

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

Histological analysis for neuronal pathway mediating energetic regulation of the reproductive function

論文題目

(栄養による生殖機能制御を担う神経経路の組織学的解析)

氏名

出浦

慎哉

論文内容の要旨

世界人口の急増により食料問題は深刻化しており、発展途上国を中心に飢餓人口は9億人を越える。一方で、世界の穀物生産量の約40%は家畜の飼料として消費されており、途上国への食糧供給を圧迫している。よって、家畜の繁殖技術向上は世界の食糧問題の解決に大きく貢献すると期待される。乳牛では、分娩後の受胎率は年々低下しており、畜産現場において解決すべき深刻な課題である。この受胎率の低下の原因のひとつは、低栄養による性腺刺激ホルモン分泌の低下であると考えられる。一方で、動物の栄養状態を脳が感知し、どのような経路により性腺刺激ホルモン分泌を調節するかの詳細は不明である。本学位論文は、栄養状態の感知を担う後脳脳室壁の上皮細胞が、性腺刺激ホルモン分泌調節中枢に栄養情報を伝達するための神経経路を同定することを目的とした。生殖機能制御中枢に末梢の栄養情報を伝達する神経経路を明らかにすることにより、家畜の繁殖率向上に資する基礎的知見を得ることを目指した。

後脳の第4脳室を裏打ちする上皮細胞には、グルコース感知の律速酵素であるグルコキナーゼ (GK) およびグルコーストランスポーター 2 (GLUT 2) が発現する。また、第4脳室を裏打ちする上皮細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度は、低グルコースに反応して上昇する。さらに第4脳室にグルコース代謝阻害剤を投与すると性腺刺激ホルモンのひとつである黄体形成ホルモン (LH) の分泌が速やかに抑制される。これらの事から、第4脳室を裏打ちする上皮細胞で感知された情報が、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 分泌を調節し、下垂体からの性腺刺激ホルモン分泌を制御すると考えられる。一方、哺乳類の GnRH 分泌は、脳内の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明らかにされている。第3章では、後脳上皮細胞から視床下部弓状核 (ARC) および前腹側室周囲核 (AVPV) に局在するキスペプチンニューロンまでの神経経路の同定を目的とした。実験にはキスペプチンニ

ニューロンを可視化した遺伝子改変ラット (*Kiss1-Td tomato*) のメスを用いた。トランスシナプティックトレーサーである小麦胚芽レクチンである wheat-germ agglutinin (WGA) を第 4 脳室に投与した。WGA 投与 48 時間後に灌流固定を行い、脳内における WGA の局在を解析した。WGA 免疫陽性は、各脳室のうち第 4 脳室および中心管における上衣細胞内に限局して認められた。また、ARC のキスペプチンニューロンの約 40%、AVPV のキスペプチンニューロンの約 70% に WGA 免疫陽性を認めた。さらに延髄弧束核および青斑核に WGA 免疫陽性が認められたことから、WGA とノルアドレナリン (NA) ニューロンマーカである dopamine β -hydroxylase (DBH) の二重免疫組織化学を実施したところ、延髄弧束核と青斑核において約 80% の DBH 陽性細胞に WGA 発現が認められた。さらに、WGA と副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) の二重免疫組織化学を行ったところ、視床下部室傍核では約 50%、視索上核では約 80% の CRH ニューロンにおいて WGA 免疫陽性を認めた。本結果から、後脳上衣細胞で感知された情報が、延髄弧束核や青斑核の NA ニューロンおよび CRH ニューロンを介して、GnRH/LH パルスおよびサージ制御中枢であるキスペプチンニューロンに入力する経路が存在することが組織学的に確認された。本研究によって得られた結果は、NA ニューロンおよび視床下部の CRH ニューロンが低栄養による LH 分泌抑制を仲介することが示唆した過去の報告を形態学的に支持するものである。

第 4 章では後脳において ATP を放出、または受容する細胞の同定を試みた。これまでに第 4 脳室に ATP 受容体のアンタゴニストを投与することで LH のパルス状分泌の抑制することが明らかとなっている。このことから後脳には ATP 分泌を介して LH 分泌を調節するメカニズムの存在が示唆される。そこで本章では、後脳における ATP シグナルを仲介する細胞を特定することを目的とした。実験には卵巣除去シエストロゲンを代償投与した成熟メスラットを用い、ATP 受容体である P2X2 と ATP を分泌顆粒内に輸送する働きをする vesicular-nucleotide transporter (VNUT) および DBH の免疫組織化学を行った。P2X2 と DBH の二重免疫染色を行ったところ、後脳最後野における NA ニューロンにおいて P2X2 免疫陽性を観察した。また延髄弧束核に繊維の P2X2 免疫陽性を観察し、舌下神経核にも P2X2 免疫陽性細胞を観察した。一方、VNUT と DBH の二重免疫組織化学を行ったところ、後脳最後野、延髄弧束核、青斑核の NA ニューロンに VNUT 免疫陽性を観察した。これらの結果から後脳最後野、延髄弧束核、青斑核の NA ニューロンは ATP を放出すること、また後脳最後野や延髄弧束核、舌下神経核では ATP が受容されることが示唆された。

第 5 章では第 3 章および第 4 章で得られた結果から、後脳上衣細胞から視床下部キスペプチンニューロンまでの神経経路及びその生理的な役割について、また後脳における ATP シグナルの LH パルス調節機構における役割について総合的に考察した。本研究成果により、後脳上衣細胞はエネルギーセンサー細胞として、感知した栄養情報を ARC と AVPV におけるキスペプチンニューロンに伝達することで GnRH/LH のパルス状またはサージ状分泌の制御に寄与すると考えられる。また、後脳における ATP シグナルが GnRH/LH 分泌の維持に寄与すると考えられる。本学位論文で得られ

た基礎的知見を基盤にした家畜の繁殖効率を向上させるための今後の研究について言及した。