

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07075

研究課題名(和文)代謝型グルタミン酸受容体を介した射精調節メカニズムの解明

研究課題名(英文)Role of metabotropic glutamate receptor in ejaculation

研究代表者

時田 美和子(馬杉美和子)(Masugi-Tokita, Miwako)

滋賀医科大学・医学部・医員

研究者番号：10420712

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文):我々はmGluR7遺伝子欠損マウス(KO)が正常に繁殖できないことを見だし、その性行動を解析した。その結果mGluR7 KOは射精障害を示すが、異性に対する匂い嗅ぎ行動、マウント行動および挿入行動は行うことが明らかになった。匂い嗅ぎ行動とマウント行動が正常であることはmGluR7 KOが性的なモチベーションを持つことを示す。また挿入が可能であることは勃起が可能で射精のみ障害されていることを示唆する。次に、どこに発現するmGluR7が射精を調節しているのかを確かめるためにmGluR7アンタゴニストを用いた解析を行った。この結果は腰髄に発現しているmGluR7が射精を調節していることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、不妊外来において射精障害の男性が増加している。しかしながら、アモキサピンなどの三環系抗うつ薬が逆行性射精を改善させる例を除き、射精障害に有効な薬物療法はない。

射精のメカニズムは不明な点が多い。mGluR7が射精調節に関与する神経回路を明らかにするために、免疫組織化学的解析を行い、その調節機構について考察した。mGluR7はシナプス前膜の伝達物質放出部位近傍に存在し、グルタミン酸放出の調節をしていると考えられている。今後、早漏や膣内射精障害を含めた遅漏などの射精障害の薬物ターゲットとしてのmGluR7の可能性を探索したい

研究成果の概要(英文):Metabotropic glutamate receptor subtype 7 (mGluR7) is a member of the group III mGluRs, which localized to presynaptic active zones of the CNS. To elucidate the mechanism of impaired reproductivity of mGluR7 knockout (KO) mice, we investigated sexual behavior in this line, which exhibits ejaculatory disorder, although with normal sexual motivation and erectile function. To identify the site of action within the CNS responsible for the effect of mGluR7 on ejaculation, we then used a para-chloroamphetamine (PCA) induced ejaculation model. Intrathecal administration of the mGluR7-selective antagonist into the lumbosacral spinal cord inhibited PCA induced ejaculation. Immunohistochemistry revealed mGluR7-like immunoreactivity (LI) expressed in the same area where lumbar spinothalamic cells regulate the parasympathetic ejaculatory pathway. These results indicate that mGluR7 in the lumbosacral spinal cord regulates ejaculation by potentiating the excitability of parasympathetic pathway.

研究分野：神経科学

キーワード：mGluR7 射精 性行動 シナプス グルタミン酸受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

男性性機能をコントロールしている神経ネットワークは、脳と脊髄の多くの部位から構成される。ヒトの胸髄レベルの脊髄損傷では反射性射精は保持されることから、腰・仙髄に射精に深く関わる重要な領域が存在することが知られていたが、その詳細については不明な点が多かった。近年になって腰髄に存在する lumbar spinothalamic (LSt) cells が射精中枢の本体であると報告された (Truitt et al., Science, 2002)。この発見により LSt の投射先など射精制御の主要な神経経路や一部の調節分子は同定されたものの、射精を調節する神経回路や射精の調節メカニズムは殆どわかっていない。

一方、mGluR7 は中枢神経系に広く発現しシナプス前膜に局在する。複数の軸索を持つ神経細胞では特定の細胞に投射する軸索終末のみに mGluR7 が発現する標的細胞特異的発現が観察される (Shigemoto et al., Nature, 1996)。また、mGluR7 は伝達物質放出の抑制の他に、長期増強 (LTP) や長期抑制 (LTD) といった可塑性の方向性を決めるスイッチとして機能する (Pelkey et al., Neuron, 2005, 2007) という興味深い報告があるが、それらの生理的意義は不明である。mGluR7 は重要な役割を担うことが示唆されているが、生体内における機能発現のメカニズムは未だ解明されていない。

研究代表者はこれまでに mGluR7 遺伝子欠損マウス (mGluR7 KO) において恐怖反応 (すくみ反応) の低下、及び味覚嫌悪学習の障害という二つの異なる扁桃体依存性行動の異常を見いだした (Masugi et al., J Neurosci. 1999)。また、このマウスにおいて攻撃対象となる雄のにおいの情報処理が障害されているため攻撃行動が低下していることを報告している (Masugi-Tokita et al., Neuropsychopharmacology. 2016)。

