース (2-DG) を静脈投与する方法などが広く用いられている [3, 4]. 2-DGは, グルコースの第2位炭素に結合しているヒドロキシル基が水素基に置換されているため, グルコースと同様に細胞内に取り込まれるものの, 糖として利用されない. LPS, 2-DGいずれも, 一定量以上を投与することでLH分泌の抑制効果がみられることが報告されている [2-4]. 体内に薬物を投与して作り出される上記の2つの条件以外にも, LH分泌を抑制するストレス刺激として, 狭い容器内や板の上などで体の自由を奪う, 拘束ストレスなどが知られている. これら3種類のストレス条件下すべてにおいて, HPA axisは活性化して, 副腎からのグルココルチコイド分泌量は上昇する.

一方, ラットの頸静脈にカニューレを留置することで, 薬物の投与・連続採血を無拘束条件下で行うことが可能である. この手法を用いて, 両側の卵巣を摘出 (OVX) した雌ラットから5分毎に採血を行ってLH濃度を測定すると, 1時間に2~3回のLHパルスが観察される. 本研究ではOVXラットに加えて, 両側の卵巣および副腎を摘出 (OVX/ADX) したラットを用いた. なお, このラットには, コルチコステロンを充填したシリコンチューブを皮下に埋め込むことで, 基底レベルのグルココルチコイドを維持している. OVX/ADXラットにおいてもOVXラットと同様の正常なLHパルスが観察され, このことから, 非ストレス条件下では内因性グルココルチコイドはLHパルスに対して影響をもたないことが確認された.

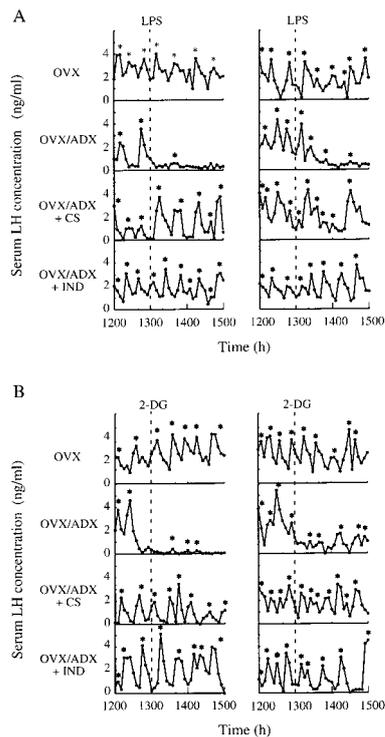


図1 感染・飢餓ストレス条件下におけるLHパルス  
採血は5分毎に行い、開始から1時間でLPS (0.5mg/kg, i.v.) (A) もしくは2-DG (100mg/kg, i.v.) (B) を静脈投与した。コルチコステロン (CS, 25mg/kg, s.c.) およびインドメタシン (IND, 10mg/kg, i.v.) は、それぞれLPS投与と同時に処置した。  
\* PULSARプログラムにより認定されたパルス。文献23より引用

### ストレスによるLHパルス抑制に対する グルココルチコイドの影響

感染ストレス刺激としてLPS (0.5mg/kg), 飢餓ストレス刺激として2-DG (100mg/kg) をそれぞれ静脈投与した。その結果LPSと2-DGはどちらも、LHのパルス状分泌に対して、副腎を摘出していないOVXラットにおいては影響を与えなかったのに対し、OVX/ADXラットではほぼ完全に抑制した(図1 A, B)。この結果から、LHのパルス状分泌にとって、感染・飢餓両ストレス条件下で正常な分泌を維持するために、副腎が重要な役割をもつことが示唆された。さらに、ストレス負荷時にコルチコステロン (25mg/kg) を皮下投与して、ストレス条件下でのOVXラットの血中コルチコステロンと同程度まで血中濃度を高めると、OVX/ADXラットでもパルスの抑制が起こらず正常なLHパルスが維持された。これにより、感染・飢餓ストレス条件下で副腎のもつLHパルス維持作用が内因性のグルココルチコイド濃度の上昇によるものであることが明らかとなった。

