

主論文の要約

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)

氏名：土田 仁美

日本の畜産現場では、育種改良により乳牛の泌乳能力が飛躍的に向上した一方で、受胎率は年々低下しており、乳牛の初回人工授精時の受胎率は 45.9% (家畜改良事業団、2018 年) と著しく低い。受胎率の低下の要因のひとつとして、分娩後の泌乳量の増加による過度の負のエネルギーバランスによる生殖中枢の抑制が考えられる。本研究では、過剰なミルク生産による極度の負のエネルギー状態を脳が感知し、生殖機能中枢を抑制するとの仮説をたて、低栄養および泌乳による生殖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。特に乳類の生殖中枢として知られるキスペプチンニューロンと抑制性神経ペプチドであるオピオイドペプチドに焦点をあてて、研究を行った。

哺乳動物において、低栄養により生殖機能が抑制される。この抑制は、主に視床下部からの性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) ひいては下垂体からの性腺刺激ホルモンのパルス状分泌の抑制に起因する。性腺刺激ホルモンのひとつである黄体形成ホルモン (LH) は、GnRH パルスに一对一に対応して分泌されるため、本研究では GnRH パルスの指標として LH パルスを用いた。最近の研究から、GnRH/LH のパルス状分泌は、弓状核に局在するキスペプチンニューロンにより第一義的に制御されることが示唆されている。本論文の第 3、4、および 5 章では、低栄養による GnRH/LH パルスの抑制を脳内のオピオイドペプチド・オピオイド受容体シグナリングが仲介しているかを検討した。第 3 章では、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 パルス抑制が阻害されたが、血中グルコース濃度や摂食量の増加は阻害されなかった。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) 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 61% に KOR の発現が認められた。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が示唆された。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が明らかとなった。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。グルタミン酸作動性ニューロンは、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が示唆された。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阻害した。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が示唆された。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、室傍核においてのみ、*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が示唆された。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たが、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の誘起を仲介することが示唆された。これら第 3 から 5 章で得られた結果から、低栄養による GnRH/LH パルスの抑制を、3 つの代表的なオピオイドペプチド全てが仲介していること、そして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が関与することが示唆された。

第 6 および 7 章では、泌乳ラットをモデルとして、生殖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。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とから、泌乳前期と後期とでは、脳内の抑制メカニズムが異なる可能性がある。この違いに着目しつつ、本論文の第 6 および 7 章では、泌乳による GnRH/LH 分泌の抑制を担う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。さらに再吸

乳刺激負荷ラットにおいて、視床下部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 ニューロンを活性化することが示唆された。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、生殖機能が抑制されることが示唆された。第 7 章では、泌乳前期の LH 分泌抑制におけるオピオイドペプチドの役割について検討した。その結果、泌乳前期には泌乳後期とは異なるオピオイドペプチドが泌乳前期の LH 分泌の抑制を仲介する可能性を示唆した。これら第 6 および 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オピオイドが関与することが示唆された。

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。具体的には、ウイルスベクターを用いてキスペプチンニューロン特異的に RVΔG 受容体を発現させ、その後 RVΔG を導入する。RVΔG 発現を蛍光標識により可視化することで、キスペプチンニューロンへ直接入力するニューロンの同定を試みた。しかしながら、RVΔG の感染を確認することはできなかった。今後、方法論のさらなる改良が必要である。

第 9 章では、第 3 から 8 章で得られた結果から、低栄養や泌乳による LH パルス抑制におけるオピオイドの役割について考察した。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 LH パルスの抑制に関与することが示唆された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機構が解明されれば、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げられる可能性について言及した。