論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※　　第　　号

氏　　名　　杉本有沙

論　文　題　目

Involvement of central somatostatin signaling in suppressing gonadal function in lactating rats

（泌乳ラットの性腺機能抑制を仲介する脳内ソマトスタチンシグナリングの役割）

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	名古屋大学講師	井上直子
委員	名古屋大学教授	吉村　崇
委員	名古屋大学教授	大蔵　聡
委員	名古屋大学准教授	松山秀一
委員	名古屋大学アジアサテライトキャンパス学院特任助教	森田康広

別紙1-2

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

杉本有沙の提出論文「Involvement of central somatostatin signaling in suppressing gonadal function in lactating rats（泌乳ラットの性腺機能抑制を仲介する脳内ソマトスタチンシグナリングの役割）」は、泌乳期の吸乳刺激が、哺乳類の生殖機能の中枢である視床下部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 *Kiss1* 発現ならびにその下流にある性腺刺激ホルモンである黄体形成ホルモン（LH）のパルス状分泌を抑制する神経メカニズムについて研究成果をまとめたものである。杉本は、脳内ソマトスタチン（SST）シグナリングが吸乳刺激を仲介し、弓状核キスペプチンニューロンにおける *Kiss1* 発現、LH 分泌を抑制するという仮説を立て、検証した。本論文は全５章で構成される。

第１章では、哺乳類の性腺機能を制御するメカニズムを解明する意義について述べ、特に泌乳中に性腺機能を抑制する脳内メカニズムに着目し、弓状核に局在するキスペプチンニューロンが、抑制性神経ペプチドである SST によって制御される可能性を述べた。また、本研究の意義として、泌乳中の性腺機能抑制メカニズムの解明が家畜、特に乳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。

第２章では、第３章、第４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、SST が、泌乳期前半の吸乳刺激によるステロイド非依存的な性腺機能抑制メカニズムに関与する可能性について検討を行った。組織学的解析の結果、卵巣除去を施した泌乳ラットの posterior intralaminar complex of the thalamus（PIL）において SST 遺伝子発現が非泌乳群と比べて増加し、PIL の SST 発現細胞のうち約 60％が、tuberoinfundibular peptide of 39 residues（TIP39）を共発現していた。TIP39 ニューロンは、PIL から弓状核へ投射し、プロラクチン分泌を促進する神経ペプチドであることが報告されている。また、Gi 共役型 GPCR である SST 受容体（SSTR）５つのサブタイプの遺伝子発現量を弓状核において測定したところ、泌乳群の SSTR2 遺伝子（*Sstr2*）の発現量が、非泌乳群と比較し有意に増加した。この結果より、吸乳刺激は PIL SST 発現を促し、弓状核における SST に対する SSTR2 の感受性を増加させることで、脳内の SST-SSTR2 シグナリングを活性化させる可能性を示唆した。内因性 SST が泌乳期の LH 分泌抑制に関与するか否かを検討するため、泌乳ラット脳内へ SSTR1-5 拮抗剤および SSTR2 拮抗剤を投与し、血中 LH 濃度への影響を確認した。その結果、SSTR1-5 拮抗剤投与群では、溶媒投与対照群と比較し、血中 LH 濃度に変化が見られなかった一方で、SSTR2 拮抗剤投与群では、血中 LH 濃度および LH パルス頻度が、溶媒投与対照群と比べて有意に増加した。また泌乳ラット弓状核において、キスペプチンニューロンに共存する NKB 遺伝子（*Tac3*）と *Sstr2* の発現を二重免疫組織化学により解析した結果、少数の *Tac3* 発現細胞で *Sstr2* の共発現を認めた。以上より，SST-SSTR2 シグナリングが吸乳刺激による LH 分泌抑制を仲介すること、および SST は、他の介在ニューロンを介して ARC のキスペプチンニュ

