

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06924

研究課題名（和文）排卵や卵胞成熟を引き起こすGnRHニューロンの周期的活動のメカニズムの解明

研究課題名（英文）The mechanism of cyclic activity of GnRH neurons causing ovulation and follicle maturation.

研究代表者

渡部 美穂（Watanabe, Miho）

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：10399321

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：栄養状態の低下が生殖制御に関わるGnRHニューロンおよびストレス応答に関わるCRHニューロンの活動に影響を及ぼすメカニズムを検討した。食餌制限負荷により、CRHニューロンの細胞内クロライドホメオスタシスが破綻し、抑制性GABA入力弱まることで、CRHニューロンの活動性が高まり、視床下部-下垂体-副腎軸が活性化されることが明らかになり、これがGnRHニューロンの活動性に影響を与える可能性が考えられ、栄養状態の低下が生殖機能に影響を与えるメカニズムの一端を明らかにすることができた。また、GnRHニューロンの活動の同期が、GnRHニューロンの大量分泌やパルス状分泌のメカニズムであるか検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

栄養状態の低下による体重の減少などにより、視床下部-下垂体の機能が低下し、無月経や無排卵になる中枢性排卵障害が知られているが、本研究で栄養状態の低下が細胞内クロライドホメオスタシスに影響を及ぼし、GABAによる神経活動制御に変化をもたらすことが、生殖機能低下のメカニズムの一端であることを明らかになり、細胞内ホメオスタシスを維持するトランスポーターやトランスポーターの活動を制御する分子を対象とした新たな治療法の開発につながると考える。

研究成果の概要（英文）：The mechanisms that reduced nutritional status affects the activity of GnRH neurons involved in reproductive regulation and CRH neurons involved in the stress response were investigated. Food restriction to mice disrupted intracellular chloride homeostasis of CRH neurons and weakened inhibitory GABAergic input, which increased the activity of CRH neurons and activated the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thereby affecting the activity of GnRH neurons. I also examined whether synchronization of GnRH neuron activity is a mechanism for the cyclic or pulsatile secretion of GnRH neurons.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：GABA GnRHニューロン CRHニューロン クロライド 生殖 視床下部

1. 研究開始当初の背景

脳による生殖内分泌調節の最終共通路は視床下部に存在する生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)ニューロンである。成熟雌マウスでは4日に1度排卵が起こる。これは卵胞の成熟に伴い卵巣から分泌されるエストロジェンの作用により、GnRHニューロンからGnRHが大量分泌され、その結果、下垂体から黄体形成ホルモン(LH)が大量分泌されるためである。GnRHおよびLHは通常パルス状に分泌され、卵胞成熟、精子形成に関与している。GnRHニューロンは細胞数が少なく、視床下部に散在しているにもかかわらず、4日に1度のGnRHの大量分泌や1時間に1度のパルス状分泌を引き起こすメカニズムは未だに明らかにされていない。多数のGnRHニューロンの活動が周期的に同期することが想定されるが、実際の証明はなされていない。また、栄養状態の低下により生殖機能が低下することが知られるが、栄養状態の低下がGnRHニューロンの活動性に变化をもたらすメカニズムもわかっていない。GnRHニューロンはGABAニューロンの制御を受けるが、代表者はこれまでにGnRHニューロンではCl⁻を細胞外にくみ出すK⁺-Cl⁻共役担体(KCC2)の発現が低く、細胞内Cl⁻濃度が高いため、抑制性伝達物質であるGABAが成熟動物においても興奮性に作用するという特有の性質を持つことを報告しており、GnRHニューロンへのGABA入力を興奮性から抑制性に变化させた遺伝子改変マウスでは性周期が乱れ、排卵や妊娠がみられず、興奮性GABA入力が生殖機能において重要な役割を持つことを明らかにしている。しかしながら、GABA入力の興奮性から抑制性への変化により、神経回路レベルでどのような変化が起こり、生殖機能に影響を及ぼしたのかはわかっておらず、興奮性GABA入力によるGnRHニューロンの活動制御のメカニズムは明らかになっていない。視床下部に存在し、ストレス応答に関わる副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)ニューロンもGABAによる制御を受けており、室傍核にあるCRHニューロンの細胞体ではGABAは抑制性に、正中隆起の神経終末ではGABAは興奮性に作用することを報告しているが、栄養状態の低下によるGnRHニューロンやCRHニューロンの活動性の变化へのGABAの関与は検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では、GnRHの大量分泌やパルス状分泌のメカニズムを明らかにするために、GnRHの大量分泌では、たくさんのGnRHニューロンの活動が同期し、パルス状分泌では一部のGnRHニューロンの活動が同期することにより起きている可能性を考え、特にGABAが興奮性に作用するというGnRHニューロンに特有な性質に着目して検討を行った。また、栄養状態の低下により生殖機能が低下するメカニズムを明らかにするために、食餌制限負荷により、GnRHニューロンおよびCRHニューロンの細胞内クロライド濃度が変化することで、GABA作用が変化し、GnRHニューロンおよびCRHニューロンの活動性に变化がみられるか検討を行った。

