

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 土田 仁美

論 文 題 目

Neuroendocrine mechanism mediating the suppression of luteinizing hormone
release by malnutrition and lactation in rats

(ラットにおける低栄養・泌乳による黄体形成ホルモン分泌抑制を
仲介する神経内分泌メカニズム)

論文審査担当者

主 査 名古屋大学教授 東村 博子

委 員 名古屋大学准教授 上野山 賀久

委 員 名古屋大学准教授 井上 直子

委 員 名古屋大学教授 大蔵 聡

委 員 名古屋大学教授 吉村 崇

論文審査の結果の要旨

土田仁美の提出論文「Neuroendocrine mechanism mediating the suppression of luteinizing hormone release by malnutrition and lactation in rats (ラットにおける低栄養・泌乳による黄体形成ホルモン分泌抑制を仲介する神経内分泌メカニズム)」は、低栄養および泌乳による性腺機能抑制を担う神経内分泌メカニズムの解明を目的とした研究成果をまとめたものである。土田仁美は、内因性オピオイドペプチドシグナリングが低栄養および泌乳による性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) /黄体形成ホルモン (LH) 分泌の抑制を仲介するという仮説を立て、低栄養モデルラットや泌乳ラットを用いて、視床下部における内因性オピオイドペプチドの発現やオピオイドペプチドニューロンの活性化状況、黄体形成ホルモン分泌動態を解析し、内因性オピオイドペプチドが、低栄養および泌乳による LH 分泌抑制を仲介することを明らかにした。以下にその要旨を記載する。

本論文は全 9 章で構成される。第 1 章では、本研究の意義として、低栄養および泌乳による性腺機能の抑制メカニズムの解明が、乳用牛の生産性を向上に資する基礎的知見となることを述べた。さらに、低栄養および泌乳による性腺機能抑制を担う神経内分泌メカニズムに着目し、内因性オピオイドペプチドが卵胞発育中枢である弓状核キスペプチンニューロンを抑制することを示唆した。

第 2 章では、第 3 章から 7 章に共通する実験手法について詳細を述べた。

第 3 章では、内因性オピオイドペプチドのひとつであるダイノルフィン A (Dyn) とその受容体 κ オピオイド受容体 (KOR) に着目した。低栄養モデルとしてラットにグルコース利用阻害剤である 2 デオキシグルコース (2DG) を第 4 脳室に投与した群では、LH パルスが抑制され、血中グルコース濃度が上昇し、摂食量が増加した。2DG 投与前に KOR 拮抗剤を脳内に投与すると、2DG 投与による LH パルス抑制が解除されたが、血中グルコース濃度や摂食量の増加には影響を及ぼさなかった。さらに、2DG を投与した群では、視床下部 Dyn ニューロンのうち、室傍核 Dyn ニューロンにおいてのみ fos 遺伝子 (神経活性化マーカー) の発現が有意に増加した。また、弓状核キスペプチン遺伝子陽性細胞の約 6 割に KOR の発現を認めた。これらの結果から、低栄養により特異的に活性化された室傍核 Dyn ニューロンが弓状核キスペプチンニューロンを直接抑制し、GnRH/LH パルスを抑制することを示唆した。また Dyn ニューロンは低栄養による糖新生や摂食促進には関与せず、低栄養時の生殖機能抑制を特異的に仲介することを明らかとした。

第 4 章では、 β -エンドルフィンとその受容体 μ オピオイド受容体 (MOR) に着目した。2DG の静脈内投与により LH パルスが抑制されたが、MOR 拮抗剤の脳内への前投与により 2DG による LH パルスの抑制が解除された。また、MOR 遺伝子 (*Oprm1*) の脳内の局在を確認したところ、弓状核キスペプチンニューロン及び視索前野 GnRH ニューロンには *Oprm1* の共発現はほとんど認められなかったが、弓

論文審査の結果の要旨

状核グルタミン酸作動性ニューロンの一部に *Oprm1* 共発現が認められた。グルタミン酸は、キスペプチンニューロンを介して GnRH/LH 分泌を刺激することが知られていることから、低栄養による GnRH/LH パルスの抑制の少なくとも一部は、脳内 β -エンドルフィン-MOR シグナリングによるグルタミン酸作動性ニューロンの抑制により仲介されることを示唆した。さらに、2DG 投与により血中グルコース濃度および摂食量は有意に増加したが、MOR 拮抗剤の脳内投与はこれらの増加を抑制した。以上の結果より、脳内 β -エンドルフィン-MOR シグナリングは、低栄養による GnRH/LH 分泌抑制に加えて、糖新生や摂食の誘起をも仲介することを示唆した。

