

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

Cellular and molecular mechanism underlying GnRH pulse generation in mammals

論文題目 (哺乳類における GnRH パルス発生を制御する細胞・分子メカニズム)

氏名 池上(渡辺) 花奈

論文内容の要旨

世界人口の急速な増加に応じて、今後ますますの食料増産が求められている。世界の飢餓人口は7億9500万人にのぼり、発展途上国では人口の約1割が栄養不足であり、栄養状態の改善は喫緊の課題である。畜産分野の振興は、乳・肉といった動物性タンパク質の供給を通じて人類の健康増進に極めて有効である。20世紀後半より、人工授精や凍結精液の普及に伴い、乳量・肉量の増加やそれらの品質改良に重点をおいた育種改良が行われ、1頭あたりの乳量・肉量が飛躍的に増加してきた。一方、近年とくに乳用牛では初回受胎率の低下などの繁殖障害が頻発し、深刻な問題となっている。こうした背景のもと、家畜の繁殖をよりいっそう効率化し、人口増加にともなう需要の増加に応じて生産性を向上させるためには、家畜を含むほ乳類の生殖機能の中核制御メカニズムに基づいた新しい繁殖制御法の開発をともなう技術革新が必要である。

哺乳類において生殖機能を制御している性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) ニューロンは脳腹側の視床下部に局在しており、下垂体からの性腺刺激ホルモン (黄体形成ホルモン: LH、卵胞刺激ホルモン: FSH) の分泌調節を介し、卵巣や精巣機能を制御する。複数の動物種において、下垂体門脈中に分泌される GnRH とそれに伴って末梢血中に分泌される LH は間欠的なパルス状の分泌パターンを呈することが報告されてきた。GnRH を慢性的に投与すると LH、FSH の分泌は抑えられ、卵胞発育が起こらない。これらの先行研究の成果は、ほ乳類の卵胞発育制御における GnRH/LH のパルス状分泌の重要性を強く示唆するものである。さらに、低栄養・日照変化・気温・湿度によるストレスが GnRH/LH のパルス状分泌抑制を介して生殖機能を低下させることも報告されており、GnRH/LH のパルス状分泌の発生および制御メカニズムはほ乳類の生殖機能の鍵を握る重要な中枢制御メカニズムである。このことから、著者は GnRH/LH のパルス状分泌の発生および制御メカニズムの解明を新規繁殖技術開

発の鍵を握る最重要の課題であると考えた。本学位論文では、GnRH/LH パルス発生を担う細胞の同定および GnRH パルス発生の分子メカニズムの解明を目的とし、*in vivo* および *in vitro* の実験系を用い、視床下部に局在するキスペプチンニューロンの GnRH パルス発生メカニズムにおける役割を明らかにすることを目的とした。

キスペプチンは 2003 年に発見されて以来、哺乳類において GnRH 分泌をさらに上位から制御する因子として広く受け入れられている。視床下部内の 2 群のキスペプチンニューロンのうち、弓状核キスペプチンニューロンが GnRH パルス発生を担う本体であるとする説が有力であるが、決定的な証拠は得られていない。第 2 章では 2 種類の Cre-loxP システムを用いコンディショナルキスペプチン遺伝子 (*Kiss1*) ノックアウト (KO) マウスの作製により、弓状核キスペプチンニューロンが GnRH パルス発生細胞である可能性を検証することを目的とした。まず、弓状核特異的 *Kiss1* エンハンサー下で Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスを *Kiss1*-floxed マウスと交配することにより弓状核特異的な *Kiss1* KO マウスの作製を試みた。これらの個体では、弓状核のみならず前腹側室周囲核においても *Kiss1* が KO され、その結果、性成熟を示さず、血中 LH/FSH 濃度も顕著に減少していた。よって当実験方法では弓状核特異的に *Kiss1* を KO できないと判断し、次に、4-水酸化タモキシフェン (4-OHT) 依存性に *Kiss1* を KO できる [CAG-CreER;*Kiss1*^{fl/fl}] マウスを作製し、成熟雌マウスの弓状核後方に 4-OHT を局所投与した。その結果、弓状核で *Kiss1* 発現細胞が著しく減少した個体を複数得た。これらのマウスの半数は 4-OHT 投与後、連続無発情を呈し、血中 LH/FSH 濃度が減少する傾向を示した。一方、対照群では全てのマウスが正常な性周期および血中 LH/FSH 濃度を示した。これらの結果は、弓状核 *Kiss1* 発現が減少したことにより、GnRH/LH のパルス状分泌が抑制され、卵胞が発育せず、連続無発情を示したと考えられた。以上より、弓状核キスペプチンニューロンが GnRH パルス発生に重要であることが示唆された。