3. 研究の方法

カルシウムイメージング法により GnRH ニューロンの活動の指標として自発的なカルシウムの上昇を記録するために、GnRH ニューロンでカルシウムセンサーである GCaMP6f を発現するマウスの作成を行った。GnRH ニューロンで tTA(テトラサイクリン制御性トランス活性化因子)を発現する GnRH-tTA マウスと β アクチン遺伝子の下流に tetO-GCaMP6f がノックインされている tetO-GCaMP6f マウスを交配させ、GnRH-tTA::tetO-GCaMP6f マウスを作成した。また、GnRH ニューロンへの興奮性 GABA 入力を抑制に変化させた時の GnRH ニューロンの活動への影響を検討するために、GnRH ニューロンで GCaMP6f と GABA 作用を抑制性にする KCC2 を発現するマウスの作成を行った。GnRH-tTA::tetO-GCaMP6f マウスと KCC2-tetO マウスを交配させ、GnRH-tTA::tetOGCaMP6f::KCC2-tetO マウスを作成した。これらのマウスより視床下部を含む急性脳スライス標本を作成し、二光子顕微鏡を用いてカルシウムイメージングを行い、GABA によるカルシウムの上昇、自発的なカルシウムの上昇の記録を行った。また、栄養状態の低下による生殖機能低下のメカニズムを検討するために、マウスに食餌制限を負荷し、GnRH ニューロンおよび CRH ニューロンの活動への影響を検討した。栄養状態の低下のモデルとして、マウスに 60%食餌制限(通常の 60%量の餌を 10 日間与える)を負荷し、体重、血中コルチコステロンへの影響を調べた。また、食餌制限負荷により CRH ニューロンおよび空腹時に活性化されるアグーチ関連ペプチド(AgRP)ニューロンが活性化されることを神経活動の活性化の指標として c-Fos の免疫染色を行うことで確認した。食餌制限を負荷したマウスより、視床下部を含む急性脳スライス標本を作成し、グラミシジン穿孔パッチクランプ法を用いて CRH ニューロンおよび GnRH ニューロンより GABA の平衡電位を記録し、細胞内クロライド濃度が変化することにより GABA 応答に変化がみられるか調べた。

4. 研究成果

GnRH ニューロン間での活動の同期性の検討を行った。カルシウムイメージング法により、GnRH ニューロンの活動の指標として自発的なカルシウムの上昇を記録するために、GnRH ニューロンで GCaMP6f を発現するマウスを作成し、ドキシサイクリン投与中止により、GnRH ニューロンで GCaMP6f が発現されることが確認できた。また、同期活動における GnRH ニューロンへの興奮性 GABA 入力の役割を検討するために、GABA 入力を興奮性から抑制性に変化させた GnRH ニューロンで GCaMP6f と KCC2 を発現するマウスを作成し、ドキシサイクリン投与中止で、GCaMP6f と KCC2 が発現されることを確認できた。視床下部を含む急性スライス標本を用いて、GABA の投与により GnRH ニューロンでカルシウムが上昇すること、KCC2 を発現させることにより、GABA によるカルシウムの上昇がみられなくなることを確認できたが、自発的なカルシウムの

