

主 論 文 の 要 約

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)

氏名：杉本 有沙

世界的な人口の増加、ならびに途上国の開発に伴う経済状況の改善によって、世界各国での畜産物への需要が増大しており、少なくとも今後10年間は、その需要が増え続けると考えられている。乳や肉などの動物性タンパク質は、穀物や野菜からでは摂取することが難しいヨウ素や亜鉛などの栄養素を多く含んでいることから、畜産物の生産性向上を目標とした研究は、畜産物の供給の増加を通して人の健康増進に貢献できる。特に乳製品は、文化的にも多くの国で受け入れられやすいことから、栄養失調に苦しむ人口が多い国においても供給が可能であり、世界的な栄養失調人口の改善に貢献すると期待されている。その一方で、乳牛および肉牛において分娩後の初回受胎率の低下や空胎期間の延長といった繁殖成績の低下が世界的に問題となっている。繁殖成績の低下は、空胎期間が延長し生乳を生産しない乳牛による飼料の消費にかかるコストを増加させ、畜産農家の経済的損失の7割以上に直結することから、解決すべき喫緊の課題である。このような背景から、畜産現場では家畜の繁殖成績を改善し、需要の増加に応じて畜産物を安定的に生産する技術の開発が求められており、より効率的な繁殖技術の確立のため、これに資する基礎的研究が必要であると考えられる。

泌乳は哺乳類に特徴的な機能である。泌乳中の繁殖機能低下は、分娩後の空胎期間の延長に大きく寄与すると考えられているが、そのメカニズムの詳細は明らかにされていない。したがって、泌乳期の繁殖機能抑制メカニズムの解明は、家畜の繁殖能力向上に大いに貢献すると期待される。哺乳類の繁殖機能は、キスペプチンニューロンによって第一義的に制御される。特に視床下部弓状核に局在するキスペプチンニューロンは、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) のパルス状分泌を直接刺激し、その下流にある下垂体からの性腺刺激ホルモンのパルス状分泌を調節し、卵胞発育と性ステロイドホルモン分泌を制御すると考えられている。泌乳中の母体において、子が乳頭を吸う刺激 (吸乳刺激) により、脳内でキスペプチン遺伝子 *Kiss1* 発現が抑制され、性腺刺激ホルモン分泌が抑制される。本学位論文では、脳内ソマトスタチン (SST) ニューロンに着目し、吸乳刺激による弓状核 *Kiss1* 発現抑制ひいては性腺刺激ホルモンである黄体形成ホルモン (LH) 分泌抑制を SST ニューロンが仲介するという仮説の証明を目的とした。SST は成長ホルモンの分泌抑制で知られる抑制性神経ペプチドである。また雄ラットにおいて、SST は吸乳刺激の中継核である視床後部の posterior intralaminar complex of the thalamus (PIL) において発現することが確認されている。さらに、泌乳ラット PIL に局在するニューロンの一部が弓状核

へ投射することが報告されている。このことから、本研究は泌乳ラットにおいて PIL SST ニューロンが弓状核 *Kiss1* 発現およびパルス状 LH 分泌の抑制を仲介する可能性について検証した。また、吸乳刺激による弓状核 *Kiss1* 発現および LH 分泌抑制は、泌乳期前半ではステロイド非依存的、一方、泌乳期後半ではステロイド依存的な抑制であることから、本学位論文では、泌乳期前半および後半のラットを用いて、それぞれにおける LH 分泌抑制メカニズムへの SST ニューロンの関与を検討した。

第3章では、PIL 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生殖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うため、泌乳前半にあたる産後8日目のラットを用いて解析を行った。卵巣除去を施した泌乳、非泌乳ラットの脳を用いて組織学的解析を行った結果、泌乳ラット PIL において *Sst* 発現が非泌乳群と比べて増加し、PIL 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が示唆された。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。また弓状核キスペプチンニューロンへ SST が直接作用する可能性を検討するため、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* 発現を認めた。以上より、SST-SSTR2 シグナリングが吸乳刺激を仲介し、泌乳期前半のステロイド非依存性パルス状 LH 分泌抑制に関与することが示唆された。

第4章では、SST-SSTR2 系が泌乳期後半のラットにおいて、吸乳刺激によるステロイド依存的な LH パルス抑制メカニズムに関与するかを検討した。実験には泌乳後半にあたる産後16日目のラットを用いて解析を行った。内因性 SST が泌乳期後半における LH 分泌抑制を仲介するかを検討するため、泌乳ラット脳内へ SSTR2 拮抗剤投与した。その結果、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、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 シグナリングが弓状核キスペプチンニューロンにおける *Kiss1* 発現とキスペプチンの放出、ひいては正中隆起 GnRH ニューロン軸索末端か

らの GnRH の放出を抑制する可能性が示唆された。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検討するため、弓状核において *Kiss1* と *Sstr2* の二重免疫組織化学を行ったところ、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が示唆された。

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。