弓状核キスペプチンニューロンは、キスペプチン/ニューロキニン B (NKB) /ダイノルフィン A の 3 つの神経ペプチドを共発現していることから、キャンディ (KNDy) ニューロンとも呼ばれる。第 3 章では、この KNDy ニューロン群が同期してパルス状に発火する分子メカニズムの解明を目的とした。マウス可視化キスペプチンニューロン (*Kiss1*-GFP 細胞) の初代培養系を用い、細胞内 Ca^{2+} 濃度を指標として、弓状核 *Kiss1*-GFP 細胞の神経活動をモニターした。その結果、NKB 受容体作動薬の添加により、*Kiss1*-GFP 細胞における Ca^{2+} オシレーションの頻度が増加し、細胞外 Ca^{2+} を除去すると同 Ca^{2+} オシレーションが消失した。また、 Ca^{2+} 濃度測定後に免疫組織化学法により、グリア細胞のマーカーである GFAP を可視化し、*Kiss1*-GFP 細胞周辺のグリア細胞の Ca^{2+} 濃度変化を解析したところ、*Kiss1*-GFP 細胞および周辺のグリア細胞における Ca^{2+} オシレーションが同期していた。これらの結果より、KNDy ニューロンとその周辺のグリア細胞が共同して GnRH パルスを発生している可能性が示唆された。次に、ギャップ結合の関与を検証するため、ニューロン-ニューロン間またはニューロン-グリア細胞間に形成される 2 種類のギャップ結合の阻害剤

を添加した。その結果、それぞれ、*Kiss1*-GFP 細胞の Ca^{2+} オシレーション頻度を有意に減少させた。また、KNDy ニューロンにおける NKB 受容体およびギャップ結合の発現を検証するため、弓状核 *Kiss1*-GFP 細胞のみを顕微鏡下で採取し（10 細胞/サンプル）、cDNA を作製し、リアルタイム PCR を行った。その結果、全 6 サンプルのうち約 8 割で NKB 受容体の遺伝子発現が検出されたことから、KNDy ニューロンの多くが NKB 受容体を発現することが示唆された。さらに、約 3 割の cDNA サンプルでギャップ結合タンパク（コネキシン 26 および 37）の遺伝子発現が検出されたことから、一部の KNDy ニューロンがギャップ結合を発現していることが示唆された。これらの結果より、KNDy ニューロンから分泌される NKB が自己分泌／傍分泌システムで KNDy ニューロンの神経活動を亢進することおよび、KNDy ニューロンおよびグリア細胞の神経活動は、ギャップ結合を介して同期している可能性が示唆された。

第 4 章では、第 2 章および第 3 章で得られた結果を受け、KNDy ニューロンを中心とした GnRH パルス発生のメカニズムについて考察した。すなわち、弓状核に局在する KNDy ニューロンとギャップ結合を介して連絡する周辺のグリア細胞が GnRH パルス発生を担う細胞集団を形成していることを示唆した。さらにこれらの細胞集団における神経活動の同期は、弓状核 KNDy ニューロンから分泌される NKB が NKB 受容体を介して近傍の同ニューロン群の神経活動を活性化し、その刺激がギャップ結合を介して周辺のグリア細胞や同ニューロン群に伝播することにより、最終的に複数の弓状核 KNDy ニューロンから同期してキスペプチンが分泌されるという新しい GnRH パルス発生機構のモデルを提唱した。また、パルス発生に重要な役割を果たしていると考えられているダイノルフィンが作用する細胞の正体など、詳細が解明されていない課題についても言及するとともに、本研究により明らかとなりつつある GnRH パルス発生を担う細胞集団および分子に着目し、それに基づいた新規繁殖技術開発への展望をまとめた。