上昇という弱いカルシウムの上昇をはっきりと記録することは難しかった。GCaMP6fの発現が弱いためと考えられたため、マウスのホモ化やGnRH Cre マウスにAAVを用いてGCaMP6fを発現させる、スライス標本の状態を良くするためにスライス作成時の溶液の工夫やチャンバーの変更などの方法を試みたが、GnRHニューロンで自発的なカルシウムの上昇を記録できるだけのGCaMP6fの十分な発現をえる方法のさらなる検討が必要である。栄養状態の低下により、生殖機能制御に関わるGnRHニューロンおよびストレス応答に関わるCRHニューロンの細胞内クロライド濃度維持機構が破綻し、GABA応答が変化するか検討を行った。マウスに60%食餌制限を負荷することにより、体重が有意に減少し、CRHニューロンでc-Fosの発現が認められ、血中コルチコステロンの上昇が認められた。空腹時に活性化されるAgRPニューロンでもc-Fosの発現が認められたことから、食事制限負荷の方法を確立できた。この方法を用いて、食餌制限の影響を検討したところ、60%食餌制限を負荷したマウスのCRHニューロンでは、GABAの平衡電位の脱分極側へのシフトが認められた(図1、GABAの平衡電位 食餌制限なし:-60.6 mV、食餌制限あり:-51.8 mV)。このことから、食餌制限負荷により、CRHニューロンへの抑制性GABA入力が弱まることがわかった。よって、CRHニューロンへのGABAの抑制力が弱まり、CRHニューロンの活動性が高まることで視床下部-下垂体-副腎軸が活性化し、GnRHニューロンの活動性および生殖機能に影響を与える可能性が考えられ、栄養状態の低下が生殖機能に影響を与えるメカニズムの一端を明らかにすることができた。GnRHニューロンのGABAの平衡電位の変化や活動性への影響も同様に調べているところであるが、食餌制限負荷を行ったマウスで妊娠が認められたことから、食餌制限負荷により生殖機能が完全に抑制されるわけではないことがわかったが、性周期の乱れなどがみられる可能性が考えられるため、今後引き続き検討を続けていく必要がある。

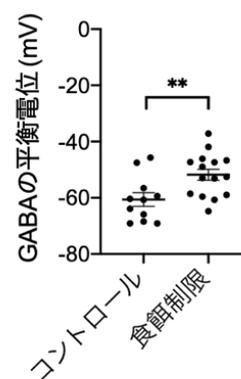


図1. 食餌制限負荷により、CRHニューロンのGABAの平衡電位の脱分極側へのシフトがみられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Watanabe Miho, Sinha Adya Saran, Shinmyo Yohei, Fukuda Atsuo	4. 巻 17
2. 論文標題 Early establishment of chloride homeostasis in CRH neurons is altered by prenatal stress leading to fetal HPA axis dysregulation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1373337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2024.1373337	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nguyen Trong Dao, Ishibashi Masaru, Sinha Adya Saran, Watanabe Miho, Kato Daisuke, Horiuchi Hiroshi, Wake Hiroaki, Fukuda Atsuo	4. 巻 64
2. 論文標題 Astrocytic NKCC1 inhibits seizures by buffering Cl ⁻ and antagonizing neuronal NKCC1 at GABAergic synapses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Epilepsia	6. 最初と最後の頁 3389-3403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/epi.17784	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Egawa K#, Watanabe M#(#contributed equally to this work), Shiraishi H, Sato D, Takahashi Y, Nishio S, Fukuda A.	4. 巻 13: 5685
2. 論文標題 Imbalanced expression of cation-chloride cotransporters as potential therapeutic target in an Angelman syndrome model mouse.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-32376-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hosoi Y, Akita T, Watanabe M, Ito T, Miyajima H, Fukuda A	4. 巻 15: 806798
2. 論文標題 Taurine depletion during fetal and postnatal development blunts firing responses of neocortical layer II/III pyramidal neurons.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	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) 10.3389/fnmol.2022.806798.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe M, Ito T, Fukuda A	4. 巻 12(7): 631
2. 論文標題 Effects of taurine depletion on body weight and mouse behavior during development.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabolites	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) 10.3390/metabo12070631.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sinha AS, Wang T, Watanabe M, Hosoi Y, Sohara E, Akita T, Uchida S, Fukuda A	4. 巻 15: 856262
2. 論文標題 WNK3 kinase maintains neuronal excitability by reducing inwardly rectifying K+ conductance in layer V pyramidal neurons of mouse medial prefrontal cortex.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	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) 10.3389/fnmol.2022.856262.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yesmin R, Watanabe M, Sinha AS, Ishibashi M, Wang T, Fukuda A	4. 巻 15: 990803
2. 論文標題 A subpopulation of AgRP neurons excites CRH axon terminals in median eminence led to HPA axis activation in response to food restriction.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	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) 10.3389/fnmol.2022.990803.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 渡部美穂、細井泰志、秋田天平、伊藤崇志、福田敦夫	4. 巻 6
2. 論文標題 細胞内タウリンのプロテインキナーゼCによるリン酸化を介したGABAA受容体膜発現制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 タウンリンサーチ	6. 最初と最後の頁 20-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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18件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Watanabe M, Kahle KT, Fukuda A, Shinmyo Y.
2. 発表標題 Regulated KCC2 phosphorylation is critical for dynamic GABA-mediated inhibition.
3. 学会等名 The 20th Kyungpook-Hamamatsu Joint Medical Symposium Hamamatsu Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nguyen DT, Ishibashi M, Watanabe M, Sinha AS, Yesmin R and Fukuda A.
2. 発表標題 Astrocytic NKCC1 plays a pivotal role in prevention of seizures promoted by postsynaptic GABAergic excitation in epilepsy models.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 51st Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nguyen DT, Ishibashi M, Watanabe M, Sinha AS, Yesmin R and Fukuda A.
2. 発表標題 Astrocytic Na-K-Cl cotransporter type1 attenuates seizures promoted by GABAergic excitation.
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Watanabe M, Kahle KT, Fukuda A.
2. 発表標題 Effects of enhanced KCC2 activity induced by dephosphorylation of Thr906 and Thr1007 on neuronal function.
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hosoi Y, Akita T, Watanabe M, Ito T, Miyajima H, Fukuda A.
2. 発表標題 Taurine depletion during fetal and postnatal development blunts firing responses of neocortical layer II/III pyramidal neurons.
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡部美穂、Kahle KT、福田敦夫
2. 発表標題 抑制性神経伝達におけるカリウム-クロライド共輸送体(KCC2)のリン酸化による機能制御の役割
3. 学会等名 第49回日本脳科学学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nguyen DT, Ishibashi M, Watanabe M, Akita T, Sinha AS, Yesmin R and Fukuda A.
2. 発表標題 Loss of astrocytic Na-K-Cl cotransporter type 1 hastens seizures promoted by GABAergic excitation of neurons.
3. 学会等名 第49回日本脳科学学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Egawa K, Watanabe M, Shiraishi H, Fukuda A.
2. 発表標題 Therapeutic effects of bumetanide on neurological dysfunction in a mouse model of Angelman syndrome.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 51st Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1 . 発表者名 Sinha AS, Wang T, Watanabe M, Sohara E, Akita T, Uchida S, Fukuda A.
2 . 発表標題 WNK3 kinase maintains neuronal excitability by regulating trafficking of KCC2 and inward rectifying K ⁺ channels in layer V pyramidal neurons of mouse medial prefrontal cortex.
3 . 学会等名 Society for Neuroscience 51st Annual Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Nguyen DT, Ishibashi M, Watanabe M, Sinha AS, Yesmin R, Fukuda A.
2 . 発表標題 Loss of astrocytic Na-K-Cl cotransporter type 1 hastens seizures promoted by GABAergic excitation of neurons.
3 . 学会等名 第69回中部生理学会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Sinha AS, Wang T, Watanabe M, Sohara E, Akita T, Uchida S, Fukuda A.
2 . 発表標題 WNK3 kinase maintains neuronal excitability by regulating trafficking of KCC2 and inward rectifying K ⁺ channels in layer V pyramidal neurons.
3 . 学会等名 第69回中部生理学会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Watanabe M, Kahle KT, Fukuda A
2 . 発表標題 Regulated KCC2 phosphorylation is critical for dynamic GABA-mediated inhibition.
3 . 学会等名 第99回日本生理学会大会
4 . 発表年 2022年

