

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月11日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21680031

研究課題名（和文） アンドロゲン依存性気分障害と雄性性機能制御の分子・神経メカニズム
関連の解明研究課題名（英文） Brain-spinal cord neural circuits controlling androgen-dependent
mood disorder and male sexual function

研究代表者

坂本 浩隆 (SAKAMOTO HIROTAKA)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：20363971

研究成果の概要（和文）：男性ホルモン（アンドロゲン）に依存する気分障害及び雄性・性機能を制御する脳-脊髄内神経ネットワークの分子・動作メカニズムの解明を目的として多角的な解析を行い、多くの新知見を得ることができた。高次脳機能と雄性・性機能を制御する脳-脊髄神経ネットワークの分子・動作メカニズム連関をより深く理解することにより、今まさに新たな神経科学と生殖内分泌学とのトランスレーショナルな新規の研究領域が生まれつつある。

研究成果の概要（英文）： We recently reported a previously unknown peptidergic system within the lumbosacral spinal cord that uses gastrin-releasing peptide (GRP) to trigger erection and ejaculation in male rats. The identification of a male-specific neural system regulating sexual functions offers new avenues for potential therapeutic approaches to male reproductive dysfunction. Furthermore, this study demonstrated that the spinal GRP system appears to be a stress-vulnerable centre for male reproductive functions, which may provide new insight into a clinical target for the treatment of stress-related erectile dysfunction in men. More studies are needed at the molecular and behavioral levels to investigate the potential determinants of sexually dimorphic brain-spinal cord neural circuits and related clinical disorders in humans.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2010年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
総計	21,000,000	6,300,000	27,300,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：アンドロゲン、雄性性機能、気分障害、脊髄、脳-脊髄神経ネットワーク、神経解剖、ガストリン放出ペプチド、オキシトシン

1. 研究開始当初の背景

雄の性機能を司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。ラットの腰髄を局所破壊すると反射性勃起が消失することから、腰髄には雄性性機能に重要な中継核が存在することが知られているが、その分子・神経回路メカニズムについてはいまだ不明な点が多い。

一方、研究代表者はこれまでに神経ペプチド gastrin-releasing peptide (GRP) の発現が雌に比べ、雄の腰髄に有意に高いことを新規に見いだした。さらに、この腰髄 GRP 系は脊髄内に複雑な神経回路を構築し、勃起、射精等の雄の性機能を調節していることを明らかにした。

2. 研究の目的

雄の性機能を制御する脊髄神経回路が同定されたので、今後はこの脊髄GRP系と脳との相互作用・機能連関を解析していく必要がある。そこで本研究では、この脊髄GRP系から脳への求心性および遠心性投射経路を解明することを目標とする。雄の性機能を司る脳-脊髄ネットワークループの全貌を明らかにすることにより、気分障害および性機能障害（勃起障害など）の原因究明・治療法開発に新規のアプローチ法を提案できる可能性が高い。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、重度の気分障害を伴う心的外傷後ストレス障害 (PTSD) における心因性勃起障害 (ED) の中枢性病態生理を明らかにする目的で、PTSD モデルラットとして学際的に認められている短期持続ストレス

(single-prolonged stress; SPS) を用いて脊髄 GRP 系について解析を行った。

(2) ラット球海綿体筋を支配する球海綿体脊髄核 (SNB) は、腰髄 (L5-L6 レベル) に存

在し、雄優位の性的二型核を示す運動ニューロン群であり、雄の性行動に重要な役割を果たす。また、血中アンドロゲン濃度の減少が SNB ニューロンの樹状突起を萎縮させること、また、その樹状突起上のシナプス密度をも減少させることが報告されているが、これらのシナプス入力 of 神経化学的特性の同定は未だなされていなかった。また、脊髄 GRP 系もアンドロゲンの影響を強く受けており、SNB ニューロンの樹状突起やシナプス入力変化との関連が示唆される。しかしながら、脊髄 GRP 系から SNB ニューロンへの直接的なシナプス入力についての報告はまだない。本研究では、GRP 免疫組織化学法と SNB ニューロンの逆行性標識法とを組み合わせることにより、超微形態学的に SNB ニューロンの樹状突起上に GRP 作動性のシナプス入力が存在するかを、超高压電子顕微鏡を用いて解析した。