2. 研究の目的

研究代表者は、mGluR7 KO が射精障害を示すことを見いだした。射精調節に関与する神経回路は不明な点が多く、射精障害の治療方法も進んでいない。そこで、mGluR7 が射精調節に関与する回路を明らかにし、さらに mGluR7 がどのようにその回路を調節しているのかを解明する。本研究は腰・仙髄に存在する mGluR7 が直接射精を調節する可能性を検証し、射精の調節機構、さらには mGluR7 による神経回路の調節機構の解明をめざすものである。

3. 研究の方法

(1) 動物

12-19 週齢の野性型マウスおよび mGluR7 KO の雄を使用した。すべてのマウスは個別飼いにし、明期 12 時間 (午後 10 時 ~ 午前 10 時) 暗期 12 時間 (午前 10 時 ~ 午後 10 時) の光条件下で飼育した。すべての行動実験は暗期に赤色光の下で行った。

(2) 性行動の解析

30 分間の性行動を一週間おきに 6 回観察した。すなわち、個別飼いにした野生型あるいは mGluR7 KO のホームケージに、ホルモンで発情させた雌を入れて行動を観察する。性行動は以下のカテゴリーに区分した。

肛門生殖器付近をかぐ
マウント行動
挿入行動
射精

(3) 薬剤誘発性射精

p-chloroamphetamine による射精誘発実験を行った。ラットの腰髄にカニューレを留置し mGluR7 アンタゴニストである MMP-IP 投与の影響を検討した。

(4) 形態学的解析

マウスの腰・仙髄における、mGluR7 と射精に関連する分子の免疫標識を行った。

4. 研究成果

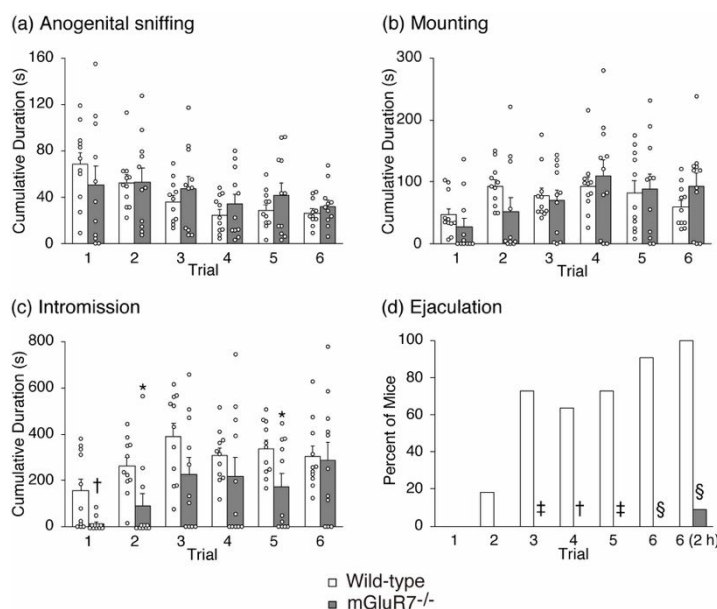


図1 性行動の解析

n = 11. *p < 0.05, †p < 0.01, ‡p < 0.001, §p < 0.0001 vs wild type.
Error bar = SEM

(1) 性行動の観察において、肛門生殖器付近の嗅ぎ行動およびマウントについては、野生型と mGluR7 KO に有意な差は認められなかった(図 1a, b)。挿入行動については、1-2 週目では mGluR7 KO の反応が多少悪いものの、3 週目以降では野生型と mGluR7 KO に大きな差は認められなかった(図 1c)。一方、野生型マウスは 3 週目以降では 11 匹のうち 7 匹以上が射精に至ったが、mGluR7 KO は 30 分間では一匹も射精しなかった。6 週目は観察時間を 30 分から 2 時間に延長したところ、11 匹中 1 匹のみ射精した(図 1d)。

肛門生殖器付近の嗅ぎ行動およびマウント行動は性行動のモチベーションの指標である。これらの結果は、mGluR7 KO は性行動のモチベーションがあるにもかかわらず射精できないこと、また観察時間の延長で少数は射精したことから、完全な機能障害ではなく、射精しにくい状態になっていることを示唆する。

(2) mGluR7 は脊髄にも脳にも発現している。mGluR7 KO における射精異常のメカニズムが脊髄の射精中枢レベルでの調整ができないためか、脳からの調節異常のためかを明らかにするために p-chloroamphetamine による射精誘発実験を行った。ラットの腰髄にカニューレを留置して mGluR7 アンタゴニストである MMPiP を投与したところ、コントロールと比べてアンタゴニスト投与群では射精が抑制された。この結果は mGluR7 が腰髄レベルで射精を調節していることを示唆する(図 2)。