1. 発表者名 渡部美穂、細井泰志、福田敦夫
2. 発表標題 タウリンの枯渇がマウス行動および発達期の体重に及ぼす影響
3. 学会等名 第8回国際タウリン研究会日本部会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡部美穂、Kahle KT、福田敦夫
2. 発表標題 リン酸化によるカリウム-クロライド共輸送体 (KCC2)の機能制御
3. 学会等名 第68回中部生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡部美穂、Kahle KT、福田敦夫
2. 発表標題 カリウム-クロライド共役担体(KCC2)のリン酸化による機能制御
3. 学会等名 第67回中部生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡部美穂、Kahle KT、福田敦夫
2. 発表標題 リン酸化によるカリウム-クロライド共輸送体(KCC2)の機能制御はGABAによる抑制性伝達形成に必須である
3. 学会等名 第47回日本脳科学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡部美穂、細井泰志、秋田天平、伊藤崇志、福田敦夫
2. 発表標題 神経細胞内タウリンによるリン酸化を介したGABAA受容体発現制御機構
3. 学会等名 第7回国際タウリン研究会日本部会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Watanabe M, Kahle KT, Fukuda A
2. 発表標題 Developmentally regulated KCC2 phosphorylation is critical for dynamic GABA-mediated inhibition
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会、第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Miho Watanabe, Atsuo Fukuda	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 13
3. 書名 Neuronal Chloride Transporters in Health and Disease. Chapter 11. Post-translational modification of neuronal chloride transporters	

〔産業財産権〕

〔その他〕

浜松医科大学神経生理学講座
<https://www.hama-med.ac.jp/education/fac-med/dept/neurophysiology/index.html>
 research map
<https://researchmap.jp/mihowatanabe>
 日本生理学会ホームページ サイエンストピックス
<http://physiology.jp/science-topic/30349/>

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
---------	---------