(3) 脊髄 GRP ニューロンにおけるオキシトシン受容体 (OXTR) の発現を解析した。今回、OXTR を発現している細胞を可視化するため、OXTR-Venus (緑色蛍光タンパク質の一種) ノックイン (KI) マウス (東北大学・西森克彦教授より供与) を用いた。現在、OXTR に対する有用な抗体は存在せず、OXTR に対する免疫組織化学的解析は極めて困難であるが、この OXTR-Venus KI マウスでは OXTR を発現する細胞に緑色蛍光 (Venus) が発現するため、簡便かつ安定的に OXTR を発現する細胞を同定することができる。この OXTR-Venus KI マウスを用いて、脊髄 GRP ニューロンにおける Venus 共発現率を解析した。

(4) シナプス通過型神経トレーサーである弱毒性狂犬病ウイルス (PRV) を用い、球海綿体筋から脊髄 GRP ニューロン群へのシナプスを介した直接的投射を解析した。球海綿体筋への PRV 感染から 2 日後、雄ラットを灌流固定し、脊髄の連続凍結切片を用いて

PRV/GRP に対する二重免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) SPS 暴露は、腰髄におけるこの GRP の発現を減少させた。さらに、SPS 負荷ラットへの GRP アゴニスト投与は、減弱した勃起能を濃度依存的に回復させた。一方、SPS 負荷後の血中テストステロン濃度はコントロール群と比べて有意な差はみられなかったが、腰髄 (L3-L4 レベル) におけるアンドロゲン受容体の発現量が SPS 負荷群で有意に減少していた。我々は、腰髄の GRP ニューロンがアンドロゲン受容体を豊富に発現していることを報告しており、過剰なストレス負荷による腰髄のアンドロゲン受容体発現の減少が、GRP 発現の減少を引き起こすものと考えられた。

(2) コレラトキシンβサブユニットにより逆行性標識された SNB ニューロンをテトラメチルベンジジン法で、また、GRP 免疫組織化学法を従来のジアミノベンジジン法で、それぞれを可視化し、超高圧電子顕微鏡下で2者を区別することに成功した。その結果、SNB ニューロンの樹状突起上に GRP を含む多くのシナプスが存在していることが明らかになった。球海綿体筋の収縮は勃起や射精に深く関与しており、SNB への求心性 GRP シナプス入力を介して性行動を制御している可能性が高い。

(3) GRP ニューロン細胞体では OXTR が極めて高い確率で発現していることが明らかとなり、OXT 線維が間脳視床下部の PVN 領域から腰髄領域にまで投射し、GRP ニューロン系を遠心性に制御することにより雄の性機能を制御することが示唆された。

(4) ほぼ半数の GRP ニューロンが PRV 陽性を示し、SNB・GRP ニューロン間の直接的なシナプスを介した神経ネットワークの存在が確

認された。球海綿体筋の収縮は勃起や射精に深く関与しており、SNB への求心性 GRP シナプス入力を介して雄性・性行動を制御していることが示唆された。

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20件)

- ① H. Sakamoto: Brain-spinal cord neural circuits controlling male sexual function and behavior. *Neuroscience Research* 72, 103-116 (2012) 査読有.
- ② H. Sakamoto, H. Takahashi, K. -I. Matsuda, M. Nishi, K. Takanami, M. Ogoshi, T. Sakamoto, M. Kawata: Rapid signaling of steroid hormones in the vertebrate nervous system. *Frontiers in Bioscience* 17, 996-1019 (2012) 査読有.
- ③ H. Sakamoto, M. Kawata: Ultrahigh voltage electron microscopy links neuroanatomy and neuroscience/neuroendocrinology. *Anatomy Research International* Article ID: 948704, 5 pages (2012) 査読有.
- ④ A. Yoshida, T. Morihara, K. -I. Matsuda, H. Sakamoto, (他4名、4番目): Immunohistochemical analysis of effects of estrogen on intraarticular neurogenic inflammation in a rat anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis. *Connective Tissue Research* 53, 197-206 (2012) 査読有.
- ⑤ K. Tsutsui, K. Ukena, H. Sakamoto, S. -I. Okuyama, S. Haraguchi: Biosynthesis, mode of action and functional significance of neurosteroids in the Purkinje cell. *Frontiers in Endocrinology* 2, article 61: 1-9

