

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21286

研究課題名(和文)キスペプチン細胞特異的トレーサー法を用いた吸乳刺激の神経回路の解明

研究課題名(英文)Identification of neural pathway for suckling stimulus using kisspeptin cell specific retrograde tracing

研究代表者

山田 俊児 (Yamada, Shunji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40454079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：性腺機能が抑制される授乳期では吸乳刺激により視床下部弓状核のキスペプチン発現が顕著に抑制されるが、その神経経路は明らかとなっていない。本研究では、吸乳刺激の神経経路を調べるために、Cre-FLEX systemを利用して偽型狂犬病ウイルスに感染した細胞に投射する神経だけを可視化するトレーシング方法の確立を試みた。

Neuropeptide Y神経(NPY)にCre recombinaseを発現するマウスにおいてNPY神経に投射する神経を可視化できたことから、本研究で得られたトレーシング方法はキスペプチンを含む様々な神経ペプチドの経路解析に活用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although expression of kisspeptin in the arcuate nucleus (ARH) is remarkably inhibited in lactating rats who are suppressed reproductive function, the neural pathway have not been fully explored. To investigate the neural pathway of suckling stimulus, in the present study, I tried to establish a tracing method visualizing only projecting neurons to first-infected cell with pseudotype rabies virus using Cre-FLEX system. Since I visualized the projecting neurons to neuropeptide Y (NPY)-expressing neurons in the ARH in the NPY-Cre mice, it is considered that the tracing methods from the present study can be applied to an analysis of neural pathway for various neuropeptide including kisspeptin.

研究分野：神経内分泌

キーワード：逆行性トレーサー 狂犬病ウイルス Cre キスペプチン

1. 研究開始当初の背景

キスペプチンは、ヒトを含むほ乳類において、生殖機能を制御する神経ペプチドとして注目をあびている。申請者らのグループはキスペプチンが生殖機能を強力に促進する作用を有すること、さらには、ラットの脳においてキスペプチン神経は前腹側脳室周囲核と視床下部弓状核の2カ所に局在することを報告した (Kinoshita Yamada et al. *Endocrinology* 2005, Adachi Yamada et al. *Journal of Reproduction and Development* 2007)。ほ乳類の生殖機能は視床下部 - 下垂体 - 性腺軸と呼ばれる一連のメカニズムによって制御される。視床下部にある性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 神経からパルス状に分泌される GnRH は、下垂体からのゴナドトロピン (卵胞刺激ホルモンと黄体形成ホルモン (LH)) を介して、性腺の活動を促す。GnRH は生殖機能を制御する「最上位のホルモン」として長い間君臨してきたが、キスペプチンは GnRH 分泌を制御するさらに上位のホルモンである。

授乳期に乳児 (仔) から母親が受ける吸乳刺激は、母親の性腺機能を抑制する因子の一つである。申請者らはパルス状 LH 分泌が抑制される授乳期の母ラットにおいて、乳仔からの吸乳刺激により視床下部弓状核のキスペプチンとその遺伝子である *Kiss1* の発現が低下すること (Yamada et al. *Endocrinology* 2007) および、授乳期のラットでもキスペプチンの脳室内投与により LH 分泌が亢進することを明らかにした (Yamada et al. *J. Neuroendocrinology* 2012)。このことは、授乳期の性腺機能低下に弓状核キスペプチン神経の抑制が関与することを示唆するとともに、キスペプチン神経を制御できれば、それに続く GnRH 分泌、ひいてはゴナドトロピン分泌も制御できる可能性を示唆する。しかしながら、吸乳刺激によるキスペプチン制御機序は分かっていない。

2. 研究の目的

本研究ではキスペプチン神経に入力する神経の詳細を明らかにするために、狂犬病ウイルスを用いた「初期感染細胞特異的逆行性トレーサー法」の確立を目的とした。

3. 研究の方法

狂犬病ウイルスは神経細胞の終末に感染

すると、逆行性軸索輸送により細胞体に運ばれ免疫染色で検出できるため、神経回路を調べるための逆行性トレーサーとして有用である。さらに、狂犬病ウイルスは細胞体に着いた後、自身を再構築しその神経に入力する神経に感染を広げる特徴をもつ。

多くの研究者により、Cre-FLEX system を利用して Cre recombinase (Cre) 発現細胞をアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて修飾し、この修飾された細胞のみに狂犬病ウイルスを感染させ、感染細胞から一つ上位の神経 (Cre 発現細胞に投射する神経) のみを可視化する方法が報告されている。

そこで本研究では、(1) Cre 発現細胞を修飾できる AAV の作製、(2) 修飾された細胞のみに感染する偽型狂犬病ウイルスの作製、を行った。また、(3) 作製したウイルスを *in vivo* で評価するために、neuropeptide Y (NPY) 神経に Cre を発現するマウスの ARH に作製したウイルスを投与しその機能並びに投射の解析を行った。

4. 研究成果

(1) AAV の作製とその機能評価

Cre 依存性に TVA 受容体と蛍光色素 mCherry を発現する AAV (AAV-TVA) と狂犬病ウイルスの糖タンパク G を発現する AAV (AAV-G) を常法に従い作製した。*in vitro* において、Cre を発現させた HEK 細胞もしくは Cre を発現させていない HEK 細胞に作製したウイルスを添加したところ、Cre 発現細胞でのみ TVA-mCherry の発現が確認された。