拘束ストレス刺激としては、ラットの四肢を1時間、

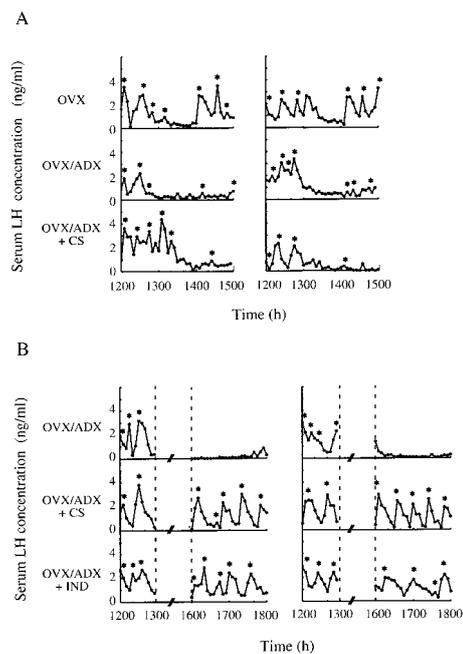


図2 拘束ストレス条件下におけるLHパルス  
採血は5分毎に行い、開始から1時間後の13時から14時まで、ラットの四肢を緊縛した。コルチコステロン (CS, 25mg/kg, s.c.) およびインドメタシン (IND, 10mg/kg, i.v.) は、それぞれ緊縛開始と同時に処置した。12時から15時までの連続採血 (A) もしくは緊縛前の1時間 (12~13時)、緊縛からの解放2時間後から2時間 (1600-1800) (B) に行った。  
\* PULSARプログラムにより認定されたパルス。文献23より引用

板の上で緊縛した。前述の感染ストレス・飢餓ストレス条件とは異なり、拘束ストレス条件下ではOVXラットにおいても、LHパルスの強い抑制が観察された。これは他のグループの報告ともよく一致する結果である[17, 18] が、このOVXラットでは緊縛からの解放後速やかなパルスの回復が見られたのに対し、OVX/ADXラットでは解放後もパルスが回復しなかった(図2 A)。このことから、副腎は拘束ストレス状態においても他の2つのストレスと同様に、LHパルスの維持に重要な役割をもつことが確認された。OVX/ADXラットにおけるLHパルスの抑制は解放後4時間後にも続いていたが、緊縛の開始と同時にコルチコステロンを投与すると、解放2時間後にはほぼ完全に回復していた(図2 B)。

前述の結果と合わせると、グルココルチコイドは、今回用いられたような急性ストレス条件において、そのストレスの種類にかかわらず共通したLHパルス維持機構をもつものと考えられる。グルココルチコイドに関しては、LHパルスに対しては抑制的に働くという報告が多数存在する[7-10]。しかし近年では、LPSによるLHパルスに対する抑制作用にはグルココルチコイドは無関

係であるということが、ラットおよびヒツジを使った実験で報告されている [19, 20]. これらの報告と本研究の結果から、急性ストレス刺激に反応して内因性に放出されるグルココルチコイドは、LHのパルス状およびサージ状分泌に対して抑制的な役割をもつのではなく、むしろ保護的に働くと考えられる。

### ストレスによるLHパルス抑制に対するプロスタグランジンの関与

過去に、われわれの研究グループおよび他のグループによって、PGsが感染ストレス刺激を仲介してLHのパルス状分泌を抑制するという報告がなされている [15, 21]. そこで、他の2つのストレス条件を含めたLHパルス抑制におけるPGsの関与を検討するため、本実験で用いた3種類のストレス条件下で、OVX/ADXラットにストレス負荷と同時にPGs合成阻害剤であるインドメタシンを投与した。その結果、インドメタシンはOVX/ADXラットにおいてすべてのストレス条件下でコルチコステロンと同様のLHパルス保護作用を示した (図1 A, B, 図2 B). このことから、PGsは、感染ストレスの場合と同様に、飢餓ストレス・拘束ストレスにおいても、そのストレス刺激を仲介してLHのパルス状分泌を抑制することが示唆された。そこでわれわれは、ストレス種によらない共通のストレス刺激仲介物質としてのPGsの働きを確認するため、PGsの合成酵素であるCOX-2の脳における発現を、免疫組織化学により検討した。その結果、免疫陽性細胞は、LPS投与群と2-DG

投与群のOVXラットではほとんど確認できなかったのに対し、OVX/ADXラットでは脳血管の細胞や髄膜下の領域に広く観察された。拘束ストレス条件でも、OVXラットよりもOVX/ADXラットの方がCOX-2免疫陽性細胞は著しく多かった(図3)。これらの結果は、LHのパルス状分泌がOVXラットではストレス刺激によってほとんど抑制されず、OVX/ADXラットでは激しく抑制されるという結果とよく一致している。OVX/ADXラットではこのCOX-2によって脳で合成されたPGsが、LHの分泌を抑制したものと考えられる。

PGsの合成がグルココルチコイドによって抑制されることは、広く知られている。グルココルチコイドはリポコルチン-1を誘導してPLA2の活性を抑制することとCOX-2の発現を抑制することで、PGs合成を阻害している [17, 18, 22]. これらの報告の通り、本実験のコルチコステロン処置群でもCOX-2の発現が抑制されていた。したがって、ストレス条件下でのグルココルチコイドによるLH分泌の維持作用は、COX-2の発現を抑制し、PGsの合成を阻害することによりなされているものと考えられる。