- (2011) 査読有.
- ⑥ **H. Sakamoto**: Gastrin-releasing peptide system in the spinal cord mediates masculine sexual function. *Anatomical Science International* 86, 19-29 (2011) 査読有.
- ⑦ T. Sakamoto *et al.*, (他7名、最後): Corticosteroids stimulate the amphibious behavior in mudskipper: Potential role of mineralocorticoid receptors in teleost fish. *Physiology & Behavior* 104, 923-928 (2011) 査読有.
- ⑧ **H. Sakamoto**: The neurobiology of psychogenic erectile dysfunction in the spinal cord. *Journal of Andrology* 31, 519-526 (2010) 査読有.
- ⑨ **H. Sakamoto**, T. Aarii, M. Kawata: High-voltage electron microscopy reveals direct synaptic inputs from a spinal gastrin-releasing peptide system to neurons of the spinal nucleus of bulbocavernosus. *Endocrinology* 151, 417-421 (2010) 査読有.
- ⑩ K. Takanami, **H. Sakamoto**, K. -I. Matsuda, K. Hosokawa, M. Nishi, E.R. Prossnitz, M. Kawata: Expression of G protein-coupled receptor 30 in the spinal somatosensory system. *Brain Research* 1310, 17-28 (2010) 査読有.
- ⑪ M. Todoroki, Y. Ueta, H. Fujihara, H. Otsubo, M. Shibata, H. Hashimoto, M. Kobayashi, **H. Sakamoto**, M. Kawata, G. Dayanithi, D. Murphy, H. Hiro, K. Takahashi, S. Nagata: Induction of the arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion trans-gene in the rat locus coeruleus. *Stress* 13, 281-291 (2010) 査読有.
- ⑫ T. Masuda, Y. Hirabara, Y. Nakamura, A. Chisyaki, M. Tsuruhisa, M. Miyakawa, K. Honda, R. Saito, **H. Sakamoto**, M. Kawata, Y. Takano: Aldosterone-sensitive NTS neurons regulate sensitivity of the baroreceptor reflex in high-sodium loaded rats. *Journal of Pharmacological Sciences* 112, 482-486 (2010) 査読有.
- ⑬ **坂本 浩隆**, 河田光博: 性機能と gastrin-releasing peptide (GRP) ニューロンシステム -EDの中枢性病態生理解明に向けて -. *自律神経* 47, 82-85 (2010) 査読有.
- ⑭ **坂本 浩隆**: 超高压電子顕微鏡を用いた 脊髓gastrin-releasing peptide (GRP) 系から球海綿体脊髓核ニューロンへのシナプス入力の可視化. *比較内分泌学* 36, 146-148 (2010) 査読有.
- ⑮ **H. Sakamoto**, K. Takanami, D.G. Zuloaga, K. -I. Matsuda, C.L. Jordan, S.M. Breedlove, M. Kawata: Androgen regulates the sexually dimorphic gastrin-releasing peptide system in the lumbar spinal cord that mediates male sexual function. *Endocrinology* 150, 3672-3679 (2009) 査読有.
- ⑯ **H. Sakamoto**, K. -I. Matsuda, D.G. Zuloaga, N. Nishiura, K. Takanami, C.L. Jordan, S.M. Breedlove, M. Kawata: Stress affects a gastrin-releasing peptide system in the spinal cord that mediates sexual function: Implications for psychogenic erectile dysfunction. *PLoS ONE* 4, e4276 (2009) 査読有.
- ⑰ **H. Sakamoto**, M. Kawata: Gastrin-releasing peptide system in the spinal cord controls the male sexual behaviour. *Journal of Neuroendocrinology* 21, 432-435 (2009) 査読有.
- ⑱ K. Sawamura, T. Ikeda, M. Nagae, S.