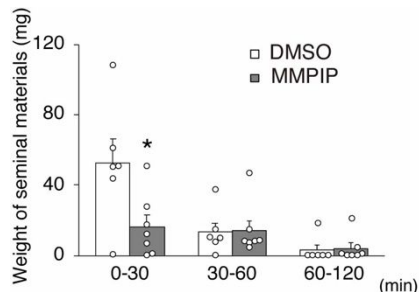


図 2 薬剤誘発性射精
n = 7. *p < 0.05 vs DMSO-injected animals. Error bar = SEM

(3) マウスでは L3-4 に存在する Lumbar spinothalamic cells (LSt cells) が射精中枢の本体であることが知られている (Truitt and Coolen, Science, 2002)。LSt cells は交感神経、副交感神経、体性神経のすべてに投射して射精を制御するが、このうち副交感神経領域において LSt cells のマーカーである Galanin と mGluR7 の発現が類似していることを見いだした(図 3a)。mGluR7 KO の脊髄切片を同様に免疫標識することで抗 mGluR7 抗体の特異性も確認した(図 3b)。

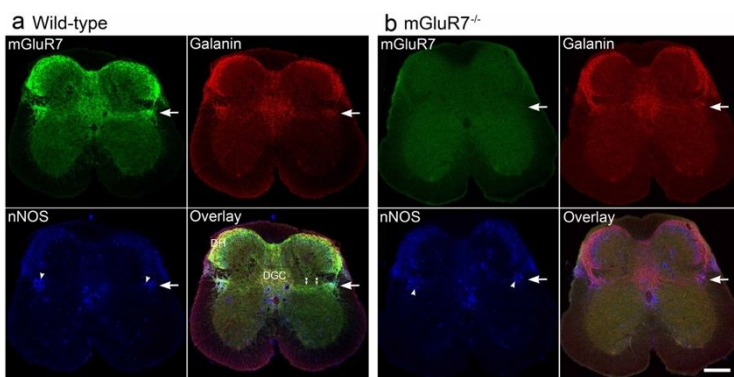


図 3 L6 レベルにおける形態学的解析
緑, mGluR7; 赤, galanin; 青, nNOS
矢印, SPN 仙髄副交感神経核; 矢頭, 副交感神経節前ニューロン; DGC, dorsal gray commissure; DH, dorsal horn. Scale bar = 200 μm

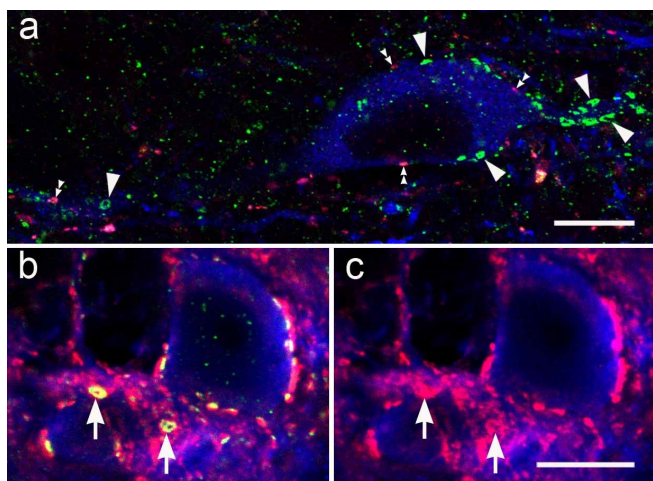


図 4 仙髄副交感神経核付近の形態学的解析
a; 緑, mGluR7; 赤, galanin; 青, nNOS
b, c; 緑, mGluR7; 赤, synaptophysin; 青, nNOS
矢頭, mGluR7 陽性軸索終末; 二重矢頭, galanin 陽性軸索終末; 矢印, mGluR7 と synaptophysin の局在. Scale bar = 10 μm

弱拡大では mGluR7 と Galanin の局在はほぼ同一であったが、次に強拡大で観察した。nNOS 陽性の副交感神経節前ニューロン(青)に mGluR7 陽性の軸索終末(緑)が入力しており、Galanin 陽性である LSt cells からの線維(赤)も同じ節前ニューロンに接していた(図 4a)。

さらに、シナプスマーカーである synaptophysin(赤)と mGluR7(緑)が、副交感神経節前ニューロン(青)上で共局在することを確認した(図 4b; 4c は mGluR7 非表示)。

(4) mGluR7 KO は正常な性行動のモチベーションを持ち、挿入行動が可能であることは勃起も可能であることを示唆するにもかかわらず、射精障害を示す。性行動の観察時間を延長したところ、まれに射精する個体も存在することから、完全な機能障害ではなく、射精の閾値が上昇していることが示唆された。mGluR7 アンタゴニストを腰髄に投与すると、薬剤誘発性射精が抑制されること、腰・仙髄の副交感神経領域で mGluR7 は LSt cell の支配領域と類似した局在を示すことから、mGluR7 は腰・仙髄レベルで射精を調節することが示唆された。