### おわりに

グルココルチコイドは、ストレス条件下において、そのストレスの種類にかかわらず副腎から多量に分泌される。一方で、生殖機能は、ストレス条件下では抑制され

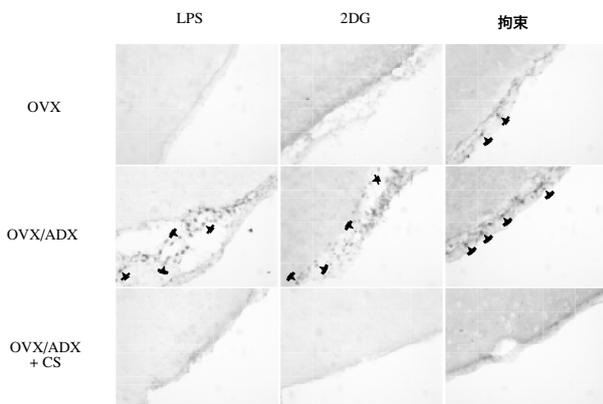


図3 ストレス条件下の脳におけるCOX-2の発現  
LPS (0.5mg/kg) もしくは2-DG (100mg/kg) の静脈投与あるいは拘束解放から1時間で脳を採取し、免疫染色を行った。コルチコステロン (CS, 25mg/kg, s.c.) はLPS・2-DG投与あるいは拘束開始と同時に処置した。矢印はCOX-2免疫陽性細胞を示す。文献23より一部改変

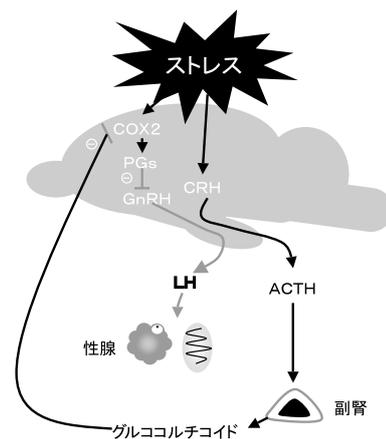


図4 ストレス条件下におけるグルココルチコイドの中枢作用に関する模式図

生体にストレス刺激が加えられると、HPA axisの活性化とHAG axisの抑制が起こる。HPG axisの抑制は、脳内で産生されるPGsによって引き起こされる。しかし、HPA axisの活性化により副腎皮質から放出されたグルココルチコイドによってCOX-2の発現が抑制されるため、PGsの合成が阻害される。その結果、ストレス条件下でも、生殖機能が維持されている。

る。この2つの現象から、グルココルチコイドはストレス時に生殖機能を抑制する役割をもつと考えられてきた。しかし今回の研究で用いた、LHの分泌には影響を与えない低度のストレスによっても、血中のコルチコステロン濃度は上昇していた。ではこのコルチコステロンの働きとは何なのか。本研究において、副腎の摘出により内因性のグルココルチコイドがストレス時にも放出されないラットでは、用いた3種類のストレス条件すべてで、LHのパルス状分泌が強く抑制された。さらにこの抑制は、ストレスにตอบสนองして分泌される内因性のコルチコステロンと同程度のコルチコステロン補充により阻害もしくは緩和された。今回用いた感染・飢餓・拘束の3種類のストレス刺激は、それぞれ免疫系・代謝系・神経系に関わるもので、ストレスの種類としては大きく異なるものである。グルココルチコイドがこの3つのストレス条件下で共通してLH分泌に対する保護的な作用を見せたことは、グルココルチコイドのもつストレス条件下での生殖機能維持作用が、ストレス特異性をもたないものであることを示唆している。本研究ではさらに、PGsがストレス刺激の共通の仲介物質として脳内で生産されて生殖機能を抑制すること、また、グルココルチコイドはこのPGs合成を阻害する事で生殖機能を維持していることを明らかにした。これらの本研究の結論を、図4に模式的に示した。

われわれ人間を含め動物は、自然界で生活する中で強弱さまざまなストレスに曝され、これらのストレス刺激が加えられる度に、HPG axisすなわち生殖機能は侵襲を受ける危機に曝される。本研究で見られたように、LHパルスに影響が見られないようなレベルのストレス条件においても、実は増加したグルココルチコイドが脳内でのPGs合成を抑制することでLHパルスを維持している。ストレス刺激に対してHPA axisが鋭敏に反応し、グルココルチコイドの合成分泌を促すことで、多種多様なストレスが存在する自然界での生殖機能が維持されていると考えられる。