Okamoto, Y. Mikami, H. Hase, K. Ikoma, T. Yamada, H. Sakamoto, K.-I. Matsuda, Y. Tabata, M. Kawata, T. Kubo: Characterization of *in vivo* effects of platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres on degenerated intervertebral discs. *Tissue Engineering* 15, 3719-27 (2009) 査読有.

- ⑱ A. Yoshida, T. Morihara, K.-I. Matsuda, H. Sakamoto, Y. Kajikawa, M. Y. Arai, Y. Oshima, M. Kawata, T. Kubo: *In vivo* effects of ovarian steroid hormones on the expressions of estrogen receptors and the composition of extracellular matrix in the anterior cruciate ligament in rats. *Connective Tissue Research* 50, 121-131 (2009) 査読有.
- ⑳ 坂本 浩隆: 新規に見出した雄の性機能を脊髄レベルで制御する gastrin-releasing peptide (GRP)ニューロンシステム. *比較内分泌学* 35, 274-279 (2009) 査読有.

[学会発表] (計20件)

- ① 坂本 浩隆, 越智 拓海, Andrew Dobberfuhr, Lesley Marson: 弱毒化狂犬病ウイルストレーサーを用いた球海綿体筋から脊髄 gastrin-releasing peptide ニューロンへの投射解析. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会 於: 山梨県 甲府市 (2012) .
- ② 坂本 浩隆: 神経系と内分泌系とをつなぐ神経内分泌系: 性機能を司る脳-脊髄神経ネットワークの包括研究. 第38回日本神経内分泌学会・学術集会 シンポジウム: “かたち”と“もの”からアプローチする神経内分泌研究 【招待講演】 於: 東京都 千代田区 (2011) .
- ③ 越智 拓海, 佐藤 慧太, 佐藤 佳亮, 西

森 克彦, 坂本 竜哉, 松田 賢一, 河田 光博, 坂本 浩隆: オキシトシンニューロンの脊髄 gastrin-releasing peptide ニューロン系への遠心性投射の解析. 第38回日本神経内分泌学会・学術集会 於: 東京都 千代田区 (2011) .

④ 関口翔子, 坂本 竜哉, 坂本 浩隆: 扁形動物ヒラムシにおける脳下垂体神経葉ホルモン様ペプチドを同定する試み. 第36回日本比較内分泌学会大会 於: 東京都 千代田区 (2011) .

⑤ 秋山 美穂, 高橋 英也, 荻野 由紀子, 宮川 信一, 御輿 真穂, 井口 泰泉, 坂本 竜哉, 坂本 浩隆: メダカ脳におけるアンドロゲン受容体の発現と局在. 日本動物学会第82回大会 於: 北海道 旭川市 (2011) .

⑥ 坂本 浩隆, 有井達夫, 河田 光博: 超高压電子顕微鏡による脊髄 gastrin-releasing peptide システムから球海綿体脊髄核への求心性入力の可視化. 第37回日本神経内分泌学会・学術集会 於: 京都府 左京区 (2010)

⑦ 坂本 浩隆: 雄の性機能を制御する脊髄内神経回路. 第13回日本行動神経内分泌研究会 シンポジウム【招待講演】 於: 茨城県 古河市 (2010) .

⑧ 坂本 浩隆: 雄の性機能を脊髄レベルで制御する神経ホルモン. 日本動物学会第81回大会 シンポジウム: 哺乳動物の脳神経系およびホルモン研究に関する最近の話題 【招待講演】 於: 東京 目黒区 (2010) .