第 5 章では、エンケファリンとその受容体 δ オピオイド受容体 (DOR) に着目した。2DG の静脈内投与による LH パルスの抑制は、DOR 拮抗剤の脳内への前投与により解除された。さらに 2DG 投与により、視床下部に分布するエンケファリンニューロンのうち、室傍核において *fos* 遺伝子を共発現するエンケファリンニューロンが増加したことから、低栄養シグナルは室傍核のエンケファリンニューロンを活性化することを見出した。さらに、2DG 投与により血中グルコース濃度が速やかに増加し、脳内への DOR 拮抗剤の前投与はこの増加を有意に抑制した。以上の結果より、脳内エンケファリン-DOR シグナリングは、低栄養による生殖機能抑制や糖新生を仲介することが示唆された。

これら第 3 章から第 5 章で得られた結果から、3 つの代表的なオピオイドペプチド全てが低栄養による GnRH/LH パルスの抑制を仲介していること、低栄養により誘起される糖新生には β -エンドルフィンとエンケファリンのみが関与することを示唆した。

第 6 章および第 7 章では、泌乳ラットをモデルとして、性腺機能抑制メカニズムの解明を目指した。泌乳ラットでは、吸乳刺激により弓状核キスペプチンニューロンにおけるキスペプチン遺伝子発現が抑制され、ひいては GnRH/LH のパルス状分泌が抑制されることが明らかにされている。さらに、泌乳前期にはエストロゲン非依存的に LH パルスが抑制され、後期にはエストロゲン依存的に LH パルスが抑制される。このエストロゲン依存性の違いに着目しつつ、本論文の第 6 章および第 7 章では、泌乳による GnRH/LH 分泌の抑制を担う内因性オピオイドペプチドの役割を検討した。

第 6 章では、泌乳後期のラットを用い LH 分泌の抑制における Dyn-KOR および β -エンドルフィン-MOR シグナリングの役割を検討した。KOR 拮抗剤の脳内投与により、泌乳後期ラットにおける LH 分泌の抑制が解除された一方で、MOR 拮抗剤の脳内投与はこの抑制を解除できなかった。さらに吸乳刺激負荷により、室傍核と視索上核の Dyn 遺伝子と *fos* 遺伝子の共発現細胞数が、対照群 (吸乳刺激なし) に比べ有意に増加したことから、吸乳刺激は室傍核と視索上核の Dyn ニューロンを活

論文審査の結果の要旨

性化することを示唆した。以上の結果から、泌乳ラットにおいて、泌乳後期には室傍核と視索上核を起始核とする Dyn ニューロンが活性化され、Dyn が弓状核キスペプチンニューロンを直接抑制することにより、GnRH/LH 分泌が抑制され、性腺機能が抑制されることを示唆した。

第 7 章では、泌乳前期の LH 分泌の抑制におけるエンケファリン-DOR シグナリングの役割を検討した。その結果、DOR 拮抗剤の脳内投与により、泌乳前期ラットにおける LH 分泌の抑制が一部解除された。以上の結果から、泌乳ラットにおいて、泌乳前期にはエンケファリン-DOR シグナリングが GnRH/LH 分泌の抑制を少なくとも部分的に仲介する可能性を示唆した。これら第 6 章および第 7 章で得られた結果から、泌乳ラットにおける LH 分泌の抑制には、前期と後期では異なる内因性オピオイドペプチドが関与することを示唆した。

第 8 章では、シナプスを一回のみ逆行性に感染する G 欠損型狂犬病ウイルス (RVΔG) を用いキスペプチンニューロンを直接抑制するニューロンの探索を試みた。しかしながら、キスペプチンニューロンやその他のニューロンに RVΔG の感染を確認することはできず、技術的な改良の必要性が示唆された。

第 9 章は、第 3 章から第 8 章で得られた結果から、低栄養や泌乳による GnRH/LH パルス抑制における内因性オピオイドペプチドの役割について総合的に考察した。すなわち、低栄養時には 3 つの代表的なオピオイドである Dyn、 β -エンドルフィン、エンケファリンの全てが LH パルス抑制を仲介すること、一方で、泌乳後期にはダイノルフィンが、泌乳前期ではエンケファリンが、LH パルスの抑制を仲介することを包括的に論じた。最後に、これらの知見から家畜の栄養不良や泌乳期における生殖抑制の脳内メカニズムが解明されれば、GnRH/LH パルスの抑制による生殖機能抑制を治療するための新しい技術開発に繋がる可能性について言及した。

以上のように、土田仁美は、内因性オピオイドペプチドが低栄養や泌乳による GnRH/LH パルス抑制に関与することを解明した。本研究で得られた知見は、学術上の価値に加え、生命農学における重要課題である畜産物の生産性向上に資する点からも極めて高い価値があると認められる。したがって、本委員会は本論文が博士 (農学) の学位論文として十分な価値を有すると認め、論文審査に合格と判定した。