(2) 偽型狂犬病ウイルスの作製と機能評価

狂犬病ウイルスの作製に必要なプラスミドや細胞は共同研究者から譲渡していただいた。

本研究では本国における実験に有用な弱毒化された狂犬病ヒトワクチン株である HEP-FLURY (HEP) を利用した。HEP のゲノムをコードするプラスミドから糖タンパク遺伝子 G を GFP に置換したプラスミドと感染力の強い糖タンパク SADG をコードするプラスミドを BHK/T7-9 細胞にトランスフェクションし、全ての細胞に対して感染能持たず再構築能のない狂犬病ウイルス (SADG-HEP G-GFP) を作製した。SADG-HEP G-GFP を BHK/T7-9 細胞に感染させたところ、40% の細胞において GFP を確認できた。また、マウスの弓状核

に投与したところ、視索前野、分界条床核等に GFP 陽性の神経線維が、室傍核や対側の弓状核に GFP 陽性の細胞体が見られた。このことから、SADG-HEP G-GFP は in vivo において感染能を有することが示唆された。

次に、SADG-HEP G-GFP を感染させた細胞に EnvA (TVA に結合する膜タンパク) をコードするプラスミドを感染させ、TVA 受容体を発現する細胞にのみ感染する偽型狂犬病ウイルス (EnvA-HEP G-GFP) を作製した。TVA 発現もしくは非発現 BHK 細胞に EnvA-HEP G-GFP を添加したところ、TVA 発現細胞でのみ GFP 陽性細胞が認められた。

(3) 作製したウイルスの in vivo 評価

NPY-Cre マウスの視床下部弓状核に AAV-TVA と AAV-G を投与し、2週間後、同じ部位に EnvA-HEP G-GFP を投与した。1週間後、4%PFA を用いて灌流固定を行い、脳をとりだして mCherry ならびに GFP の局在を免疫染色で調べた。

NPY-Cre マウスの ARH において mCherry と GFP の共陽性細胞が見られた。コントロール群である wild-type へのウイルス投与では mCherry ならびに GFP 陽性細胞は見られなかった。これらのことから作製した AAV ならびに偽型狂犬病ウイルスはそれぞれ Cre もしくは TVA 依存性であることが in vivo においても証明された。

視床下部室傍核や視索上核、内側扁桃体に mCherry 陰性で GFP 陽性の細胞体が見られた。これらの神経核から ARH の NPY 神経に投射する神経の存在が明らかとなった。

本実験ではキスペプチン神経に Cre を発現するマウスを用いて実験できなかったが、今後、キスペプチンを含む様々な神経ペプチドの Cre 発現マウスと本実験で作製したウイルスを利用し、その神経に対して入力する神経を明らかにできると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Tanida T, Matsuda KI, Yamada S, Kawata M, Tanaka M. Immunohistochemical profiling of estrogen-related receptor gamma in rat brain and colocalization with estrogen receptor alpha in the preoptic area. Brain

Research 査読有り, 1659, 71-80, 2017
doi:10.1016/j.brainres.2017.01.024 2014

Yoshitaka Hashimoto, Muhei Tanaka, Hiroshi Okada, Kazuteru Mistubishi, Toshihiro Kimura, Noriyuki Kitagawa, Takuya Fukuda, Saori Majima, Yukiko Fukuda, Yoshimitsu Tanaka, Shunji Yamada, Takafumi Senmaru, Masahide Hamaguchi, Mai Asano, Masahiro Yamazaki, Yohei Oda, Goji Hasegawa, Naoto Nakamura, Michiaki Fukui. Postprandial hyperglycemia was ameliorated by taking metformin 30 min before a meal than taking metformin with a meal; a randomized, open-label, crossover pilot study. Endocrine, 査読有り, 52, 271-6, 2016,
doi:10.1007/s12020-015-0786-04

Shunji Yamada, Miku Ohiya, Keiko Takanami, Ken Ichi Matsuda, Mitsuhiro Kawata. Critical role of androgen receptor in the postnatal period in male sexual behavior in rats. Neuroscience Letters, 査読有り, 609, 189-193, 2015
doi: 10.1016/j.neulet.2015.10.040

Uenoyama Y, Tanaka A, Takase K, Yamada S, Pheng V, Inoue N, Maeda K, Tsukamura H. Central estrogen action sites involved in prepubertal restraint of pulsatile luteinizing hormone release in female rats. Journal of Reproduction and Development, 査読有り, 61, 351-359, 2015
doi: 10.1262/jrd.2014-143

Tanida T, Matsuda KI, Yamada S, Hashimoto T, Kawata M. Estrogen-related Receptor β Reduces the Subnuclear Mobility of Estrogen Receptor α and Suppresses Estrogen-dependent Cellular Function. Journal of Biological Chemistry 査読有り, 290, 12332-12345, 2015
doi: 10.1074/jbc.M114619098

[学会発表](計4件)

山田俊児、井上海平、田中雅樹 ラット分界条床核におけるエストロゲン受容体

発現細胞の特性、 第 122 回日本解剖
学会総会・全国学術集会、2017 年 3 月
28-30 日 長崎大学（長崎）

山田俊児、杉本有沙、上野山賀久、谷田
任司、松田賢一、河田光博、束村博子、
田中雅樹 授乳期における弓状核 Kiss1
遺伝子制御メカニズムの解明、第 43 回日
本神経内分泌学会学術集会、2016 年 10
月 14-15 日、アクトシティ浜松（静岡）

山田俊児、田中雅樹 授乳期における
Kiss1 発現抑制とヒストンアセチル化
第 13 回 GPCR 研究会、2016 年 5 月 13-14
日、日本未来科学館（東京）

山田俊児、谷田任司、松田賢一、河田光博
片側乳頭結紮による神経伝達阻害が授乳
ラットの脳に及ぼす影響 第 56 回日本
組織細胞化学会、2015 年 10 月 3-4 日、
関西大学（大阪）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山田 俊児 (YAMADA Shunji)
京都府立医科大学大学院 医学研究科
解剖学教室 生体構造科学部門・講師

研究者番号：40454079

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()