

## 主論文の要約

**Brain mechanism involved in energy sensing  
to mediate suppression of reproduction by malnutrition**  
(低栄養による繁殖抑制を担う脳内エネルギーセンシングメカニズム)

名古屋大学大学院生命農学研究科  
生命技術科学専攻  
生物機能技術科学講座  
生殖科学研究室

美辺詩織

2015 年 3 月

## 【第一章：緒言】

近年、畜産現場において高泌乳牛の受胎率低下を改善することが重要課題となっている。受胎率低下は複合的な要因により引き起こされるが、その原因のひとつに負のエネルギーバランスにある。乳牛では、多量の生乳生産によるエネルギー消費量が摂食によるエネルギー摂取量を上回るため、恒常的に負のエネルギーバランスに陥っている。高泌乳牛における受胎率低下は、負のエネルギーバランスへの対応として、次世代確保（繁殖）より個体の生存を優先する適応戦略であると考えられる。

ほ乳類では、様々な種において飢餓時や慢性的な低栄養での性腺機能抑制が認められる。ほ乳類の性腺機能は、間脳視床下部由来の性腺刺激ホルモン（GnRH）と、その支配下にある下垂体からの性腺刺激ホルモン（LH、FSH）により制御される。これまでの報告により、低栄養による性腺機能抑制は GnRH/LH のパルス状分泌抑制に起因することが明らかとなっている。グルコースなどのエネルギー基質は、脳内でその利用性が感知され、そのエネルギー基質の状態により性腺機能や摂食行動が制御される。ラット後脳における薬理学的なグルコース代謝阻害は、摂食行動を誘起し、パルス状分泌を抑制することが報告されている。以上のことから、グルコースの利用性は後脳に局在するエネルギーセンサーに感知され、摂食行動の誘起だけでなく性腺機能抑制を引き起こすことで、低栄養時のエネルギーバランスを調節していると考えられる。

これまでの報告から、後脳にはグルコースを感知する機能があると考えられ、後脳に分布する上衣細胞がグルコースセンサー細胞としての役割をもつ可能性が高い。上衣細胞は、脳室を裏打ちし脳脊髄液に接する繊毛性のグリア細胞であり、グルコースやケトン体の膜輸送体タンパクを発現する。脳脊髄液に含まれるエネルギー基質濃度は、末梢血中の血漿成分を反映するため、脳脊髄液に直接接する上衣細胞は末梢のエネルギー状態を感知するのに適した細胞である。実際、ラット後脳の上衣細胞を用いた *in vitro* の実験では、細胞外グルコース濃度低下により細胞内カルシウム濃度が上昇する (R. Moriyama et al., 2004)。以上のことから私は、後脳上衣細胞は低栄養状態を感知し性腺機能を制御するエネルギーセンサー細胞であると仮説を立てた。また、本仮説を証明し、性腺機能

を制御する脳内エネルギーセンシングメカニズムを明らかにすることにより、この機能を利用した繁殖障害に対する治療・予防法の開発に資する基礎的な知見を得ることができると考えた。

## 【第二章：マウスのパルス状 LH 分泌に対する絶食の影響】

遺伝子工学の発展に伴い、様々なノックアウトマウスが作出され、マウスは生殖内分泌研究に広く用いられている。これまでにヤギやラットなど多くの動物種では、性腺機能の指標として頻回採血を用いたパルス状 LH 分泌が解析されてきた。しかし、小型動物であるマウスでは手術あるいは採血量などの問題から、パルス状 LH 分泌の詳細を示した報告はない。そこで第二章では、遺伝子改変マウス解析のための基礎的な知見を得ることを目的として、マウスにおいて頻回採血によるパルス状 LH 分泌動態の解析法を確立し、低栄養が LH パルスに及ぼす影響について検討した。実験では無拘束・無麻酔下での頻回採血を行うため、雌 CD1 系統マウスの右側頸静脈から挿入したシリコンカニューレを右心房に留置した。自由摂食群および 24 時間絶食群において、採血量 20  $\mu$ l の頻回採血を 3 分間隔で 1.5 時間行いパルス状 LH 分泌動態を解析した。血中 LH 濃度は、 $^{125}$ I で標識された LH を用いてラジオイムノアッセイにより測定し、頻回採血がおよぼすストレスの有無を検出するため、血糖値をモニターした。その結果、自由摂食群では、明瞭なパルス状 LH 分泌が認められたが、24 時間絶食群では、自由摂食群に比べ、LH パルスが有意に抑制された。また、解析した全個体で採血時間中に血糖値の上昇は観察できなかった。このように本実験で観察された絶食による LH 分泌抑制は、他の動物種での報告と一致していることから、マウスが家畜の低栄養による生殖抑制メカニズムを解析するための適切なモデルであることが示唆された。