ーロンに作用する可能性を示唆した。

第４章では、SST-SSTR2 系が泌乳期後半のラットにおいて、吸乳刺激による LH パルス抑制メカニズムに関与するかを検討した。泌乳期後半の LH パルス抑制は、ステロイド依存的である点で、泌乳期前半と異なるため、同様に SST が吸乳刺激による LH パルス抑制を仲介するか否かを確かめた。泌乳後半のラット脳内へ SSTR2 拮抗剤を投与した結果、血中 LH 濃度が溶媒投与対照群に比べ有意に増加した。さらに、泌乳ラット脳内への SSTR2 拮抗剤投与群では、溶媒投与対照群に比べ、弓状核 *Kiss1* 発現細胞数の有意な増加がみられた。一方で、脳内への SSTR2 拮抗剤投与により、弓状核-正中隆起領域ではキスペプチン免疫陽性強度が低下傾向を、GnRH 免疫陽性強度が有意な低下を示した。これらの結果から、泌乳期後半において SST-SSTR2 シグナリングが、吸乳刺激による弓状核 *Kiss1* 発現とキスペプチンの放出抑制、ひいては正中隆起 GnRH ニューロン軸索末端からの GnRH の放出抑制を仲介することを示唆した。またラット弓状核において SST がキスペプチンニューロンに直接作用するか否かを検討するため、弓状核において *Kiss1* と *Sstr2* の二重標識を行ったところ、ごく少数の *Kiss1* 発現細胞で *Sstr2* の共発現を認めた。このことから、SST-SSTR2 シグナリングが間接的にキスペプチンニューロンを抑制すると考えられた。そこで、SST ニューロンからの抑制を受ける介在ニューロン候補として LH 分泌に対する刺激性因子であるグルタミン酸作動性ニューロンに着目した。弓状核グルタミン酸作動性ニューロンにおける *Sstr2* 発現、キスペプチンニューロンにおける N-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）型グルタミン酸受容体遺伝子の発現を検討した結果、約 10%の弓状核グルタミン酸作動性ニューロンにおいて *Sstr2* 発現が認められ、さらに約 90%のキスペプチンニューロンにおいて NMDA 型グルタミン酸受容体遺伝子の共発現を確認した。また、グルタミン酸作動性ニューロンマーカーとして用いた小胞性グルタミン酸輸送体遺伝子発現は、非泌乳群と比べ、泌乳群で有意に低下した。以上より、SST-SSTR2 シグナリングが吸乳刺激による泌乳後半の弓状核 *Kiss1* 発現およびパルス状 LH 分泌抑制を仲介すること、さらに SST-SSTR2 シグナリングがグルタミン酸作動性ニューロンを介してキスペプチンニューロンへの入力する可能性を示唆した。

第５章では、第３章および第４章で得られた結果から、泌乳期前半および後半を通した、吸乳刺激による弓状核 *Kiss1* 発現およびパルス状 LH 分泌抑制メカニズムへの SST-SSTR2 シグナリングの関与について総合的に考察した。すなわち、SST-SSTR2 シグナリングが、泌乳前半のステロイド非依存性の抑制および後半のステロイド依存性の抑制の双方に関与し、吸乳刺激による LH 分泌抑制を仲介する可能性を示唆した。最後に、家畜の繁殖能力向上を目指した技術開発における、本研究成果の位置付け、ならびに応用のために必要な今後の研究における重要な課題についても言及した。

以上のように、杉本有沙は脳内の SST-SSTR2 シグナリングが吸乳刺激を仲介し、泌

乳中の哺乳動物における性腺機能抑制に関与することを示し、吸乳刺激を仲介し性腺機能を抑制する神経経路の一部を解明した。また、泌乳中の母体における生理学的変化の中枢制御に SST-SSTR2 シグナリングが関与するという新しい知見を得た。本研究で得られた知見は、学術上の価値に加え、家畜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。よって、本審査委員会は、本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値があるものと認め、論文審査に合格と判定した。