⑨ H. Sakamoto, K.-I. Matsuda, D.G. Zuloaga, H. Hongu, E. Wada, K. Wada, C.L. Jordan, S.M. Breedlove & M. Kawata: The gastrin-releasing peptide system in the lumbar spinal cord is sexually dimorphic and controls male reproductive functions in rats. 第7回国際神経内分泌学会・学術集会 於: 仏国、ルーアン (2010) .

⑩ 松田 賢一, 森 浩子, 高浪 景子, 坂本 浩隆, 河田 光博: シンポジウム: 神経系に

おけるエストロゲン受容体の組織化学-核受容体・膜受容体. 第51回日本組織細胞化学会 於: 東京 台東区 (2010).

⑪ **坂本 浩隆**: 新規に見出された雄の性機能を脊髄レベルで制御する gastrin-releasing peptide (GRP) システム. 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会 平成21年度 日本解剖学会奨励賞受賞者講演【招待講演】 於: 岩手県 盛岡市 (2010).

⑫ **坂本 浩隆**, 有井 達夫, 河田 光博: 超高压電子顕微鏡を用いた脊髄ガストリン放出ペプチド系から球海綿体脊髄核ニューロンへのシナプス入力の可視化. 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会 於: 岩手県 盛岡市 (2010).

⑬ **坂本 浩隆**: 医学生物分野における超高压電子顕微鏡の応用: 免疫組織化学染色法と逆行性標識法の適用例. 生理学研究所研究会「医学生物学用超高压電子顕微鏡 (H-1250M) の30年」【招待講演】 於: 愛知県 岡崎市 (2010).

⑭ **坂本 浩隆**: 新規に見出した雄の性機能を脊髄レベルで制御する gastrin-releasing peptide ニューロンシステム. 第340回岡山大学生物科学セミナー【招待講演】 於: 岡山県 岡山市 (2009).

⑮ **坂本 浩隆**: 性機能と gastrin-releasing peptide (GRP) ニューロンシステム. 第62回日本自律神経学会総会【招待講演】 於: 和歌山県 和歌山市 (2009).

⑯ **坂本 浩隆**, 河田 光博: 脊髄レベルで雄の性機能を制御する gastrin-releasing peptide (GRP) ニューロンシステム. 日本解剖学会第64回中国・四国学術集会 於: 高知県 南国市 (2009).

⑰ **H. Sakamoto**, T. Arii, M. Kawata: Direct synaptic inputs from a gastrin-releasing peptide system to

neurons of the spinal nucleus of bulbocavernosus revealed by the HVEM. 第50回日本組織細胞化学会 於: 滋賀県 大津市 (2009).

⑱ **坂本 浩隆**, 松田 賢一, 細川 康二, 西真弓, 河田 光博: ラット視床下部における膜結合型エストロゲン受容体 (GPR30) の発現と細胞内局在. 日本動物学会中国四国支部第61回大会 於: 高知県 高知市 (2009).

⑲ **H. Sakamoto**, K.-I. Matsuda, D.G. Zuloaga, H. Hongu, E. Wada, K. Wada, C.L. Jordan, S.M. Breedlove & M. Kawata: Sexually dimorphic gastrin-releasing peptide system in the lumbar spinal cord controls masculine reproductive functions in rats. 他共著演題1 第32回日本神経科学大会 於: 愛知県 名古屋市 (2009).

⑳ **坂本 浩隆**, 河田 光博: 雄の性機能を制御するラット腰髄ガストリン放出ペプチド系におけるストレス応答: 心因性勃起障害治療への新たな展望. 第36回日本神経内分泌学会, VIII World Congress on Neurohypophysial Hormones 合同学術集会 於: 福岡県 北九州市 (2009).

[図書] (計1件)

① **H. Sakamoto**, S.M. Breedlove and M. Kawata: Neurobiology of PTSD effects on the spinal cord. In: *Neurobiology of Post-traumatic Stress Disorder*. Sher L. and Vilens A. (eds.) Nova Science Publishers, New York, Chapter VIII, pp 107-118 (2011).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 浩隆 (SAKAMOTO HIROTAKA)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号: 20363971