## 【第三章：性腺機能制御に関わる後脳上衣細胞の AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の役割】

第三章では、低栄養によるパルス状 LH 分泌抑制を担う脳内エネルギーセンシングメカニズムを解明することを目的として、ラットおよび遺伝子改変マウスを用いて後脳上衣細胞の AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の役割につ

いて検討した。AMPK は、肝臓や脂肪組織においてエネルギーセンシングシステムの最上位調節因子であり、細胞外グルコース濃度低下などの低栄養状態において細胞内 AMP/ATP 比の上昇により活性化され、転写因子や代謝関連酵素をリン酸化することで下流シグナリングを亢進する。そこで本研究ではまず、後脳周囲の AMPK 活性化が性腺機能に及ぼす影響を検討するため、Wistar-Imamichi 系雌ラットの第 4 脳室に AMPK 活性化剤である細胞透過性 AMP アナログ (AICAR) を投与し、LH 分泌に及ぼす影響を解析した。その結果、コントロール群に比べて AICAR 投与群ではパルス状 LH 分泌が抑制されたことから、後脳脳室周囲の AMPK 活性化が性腺機能を抑制することが示唆された。次に、AMPK の脳内局在を解析するため、雌ラットの脳切片を用いて、上衣細胞のマーカーであるヴィメンチン (Vim) と活性型 AMPK であるリン酸化 AMPK の二重免疫染色を行った。その結果、後脳脳室を裏打ちする上衣細胞の繊毛に強い AMPK 免疫陽性が検出されたことから、後脳脳室周囲の AMPK 活性化によるパルス状 LH 分泌抑制は、後脳上衣細胞の繊毛に発現する AMPK を介していることが示唆された。最後に、上衣細胞可視化マウスを作出し、後脳上衣細胞における AMPK の役割を *in vitro* において解析した。後脳上衣細胞を可視化するため、Vim 遺伝子の下流で蛍光タンパク質 (Venus) を発現するトランスジェニック (Tg) マウスを新たに作出した。本研究で作出した 2 系統の Tg 始祖系統から得られた子世代のマウスにおいて、第 4 脳室の一部、および中心管を裏打ちする後脳上衣細胞に明瞭な Venus の蛍光が検出された。本 Tg マウス由来の可視化上衣細胞初代培養系を用い、細胞内カルシウム濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 変化を指標として、AMPK 活性化剤 AICAR への応答性を検討した。その結果、Venus で可視化された後脳上衣細胞において、AICAR による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が認められた。以上の結果から、後脳上衣細胞は AMPK の活性化による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇により個体の低エネルギー状態を感知し、負のエネルギーセンサーとして機能する事が示唆された。また、第 4 脳室周囲の AMPK 活性化がパルス状 LH 分泌を抑制することから、低栄養時には、後脳の上衣細胞内の細胞内 AMPK シグナリングの活性化が引き金となり、GnRH/LH 分泌を抑制し、ひいては性腺機能を抑制すると示唆された。

#### 【第四章：考察】

本研究では、モデル動物であるげっ歯類において、後脳上衣細胞は負のエネルギーセンサー細胞として機能し、AMPK シグナリングを介して低栄養状態を感知し性腺機能抑制を担うことが示された。脳脊髄液は抹消血中のエネルギー基質の量を反映しているため (K. Iwata et al., 2011)、上衣細胞が全身血の低エネルギー状態を直接感知するセンサー細胞として機能し、性腺機能を制御の引き金となることが示唆される。以上、本研究により明らかとなったメカニズムは、乳牛における受胎率の低下の一因に関わる可能性が考えられ、後脳上衣細胞の AMPK シグナリングをターゲットとした繁殖制御剤開発への応用が期待される。

#### 【参考文献】

- Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER (2003) Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* 546:113-120.
- Iwata K, Kinoshita M, Yamada S, Imamura T, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda K (2011) Involvement of brain ketone bodies and the noradrenergic pathway in diabetic hyperphagia in rats. *J Physiol Sci* 61:103-113.
- Moriyama R, Tsukamura H, Kinoshita M, Okazaki H, Kato Y, Maeda K (2004) In vitro increase in intracellular calcium concentrations induced by low or high extracellular glucose levels in ependymocytes and serotonergic neurons of the rat lower brainstem. *Endocrinology* 145:2507-2515.