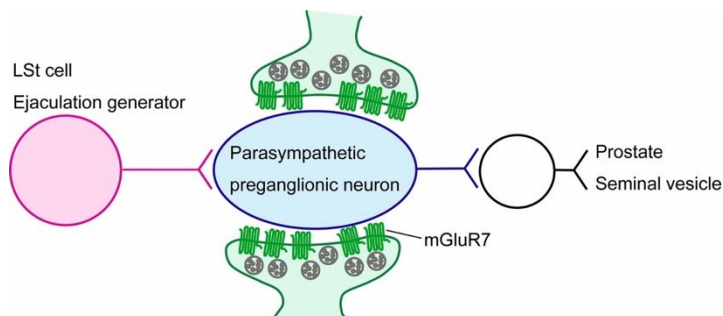


図5 射精制御経路における mGluR7 の局在
 緑, mGluR7 と mGluR7 陽性軸索終末; 赤, LSt cell; 青, 副交感神経節前ニューロン

射精中枢である LSt cell は、交感神経、副交感神経、体性神経のすべてを調整することで射精を制御する。mGluR7 はこのうち副交感神経の枝を調節することで、射精の閾値を変化させている可能性がある (図5)。

今後は、脊髄を胸髄レベルで切断して、脳からの影響をなくしたモデルを使って、薬剤誘発性、あるいは電気刺激などを利用して mGluR7 が射精を調節している部位を特定していきたい。また、mGluR7 はシナプス前膜に局在するため、免疫標識ではその神経回路を可視化することができない。そこで mGluR7 プロモーターの制御下で GFP を発現するトランスジェニックマウスの解析なども行う予定である。

射精の主要な制御経路は LSt cells からの出力によるものであるが、調節経路はいまだ殆どわかっていない。近年増加しつつある射精障害にはさまざまな種類があると考えられているが、有効な治療法が見つかったものはごく一部しかない。mGluR7 による調節経路の解析は、射精のメカニズムの理解に寄与し、射精障害の治療法の開発に結びつくことが期待される。

<引用文献>

Masugi M, Yokoi M, Shigemoto R, Muguruma K, Watanabe Y, Sansig G, van der Putten H, Nakanishi S (1999) Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes deficit in fear response and conditioned taste aversion. *J Neurosci* 19(3):955-963.

Masugi-Tokita M, Flor PJ, Kawata M (2016) Metabotropic glutamate receptor subtype 7 in the bed nucleus of the stria terminalis is essential for intermale aggression. *Neuropsychopharmacology* 41(3):726-735.

Pelkey KA, Lavezzari G, Racca C, Roche KW, McBain CJ (2005) mGluR7 is a metaplastic switch controlling bidirectional plasticity of feedforward inhibition. *Neuron* 46(1):89-102.

Pelkey KA, Yuan X, Lavezzari G, Roche KW, McBain CJ (2007) mGluR7 undergoes rapid internalization in response to activation by the allosteric agonist AMN082. *Neuropharmacology* 52(1):108-117.

Shigemoto R, Kulik A, Roberts JD, Ohishi H, Nusser Z, Kaneko T, Somogyi P (1996) Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature* 381(6582):523-525.

Truitt WA, Coolen LM (2002) Identification of a potential ejaculation generator in the spinal cord. *Science* 297(5586):1566-1569.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masugi-Tokita Miwako, Tomita Keiji, Kobayashi Kenichi, Yoshida Tetsuya, Kageyama Susumu, Sakamoto Hirota, Kawauchi Akihiro	4. 巻 57
2. 論文標題 Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 7 Is Essential for Ejaculation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 5208 ~ 5218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-020-02090-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Bando Masako, Kinugawa Tetsuhiro, Manabe Yuichiro, Masugi Miwako, Nakajima Hiroo, Suzuki Kazuyo, Tsunoyama Yuichi, Wada Takahiro, Toki Hiroshi	4. 巻 95
2. 論文標題 Study of mutation from DNA to biological evolution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Radiation Biology	6. 最初と最後の頁 1390 ~ 1403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09553002.2019.1606957	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsunoyama Yuichi, Suzuki Kazuyo, Masugi-Tokita Miwako, Nakajima Hiroo, Manabe Yuichiro, Wada Takahiro, Bando Masako	4. 巻 -
2. 論文標題 Verification of a dose rate-responsive dynamic equilibrium model on radiation-induced mutation frequencies in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Radiation Biology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09553002.2019.1569772	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masugi-Tokita M, Yoshida T, Kageyama S, Kawata M, Kawauchi A.	4. 巻 3
2. 論文標題 Metabotropic glutamate receptor subtype 7 has critical roles in regulation of the endocrine system and social behaviours	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jne.12575.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 馬杉 美和子、富田 圭司、吉田 哲也、影山 進、河内 明宏
2. 発表標題 代謝型グルタミン酸受容体による射精調節
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会 総会賞ポスター 06
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------