## 文 献

1. Chen MD, Ordog T, O'Byrne KT, Goldsmith JR, Connaughton MA, Knobil E (1996) The insulin hypoglycemia-induced inhibition of gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey : roles of vasopressin and corticotropin-releasing factor. *Endocrinology* 137, 2012-2021.
2. Yoo MJ, Nishihara M, Takahashi M (1997) Involvement of tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates endotoxin induced suppression of gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rat. *Endocrine J* 44, 141-148.
3. Cagampang FR, Cates PS, Sandhu S, Strutton PH, McGarvey C, Coen CW, O'Byrne KT (1997) Hypoglycemia-induced inhibition of pulsatile luteinizing hormone secretion in female rats : role of oestradiol, endogenous opioids and the adrenal medulla. *J Neuroendocrinol* 9, 867-872.
4. Goubillon ML, Thalabard JC (1996) Insulin-induced hypoglycemia decreases luteinizing hormone secretion in the castrated male rat : involvement of opiate peptides. *Neuroendocrinology* 64, 49-56.
5. Hashimoto R, Arita J, Kimura F (1990) LH and PRL secretion in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 122, 540-544.
6. Levine JE, Bauer-Dantoin AC, Besecke LM, Conaghan LA, Legan SJ, Meredith JM, Strobl FJ, Urban JH, Vogelsong KM, Wolfe AM (1991) Neuroendocrine regulation of the luteinizing hormone-releasing hormone pulse generator in the rat. *Recent Prog Horm Res* 47, 97-151.
7. Baldwin DM (1979) The effect of glucocorticoids on estrogen-dependent luteinizing hormone release in the ovariectomized rat and on gonadotropin secretion in the intact female rat. *Endocrinology* 105, 120-128.
8. Briski KP, Sylvester PW (1994) Antagonism of type II, but not type I glucocorticoid receptors results in elevated basal luteinizing hormone release in male rats. *Neuroendocrinology* 60, 601-608.
9. McGivern RF, Redei E (1994) Adrenalectomy reverses stress-induced suppression of luteinizing hormone secretion in long-term ovariectomized rats. *Physiol Behav* 55, 1147-1150.
10. Saketos M, Sharma N, Santoro NF (1993) Suppression of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in normal women by glucocorticoids. *Biol Reprod* 49, 1270-1276.
11. Matsuwaki T, Watanabe E, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M (2003) Glucocorticoid maintains pulsatile secretion of luteinizing hormone under infectious stress condition. *Endocrinology* 144, 3477-3482.
12. Matsuwaki T, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M (2004) Glucocorticoid counteracts the suppressive effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  on the surge of luteinizing hormone secretion in rats. *J Endocrinol* 181, 509-513.
13. Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM, Wilmore DW (1988) Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* 318, 1481-1486.
14. Sanna PP, Weiss F, Samson ME, Bloom FE, Pich EM (1995) Rapid induction of tumor necrosis factor  $\alpha$  in the cerebrospinal fluid after intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide revealed by a sensitive capture immuno-PCR assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 272-275.
15. Yoo MJ, Nishihara M, Takahashi M (1997) Involvement of prostaglandins in suppression of gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Reprod Dev* 43, 181-187.
16. Blatteis CM, Li S, Li Z, Feleder C, Perlik V (2005) Cytokines, PGE (2) and endotoxin fever : a re-assessment. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 76, 1-18.
17. Li XF, Edward J, Mitchell JC, Shao B, Bowes JE, Coen CW, Lightman SL, O'Byrne KT (2004) Differential effects of repeated restraint stress on pulsatile luteinizing hormone se-

- cretion in female Fischer, Lewis and Wistar rats. *J Neuroendocrinol* 16, 620-627.
18. Li XF, Bowe JE, Lightman SL, O'Byrne KT (2005) Role of corticotropin-releasing factor receptor-2 in stress-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 146, 318-322.
  19. Watanobe H, Habu S (2003) Adrenal glucocorticoids do not mediate impaired reproductive function induced by lipopolysaccharide in rats. *Neuroendocrinology* 78, 23-28.
  20. Debus N, Breen KM, Barrell GK, Billings HJ, Brown M, Young EA, Karsch FJ (2002) Does cortisol mediate endotoxin-induced inhibition of pulsatile luteinizing hormone and gonadotropin-releasing hormone secretion? *Endocrinology* 143, 3748-3758.
  21. Harris TG, Battaglia DF, Brown ME, Brown MB, Carlson NE, Viguie C, Williams CY, Karsch FJ (2000) Prostaglandins mediate the endotoxin-induced suppression of pulsatile gonadotropin-releasing hormone and luteinizing hormone secretion in the ewe. *Endocrinology* 141, 1050-1058.
  22. Kim SW, Rhee HJ, Ko J, Kim YJ, Kim HG, Yang JM, Choi EC, Na DS (2001) Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I. Specific interaction model and mapping of the interaction site. *J Biol Chem* 276, 15712-15719.
  23. Matsuwaki T, Kayasuga Y, Yamanouchi K, Nishihara M (2006) Maintenance of gonadotropin secretion by glucocorticoids under stress conditions through the inhibition of prostaglandin synthesis in the brain. *Endocrinology* 147, 1087-1093.